



HAL
open science

Protéines Amphitropiques : Diversité Conformationnelle et Versatilité des Interactions Protéines-Lipides. Cas d'étude de l' α -lactalbumine et de l'apo-myoglobine.

Grégory Vernier

► To cite this version:

Grégory Vernier. Protéines Amphitropiques : Diversité Conformationnelle et Versatilité des Interactions Protéines-Lipides. Cas d'étude de l' α -lactalbumine et de l'apo-myoglobine.. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT: . tel-00266489

HAL Id: tel-00266489

<https://theses.hal.science/tel-00266489>

Submitted on 23 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.

THESE

Présentée par

Grégory VERNIER

Pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Joseph-Fourier – Grenoble 1

Spécialité : Biologie Structurale et Nanobiologie

**Proteines Amphitropiques :
Diversité Conformationnelle et
Versatilité des Interactions Protéines-Lipides**

Cas d'étude de l' α -lactalbumine et de l'apo-myoglobine

Soutenue publiquement le 6 janvier 2006 devant :

Pr. Eva PEBAY-PEYROULA
Dr. Maité PATERNOSTRE
Dr. Bruno ANTONNY
Pr. James STURGIS
Dr. Daniel GILLET
Dr. Vincent FORGE

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

LABORATOIRE DE BIOPHYSIQUE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE UMR 5090

Département de Réponse et Dynamique Cellulaire
Commissariat à l'Energie Atomique-Grenoble

Proteines Amphitropiques : Diversité Conformationnelle et Versatilité des Interactions Protéines-Lipides

Cas d'étude de l' α -lactalbumine et de l'apo-myoglobine

Résumé :

Certaines protéines, appelées protéines amphitropiques, sont solubles en milieux aqueux et capables de se lier aux membranes pour leurs activités biologiques. Ces protéines apparaissent comme d'excellents modèles pour la compréhension des principes généraux de stabilité et de repliement des protéines membranaires intrinsèques. L' α -lactalbumine et l'apo-myoglobine ont été choisies comme modèles de protéines amphitropiques. Nous proposons une étude exhaustive des facteurs qui influencent la liaison aux membranes de ces deux protéines telles que le pH, la présence de cofacteurs, la force ionique, la charge et la courbure des membranes. Une description macroscopique des mécanismes de liaison a été entreprise par des expériences de centrifugation et de fluorescence. Enfin, la structure et la stabilité des états liés aux membranes ont été sondées par des expériences d'échanges hydrogène/deutérium (H/D).

L'état conformationnel de l' α -lactalbumine liée aux membranes s'est révélé très dépendant de la courbure membranaire. Nous avons identifié deux hélices amphiphiles qui sont directement impliquées dans les interactions α -lactalbumine-lipides. D'autre part, nos expériences d'échanges H/D permettent une description thermodynamique de la liaison à la membrane. Dans le cas de l'apo-myoglobine, nos résultats suggèrent un mécanisme commun d'insertion membranaire pour les protéines qui possèdent une topologie de type globine. Par ailleurs, la liaison de l'apo-myoglobine aux membranes ne semble pas nécessaire pour la fonction biologique de cette protéine. Une description des structures membranaires de l'apo-myoglobine a été entreprise par des expériences d'échanges H/D suivies par spectrométrie de masse.

Mots-clefs :

α -lactalbumine, apo-myoglobine, protéines amphitropiques, vésicules lipidiques, interactions protéines-lipides, échanges H/D.

Abstract :

Besides transmembrane proteins, some soluble proteins, the so-called amphitropic proteins, are driven to interact with membranes at one stage of their biological activity. Such proteins are excellent models to provide insight into the interactions between proteins and membranes. α -lactalbumin and apomyoglobin was chosen as model of amphitropic proteins. The effect of the proton and cofactor together with those of the physicochemical properties of the lipid bilayer, such as the curvature and the charge of the membrane, are investigated. We performed centrifugation and fluorescence measurements to follow the binding of proteins to membranes. We also present H/D exchange experiments performed to characterise the state of the proteins when bound to vesicles and their sites of interaction with the membranes.

Our results show that the conformational state of α -lactalbumin depends of membrane curvature. The regions anchoring the protein to the membrane are restricted to amphiphilic helices. H/D exchange experiments monitored by NMR also yield residue-level data that constitute comprehensive information providing a new point of view on the thermodynamics of the interactions between the protein and the membrane. In the case of apomyoglobin, our results suggest some inherent properties of the globin fold propitious to the interactions with lipid bilayers. In addition, the binding of apomyoglobin to membranes does not seem necessary for its biological activity. A molecular description of the membrane-binding states has been undertaken using H/D exchange experiments monitored by mass spectrometry.

Key words :

α -lactalbumin, apomyoglobin, amphitropic proteins, liposomes, proteins-lipids interactions, H/D exchange.

Table des matières

Préambule	1
Partie I :	
Introduction Générale	3
CHAPITRE 1 : STRUCTURE ET PROPRIETES DES BICOUCHES LIPIDIQUES	6
1.1 Les lipides membranaires	6
1.2 Les diacylphosphoglycérides	8
1.3 Autres lipides	10
1.4 De la membrane biologique aux systèmes modèles	11
1.4.1 Les vésicules lipidiques	11
1.5 Structure de la bicouche lipidique	13
1.6 Propriétés des membranes biologiques	15
1.6.1 Polymorphisme lipidique et formes des membranes	16
1.6.1.1 Phases des lipides dans l'eau	16
1.6.1.2 Modélisation des assemblages lipidiques : approche géométrique	18
1.6.2 Propriétés de fluidité et de diffusion dans les membranes	20
1.6.3 Les membranes biologiques dans le contexte cellulaire	23
CHAPITRE 2 : LES INTERACTIONS PROTEINES-LIPIDES	26
2.1 Structure des protéines membranaires	28
2.1.1 Organisation et topologies	28
2.1.1.1 Les protéines extrinsèques	29
2.1.1.2 Les protéines intrinsèques	29
2.1.2 Structure tridimensionnelle des protéines membranaires	30
2.2 Protéines membranaires transitoires : amphitropisme	34
2.2.1 Définition et rôles biologiques	34
2.2.2 Mécanisme de liaison aux membranes	34
2.3 Comment les lipides affectent l'activité et la structure des protéines	36
2.3.1 Influence des têtes polaires	37
2.3.2 Influence des propriétés physiques des membranes	38
2.3.2.1 L'épaisseur de la bicouche	38
2.3.2.2 Effets de la viscosité membranaire	39

2.3.2.3 Effets de la courbure membranaire	39
2.4 Description thermodynamique des interactions protéines-lipides	40
2.4.1 Partition des protéines dans les membranes	41
2.4.2 Repliement des protéines dans les membranes : aspects énergétiques .	42
2.4.2.1 Le couplage partition / repliement	43
2.4.2.2 Les interactions hélices-hélices.....	44
2.4.3 Partition ou liaison des protéines aux membranes ?	45

Partie II :

Liaison de l'α-lactalbumine aux membranes 48

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	49
1.1 Fonctions biologiques de l'α-lactalbumine	49
1.2 Structure de l' α -lactalbumine.....	50
1.3 Repliement de l' α -lactalbumine	52
1.3.1 L'état molten globule de l' α -lactalbumine à pH 2	53
1.4 Liaison de l' α -lactalbumine aux membranes	56
CHAPITRE 2 : BUT DU TRAVAIL	59
CHAPITRE 3 : RESULTATS	61
Article 1	64

Partie III :

Liaison de l'apo-myoglobine aux membranes 65

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	66
1.1 Fonction physiologique de la myoglobine	66
1.2 Structure de l'apo-myoglobine.....	67
1.3 Le repliement de l'apo-myoglobine	69
1.4 Interaction des globines avec les membranes	70
1.4.1 Insertion membranaire des colicines.....	71
1.4.2 Cas de la toxine diphtérique.....	72
CHAPITRE 2 : BUT DE L'ETUDE	76
CHAPITRE 3 : RESULTATS : Mécanisme de liaison de l'apo-myoglobine aux membranes	78
Article 2	83

CHAPITRE 4 : STRUCTURE DES ETATS LIES A LA MEMBRANE :	
Expériences d'échanges H/D suivies par spectrométrie de masse.....	84
4.1 Objectifs.....	84
4.2 Matériels et méthodes	85
4.2.1 Principe général de l'expérience	85
4.2.2 Deutération de la protéine	87
4.2.3 Incubation	87
4.2.4 Cinétique d'échange D/H globale et "quenching"	87
4.2.5 Analyse par spectrométrie de masse.....	88
4.2.5.1 Principe.....	88
4.2.5.2 Protocole	89
4.2.6 Digestion enzymatique et cartographie peptidique	90
4.2.6.1 Principe.....	90
4.2.6.2 Protocole	92
4.3 Résultats et discussion.....	92
4.3.1 Cinétique d'échange D/H global.....	94
4.3.2 Digestion enzymatique et cartographie peptidique	98
Partie IV :	
Conclusion Générale et Perspectives	103
Partie V :	
Annexes	108
Les échanges hydrogène/deutérium (H/D).....	109
Préparation des vésicules lipidiques	114
Partie VI :	
Références bibliographiques	119
Remerciements	132

Préambule

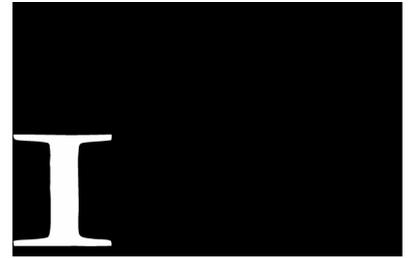
La structure native d'une protéine membranaire intrinsèque est stabilisée par un ensemble d'interactions protéines-lipides. La compréhension des mécanismes de repliement de ces protéines est un des problèmes majeurs de la biologie moléculaire. Cependant, les informations sur la structure et le repliement des protéines membranaires sont difficilement accessibles du fait de leur insolubilité dans les solvants aqueux. Certaines protéines, appelées protéines amphitropiques, sont solubles en milieu aqueux et capables de s'insérer dans les bicouches lipidiques. Elles sont présentes de manière ubiquitaire chez les organismes eucaryotes et procaryotes, et accomplissent des fonctions biologiques très diverses. Ce travail de thèse s'intéresse à la description des mécanismes d'insertion membranaire de protéines amphitropiques modèles. Ces protéines sont solubles et par conséquent plus facilement manipulables que les protéines membranaires. Ainsi, la compréhension des mécanismes d'insertion membranaire des protéines amphitropiques nous informe sur les principes généraux de stabilité et de repliement des protéines membranaires intrinsèques.

L'insertion membranaire des protéines amphitropiques est en général gouvernée par une variation des conditions physico-chimiques à proximité de la membrane (pH, force ionique, potentiel de membrane...). Ces changements de conditions induisent des transitions conformationnelles vers des états compétents pour se lier aux membranes. Les protéines amphitropiques les mieux connues s'intègrent dans les membranes *via* un ensemble d'hélices amphiphiles et hydrophobes. Nous nous sommes donc intéressés à la liaison sur des vésicules lipidiques de protéines amphitropiques modèles composées majoritairement d'hélices. Pour beaucoup de protéines amphitropiques, l'acidité du milieu est responsable de l'insertion dans les membranes. Les structures natives et les transitions conformationnelles induites par des variations de pH sont très bien connues pour l' α -lactalbumine et l'apomyoglobine. Pour ces raisons, ces deux protéines apparaissent comme des modèles de choix pour décrire la liaison aux membranes au niveau moléculaire des protéines amphitropiques structurées en hélices α .

Nous proposons une étude exhaustive des facteurs qui influencent la liaison aux membranes de ces deux protéines telles que le pH, la présence de cofacteurs, la force ionique, la charge et la courbure des membranes. Dans un premier temps, une description macroscopique des mécanismes de liaison a été entreprise par des expériences de centrifugation et de fluorescence. Enfin, la structure et la stabilité des états liés aux membranes ont été sondées par des expériences d'échanges

hydrogène/deutérium (H/D). C'est une méthode classique pour étudier la structure et la dynamique des protéines solubles mais qui reste novatrice dans le cas de protéines insérées dans les membranes.

Les cinétiques d'échanges H/D ont été suivies par résonance magnétique nucléaire (RMN) à l'échelle du résidu sur l'état de l' α -lactalbumine liée aux membranes. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr. Alexandre Chenal au Département d'Ingénierie et d'Etude des Protéines du CEA-Saclay. Dans le cas de l'apo-myoglobine, les cinétiques d'échanges isotopiques ont été suivies par spectrométrie de masse. Ces expériences ont été effectuées en collaboration avec le laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines dirigé par le Dr. Eric Forest à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble.



Introduction Générale

Ce travail de thèse s'intéresse aux aspects structuraux et énergétiques des interactions entre les protéines et les membranes. Dans ce contexte, il est utile de rappeler les fonctions principales des membranes biologiques.

Les membranes biologiques sont des éléments ubiquitaires indispensables à la survie de la cellule. Elles sont principalement impliquées dans la compartimentation cellulaire, le maintien des constantes des milieux internes, la communication avec l'environnement et la transduction d'énergie. La membrane plasmique et le réseau de membranes internes sont les deux types de membranes présentes dans une cellule eucaryote. La membrane plasmique définit l'espace cellulaire et sépare le cytosol de son environnement. Les organites sont compartimentés par un ensemble de membranes internes. Cependant, en contraste avec son rôle de barrière, la membrane est l'unique zone d'échange entre les deux milieux qu'elle sépare. C'est un filtre sélectif qui contrôle les flux de substances et régule finement la composition du milieu intracellulaire. Elle constitue aussi une interface de communication avec l'extérieur *via* des messagers chimiques ou électriques. Enfin la photosynthèse et la phosphorylation oxydative prennent respectivement place dans les membranes chlorophylliennes et mitochondriales.

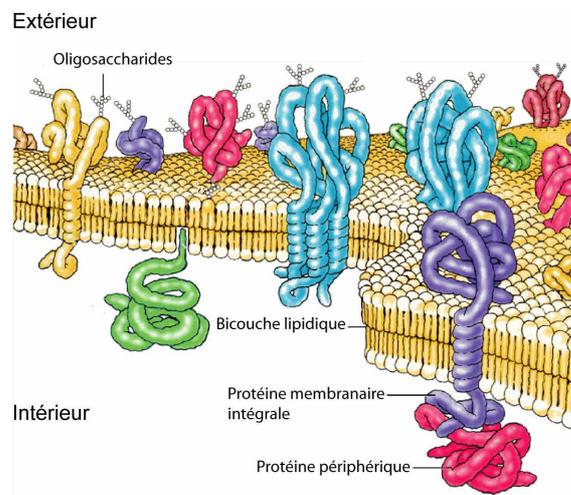


Fig. I.1 – Vue schématique d'une membrane plasmique eucaryote. Extrait de Cooper, GM., *The cell - A molecular approach*, 2000.

La membrane est également une zone d'intense activité biochimique : les collisions entre récepteur et ligand sont facilitées dans un espace à deux dimensions. Ainsi, une fraction importante de la machinerie enzymatique de la cellule est associée à ses différentes membranes.

Toutes les membranes biologiques partagent une structure globale commune : ce sont des assemblages lamellaires de molécules lipidiques et protéiques dont l'intégrité structurale est maintenue *via* des liaisons non covalentes. L'ensemble s'organise en une double couche de lipides dans laquelle sont insérées les protéines membranaires. Des structures oligosaccharidiques variées sont aussi retrouvées à la surface des membranes associées aux lipides ou aux protéines (Fig. I.1). Les protéines s'insèrent de manière intégrale (protéines transmembranaires), partielle (protéines périphériques) ou sont liées à la membrane *via* une ancre lipidique. Elles assurent toutes les fonctions de transport, de communication et de création d'énergie. En revanche, ce sont les lipides qui assurent la stabilité mécanique, et structurent spontanément la membrane en une bicouche de 5 à 10 nm d'épaisseur. L'ensemble est fluide et la plupart des éléments peuvent librement diffuser dans le plan de la membrane.

CHAPITRE 1

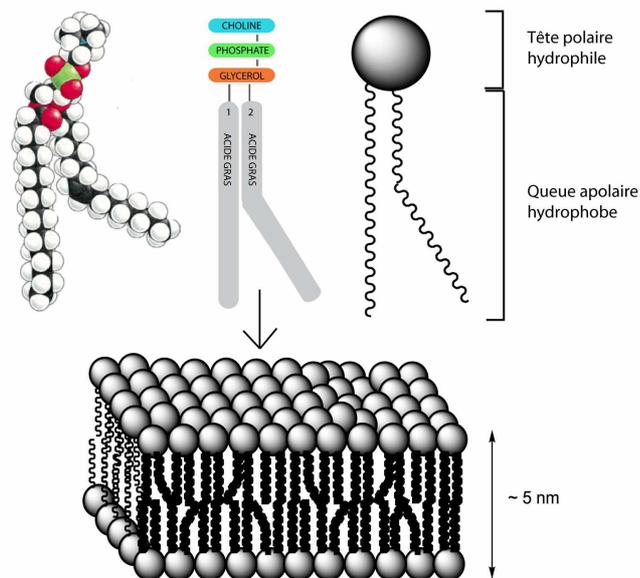
STRUCTURE ET PROPRIETES DES BICOUCHES LIPIDIQUES**1.1 Les lipides membranaires**

Fig. 1.2 – Structure amphiphile des lipides membranaires (exemple de la phosphatidylcholine) et organisation spontanée des lipides en double bicouche.

Dans sa définition la plus large, un lipide (du grecque *lipos* : gras) se définit comme un composé de poids moléculaire faible ou intermédiaire (<5000 Da) avec une proportion importante de chaînes hydrocarbonées dans sa structure. Les lipides sont les briques fondamentales des membranes biologiques. Une section membranaire de $1 \mu\text{m}^2$ contient approximativement 5×10^6 molécules de lipides. Ce sont des molécules amphiphiles, c'est à dire qu'elles possèdent une extrémité apolaire hydrophobe et une extrémité polaire hydrophile situées dans deux régions

distinctes de l'espace (Fig. I.2). La partie apolaire est composée de chaînes acyles d'acides gras de 2 à 3 nm possédant de 0 à 6 insaturations. La tête hydrophile varie largement par sa nature et présente une surface moyenne de 50 \AA^2 .

En milieu aqueux, les lipides s'organisent afin de limiter les contacts entre le solvant et la partie apolaire. Les parties apolaires tendent alors à se rapprocher dans l'espace et créent de nombreuses interactions de Van der Waals de manière à exclure toute molécule polaire. Cet effet hydrophobe, limitant la perte d'entropie, conduit les lipides membranaires à s'auto-organiser en bicouche où les parties hydrophobes ne sont pas accessibles à l'eau (Fig. I.2). L'ensemble se referme sur lui-même de manière à former un compartiment aqueux isolé. Le caractère hydrophobe de la barrière lipidique la rend très imperméable aux molécules polaires ; par ailleurs, la perméabilité diminue avec la masse moléculaire des solutés. Elle est de l'ordre de 10^{-10} et $10^{-14} \text{ m.s}^{-1}$ respectivement pour le glucose et l'ion potassique.

	<i>membrane plasmique des erythrocytes</i>	<i>Myéline</i>	<i>Mitochondrie</i>	<i>Microsome</i>
Phospholipides :				
PC	23	11	48	40
PE	20	14	28	17
PI	2	0	8	11
PS	11	7	0	0
PG	0	0	1	2
DPG	0	0	11	0
Totaux	56	32	95	70
Sphingolipides	18	32	0	5
Stérols	25	25	5	6
Autres	11	1	0	19

PC, PE, PI, PS, PG, DPG : phosphatidylcholine, éthanolamine, inositol, sérine, diphosphatidylglycérol

Tableau I.1 – Composition lipidique approximative de différentes membranes biologiques. Les proportions de lipides sont données en pourcentage des lipides totaux en poids. Extrait de Shechter E., Biochimie et biophysique des membranes, Masson, 1997.

De nombreuses classes de lipides sont présentes dans les membranes de cellules eucaryotes : les phospholipides, les glycolipides, les sphingolipides, les stérols et leurs dérivés. Le tableau I.1 montre les variations de composition lipidique entre

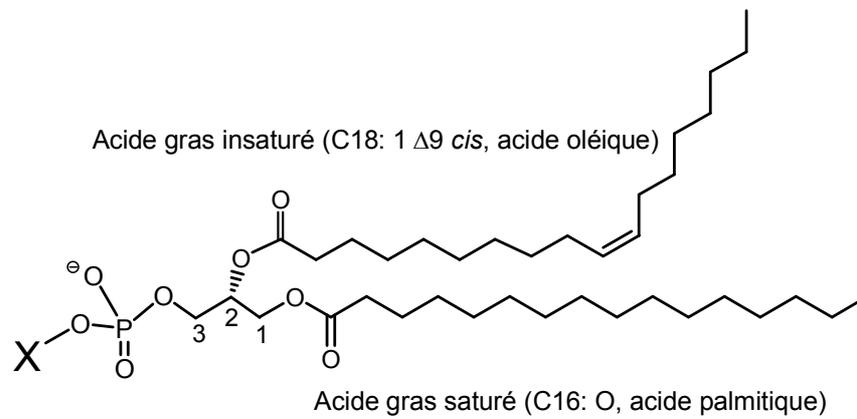
différentes membranes. Chaque type de cellule et de membrane ont leur propre composition lipidique [van Meer, 1998] qui peut également changer au cours du développement cellulaire [Simons & Ikonen, 2000]. Ces variations indiquent que les cellules régulent et adaptent leurs compositions lipidiques aux besoins de l'activité membranaire. Cependant, les phospholipides forment la classe la plus abondante des lipides des cellules animales.

1.2 Les diacylphosphoglycérides

Les diacylphosphoglycérides ou phospholipides résultent de l'estérification en position 1 et 2 du glycérol par 2 chaînes d'acides gras. La position 3 est estérifiée par un acide phosphorique. La nature du substituant fixé sur l'acide phosphorique définit la nature du phospholipide. Les principaux sont représentés dans la figure I.3.

La nature des acides gras est extrêmement variée, environ un millier d'acides gras a été caractérisé. Pour les plus communs, la partie apolaire varie de 12 à 24 atomes de carbones. La chaîne hydrocarbonée sur la position 2 du glycérol contient en général une à six insaturations le plus souvent en configuration *cis*. Ces dernières ont un effet important sur la fluidité membranaire en ajoutant du désordre dans le cœur hydrophobe. Les acides gras les plus classiques, acide palmitique et acide oléique, sont représentés dans la figure I.3.

Le substituant et le groupe phosphoryle constituent la tête polaire du phospholipide (Fig. I.2). Le pKa du groupement phosphoryle dans un phospholipide est compris entre 1 et 2, et porte une charge négative à pH neutre. La charge globale est alors déterminée par la nature du substituant : les phospholipides seront zwitterioniques ou chargés négativement. Les systèmes lipidiques modèles utilisés dans ce travail sont composés uniquement des phospholipides qui permettent de faire varier la taille et la charge des têtes polaires.



Nom du phospholipide	Formule chimique de X	Charge net à pH 7
Acide phosphatidique	—H	-1
Posphatidyléthanolamine	—CH ₂ —CH ₂ —NH ₃ [⊕]	0
Phosphatidylcholine	—CH ₂ —CH ₂ —N [⊕] (CH ₃) ₃	0
Phosphatidylsérine	—CH ₂ —CH(NH ₃ [⊕])COO [⊖]	-1
Phosphatidylglycérol	—CH ₂ —CH(OH)—CH ₂ —OH	-1
Posphatidylinositol		-1
Cardiolipine	—CH ₂ —CH(OH)—CH ₂ —O—P(=O)(O [⊖])—O—CH ₂ —CH(R)—O—CH ₂ —R'	-2

Fig. I.3 – Structure des principaux phospholipides des membranes biologiques. Les carbones de la chaîne principale du glycérol sont notés de 1 à 3.

1.3 Autres lipides

Bien qu'un nombre limité de phospholipides soit largement majoritaire, beaucoup d'autres lipides sont présents dans les membranes animales. Nous ne ferons que les citer.

Les sphingolipides sont dérivés de la sphingosine qui est un amino-glycol éthylénique. On retrouve dans cette famille des phospholipides comme les céramides ou les sphingomyélines (Fig. I.4A), éléments essentiels de la conduction du potentiel d'action dans le tissu nerveux.

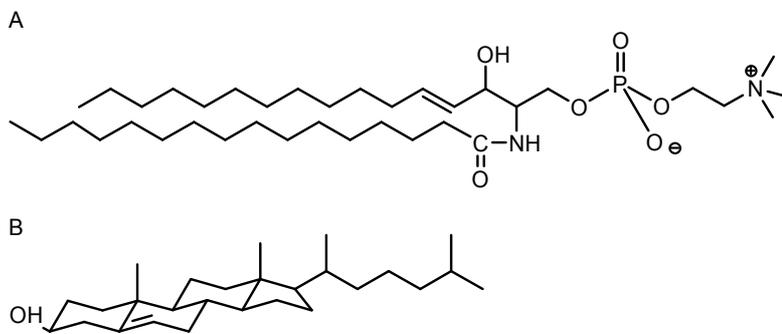


Fig. I.4 – Structure d'une sphingomyéline (A) et du cholestérol (B).

Les sphingoglycolipides sont des sphingolipides avec un glycosile substitué au groupement phosphate. Ils constituent une grande famille dont les membres se différencient par la longueur et la composition de leurs chaînes oligosaccharidiques. De la même manière, les glycolipides sont des diacylphosphoglycérolipides avec un groupement phosphate substitué par des sucres.

Les stérols sont des molécules cycliques, planes et très hydrophobes. Ils sont retrouvés chez les eucaryotes et les procaryotes. Le cholestérol est le stérol membranaire le plus représenté dans les cellules animales (Fig. I.4B). Sa seule partie polaire est son groupement hydroxyle. Il représente en moyenne 30% des lipides de la membrane plasmique et joue un rôle important dans le maintien d'une fluidité membranaire constante malgré les variations de température [*Behan-Martin et al.*, 1993]. Pour cet effet, il est largement utilisé et étudié dans les systèmes lipidiques modèles en complément des phospholipides classiquement utilisés.

La diversité de nature et de répartition des lipides, ainsi que leurs recyclages rapides dans la membrane [Hao & Maxfield, 2000], constituent des obstacles majeurs à l'étude des interactions protéines-lipides. Les systèmes modèles de membranes permettent de simplifier l'étude des bicouches lipidiques seules ou en interaction avec un partenaire protéique.

1.4 De la membrane biologique aux systèmes modèles

Les membranes artificielles sont des bicouches lipidiques le plus souvent composées de phospholipides. Elles ont fourni de précieux renseignements sur leurs comportements et leurs caractéristiques physico-chimiques. Elles sont aussi largement utilisées pour étudier les interactions protéine-membrane ou l'activité de transporteurs protéiques. Les deux principaux modèles classiquement utilisés sont les bicouches planes de lipides et les vésicules.

Les bicouches lipidiques planes sur support permettent d'étudier la structure et l'orientation des protéines insérées dans la bicouche. Elles sont utilisées pour des expériences de résonance plasmonique de surface [Alves *et al.*, 2005], de spectroscopie infrarouge par réflexion totale atténuée [Goormaghtigh *et al.*, 1999], de résonance magnétique nucléaire du solide [Watts *et al.*, 2004] ou encore pour les expériences de diffusion de rayons X ou de neutrons [Miller *et al.*, 2005].

Ce chapitre n'est pas un récapitulatif exhaustif des systèmes lipidiques modèles et nous nous attacherons à décrire seulement les vésicules lipidiques, modèle utilisé dans notre étude.

1.4.1 Les vésicules lipidiques

Les vésicules lipidiques sont les modèles de bicouches les plus utilisés pour étudier les interactions protéines-membranes. De nombreuses méthodes biochimiques et spectroscopiques permettent de sonder les mécanismes d'insertion membranaire et la structure des protéines liées aux membranes. De plus, la synthèse de vésicules est indispensable pour étudier des protéines membranaires isolées et reconstituées dans des protéoliposomes. Cette approche a été appliquée avec succès pour détailler le mécanisme d'action d'enzymes impliquées dans les transferts d'énergie [Rigaud *et al.*, 1995] telles que la bactériorhodopsine, l'ATP synthétase [Richard & Graber, 1992] et la pompe calcium hydrolysant de l'ATP pour transporter le Ca^{2+} [Levy *et al.*, 1992].

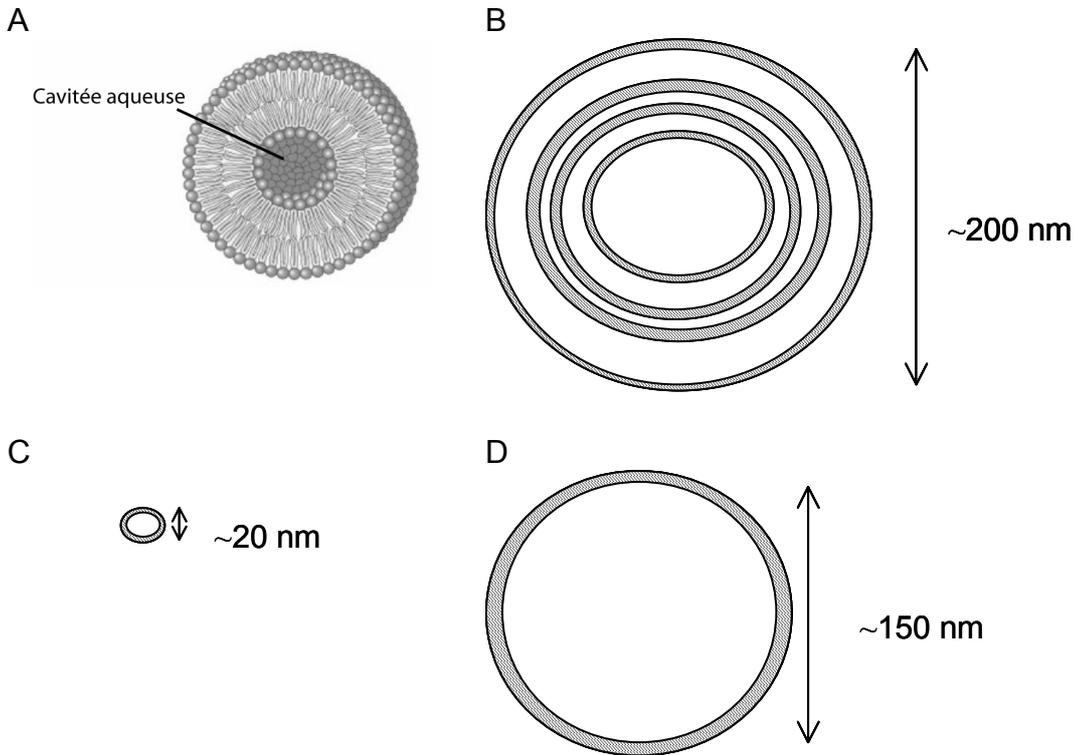


Fig. I.5 – Comparaison à l'échelle des différentes vésicules. (A) Structure schématique de la double couche lipidique au sein d'une vésicule. Schémas d'un MLV (B) ; SUV (C) et LUV (D).

La méthode la plus simple de préparation des vésicules consiste à évaporer des lipides en solution dans un solvant organique et les remettre lentement en suspension dans une phase aqueuse par simple agitation. Les lipides s'organisent alors en vésicules multilamellaires (MLV, Multi Lamellar Vesicles) qui sont des bicouches concentriques de taille très hétérogène (Fig. I.5B). Leur taille moyenne élevée, d'environ 200 nm, et l'hétérogénéité de la solution obtenue en font des mauvais candidats pour les études biophysiques. En effet, les MLV diffusent fortement la lumière et rendent difficile les études en spectroscopie optique. De plus les différences de taille entre les préparations influent sur la reproductibilité des résultats. Pour ces raisons les vésicules unilamellaires sont plus largement utilisées.

Les vésicules unilamellaires de petite taille (SUV, Small Unilamellar Vesicles) sont obtenues par un traitement physique des vésicules multilamellaires (ultrasons, pressions élevées). Les vésicules ont un diamètre de l'ordre de 15 à 25 nm, et sont constituées d'une seule bicouche lipidique contenant un faible volume interne de solvant (Fig. I.5C). La forte courbure imposée à la membrane implique une surface

externe significativement supérieure à la surface de la monocouche interne et donc un nombre de lipides supérieur dans cette monocouche. La petite taille des SUVs leur permet d'être facilement utilisables en spectroscopie optique.

Les vésicules unilamellaires de plus grande taille (LUVs, Large Unilamellar Vesicles) sont aussi largement utilisées pour étudier les interactions protéines-membranes. La technique la plus simple de préparation de ces vésicules est celle que nous avons utilisée : l'évaporation par inversion de phase [Rigaud *et al.*, 1983]. Elle consiste à forcer l'émulsion par sonication entre une phase éther, solvant des lipides, et une phase aqueuse. L'éther est ensuite éliminé lentement par évaporation sous vide partiel, les lipides se réorganisent de manière à favoriser les interactions entre les chaînes hydrocarbonées et l'éther, dont le volume diminue. La structure prend une allure de gel qui se liquéfie par élimination totale de l'éther. A ce stade, des LUVs, dont le diamètre varie de 0.2 μm à 1 μm sont formés (Fig. I.5D). Des filtrations consécutives à travers des pores de 0.2 μm de diamètre sélectionnent une population homogène de LUVs centrée sur 150 nm. La courbure d'une vésicule de grande taille est plus proche de la réalité physiologique ; ce sont cependant des objets beaucoup plus diffusants que les SUVs. La taille et la monodispersité des vésicules sont en général vérifiées par microscopie électronique ou diffusion quasi-élastique de la lumière. Des vésicules de très grande taille (GUV, Giant Unilamellar Vesicles) de 10 à 100 μm de diamètre sont aussi utilisées pour décrypter certains mécanismes membranaires (diffusion des protéines membranaires, étude des radeaux lipidiques) à une échelle cellulaire.

Le choix du système modèle, et principalement la taille des vésicules joue un rôle déterminant pour l'étude des interactions protéines-membranes. Nous détaillerons l'importance du rayon de courbure sur ces interactions dans le chapitre 2. Les modèles de bicouches lipidiques ont apporté de nombreuses informations sur ces assemblages supramoléculaires et notamment sur leurs structures ; connaissance préalable à la compréhension des propriétés fondamentales des membranes biologiques.

1.5 Structure de la bicouche lipidique

L'organisation en double couche des membranes biologiques a été proposée pour la première fois par *Gorter et Grendel* en 1925 : ils ont estimé que la surface recouverte par les lipides extraits de la membrane plasmique d'érythrocytes était le double de la surface cellulaire. Cette observation a été confortée par des clichés de microscopie électronique et des expériences de cryofracture où les deux couches sont mécaniquement scindées par le milieu.

Les premières structures de bicouches orientées et déshydratées ont été résolues dans les années 1970 par diffraction des rayons X à une résolution de 5 à 10 Å [Levine & Wilkins, 1971]. Cependant les bicouches lipidiques à l'état naturel existent dans un état fluide et désordonné rendant extrêmement difficile l'interprétation des clichés de diffraction. En effet, contrairement aux structures à haute résolution de protéines cristallisées, où chaque atome a une position relative fixe, la notion même de structure est difficilement applicable à un assemblage dynamique de lipides.

Wiener & White ont fourni une image moderne d'une bicouche lipidique fluide grâce à une méthode d'affinement joint de données de diffraction des rayons X et de neutrons [Wiener et al., 1991 ; Wiener & White, 1992]. Plutôt que de définir une position précise de chaque atome, les auteurs décrivent la membrane comme les distributions spatiales des différents groupements submoléculaires projetées sur la normale au plan membranaire. La probabilité de présence moyennée dans le temps de chaque groupement chimique est fonction de la distance transmembranaire.

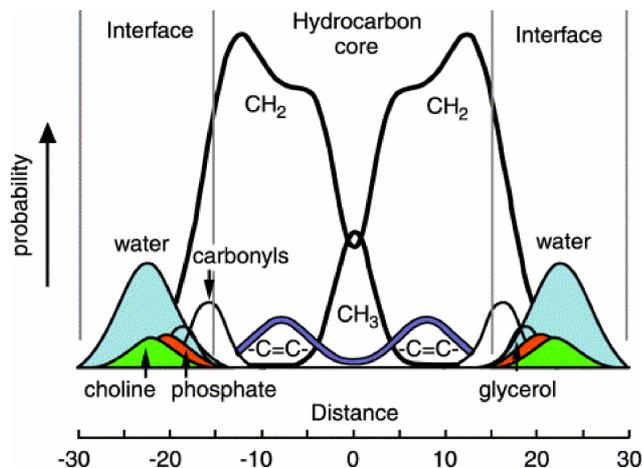


Fig. I.6 – Représentation d'une bicouche fluide de DOPC. L'aire des distributions Gaussiennes est proportionnelle au nombre de chaque groupement chimique. Extrait de [White & Wimley, 1999].

La figure I.6 montre la distribution des différents groupements chimiques présents dans une bicouche de dioleil-phosphatidylcholine (DOPC). L'interface membranaire est définie par les régions occupées par l'eau d'hydratation des têtes polaires tandis que le cœur hydrophobe de la bicouche est peuplé par les chaînes hydrocarbonées. Cette représentation met en lumière certaines caractéristiques fondamentales des membranes biologiques : (i) La largeur des distributions reflète

le désordre thermique au sein d'une membrane fluide ; (ii) L'épaisseur cumulée des deux interfaces (15 Å chacune) est égale à l'épaisseur de la zone hydrophobe, contrairement aux représentations classiques où la zone polaire apparaît plus étroite. Néanmoins, l'épaisseur de la membrane est fortement dépendante de la composition lipidique. Ainsi, l'épaisseur de l'interface sera définie par la taille de la tête hydrophile et son hydratation alors que l'épaisseur du centre hydrophobe dépendra uniquement de la longueur des chaînes hydrocarbonées.

La taille conséquente et l'hétérogénéité chimique des interfaces offrent de nombreuses possibilités d'interactions non covalentes avec les protéines. Une portion significative des protéines membranaires est en contact avec au moins une interface, celle-ci est par conséquent particulièrement importante pour le repliement et la stabilité des protéines membranaires. De plus, ce sont les premières zones d'interactions avec les protéines membranaires non constitutives telles que les protéines amphitropiques : l'interface joue un rôle évident pour l'insertion de ces protéines dans les membranes.

En dehors de son hétérogénéité chimique, l'interface est une région où a lieu une grande variation de polarité sur une courte distance. La constante diélectrique passe de 80 dans le milieu aqueux à environ 30 au niveau des têtes polaires et à 3 dans la région hydrophobe [Ashcroft *et al.*, 1981]. Ces valeurs révèlent de larges variations des caractéristiques électriques dans l'environnement de la membrane, reflet du gradient de polarité [White & Wimley, 1998].

La structure des bicouches lipidiques et la diversité des lipides membranaires donnent un aperçu de la complexité des membranes biologiques : à la fois barrière et solvant bidimensionnel où prennent place de nombreux processus biologiques fondamentaux.

1.6 Propriétés des membranes biologiques

La composition lipidique des membranes module un grand nombre de leurs constantes physiques : épaisseur, courbure, fluidité, élasticité, pression latérale et de surface, diffusion et polarité. Ces propriétés définissent leurs structures et influencent les interactions avec les protéines.

1.6.1 Polymorphisme lipidique et formes des membranes

Bien que les membranes biologiques soient organisées en bicouche plane, certains de leurs composants lipidiques peuvent former spontanément des assemblages non lamellaires. Ces structures intermédiaires sont observées transitoirement dans la cellule.

Du fait de leur caractère amphiphile, les lipides s'auto-associent de manière à établir le maximum d'interactions hydrophobes. Les structures formées dépendent alors de la teneur en eau (proportion du mélange lipide/eau), de la nature chimique des lipides, de la température, de la force ionique, du pH et de la présence de cations divalents.

1.6.1.1 Phases des lipides dans l'eau

Les travaux de *Luzzati et al.* ont permis de mettre en évidence les différentes structures adoptées par les lipides dans l'eau [*Luzzati et al.*, 1968]. On peut distinguer deux types de structures : (i) celles dites de type *I* ou "directes" (huile dans l'eau) où les agrégats de lipides se trouvent dans un milieu aqueux continu et (ii) celles de type *II* ou "inverses" (eau dans huile) dans lesquelles les têtes polaires hydratées sont organisées au sein d'une matrice non polaire continue constituée de chaînes aliphatiques.

Nous ne ferons pas de description détaillée des différentes phases adoptées par les lipides dans l'eau qui sont largement exposées dans la littérature [*Luzzati et al.*, 1968 ; *Lindblom & Rilfors*, 1989]. La figure I.7 présente les différents assemblages possibles pour un tensioactif tel que les lipides. De manière succincte, en présence d'un excès d'eau (structures de type *I*), une solution monocaténaire de lipide est obtenue. Lorsque la concentration en lipide augmente et passe au dessus de la concentration micellaire critique (cmc), les lipides s'auto-asocient sous formes de micelles sphériques (Fig. I.7a). La valeur de la cmc dépend de la nature chimique de chaque lipide et principalement de la balance hydrophile-liphophile du lipide (de l'ordre de 10^{-3} - 10^{-4} M pour la plupart des acides gras biologiques). Dans le cas des lipides monocaténaires, si la concentration augmente encore, les micelles s'allongent pour former une phase hexagonale (appelée H_I , Fig. I.7b). Dans cette phase, les lipides sont organisés en cylindre dont la surface est constituée par les têtes polaires, les chaînes aliphatiques se rassemblant au niveau du cœur hydrophobe. Les cylindres sont disposés suivant un réseau hexagonal (Fig. I.7b'). Enfin, au-delà d'une certaine concentration, les lipides monocaténaires s'organisent en phases lamellaires, c.à.d un empilement de bicouches séparées les unes des autres par le milieu aqueux (Fig. I.7c').

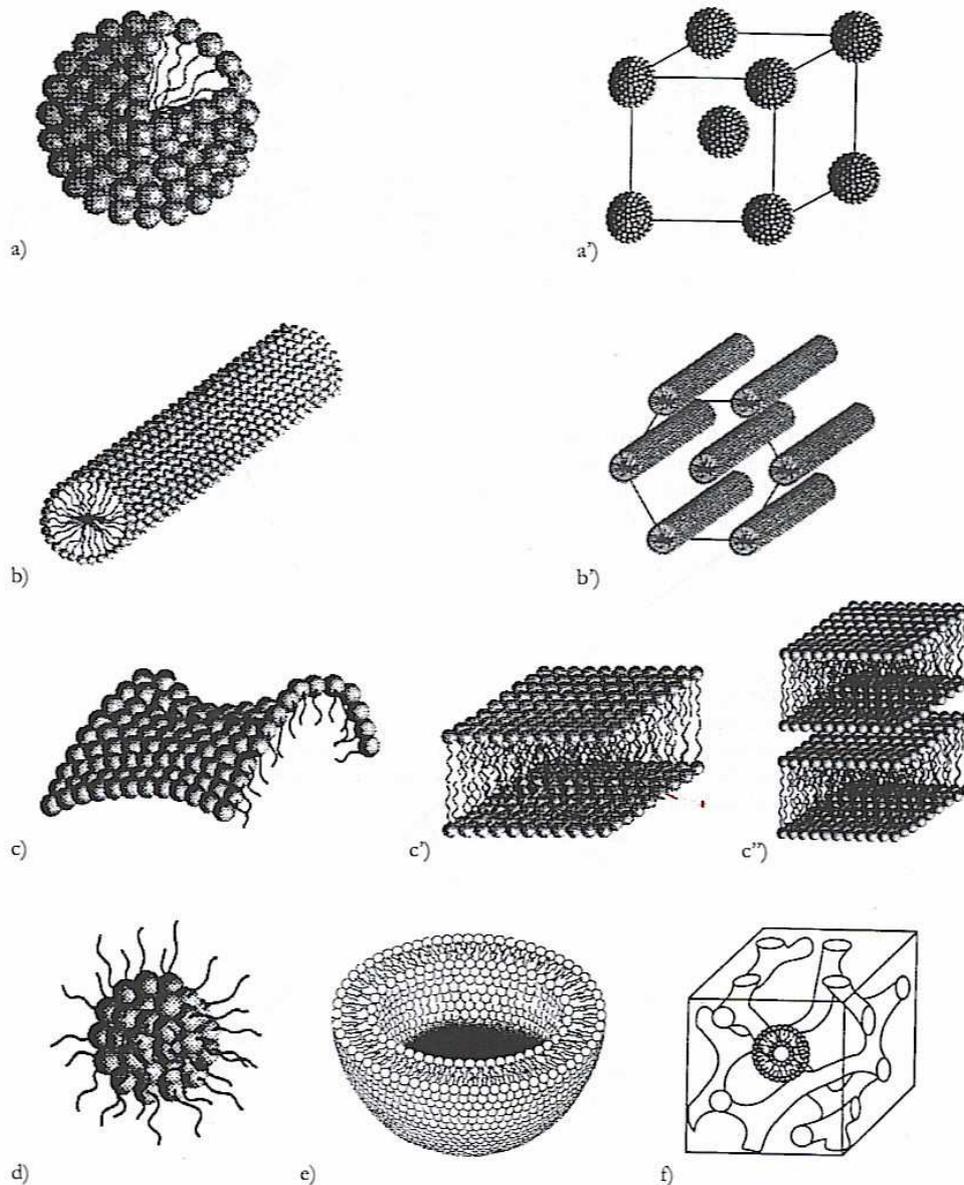


Fig. 1.7 – Structures organisées formées à partir de lipides : micelles sphériques (a), structure micellaire cubique (a'), micelle cylindrique (b), structure hexagonale (b'), monocouche (c), bicouche (c'), structure lamellaire (c''), micelle sphérique inverse (d) et vésicule (e). D'après [Paquot, 2001]

Pour les lipides bicaténaires, les phases lamellaires sont rapidement obtenues après la formation de micelles lorsque la concentration de lipides augmente. Dans ce cas, la température (et non la teneur en eau) devient la variable d'état prédominante (cf. section 1.6.2, page 20).

Les structures de type *II* apparaissent pour des concentrations élevées de lipides pour former principalement des phases hexagonales inversées appelées H_{II} . Cette phase hexagonale est, comme la phase H_I , constituée de cylindres disposés suivant un hexagone, mais dans ce cas, les têtes polaires sont dirigées vers l'intérieur du cylindre et entourent le cœur aqueux.

1.6.1.2 Modélisation des assemblages lipidiques : approche géométrique

La structure des assemblages lipidiques peut être décrite de manière simplifiée par le concept de forme. En effet la structure d'un assemblage lipidique est dépendante de la forme moléculaire intrinsèque des lipides le constituant. Le concept de forme basé sur l'importance relative du volume occupé par la partie hydrophobe par rapport à la partie hydrophile permet de prévoir le type d'organisation qu'un lipide adoptera dans l'eau [Cullis & de Kruijff, 1979]. Le volume de la tête hydrophile dépend du volume des atomes la constituant, de son hydratation et de sa dynamique de rotation. Le volume moléculaire des chaînes acyles est fonction du nombre d'insaturations en configuration *cis* : plus elles sont nombreuses et proches de la tête hydrophile et plus le volume occupé par ces chaînes est important.

Ainsi, *in vitro*, la lysophosphatidylcholine (LPC), qui ne possède qu'une chaîne acyle saturée, s'organisera en micelle dans un solvant aqueux, tandis que la phosphatidylcholine (PC), s'organisera en bicouche (Fig. I.8). De manière générale, un lipide en forme de cône induit une courbure positive (type micelle), et un lipide en forme de cône inversé tel que la PE induit une courbure négative (type micelle inversée) [de Kruijff, 1997].

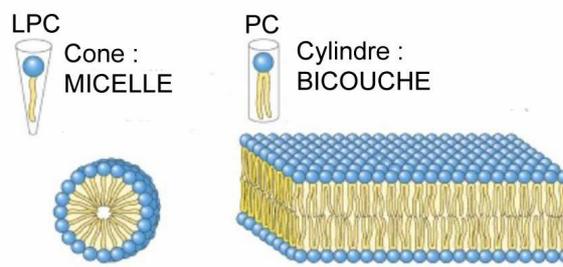


Fig. I.8 – Auto-organisation dans l'eau de la lysophosphatidylcholine (LPC) et de la phosphatidylcholine (PC). Extrait de Cooper, GM., The cell - A molecular approach, 2000.

Ces différentes organisations ont un intérêt physiologique transitoire ou durable. En effet, chaque organite possède sa propre courbure de membrane modulée par sa composition propre de lipides [Zimmerberg, 2000]. De même, les organisations non lamellaires sont observées lors de la fusion membranaire, c'est à dire lors du passage de deux à une bicouche. Elles sont impliquées dans de nombreux processus biologiques fondamentaux tels que la synthèse membranaire, le trafic intracellulaire, la division cellulaire, l'infection des cellules par des virus à enveloppes et, en général, tout phénomène d'endocytose et d'exocytose.

La figure I.9 illustre l'adaptation locale de la composition lipidique pendant la formation ou la fusion de vésicules. Dans ce cas, la présence de phosphatidyléthanolamine sur la face interne de la membrane permet de créer une invagination de la membrane. La fusion est néanmoins étroitement contrôlée *in vivo* par les protéines fusogènes. Les récepteurs SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) sont les acteurs majeurs de la reconnaissance et de la fusion de diverses vésicules de transport [Hong, 2005].

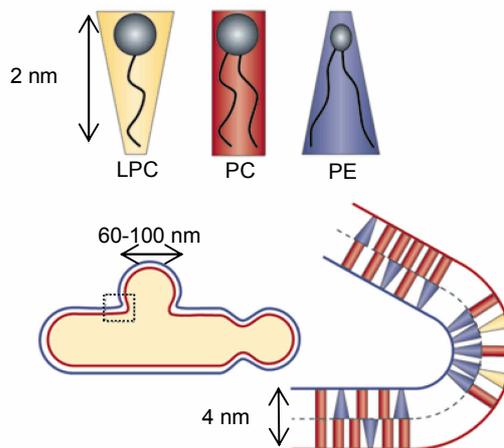


Fig. I.9 – Influence de la forme moléculaire des lipides sur les propriétés physiques de membranes. Exemple simplifié de formation d'une invagination membranaire à l'aide de 3 phospholipides de formes différentes. Extrait de [Sprong *et al.*, 2001].

De plus, certaines enzymes agissent directement sur la forme des lipides. Par exemple, lors de la formation des vésicules synaptiques, l'acide lysophosphatidique (cône inversé) est acétylé en acide phosphatidique (cône) par l'endophiline acétyltransférase [Schmidt *et al.*, 1999]. De manière similaire, plusieurs phospholipases membranaires hydrolysent spécifiquement les têtes polaires et modifient ainsi leurs tailles [Roth *et al.*, 1999].

Les formes individuelles des lipides qui composent la membrane jouent un rôle important à l'échelle locale sur la stabilisation des protéines insérées dans la bicouche. La présence d'un lipide dans une membrane possédant une courbure différente de la courbure intrinsèque du lipide déstabilisera la membrane et engendrera un stress de courbure. Ce dernier influence la stabilité du système et les interactions avec les protéines membranaires (cf. Chap. 2). A contrario, les peptides et protéines insérés dans les membranes sont aussi responsables de l'organisation membranaire locale. Inversement, les lipides modulent dans une certaine mesure la structure des protéines membranaires. Cet aspect sera développé dans le chapitre 2.

Nous avons décrit la structure des bicouches lipidiques, mais ces dernières ne sont pas statiques : elles sont le siège d'une dynamique importante proche d'un liquide.

1.6.2 Propriétés de fluidité et de diffusion dans les membranes

Nous avons souligné que les premières structures par diffraction de rayons X sur des bicouches déshydratées n'étaient pas satisfaisantes car exempt de caractère fluide. La fluidité des membranes est étroitement liée à la composition lipidique, la température et l'humidité du milieu.

La figure I.10 montre le diagramme de phase du système modèle DMPC/H₂O [Janiak *et al.*, 1979]. Trois phases lamellaires sont observables pour ce système : P_β, L_β et L_α. Les deux premières, présentes à basse température, correspondent à des phases rigides (appelées phases gel), où les chaînes aliphatiques sont cristallisées dans le plan normal à la membrane. La dernière est une phase fluide appelée liquide-cristalline. Les chaînes des lipides sont désordonnées et les lipides peuvent diffuser latéralement dans le plan. Les bicouches sont alors libres de fluctuer.

La température de fusion ($T_M = 23^\circ\text{C}$ pour le DMPC) est la température de transition entre une phase gel et la phase L_α. Pour des températures supérieures à T_M , les chaînes hydrocarbonées "fondent" ; des niveaux plus élevés d'énergie rotationnelle des liaisons C-C sont excités [Petrov & Radoev, 1981]. Dans une bicouche lipidique, les changements de direction des chaînes hydrocarbonées, *via* les configurations gauches et *cis* des doubles liaisons, rendent plus difficile le parallélisme des chaînes hydrocarbonées. Par conséquent, l'agencement de ces chaînes dans une phase gel est plus difficile et le désordre moléculaire augmente. Les lipides forment alors un liquide bidimensionnel où les chaînes aliphatiques sont dans une conformation désordonnée, mais en moyenne, normales au plan. T_M dépend principalement de la longueur des chaînes et du nombre d'insaturations. A longueur de chaîne hydrocarbonée égale, la fluidité de la membrane augmente avec

le nombre d'insaturations. Au contraire, à nombre d'insaturations égal, la fluidité est inversement proportionnelle à la longueur de la chaîne.

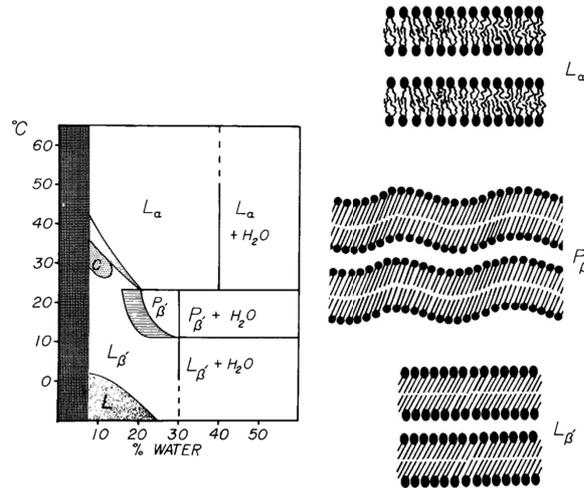


Fig. I.10 – Diagramme de phase du DMPC et représentation schématique des phases L_α , P_β et L_β . D'après [Janiak *et al.*, 1979].

La phase L_α décrite sur des systèmes modèles est la phase la plus représentative des membranes biologiques. Au niveau moléculaire, bien que les différents composants de la membrane soient confinés dans un espace à deux dimensions, ils ne sont pas moins animés de mouvements divers. Les mouvements à petite ou plus grande échelle donnent à la membrane sa propriété de fluidité. Cette caractéristique est décrite dans le modèle classique dit en mosaïque fluide proposé par Singer et Nicholson en 1972. Tous les éléments forment une mosaïque d'éléments mobiles et capables de se réunir pour s'engager dans diverses interactions plus ou moins transitoires.

La viscosité, unité inverse de la fluidité, représente la résistance au déplacement. La viscosité moyenne d'une membrane est de l'ordre de 10^{-1} N.s.m⁻², soit 100 fois plus que celle de l'eau pure. Cependant, les membranes sont des milieux anisotropes et la résistance aux mouvements n'est pas identique dans toutes les directions et à tous points de la membrane [Matko *et al.*, 1988]. Les différents mouvements locaux qui procurent aux bicouches lipidiques leur fluidité sont illustrés sur la figure I.11.

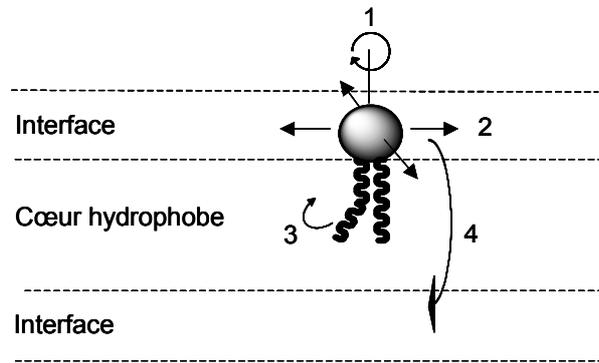


Fig. I.11 – Mouvements d'un phospholipide dans une membrane : (1) rotation, (2) translation, (3) mouvements des chaînes acyles et (4) flip-flop.

Les lipides se déplacent perpétuellement dans le plan de la membrane et tournent sur leur axe. Les chaînes hydrocarbonées sont aussi animées d'un mouvement de balancier. Tous les mouvements de translation et de rotation sont très rapides (temps de corrélation $\sim 10^{-10}$ - 10^{-11} s). La mesure du coefficient de diffusion de translation latérale (D_L) donne une idée précise de cette dynamique. D_L est mesuré par la technique de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP, Fluorescence Recovery After Photobleaching) sur des systèmes modèles ou sur cellule entière possédant un 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 au balayage de $4 \mu\text{m}^2$ 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 moins grande que les lipides [Lenaz, 1987]. Ce coefficient est toutefois dépendant de la taille des molécules, d'où une diffusion latérale presque inexistante pour de gros complexes protéiques.

La diffusion transversale des lipides (ou flip-flop) est beaucoup plus lente que la diffusion latérale. La translocation spontanée d'une face à une autre de la membrane nécessite un temps de demi-réaction ($t_{1/2}$) d'environ 5 heures pour une molécule de phosphatidylcholine [Bai & Pagano, 1997]. Le passage à travers la membrane est fortement dépendant de la taille et de la charge de la tête polaire qui doit traverser le cœur hydrophobe de la bicouche [Ganong & Bell, 1984]. Pour cette raison, le flip-flop est assisté dans la cellule par des enzymes appelées flipases, qui jouent le rôle de transporteurs membranaires et catalysent la diffusion facilitée des lipides. La vitesse de transport est nettement supérieure avec un $t_{1/2}$ de l'ordre de quelques minutes pour la phosphatidylcholine [van den Besselaar et al., 1978]. Il existe également un transport actif de certains phospholipides contre un gradient de concentration. L'aminophospholipide translocase, ATPase membranaire de

115 kDa, transporte les phosphatidylsérines et la phosphatidyléthanolamines de la face externe à la face interne de la membrane plasmique de nombreuses cellules [Seigneuret & Devaux, 1984]. L'activité de translocation est aussi très active dans le réticulum endoplasmique pour la formation des N-glycosilations et des ancres glycosylphosphatidylinositols ; le réticulum endoplasmique synthétise les précurseurs lipidiques du côté cytosolique et les transporte dans la face lumenique pour la synthèse finale [Helenius & Aebi, 2001 ; Maeda et al., 2001].

Enfin, les mouvements collectifs de la membrane, dans son ensemble (ondulation de la surface membranaire, vibration spontanée) ont lieu sur des temps caractéristiques de l'ordre de la milliseconde à la microseconde.

La fluidité et la diffusion des lipides ne sont cependant pas toujours homogènes sur toute la surface membranaire. De nombreuses études, *in vivo* et *in vitro*, ont mis en évidence l'organisation en domaines lipidiques composés de lipides saturés (type sphingolipides) et de cholestérol. Ces derniers peuvent se rassembler de manière étroite, *via* des liaisons non covalentes, et former des domaines lipidiques. Ces domaines, encore appelés radeaux lipidiques ou rafts, forment un ensemble membranaire dans une phase liquide-ordonnée [Ahmed et al., 1997 ; Schroeder et al., 1998]. Cet état possède un empilement des chaînes acyles, de manière similaire à une phase gel, bien que les mouvements de diffusion latérale soient assez rapides. Cet ensemble rigide, insoluble aux détergents, « flotte » sur la surface membranaire. Le rassemblement des sphingolipides à longue chaîne affecte l'épaisseur membranaire : 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 la ségrégation et le rassemblement de certaines protéines membranaires. La ségrégation lipidique et protéique au sein des rafts serait impliquée dans la transduction des signaux et le trafic membranaire [Anderson & Jacobson, 2002 ; Lucero & Robbins, 2004]. Leur formation peut se produire spontanément ou sous l'action de stimuli externes comme un changement de température, de pH ou de force ionique.

Bien que toutes les membranes présentent une organisation globale commune, de nombreux lipides de nature différente sont nécessaires pour déterminer précisément les propriétés physiques adéquates à la fonction d'une membrane donnée dans la cellule.

1.6.3 Les membranes biologiques dans le contexte cellulaire

Les membranes sont le siège de nombreuses réactions biochimiques dans un environnement cellulaire extrêmement complexe. Chacune possède son ensemble de protéines membranaires qui assurent des fonctions métaboliques spécialisées.

Nous avons déjà souligné que chaque membrane possède aussi une composition lipidique propre (cf. Tab. I.1), et ce, malgré des échanges permanents entre les différentes membranes. Le système de transport vésiculaire *via* les voies d'endocytose et d'exocytose permet les échanges entre le réticulum endoplasmique (lieu de croissance membranaire), l'appareil de Golgi et la membrane plasmique. Ces échanges sont souvent unidirectionnels : les lipides saturés et le cholestérol transiteront du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique *via* l'appareil de Golgi, alors que les lipides insaturés emprunteront un chemin inverse [*Sprong et al.*, 2001].

De plus, pour une membrane donnée, la composition n'est pas identique sur chaque monocouche (cf. Tab. I.2). Les membranes biologiques possèdent une distribution transmembranaire asymétrique des lipides qui la composent. Le rôle physiologique de cette asymétrie est encore discuté. Néanmoins, dans le cas du globule rouge, l'asymétrie de la membrane plasmique est responsable de sa forme discoïdale, nécessaire à un bon écoulement dans les capillaires. Les mouvements de flip-flop indispensables à l'établissement de ce déséquilibre ont déjà été décrits dans la section 1.6.2 (page 20).

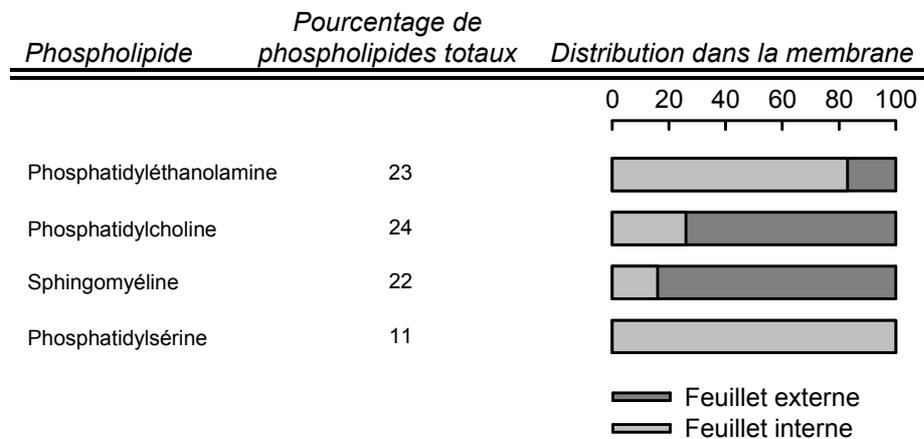


Tableau I.2 – Distribution transmembranaire des phospholipides de la membrane plasmique des érythrocytes humains. D'après [*Verkleij & Vervegaert*, 1978].

Le métabolisme local n'est pas suffisant pour expliquer ces différences de composition lipidique entre les différentes membranes. Le système spécifique de transfert vésiculaire assure une grande partie du travail. En dehors de ce système,

des transporteurs protéiques interviendraient spécifiquement dans le transfert de lipides monomériques [*van Helvoort et al.*, 1999]. Certaines protéines faciliteraient la désorption des lipides lors du contact entre deux membranes [*Daum & Vance*, 1997].

Les variations de compositions lipidiques et protéiques donnent à chaque membrane des propriétés de structures, de charges et de fluidités légèrement différentes. Toutes ces propriétés influencent l'activité physiologique des membranes et notamment la stabilité et l'activité des protéines insérées dans les bicouches. Cependant, la composition n'est pas figée : la cellule est capable d'adapter sa composition lipidique et protéique à son environnement (cas de la régulation homéovisqueuse).

La description de la structure des membranes et de ses propriétés met en lumière l'importance et la complexité des interactions entre ses composants. Dans le chapitre 2, nous détaillerons les relations entre les protéines et les lipides au sein des membranes biologiques.

CHAPITRE 2

LES INTERACTIONS PROTEINES-LIPIDES

Les interactions entre les protéines et la bicouche lipidique stabilisent l'ensemble membranaire tout en permettant les mouvements internes nécessaires à l'activité des protéines. Nous nous attacherons dans ce chapitre à décrire la structure et le repliement des protéines liées aux membranes, ainsi que les facteurs qui stabilisent l'insertion d'une protéine dans une bicouche lipidique.

De manière identique aux protéines solubles, les protéines insérées dans les membranes adoptent une structure correspondant à un minimum d'énergie libre. La bicouche lipidique joue le rôle de solvant bidimensionnel dans lequel les protéines membranaires et amphitropiques se replient. Néanmoins, les conditions physico-chimiques divergent radicalement entre le milieu cytosolique et membranaire (cf. Tab. I.3).

La bicouche lipidique est anisotrope et non-uniforme le long de l'axe perpendiculaire à la bicouche. Les gradients de pH et de constante diélectrique influencent la stabilité conformationnelle des protéines. La force des liaisons hydrogène et les pKs des résidus acides et basiques sont fonction de l'hydrophobicité du milieu : casser une liaison hydrogène ou changer l'état de protonation d'un résidu est plus coûteux en énergie dans un milieu hydrophobe. L'hétérogénéité chimique spatiale et la nature des groupements chimiques en présence induisent une localisation et une orientation précise des protéines membranaires, tandis que les protéines solubles sont orientées de façon aléatoire dans un milieu aqueux.

En effet, dépendant de la taille des protéines et de leur topologie, les protéines insérées se structurent de manière à créer des interactions à la fois avec le cœur hydrophobe et l'interface membranaire hydrophile. Par ailleurs, la viscosité des bicouches lipidiques restreint les mouvements de grande amplitude des protéines membranaires. En définitif, les nombreuses contraintes environnementales de l'espace membranaire limitent le nombre de conformations possibles pour les protéines, simplifiant ainsi le problème du repliement [*Popot & Engelman, 2000*]. Nous envisagerons la structure des protéines membranaires constitutives et transitoires.

<i>Propriétés</i>	<i>Cytosol</i>	<i>Membrane plasmique</i>
Homogénéité chimique du solvant	Oui	Non
Groupes chimiques disponibles	HOH, ions, SH	CH ₃ , CH ₂ , CH
Isotropie	Oui mais encombré	Non
Gradient de pH	Non	Oui
Champ électrique (V.m ⁻¹)	~0	~2.10 ⁶
Gradient de constante diélectrique	Non	Oui
Séparation entre deux protéines :		
Distance (Å)	~50	~30–35
Molécules de solvant interposées	~15–20	~4
Viscosité à 20°C (η , N.s.m ⁻²)	0,001	0,1
Diffusion translationnelle (protéine de 50 kDa)		
D _L (m ² .s ⁻¹)	~10 ⁻¹⁰	~10 ⁻¹¹
Distance moyenne explorée en 1 μ s (Å)	~250	~50
Constante diélectrique (ϵ)	80	~2
ΔG° (kcal.mol ⁻¹) pour		
Casser une liaison H de la chaîne principale	~0	4–6
Déprotoner Glu à pH 7	-4	>30
Ouvrir un pont salin	<1	60
Exposer 1 Å de la surface hydrophobe des protéines	0,025	~0
Exposer Leu au solvant	2,8	~0
Associer deux protéines de 50 kDa (T Δ S à 20 °C)	8	5

Tableau I.3 – Comparaison des propriétés des environnements cytosoliques et membranaires influant sur le repliement et l'association des protéines. Les valeurs dans la membrane sont données pour le cœur hydrophobe. Extrait de [Popot & Engelman, 2000].

2.1 Structure des protéines membranaires

Les protéines membranaires constitutives ne sont pas solubles dans un milieu aqueux et sont insérées dans la membrane tout au long de leur vie biologique. Contrairement à ces dernières, les protéines amphitropiques sont solubles dans le cytosol et peuvent pénétrer de manière transitoire dans une bicouche lipidique lorsque les conditions physico-chimiques du milieu le permettent. Cette liaison à la membrane est observée pour un grand nombre de toxines bactériennes et protéines eucaryotes lors de leurs activités biologiques.

Bien que ce travail soit focalisé sur la structure et les changements de conformations de protéines amphitropiques modèles, les informations structurales disponibles sur les protéines membranaires constitutives sont plus nombreuses. Nous détaillerons la structure et les interactions qui stabilisent les protéines membranaires constitutives en acceptant le postulat que l'organisation structurale et les mécanismes de repliement dans la membrane obéissent à des contraintes identiques dans les deux cas.

2.1.1 Organisation et topologies

Les différents modes d'association des protéines membranaires dans une membrane biologique sont décrits dans la figure I.12 : (i) Les protéines intrinsèques pénètrent dans la bicouche lipidique (Fig. I.12 ; a, b, c et d) (ii) Les protéines extrinsèques sont localisées sur la surface membranaire (Fig. I.12 ; e, f, g et h).

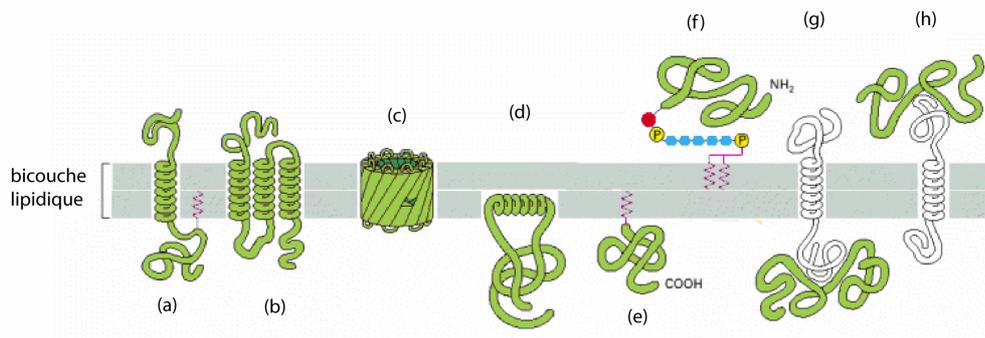


Fig. I.12 – Différents modes d'association des protéines avec les membranes biologiques (voir texte pour la description). Extrait de Alberts et al., *Molecular biology of the cell*, 2002.

2.1.1.1 Les protéines extrinsèques

Les protéines périphériques sont localisées sur la surface membranaire. Elles sont associées à la membrane *via* des liaisons électrostatiques faibles avec les têtes polaires des lipides ou une portion hydrophile d'une chaîne polypeptidique sortant de la bicouche (Fig. I.12 ; g et h).

Les protéines à ancrage sont liées de manière covalente à une molécule de lipide ou un acide gras situé à l'intérieur de la bicouche (Fig. I.12 ; e et f). Les modifications les plus connues sont les myristoylations sur les glycines N-terminales, les palmitoylations et isoprénylations sur les cystéines, et enfin un ancrage par l'intermédiaire d'un lipide modifié, le glycosylphosphatidylinositol (GPI). Une partie des protéines intrinsèques possède aussi un ancrage lipidique sur un domaine cytosolique de manière à stabiliser l'ensemble (Fig. I.12 ; a).

Certaines protéines périphériques et à ancrage peuvent être considérées comme amphitropiques puisqu'un changement de structure et/ou un détachement régulé de la partie hydrophobe permet de solubiliser ces dernières. Ces protéines peuvent alors exister sous forme soluble et sous forme membranaire. Nous ne détaillerons pas plus ce type d'association protéines-lipides où les interactions hydrophobes n'interviennent pas.

2.1.1.2 Les protéines intrinsèques

Les protéines membranaires intrinsèques sont en interaction à la fois avec le cœur hydrophobe et l'interface membranaire. Elles peuvent traverser la membrane de part en part ou y être partiellement insérées. La bicouche lipidique impose des contraintes environnementales et seulement deux motifs structuraux ont été observés : les structures en paquets d'hélices α transmembranaires (Fig. I.12 ; a, b et d) et les structures en tonneau β (Fig. I.12 ; c).

Les structures en hélices α transmembranaires représentent une large majorité des structures connues. L'analyse des profils d'hydrophobicité de plusieurs séquences génomiques complètes indique que 20 à 30% des cadres ouverts de lecture codent pour ce type de motif [Wallin & von Heijne, 1998]. Toutefois, toutes les hélices liées à la membrane ne sont pas transmembranaires. Une hélice amphiphile, c.à.d possédant clairement une face hydrophobe et une face hydrophile en projection hélicoïdale, peut ancrer une protéine dans le plan de la membrane. L'hélice établie alors des interactions électrostatiques avec l'interface, et des interactions hydrophobes avec les chaînes acyles (Fig. I.12 ; d).

Les protéines structurées en tonneau β sont plus rares. On retrouve ce type d'organisation chez les porines, filtres moléculaires de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif. La première structure d'une porine de *Rhodobacter capsulatis* en 1992 a montré une structure composée de 16 brins β antiparallèles s'enroulant autour d'un axe perpendiculaire à la membrane et formant un pore hydrophile [Cowan *et al.*, 1992].

Nous nous intéresserons principalement aux structures transmembranaires hélicoïdales dont le repliement et la stabilité sont les plus étudiés. Par la suite, et sauf indication contraire, nous assimilerons toutes les protéines membranaires comme étant intrinsèques et possédant un repliement en paquets d'hélices α .

2.1.2 Structure tridimensionnelle des protéines membranaires

Comme les phospholipides de la bicouche, les protéines membranaires sont amphiphiles. La structure globale optimise les interactions hydrophobes entre les chaînes latérales des résidus apolaires et le cœur hydrophobe de la bicouche, et ce, tout en masquant les groupements chimiques polaires. Les domaines hydrophobes servent à l'insertion de la protéine dans la paroi lipidique. Le reste de la chaîne polypeptidique est composé de résidus ioniques et polaires qui débordent dans l'espace extra-membranaire, ou forment un canal aqueux à travers la membrane. Ces domaines hydrophiles sont capables d'interagir avec des ligands hydrosolubles (ions, substrats, hormones ou autres protéines).

En raison de leur caractère hydrophobe, les protéines membranaires ne sont pas solubles dans un tampon aqueux et sont donc difficiles à purifier et à cristalliser. La solubilisation nécessite l'utilisation de détergents non dénaturants. Les conditions expérimentales sont empiriques et dépendent de la protéine étudiée. A ce jour, seulement 95 structures différentes sont connues.

La première structure cristallographique d'une protéine membranaire a été résolue en 1985 [Deisenhofer *et al.*, 1985]. La bactériorhodopsine, archétype d'une structure en hélices α transmembranaires, est représentée dans la figure I.13 [Pebay-Peyroula *et al.*, 1997]. Cette protéine membranaire utilise l'énergie photonique pour catalyser le transport de protons du cytoplasme vers le milieu extérieur chez certaines bactéries. Sa structure est composée d'un ensemble de 7 segments transmembranaires plus ou moins perpendiculaires au plan de la membrane. A l'intérieur de la structure, une molécule de rétinol est fixée par une liaison covalente. Les hélices sont en contact entre elles et avec les lipides membranaires situés vers l'extérieur de la structure. Toutes les hélices possèdent un caractère amphiphile : les faces hydrophobes des hélices sont orientées vers l'extérieur et les faces polaires vers l'intérieur. L'ensemble s'organise en une structure cylindrique laissant apparaître un espace polaire au centre.

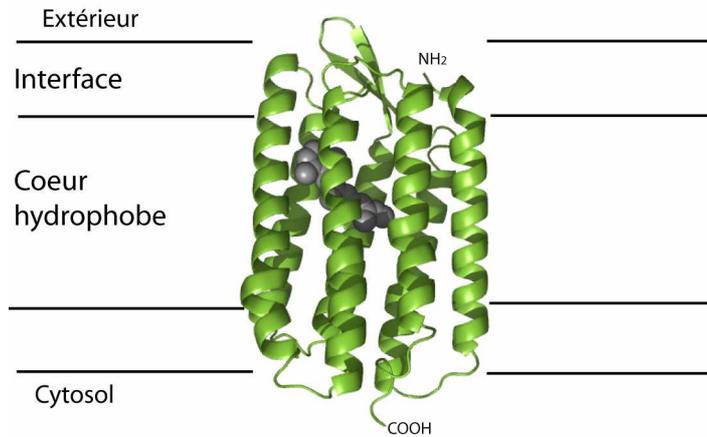


Fig. 1.13 – Structure cristallographique de la bactériorhodopsine de *Halobacterium salinarum* à 2.5 Å de résolution. Le centre de la structure accueille une molécule de rétinol. Les hélices transmembranaires constituent 80% de la protéine.

Les différentes structures de protéines membranaires disponibles ont fourni de nombreuses informations sur l'organisation structurale et la stabilité des protéines membranaires. Bien que leur environnement soit très différent (cf. Tab. I.3, page 27), les caractéristiques structurales des protéines membranaires et des protéines solubles sont relativement proches. Les éléments de structures secondaires sont identiques bien que les segments transmembranaires des protéines membranaires soient exclusivement hydrophobes ou amphiphiles. La faible constante diélectrique du milieu stabilise les liaisons hydrogène internes des hélices α et des feuilletts β . Afin de traverser les 30 Å du cœur hydrophobe de la bicouche, les structures secondaires sont en moyenne plus longues dans les protéines membranaires : 20 résidus minimums pour une hélice α (1.5 Å par résidu) et 10 résidus minimums pour les brins β (3.3 Å par résidu).

Dans leur majorité, les protéines membranaires sont aussi compactes que les protéines solubles [Tristram-Nagle *et al.*, 1986]. Cependant, la nature des forces qui stabilisent les structures tridimensionnelles des protéines membranaires diverge. En effet, l'observation des structures montre qu'une protéine membranaire ne peut être considérée comme une protéine soluble "inversée", c.à.d une protéine où les zones hydrophobes seraient en surface et les résidus hydrophiles formeraient un cœur polaire. Sauf exception, et malgré une structure compacte, peu de liaisons hydrogène et de ponts salins stabilisent le centre hydrophile des protéines membranaires. Le rapprochement des hélices est le résultat d'un effet entropique qui exclut les contacts entre les résidus polaires et les chaînes hydrocarbonées de la bicouche. Les boucles entre les hélices sont aussi des éléments stabilisateurs de la

structure tertiaire. Comme dans le cas de la bactériorhodopsine, un groupement prosthétique aide à contraindre la conformation native. Enfin, de nombreuses forces de van der Waals stabilisent la structure. La figure I.14 donne une vue d'ensemble des principales interactions qui stabilisent la structure native d'une protéine membranaire.

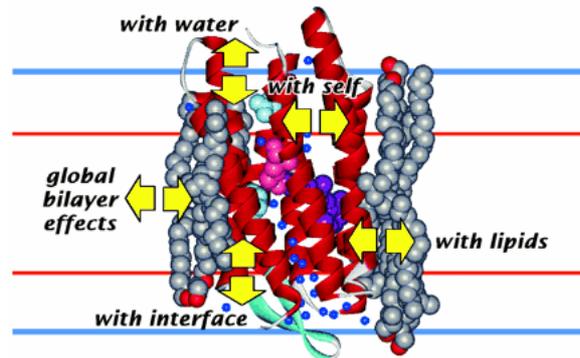


Fig. I.14 – Description des différentes interactions qui déterminent la structure et la stabilité des protéines membranaires. Exemple de la bactériorhodopsine. Sont représentées les interactions de la protéine avec elle-même, l'interface, le cœur hydrophobe, des lipides spécifiques, l'eau et un cofacteur. Extrait de [White et al., 2001].

Une autre différence notable entre les protéines membranaires et les protéines solubles est l'orientation spécifique qu'adoptent les protéines membranaires dans les membranes biologiques. L'analyse des séquences des structures connues donne certaines indications sur la disposition des segments transmembranaires et de la protéine entière [Wallin et al., 1997]. Les résidus aromatiques, principalement les tryptophanes et tyrosines, sont localisés à la frontière entre l'interface et le cœur hydrophobe des membranes. Cette localisation facilite l'ancrage des protéines membranaires dans une orientation optimale [Schiffer et al., 1992]. Les séquences des segments transmembranaires sont en général pauvres en résidus polaires. La cystéine, la thréonine et la sérine sont les résidus polaires les plus courants. Ils partagent des liaisons hydrogène avec la chaîne principale de manière à masquer les groupements polaires. De plus, les résidus polaires sont peu chargés en raison de la faible constante diélectrique du milieu et apparaissent ainsi plus hydrophobes. Contrairement aux protéines solubles, la proline et la glycine sont rencontrées souvent dans les hélices transmembranaires et participent à la formation des coudes. Ces règles ne sont pas exclusives mais permettent cependant de prévoir la topologie des protéines membranaires dont les structures tridimensionnelles sont inconnues.

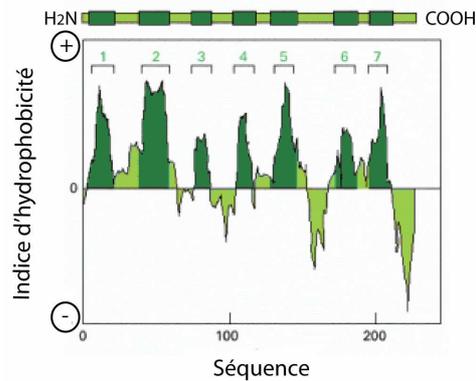


Fig. I.15 – Profil d'hydrophobicité de la bactériorhodopsine de *Halobacterium salinarum*. Echelle de Kyte & Doolittle, la fenêtre utilisée est de 21 résidus. Les 7 segments transmembranaires sont facilement repérés et colorés en vert sombre. Extrait de Alberts et al., Molecular biology of the cell, 2002.

L'obtention de cristaux utilisables en diffraction des rayons X est souvent difficile et aléatoire. Cependant, les profils d'hydrophobicité permettent de localiser facilement les segments transmembranaires. Le calcul d'un profil d'hydrophobicité consiste à attribuer un indice d'hydrophobicité à chaque acide aminé et de parcourir la séquence en portant sur un graphique l'indice de l'acide aminé en fonction de la séquence. Pour éliminer le bruit de fond, on utilise une fenêtre d'environ 20 résidus (soit la taille nécessaire pour qu'une hélice transmembranaire traverse la membrane) et on parcourt la séquence en attribuant un indice moyen au résidu central. Les indices sont obtenus soit par des mesures de coefficient de partage entre un solvant aqueux et hydrophobe, soit par des méthodes statistiques, ou une combinaison des deux. La première échelle d'hydrophobicité fut donnée par Kyte & Doolittle en 1982, mais de nombreuses échelles existent à ce jour. Les profils d'hydrophobicité se sont révélés très utiles et précis pour sonder la topologie des protéines membranaires (Fig. I.15) [Engelman et al., 1986 ; Rose, 1978].

D'autres indications permettent de sonder la topologie d'insertion des protéines membranaires dont la structure n'est pas connue. Les projections hélicoïdales des segments transmembranaires donnent une idée de l'orientation des hélices. Celles-ci s'organiseront de manière à optimiser les contacts électrostatiques entre elles, et les contacts hydrophobes avec les lipides membranaires. Les expériences de protéolyse ménagée ou de fixation d'anticorps permettent de localiser les domaines extramembranaires et leur orientation (cytoplasmique ou externe). Les techniques de transfert et d'atténuation de fluorescence sont efficaces pour donner des détails structuraux à l'échelle d'un tryptophane ou d'un résidu marqué. Tous les outils et détails structuraux présentés ci-dessus sont utilisables pour étudier la structure d'une protéine amphitropique insérée dans une membrane.

2.2 Protéines membranaires transitoires : amphitropisme

2.2.1 Définition et rôles biologiques

Les protéines cytosoliques sont solubles dans le solvant aqueux contrairement aux protéines membranaires. Certaines protéines brisent cette dichotomie : elles sont solubles dans un milieu aqueux et capables de se lier aux membranes de façon réversible. Cette double localisation apparente a été appelée amphitropisme [Burn, 1988]. On retrouve des protéines amphitropiques chez les eucaryotes et procaryotes. Elles accomplissent des fonctions biologiques extrêmement variées. Elles sont impliquées dans l'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. Pour toutes les protéines possédant un caractère amphitropique, la liaison à la membrane est essentielle à une étape de leur activité biologique. Par exemple, la cytidyltransférase qui catalyse une étape limitante de la synthèse de la phosphatidylcholine, n'est active qu'après insertion dans la membrane [Cornell & Northwood, 2000]. De même, la déstabilisation et la fuite ionique de membranes biologiques cibles par des peptides antimicrobiens, ou les toxines bactériennes, nécessitent l'insertion des polypeptides dans les membranes [Parker & Feil, 2005]. On ne peut pas attribuer de fonction commune aux protéines amphitropiques. Cependant, malgré des structures tridimensionnelles variées un mécanisme commun de liaison aux membranes semble émerger.

2.2.2 Mécanisme de liaison aux membranes

Les mécanismes de liaison aux membranes sont complexes et impliquent une spécificité plus large qu'une simple liaison protéine-ligand. Nous ne présenterons que quelques généralités sur ces mécanismes. Des exemples plus précis sur nos modèles d'étude, l' α -lactalbumine et l'apo-myoglobine, seront donnés dans la partie II et III. Pour de nombreux cas, le mécanisme de liaison aux membranes des protéines amphitropiques suit un processus en deux étapes : une adsorption électrostatique sur la surface membranaire et l'insertion de la protéine dans la bicouche favorisée par un effet hydrophobe [Johnson & Cornell, 1999].

La première étape implique des interactions dipolaires entre des clusters de résidus basiques et les têtes polaires anioniques de la bicouche. En effet, les membranes biologiques sont en moyenne composées de 10 à 20% de lipides

anioniques. La liaison aux membranes de la plupart des protéines amphitropiques requiert la présence de lipides anioniques. Cette généralité est vérifiée pour une grande variété de protéines amphitropiques telles que la phosphocholine cytidyltransférase [Johnson *et al.*, 2003], les protéines de la famille Bcl-2 [Garcia-Saez *et al.*, 2004], les annexines [Ladokhin *et al.*, 2002], les toxines bactériennes [Parker & Feil, 2005], les protéines MARCKS et Src, ou encore le cytochrome c [Pinheiro & Watts, 1994]. La première étape d'adsorption électrostatique dépend du nombre de résidus basiques exposés et de leurs répartitions sur la surface des protéines. Elle est aussi fortement dépendante du pH puisque la charge des résidus dépend directement de la concentration en protons. Cette étape d'association est souvent très rapide et, dans certains cas limitée par la diffusion. Par exemple, la constante de vitesse d'association de la protéine MARCKS sur des LUVs anioniques a été estimée à $10^{11} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [Arbuzova *et al.*, 1997]. En revanche, la vitesse de relargage est seulement de $10 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ce qui révèle une forte liaison de la protéine sur la surface membranaire. La nature des têtes polaires définit la spécificité de la liaison protéine-membrane [Johnson & Cornell, 1999]. D'autre part, certaines protéines sont spécifiques pour un phospholipide anionique particulier : la protéine kinase C s'associe préférentiellement aux phosphatidylsérines et la protéine MARCKS se lie spécifiquement aux phosphatidylinositols. Par conséquent, la nature des têtes polaires influence largement l'affinité des protéines pour les membranes.

L'adsorption électrostatique des protéines sur les membranes permet de localiser les polypeptides sur la surface membranaire et de les orienter de manière optimale pour faciliter la seconde étape. La protéine subit ensuite un changement de conformation vers un état favorable à la pénétration dans la membrane. En effet, les protéines amphitropiques possèdent un caractère amphiphile. En solution, les protéines se replient de manière à masquer les zones hydrophobes du solvant aqueux. Une transition conformationnelle vers un état partiellement replié permet, dans la plupart des cas, d'exposer les régions hydrophobes des protéines. Selon la protéine concernée, les zones hydrophobes s'intercalent alors plus ou moins profondément entre les lipides de la bicouche. Certaines pénètrent superficiellement dans une seule monocouche alors que d'autres deviennent transmembranaires. Cette étape est fortement ralentie dans une bicouche lipidique en phase gel qui laisse peu d'espace à l'intercalation des protéines entre les lipides [Arnold & Cornell, 1996].

Une fois insérées, les protéines sont stabilisées par un ensemble d'interactions électrostatiques et hydrophobes d'une manière similaire aux protéines membranaires constitutives [Heymann *et al.*, 1996]. De nombreux travaux se sont attachés à décrire les structures des protéines amphitropiques liées aux membranes. Les plus aboutis concernent les toxines bactériennes et notamment les colicines et la toxine diphtérique. Ces protéines forment des pores dans les membranes cibles en suivant un mécanisme à deux étapes déclenché par un pH ou un potentiel de

membrane adéquate. Les deux toxines possèdent une structure composée uniquement d'hélices α . Elles appartiennent à la famille structurale des globines et sont homologues à la myoglobine. Nous décrirons l'interaction de ces protéines dans la partie III, consacrée à l'étude de la liaison de l'apo-myoglobine aux membranes.

En définitive, les deux étapes impliquent une fine balance entre les interactions électrostatiques et les forces hydrophobes dont les proportions sont modulées par un échange conformationnel. La contribution de chaque composante peut être mise en évidence de manière simple en ajustant la force ionique : une force ionique élevée favorise les interactions hydrophobes au détriment des interactions dipolaires et, inversement, une force ionique faible favorise les interactions dipolaires au détriment des interactions hydrophobes. De nombreux autres facteurs environnementaux comme le pH ou les propriétés de la bicouche régulent ces interactions.

2.3 Comment les lipides affectent l'activité et la structure des protéines

Nos connaissances de l'influence des lipides sur la fonction et la stabilité des protéines insérées dans la membrane sont pour la plupart basées sur des travaux utilisant des protéines membranaires constitutives. Toutefois, nous considérons que le milieu membranaire affecte de manière identique les protéines amphitropiques. Une protéine membranaire sera alors considérée indifféremment comme constitutive ou transitoire.

La bicouche lipidique induit des contraintes physiques sur les protéines membranaires, et limite le champ d'exploration conformationnelle de ces dernières. Les protéines sont confinées dans un espace à deux dimensions, lequel oriente et structure la chaîne polypeptidique en fonction des diverses interactions établies avec les lipides membranaires.

Deux types de lipides sont en contact avec les protéines membranaires : les lipides annulaires et les lipides non-annulaires. Les lipides annulaires sont considérés comme un solvant entourant la chaîne polypeptidique et les interactions dépendent alors des propriétés physiques du solvant [Lee, 2003]. Leur vitesse d'échange avec les lipides environnants est de l'ordre de $1 \text{ à } 2 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$, ce qui est légèrement moins rapide que la diffusion translationnelle. Cette vitesse reflète une interaction peu spécifique entre les deux partenaires. En revanche, les lipides non-annulaires établissent des contacts étroits et spécifiques avec les protéines et

peuvent être assimilés à des cofacteurs [Simmonds *et al.*, 1982]. Ces lipides sont fortement liés aux segments transmembranaires et leur vitesse d'échange est lente. Ils sont copurifiés avec les protéines membranaires et résolus en diffraction des rayons X [Valiyaveetil *et al.*, 2002]. Le nombre, la présence et le rôle des lipides non-annulaires dépendent de chaque protéine. Leur rôle précis reste encore à préciser [McAuley *et al.*, 1999]. Pour cette raison nous ne détaillerons que l'influence des lipides annulaires sur l'activité et la structure des protéines membranaires.

2.3.1 Influence des têtes polaires

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 des phospholipides créent un réseau bidimensionnel dense de liaisons hydrogène entre elles et avec des molécules d'eau. Par ailleurs, les membranes biologiques sont en moyenne composées de 10 à 20% de lipides anioniques, ce qui correspond à un potentiel de surface entre -8 et -30 mV [Honig *et al.*, 1986]. Les têtes polaires anioniques établissent alors des interactions électrostatiques avec des partenaires chargés positivement. De plus, la faible constante diélectrique du milieu ($\epsilon \sim 30$) renforce les contacts électrostatiques et les liaisons hydrogène entre les lipides et les protéines. Nous avons déjà relevé l'importance des lipides anioniques pour la liaison à la membrane de la plupart des protéines amphitropiques.

Le potentiel de membrane créé par les charges négatives conduit à un recrutement de contre-ions positifs, augmentant la force ionique à proximité de la surface. Parmi ces cations, les protons sont recrutés et leur concentration locale augmente. Une baisse de 1 à 2 unités pH [Eisenberg *et al.*, 1979] prend place sur une distance de 5 à 15 Å de la surface [Bychkova *et al.*, 1996 ; Prats *et al.*, 1989].

La stabilité des protéines membranaires est également particulièrement sensible à la charge globale, la force ionique et au pH de l'interface. Par exemple, l'équilibre conformationnel entre les deux intermédiaires majeurs de la photoactivation de la rhodopsine subit une forte influence du pH local [Wang *et al.*, 2002]. Pour certaines protéines amphitropiques comme la toxine diphtérique, l'augmentation de l'acidité favorise la déstabilisation et l'insertion dans la membrane.

2.3.2 Influence des propriétés physiques des membranes

La composition lipidique définit les propriétés physiques de la membrane. Les principales propriétés qui influencent les interactions protéines-lipides sont l'épaisseur, la fluidité et la courbure de la bicouche.

2.3.2.1 L'épaisseur de la bicouche

L'épaisseur de la membrane, en moyenne égale à 5 nm, est optimisée de manière à accueillir les protéines membranaires. Le cœur hydrophobe de la bicouche (~2.5 à 3 nm) doit recouvrir les segments transmembranaires. La surface hydrophobe des protéines dépend de la longueur et de l'orientation de ces segments transmembranaires. L'épaisseur du cœur hydrophobe de la bicouche est égale à la longueur des chaînes acyles. Des mesures d'activités de la calcium ATPase et de la diacylglycérol kinase reconstituées ont montré une dépendance en cloche de leurs activités enzymatiques en fonction de la longueur des chaînes hydrocarbonées [Caffrey & Feigenson, 1981 ; Lee, 2003]. Un mauvais ajustement des deux parties aboutit en premier lieu à une adaptation de l'épaisseur de la bicouche lipidique, la protéine restant rigide [Fattal & Ben-Shaul, 1993].

La figure I.16 illustre cette adaptation. Toutefois, si la distorsion lipidique n'est pas suffisante, la protéine est capable de flexibilité *via* des changements d'orientation et de compaction de ses hélices transmembranaires.

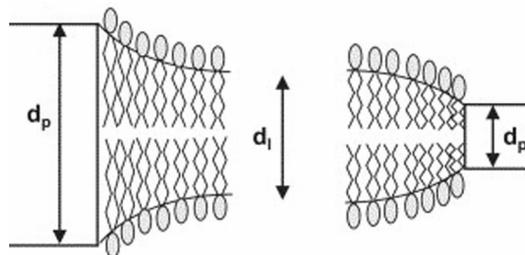


Fig. I.16 – Mauvais ajustements hydrophobes entre une protéine membranaire et la bicouche lipidique. d_p et d_l sont respectivement les longueurs intrinsèques des segments hydrophobes de la protéine membranaire et de la bicouche. Lorsque $d_p > d_l$, la bicouche s'étire et l'aire moléculaire des lipides diminue à proximité de la protéine. Lorsque $d_p < d_l$, la bicouche se comprime et les lipides occupent une plus grande surface. Extrait de [Lee, 2004].

2.3.2.2 Effets de la viscosité membranaire

Les mouvements de faible amplitude à période de temps courte ($<10^{-12}$ s) sont similaires dans le milieu liquide et le milieu membranaire. En revanche, les forces de friction dans le milieu membranaire s'opposent aux mouvements de grande amplitude de la protéine. Les protéines membranaires, en assurant leurs fonctions enzymatiques ou autres, subissent des changements conformationnels. Dans un milieu visqueux, les forces de friction s'opposent à ces mouvements. L'activité des protéines membranaires est donc dépendante de l'état de fluidité des membranes. En effet, certaines protéines comme la Ca^{2+} -ATPase ou la Na^+, K^+ -ATPase perdent une grande partie de leur activité enzymatique dans une phase visqueuse de type gel [Starling *et al.*, 1995].

Par conséquent, la barrière énergétique entre deux états conformationnels augmente avec la viscosité. Une température ou une composition lipidique différente a donc un effet majeur sur l'activité et les transitions conformationnelles des protéines.

2.3.2.3 Effets de la courbure membranaire

Nous avons déjà décrit le polymorphisme lipidique dans la section 1.6.1 (page 16). Beaucoup de lipides membranaires préfèrent intrinsèquement un assemblage non lamellaire [Rietveld *et al.*, 1993]. La présence de ces lipides dans une bicouche introduit une courbure qui la déstabilise. Le maintien d'une structure en bicouche est la résultante des forces attractives et répulsives (Fig. I.17).

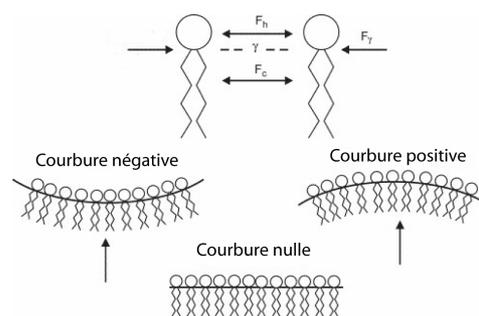


Fig. I.17 – Courbure spontanée de la bicouche lipidique. La forme des lipides et les forces en présence induisent une courbure positive, négative ou nulle. F_c : force de répulsion entre les chaînes par agitation thermique. F_γ : tension interfaciale qui tend à minimiser l'aire moléculaire. F_h : interactions attractives ou répulsives entre les têtes hydrophiles. Les forces de van der Waals entre les chaînes hydrocarbonées sont attractives. Extrait de [Lee, 2004].

L'insertion d'une protéine dans la membrane a, en général, pour effet de stabiliser la structure en bicouche [Rietveld *et al.*, 1987]. A contrario, l'insertion de certaines protéines demande un ajustement de l'épaisseur de la bicouche et crée une courbure membranaire positive ou négative (cf. section précédente). Ces contraintes influencent l'activité des protéines membranaires. Par exemple, la dimerisation de la gramicidine est indispensable à sa fonction de canal ionique et nécessite une courbure positive de la membrane [Lundbaek *et al.*, 1997].

De nombreux travaux s'intéressent à l'influence de la courbure membranaire sur les interactions entre des protéines solubles et des vésicules [Epanand *et al.*, 2002 ; Epanand & Epanand, 2001]. Des tailles différentes de vésicules (SUVs ou LUVs) permettent de faire varier le rayon de courbure. En effet, lorsque le diamètre des vésicules diminue, la courbure de la membrane augmente. Dans le cas des vésicules de petite taille, le faible rayon de courbure affecte la distribution des lipides entre les deux monocouches. Une forte contrainte mécanique s'exerce sur le feuillet externe des SUVs et entraîne une plus grande exposition au solvant des chaînes acyles. Les lipides exercent alors une plus faible pression latérale sur les protéines liées à la membrane [Booth *et al.*, 1997]. Ces deux effets favorisent les interactions hydrophobes entre les protéines et la monocouche externe des SUVs [Huang *et al.*, 1999].

Nous avons déjà souligné que lors de la fusion membranaire (cf. section 1.6.1.2, page 19), la cellule régule localement sa composition lipidique et donc la courbure de la membrane. De manière similaire, le mécanisme de transport des protéines membranaires dans l'appareil de Golgi *via* les vésicules de transport COPI nécessite une forte courbure locale. Ce système d'assemblages protéolipidiques sur la surface membranaire est un phénomène actif reproduit *in vitro* sur des SUVs qui miment le rayon de courbure des vésicules de transport [Bigay *et al.*, 2003 ; Holthuis & Burger, 2003].

2.4 Description thermodynamique des interactions protéines-lipides

Les protéines membranaires sont dans une conformation native qui correspond à un minimum d'énergie libre [Lemmon *et al.*, 1994]. Comme les protéines solubles, la séquence contient toute l'information nécessaire pour définir la structure finale [Huang *et al.*, 1981]. Les structures transmembranaires sont stabilisées par diverses interactions énergétiquement favorables : la chaîne peptidique avec l'eau, elle-même, la bicouche lipidique (interface et cœur hydrophobe) et des cofacteurs éventuels. Nous avons déjà décrit les caractéristiques structurales (section 2.1.2,

page 30) et l'influence des lipides sur la structure des protéines transmembranaires (section 2.3, page 36). Les processus d'insertion et de repliement dans la membrane peuvent être décrits d'un point de vu thermodynamique.

Cependant, l'étude de la stabilité des protéines membranaires constitutives est difficile à cause de leur insolubilité. Les protéines amphitropiques ou les fragments peptidiques sont plus facilement manipulables. L'étude de leur partition dans les membranes nous informe sur les principes généraux de stabilité et d'assemblage des protéines membranaires.

2.4.1 Partition des protéines dans les membranes

La partition d'une protéine membranaire constitutive ou transitoire dans une bicouche lipidique est un processus spontané. La variation d'énergie libre de transfert d'un polypeptide dans une membrane est une somme de différentes contributions favorables et défavorables [*Ben-Shaul et al.*, 1996 ; *Ben-Tal et al.*, 1996 ; *Janin*, 1996] :

$$\Delta G^0 = \Delta G_{\text{HC}}^0 + \Delta G_{\text{elec}}^0 + \Delta G_{\text{E}}^0 + \Delta G_{\text{con}}^0 + \Delta G_{\text{imm}}^0 + \Delta G_{\text{lip}}^0$$

Les quatre premiers termes sont favorables à la partition des polypeptides dans les membranes. L'expulsion de l'eau par les résidus hydrophobes (coût énergétique = ΔG_{HC}), ainsi que les attractions dipolaires (ΔG_{E}) entre les résidus basiques et les lipides anioniques, constituent les premières causes à la liaison d'une protéine aux membranes. Une fois liés à la membrane, les polypeptides se retrouvent dans un solvant différent et adoptent une conformation plus favorable (ΔG_{con}). Des effets électrostatiques s'ajoutent en raison de la différence de constante diélectrique entre l'eau et la membrane. Ces effets sont représentés par l'énergie libre ΔG_{elec} . Ce dernier est relié au coût énergétique de la partition de la chaîne principale, laquelle est favorisée par la formation des structures secondaires. Cette contribution est négative et extrêmement favorable pour le repliement des polypeptides dans les membranes.

Néanmoins, la bicouche lipidique impose des contraintes de mouvements et le degré de liberté des protéines diminue dans l'espace membranaire (ΔG_{imm}). La perte d'entropie conformationnelle et translationnelle est estimée à environ 16 kcal.mol^{-1} pour une protéine de 100 kDa [*Jahnig*, 1983]. Enfin, la partition de la protéine peut perturber la bicouche ; l'énergie libre ΔG_{lip} représente le coût énergétique de cette perturbation. Dans le cas où la protéine s'intègre profondément dans la bicouche lipidique, ΔG_{lip} s'oppose à l'insertion de la protéine. En effet, la membrane doit adapter son épaisseur et son rayon de courbure à la protéine insérée. De plus, l'insertion d'une protéine diminue la liberté conformationnelle des chaînes acyles.

En revanche, une simple adsorption de la protéine sur la surface membranaire augmente l'espace entre les lipides et la liberté des chaînes acyles. Dans ce cas, la contribution de ΔG_{lip} peut être favorable à la liaison des protéines aux membranes.

Les deux premiers termes (ΔG_{HC}^0 et ΔG_{elec}^0) sont reliés à la solvataion de la protéine sur la membrane et sont une conséquence directe de l'effet hydrophobe [Ben-Tal et al., 1996]. En revanche, les trois derniers termes représentent la contribution des effets de la bicouche [Wimley & White, 1993]. La compréhension des mécanismes de repliement des protéines membranaires implique la détermination de ces différentes composantes énergétiques.

2.4.2 Repliement des protéines dans les membranes : aspects énergétiques

Les expériences de partition de peptides et de protéines entre la phase aqueuse et la phase membranaire ont fourni plusieurs modèles décrivant le repliement des protéines membranaires constitutives et transitoires dans les bicouches lipidiques. *Jacobs & White* ont proposé un modèle en trois étapes : liaison du polypeptide, repliement à l'interface et insertion dans la bicouche. Parallèlement, *Popot & Engelman* proposent le modèle en deux étapes pour l'assemblage de protéines en hélices α . Dans ce modèle, les hélices α transmembranaires sont des unités de repliement autonomes déjà présentes dans la bicouche et les interactions entre les hélices compactent la structure en une protéine fonctionnelle.

Le modèle en quatre étapes proposé par *White & Wimley* est une combinaison logique des schémas précédents. Ce modèle est schématisé dans la figure I.18 pour la partition et le repliement d'une protéine en hélice α . C'est un modèle séquentiel où les quatre étapes : partition, repliement, insertion et association, ont lieu dans l'interface (Fig. I.18, interfacial path), l'eau (Fig. I.18, water path) ou une combinaison des deux. Ce modèle est utilisable pour les protéines membranaires constitutives et transitoires.

La figure I.18 met en évidence deux cycles thermodynamiques séquentiels. Dans un premier temps, la partition du polypeptide dans l'interface membranaire est accompagnée par la formation des structures secondaires. Les différents états : le polypeptide déplié libre, le polypeptide déplié lié à l'interface membranaire, le polypeptide replié libre et le polypeptide replié lié à l'interface sont en équilibre dans un cycle thermodynamique. La partition dans la membrane est par conséquent couplée au repliement (couplage partition / repliement). Dans une deuxième phase, l'insertion transmembranaire des hélices α dans le cœur hydrophobe de la bicouche est accompagnée de l'association des hélices. L'insertion transmembranaire est donc couplée à la formation de la structure tertiaire. Tous les équilibres possibles

sont détaillés dans la figure I.18, cependant, chaque protéine empreinte la voie qui lui est la plus favorable.

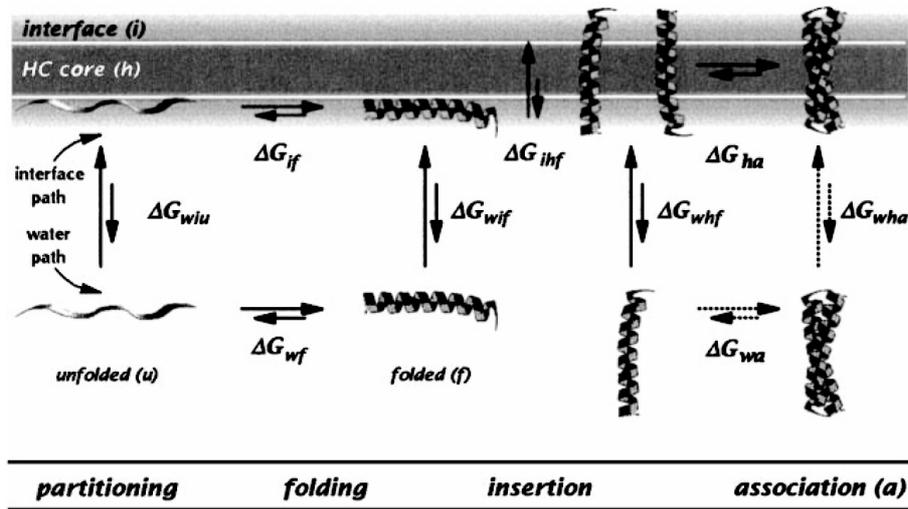


Fig. I.18 – Modèle en quatre étapes décrivant la partition, le repliement, l'insertion et l'association d'une protéine en hélices α . ΔG représente la variation d'énergie libre. La terminologie en index indique une étape spécifique dans le cycle : i = interface, h = cœur hydrophobe, u = état déplié d'une hélice α , f = état replié d'une hélice α , et a = association en paquets d'hélices α . Selon cette terminologie, l'énergie standard de transfert de l'eau à l'interface d'une protéine repliée s'écrit ΔG_{wif} . Extrait de [White & Wimley, 1999].

2.4.2.1 Le couplage partition / repliement

La bicouche lipidique participe au repliement de deux manières : (i) Le polypeptide se replie dans la phase aqueuse et se partitionne dans la membrane. La bicouche lipidique affectera alors principalement le repliement en stabilisant la structure finale. (ii) La protéine dépliée partitionne dans la membrane et se replie dans l'interface membranaire.

Le repliement des protéines à l'interface s'explique par les propriétés physico-chimiques favorables de l'interface membranaire. La figure I.19 illustre le couplage de la partition et du repliement de la melittine dans les membranes. La melittine est un peptide contenu dans le venin d'abeille. L'utilisation de peptides modèles comme la melittine a permis une description structurale et thermodynamique simplifiée de l'insertion des hélices α dans les membranes. Ce peptide s'insère dans

les membranes, se structure en hélice et déstabilise les bicouches lipidiques [Mishra *et al.*, 1994 ; Vogel, 1981].

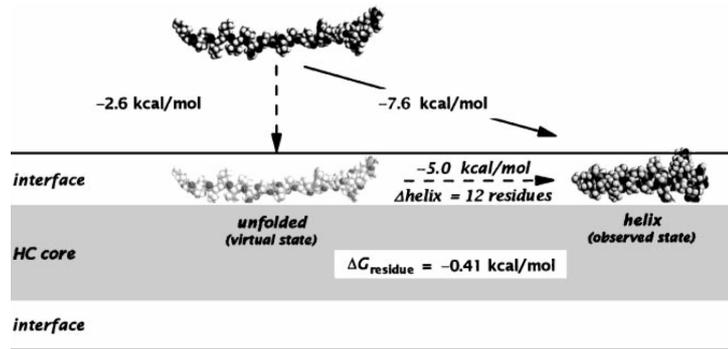


Fig. I.19 – Couplage partition / repliement de la melittine dans une membrane. La formation de l'hélice α apporte une stabilité de 5 kcal.mol^{-1} . Extrait de [White & Wimley, 1999]

L'interface membranaire apparaît comme un catalyseur de formation des structures secondaires pour les protéines [Ladokhin & White, 1999 ; Wimley *et al.*, 1998]. En effet, l'insertion de la chaîne principale n'est pas favorable et expose des groupements polaires au solvant. L'établissement de liaisons hydrogène entre les groupements amides et carbonyles de la chaîne principale rend la liaison peptidique plus hydrophobe. Les liaisons hydrogène des structures secondaires réduisent considérablement le coût énergétique de la partition membranaire des liaisons peptidiques [Wimley & White, 1996]. Typiquement, la variation d'énergie libre attribuée à la formation de structures secondaires à l'interface est estimée à -5 kcal.mol^{-1} (égale à ΔG_{if} dans la figure I.18). Par ailleurs, les liaisons hydrogène sont facilitées dans un milieu comme l'interface où la constante diélectrique est faible.

2.4.2.2 Les interactions hélices-hélices

Une fois les structures secondaires formées, l'insertion membranaire des hélices résulte uniquement de la nature des chaînes latérales présentes. La valeur de l'énergie libre de la pénétration dans le cœur hydrophobe de la membrane (Fig. I.18, ΔG_{ihf} et ΔG_{whf}) est alors dépendante de la séquence qui doit être riche en résidus hydrophobes.

La compaction des structures secondaires en une structure native compacte représente la dernière étape du repliement des protéines membranaires. En effet, la propension de chaque hélice α de la bactériorhodopsine à former des unités transmembranaires autonomes a été mise en évidence par *Hunt et al.* [*Hunt et al.*, 1997]. Les différents segments s'assemblent ensuite pour donner une structure native fonctionnelle. L'effet hydrophobe constitue la principale force d'association entre hélices transmembranaires. Un ensemble de force hydrophobe et électrostatique stabilise la protéine membranaire en un ensemble compact (cf. section 2.1.2, page 30). De plus, la nature et les propriétés complexes des bicouches lipidiques affectent la stabilité des protéines insérées (cf. section 2.3, page 36). Compte tenu de toutes les interactions possibles, l'énergie libre d'association d'hélices transmembranaires (ΔG_{ah}) peut être décrite comme

$$\Delta G_{ah} = \Delta G_{H-H} + n\Delta G_{L-L} - 2n\Delta G_{H-L}$$

où ΔG_{H-H} , ΔG_{L-L} , ΔG_{H-L} sont respectivement les énergies libres des interactions hélice-hélice, lipide-lipide et hélice-lipide. Cette description admet que la formation d'une paire d'hélices déplace $2n$ molécules de lipides ; n interactions lipides-lipides sont gagnées et $2n$ interactions hélice-lipide sont perdues [*White & Wimley*, 1999].

Les forces en présence dépendent aussi du rapport des concentrations entre les protéines et les lipides (P/L). En effet, une dilution par les lipides (faible rapport P/L) induit le désassemblage des segments transmembranaires (avantage entropique).

Bien que les forces hydrophobes constituent la principale force stabilisatrice entre les hélices transmembranaires elles-mêmes et les lipides, les segments transmembranaires ne s'agrègent pas de manière non spécifique. Cette propriété met en lumière la complexité des interactions entre les différents partenaires [*Fisher et al.*, 2003].

2.4.3 Partition ou liaison des protéines aux membranes ?

Les notions de liaison et de partition ont jusqu'à présent été amalgamé. Cependant, l'association de protéines (P) aux lipides (L) ne peut pas être rigoureusement considérée comme une simple interaction protéine-ligand. En effet, si l'on considère l'équilibre chimique classique :



Deux postulats improbables sont implicites à ce schéma : (i) la stœchiométrie entre la protéine et le lipide est fixe. (ii) l'association est spécifique d'un lipide ou

d'un groupe de lipide. Cependant, la membrane est un milieu fluide et l'association des protéines aux membranes met en jeu des interactions électrostatiques et hydrophobes qui résultent des propriétés globales de la bicouche [White *et al.*, 1998]. La bicouche lipidique constitue une phase non miscible avec l'eau. L'association des protéines aux membranes est alors considérée comme un partage entre deux phases non miscibles plutôt qu'un équilibre chimique entre un récepteur et un ligand. La membrane est assimilée à un solvant et non à un assemblage moléculaire avec lequel des interactions spécifiques peuvent s'établir. Bien que le terme de liaison soit souvent employé, c'est la notion de partition qui prévaut dans le cas des interactions protéines-lipides.

Dans ce contexte, les protéines tendent à équilibrer leurs potentiels chimiques (μ) entre les deux phases :

$$\Delta G^0 = \mu_{bi}^0 - \mu_w^0 = -RT \ln K_x$$

où μ_{bi}^0 et μ_w^0 sont les potentiels chimiques dans les conditions standards de la protéine respectivement dans la bicouche lipidique et dans l'eau. On définit ainsi K_x comme le coefficient de partage molaire. En considérant que la concentration de la protéine est négligeable devant les concentrations en solvant (lipide et eau) :

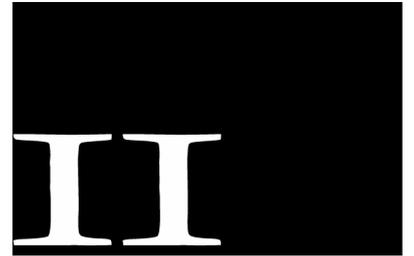
$$K_x = \frac{[P]_{bi} / [L]}{[P]_w / [W]}$$

où $[P]_{bi}$ et $[P]_w$ sont respectivement les concentrations molaires de la protéine dans la phase lipidique et la phase aqueuse, $[L]$ et $[W]$ sont les concentrations molaires de lipide et d'eau (55.3 M pour l'eau) [Wimley & White, 1993]. Dans le cas où la protéine n'atteint que la monocouche externe, seulement la moitié de la concentration en lipides est prise en compte. Le coefficient de partage molaire donne accès à l'énergie libre d'association de la protéine dans la membrane. Il peut toutefois être relié à une constante d'association classique (K) dans les conditions standards (concentrations des solutés égales à 1M) : $K = K_x / [W]$ [Jahnig, 1983]. D'une manière générale, les mesures *in vitro* de constantes d'affinité des protéines amphitropiques pour les membranes dans des conditions optimales d'interactions varient de 10^{-4} à 10^{-11} M^{-1} [Johnson & Cornell, 1999].

En pratique, la détermination de la concentration de l'espèce liée en fonction de concentrations variables de lipides donne accès à la fraction de protéine partitionnée dans la membrane (f_p). f_p est facilement relié à K_x par la relation :

$$f_p = \frac{K_x [L]}{[W] / K_x [L]}$$

La mesure de f_p est réalisée, soit par des expériences de séparation physique des états liés et solubles permettant des mesures de concentrations sur un état, soit par des expériences de titration d'une propriété physique de l'état libre ou lié pendant la fixation. Les méthodes de séparation utilisent les expériences de dialyse à l'équilibre ou de centrifugation. Les méthodes spectroscopiques ou calorimétriques sont utilisées pour les expériences de titration. Cependant toutes les associations aux membranes ne suivent pas la relation précédente. En effet les phénomènes d'agrégations sur la membrane ou de répulsions électrostatiques entre protéines induisent des associations coopératives ou anticoopératives.



Liaison de l' α -lactalbumine aux membranes

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

L' α -lactalbumine est une protéine du lait (14 200 Da) impliquée dans la synthèse du lactose. Elle représente 20 à 25% de la fraction protéique du lait. Par ailleurs, elle a été identifiée comme étant une protéine amphitropique [Banuelos & Muga, 1996 ; Cawthern *et al.*, 1997 ; Montich & Marsh, 1995]. C'est une des protéines modèles les plus utilisées pour étudier le repliement des protéines. Les propriétés de ses états partiellement repliés, et particulièrement de son état molten globule, sont très bien connues. Des changements conformationnels vers des états partiellement repliés étant requis pour l'insertion des protéines amphitropiques dans les membranes, l' α -lactalbumine apparaît comme un excellent modèle d'étude pour élucider les mécanismes de liaison et d'insertion aux membranes.

1.1 Fonctions biologiques de l' α -lactalbumine

L' α -lactalbumine est sécrétée dans le lait mais sa principale fonction biologique est intracellulaire. Elle est synthétisée dans les cellules épithéliales des glandes mammaires et intervient principalement dans la formation de la lactose synthétase. Ce complexe enzymatique, qui catalyse l'étape finale de la biosynthèse du lactose dans le lumen de l'appareil de Golgi, est composé de la β 1,4-galactosyltransférase (GT) et de l' α -lactalbumine (BLA). La β 1,4-galactosyltransférase sous forme libre, est impliquée dans les modifications post-traductionnelles des protéines des cellules sécrétrices, en transférant un groupement galactosyl de l'uridine diphosphogalactose vers les glycoprotéines N-acétylglucosaminées [Brew *et al.*, 1968]. La spécificité de la β 1,4-galactosyltransférase est modulée par son interaction avec l' α -lactalbumine. Cette dernière se fixe sur le site de reconnaissance des groupements N-acétylglucosaminés de la β 1,4-galactosyltransférase et induit un changement conformationnel de celle-ci. La formation de la lactose synthase (la β 1,4-galactosyltransférase et l' α -lactalbumine) augmente l'affinité et la spécificité de la β 1,4-galactosyltransférase pour le glucose au détriment de l'interaction avec les glycoprotéines N-acétylglucosaminées [Gastinel *et al.*, 1999] :



Une fois sécrétée, l'α-lactalbumine serait également impliquée dans diverses fonctions biologiques. C'est un composant très nutritif pour les nouveau-nés de par sa composition variée et riche en acides aminés essentiels. L'α-lactalbumine est également impliquée dans le système de défense des muqueuses gastro-intestinales [Matsumoto *et al.*, 2001]. En effet, des rats nourris avec de l'α-lactalbumine présentent une résistance importante contre les ulcères induits par l'alcool et le stress thermique. Par ailleurs, certains fragments de l'α-lactalbumine présentent une activité antibiotique contre les bactéries Gram positives [Pellegrini *et al.*, 1999]. Ces différentes propriétés font de l'α-lactalbumine, un constituant protecteur pour le système digestif de l'enfant.

D'autre part, Svensson *et al.* ont mis en évidence la possibilité d'induire l'apoptose de cellules tumorales par une forme particulière de l'α-lactalbumine [Svensson *et al.*, 1999]. Les auteurs décrivent la formation et la liaison d'oligomères de l'α-lactalbumine sur la surface de la membrane plasmique de cellules tumorales en culture. Les multimères pénètrent dans le cytosol et interagissent avec les mitochondries. Le dépôt de multimères sur les mitochondries déclenche le relargage du cytochrome c mitochondriale qui active la voie apoptotique médiée par les caspases [Kohler *et al.*, 1999]. Cette activité pro-apoptotique serait reliée à la protection contre le cancer. Les diverses fonctions protectrices et pro-apoptotiques mettent en jeu l'interaction de l'α-lactalbumine avec les membranes.

L'α-lactalbumine a également une forte affinité pour les ions Ca²⁺. Elle est pour cette raison un modèle très courant pour étudier les protéines liant le Ca²⁺. Cependant, le rôle physiologique de la liaison des ions calciques reste encore à déterminer.

1.2 Structure de l'α-lactalbumine

Les α-lactalbumines de mammifères sont constituées de 123 résidus (14 200 Da pour l'α-lactalbumine bovine) et leur point isoélectrique est compris entre 4 et 5. La structure cristallographique de l'α-lactalbumine bovine (Fig. II.1) révèle une organisation en deux domaines, le domaine α qui contient les résidus 1-39 et 81-123), et le domaine β contenant les résidus 40-80. Le domaine α est composé des hélices αA (5-11), αB (23-34), αC (86-99), αD (105-109) et d'une hélice 3₁₀ (115-119). Deux boucles, une hélice 3₁₀ et trois brins β antiparallèles forment le domaine β. L'ensemble est stabilisé par quatre ponts disulfures [Chrysina *et al.*,

2000], deux dans le domaine α (C28-C11, C6-C120), un dans le domaine β , (C61-C77) et un dernier qui connecte le domaine β à l'hélice C du domaine α (C73-C91).

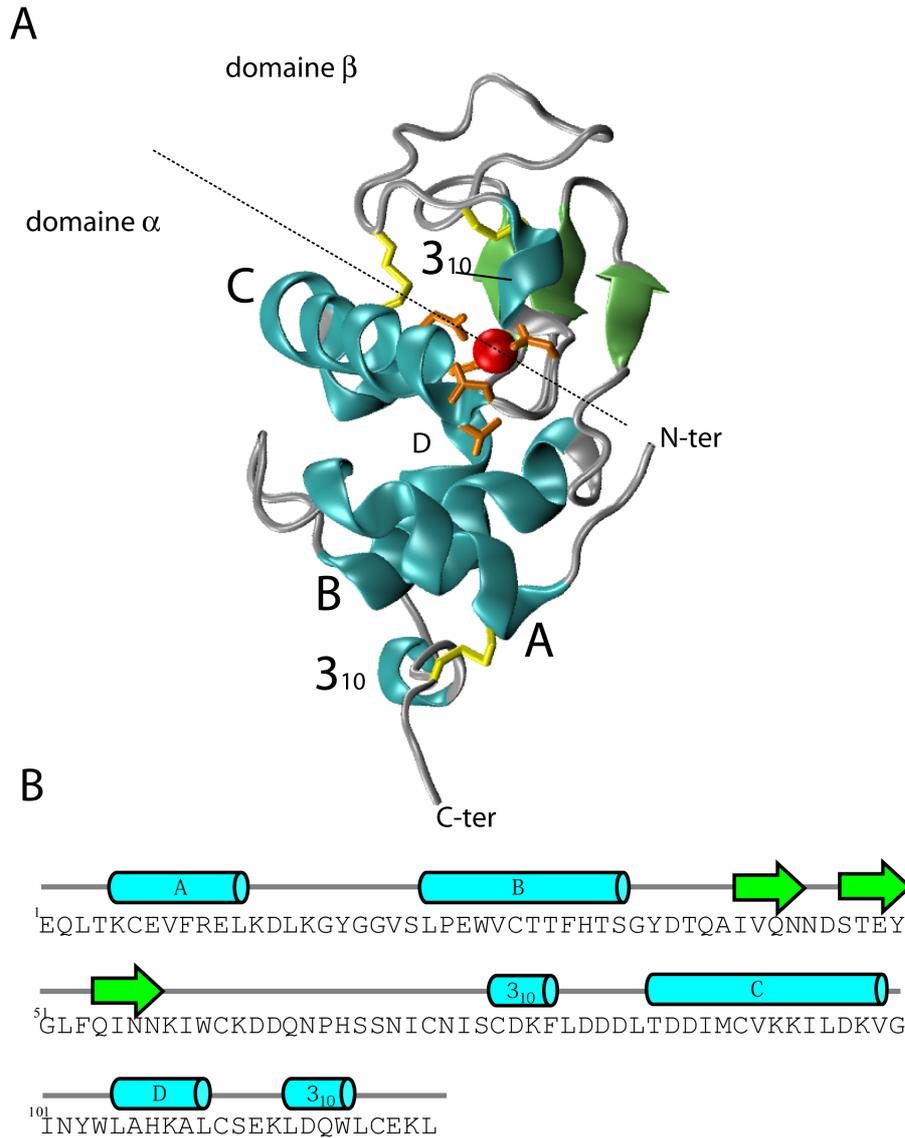


Fig. II.1 – (A) Structure cristallographique de la forme holo de l' α -lactalbumine bovine. Le site de liaison au Ca^{2+} est coloré en orange. Un Ca^{2+} lié est représenté en rouge. Les hélices α sont en bleu et les brins β en vert. Les ponts disulfures sont indiqués en jaune. Les domaines α et β sont séparés par un trait pointillé. (B) Localisation des structures secondaires dans la séquence.

La protéine contient quatre tryptophanes (26, 60, 104 et 118) et 4 tyrosines (18, 36, 50 et 103). Certains de ces résidus aromatiques forment deux rassemblements hydrophobes nommés clusters hydrophobes I et II. Le cluster I est formé des résidus F31, H32, Y36 et W118 dans un noyau hydrophobe entre les hélices A, B et 3_{10} C-terminale. Le cluster II forme une poche hydrophobe entre les hélices C, D et une partie du domaine β , et met en jeu les résidus F53, W60, Y103, W104 et W26.

A pH neutre, l' α -lactalbumine peut fixer un ion calcique. La forme libre est appelée apo et la forme liée holo. Le site de liaison des ions calciques est mis en évidence dans la figure II.1. Il est formé de l'hélice 3_{10} du domaine β , de quelques résidus de l'hélice C et principalement de la boucle entre l'hélice α C et l'hélice 3_{10} . La coordination du Ca^{2+} est tétraédrique et met en jeu les groupements carboxylates des aspartates D82, D87, D88, ainsi que les groupements carbonyles des résidus K79 et D84 [Permyakov & Berliner, 2000]. L'affinité de la protéine pour le Ca^{2+} est très forte, la constante d'association du Ca^{2+} à pH 7 et à 20°C est égale à 3×10^8 M [Murakami *et al.*, 1982]. Le même site de liaison peut accueillir d'autres cations divalents mais les affinités sont plus faibles. Les structures cristallographiques des formes apo et holo sont très proches et indiquent que la liaison du Ca^{2+} n'a pas d'effet majeur sur la structure finale de la protéine. En revanche, les expériences d'échanges hydrogène/deutérium (H/D) des résidus amides suivies en RMN montrent que le site de fixation est plus protégé du solvant, donc plus structuré dans la forme holo [Schulman *et al.*, 1997]. Par conséquent, le Ca^{2+} stabilise localement la structure autour de son site de liaison et favoriserait les interactions tertiaires entre les deux domaines de la protéine. Ainsi la stabilité de la protéine est fortement augmentée en présence de Ca^{2+} . D'autre part, la liaison de Ca^{2+} accélère la réaction de repliement [Forge *et al.*, 1999 ; Schulman *et al.*, 1995 ; Troullier *et al.*, 2000 ; Wu *et al.*, 1996].

1.3 Repliement de l' α -lactalbumine

Le repliement de protéines de plus de 100 résidus passe souvent par l'accumulation d'intermédiaires détectables. Ces intermédiaires apparaissent pendant la phase précoce de la réaction de repliement. Le premier état accumulé durant les premières millisecondes a une compacité proche de celle de l'état natif. Une autre caractéristique de cet état est la présence de structures secondaires similaires à celles de l'état natif, et l'absence de structure tertiaire stable. Ces caractéristiques définissent un état appelé molten globule (globule fondu). Son rôle est de guider la protéine sur le bon chemin de repliement.

L' α -lactalbumine est une protéine modèle très utilisée pour étudier les mécanismes du repliement des protéines. L'état molten globule a été décrit pour la première fois sur le chemin de repliement de l' α -lactalbumine [Kuwanjima *et al.*, 1979 ; Nozaka *et al.*, 1978]. En effet les mesures de dichroïsme circulaire dévoilent que la réaction de repliement de l' α -lactalbumine de l'état complètement déplié dans 6 M de chlorure de guanidinium vers l'état natif à pH neutre n'est pas coopérative. Un intermédiaire de type molten globule apparaît après quelques millisecondes et évolue ensuite vers la forme native. L'état partiellement replié formé contient déjà 85% des structures secondaires mais peu de structuration tertiaire [Forge *et al.*, 1999]. Par chance, l'état molten globule de l' α -lactalbumine est stabilisable à l'équilibre à pH 2 [Dolgikh *et al.*, 1981], et présente les mêmes caractéristiques structurales que l'intermédiaire cinétique de repliement à pH neutre [Forge *et al.*, 1999]. La stabilisation de l'état molten globule à pH acide a permis une caractérisation structurale de cet état par diverses méthodes biophysiques.

Par ailleurs, les ions calciques influencent largement la vitesse de repliement et la stabilité de l'état final. En effet, le repliement de la forme apo est d'environ 200 s à 20°C alors que la forme holo atteint sa forme native en une seconde [Forge *et al.*, 1999 ; Kuwanjima, 1989]. La transition de l'état molten globule vers l'état natif en présence de Ca^{2+} est coopérative. Les ions calciques stabilisent très fortement la structure tertiaire. Ainsi le dépliement de la forme holo à pH neutre par des agents chaotropiques en présence d'un excès de Ca^{2+} est coopératif et ne présente pas d'état partiellement replié : les structures tertiaires stabilisées par le Ca^{2+} sont dénaturées en même temps que les structures secondaires. L'effet est identique pour le dépliement de la forme native à pH neutre vers l'état molten globule à pH 2 : la transition ne débute qu'autour de pH 3.5 en présence d'ions calciques et de pH 4.5 en absence d'ions calciques. Il semble également que la liaison de Ca^{2+} sur les états partiellement repliés guide la protéine sur le bon chemin de repliement. Dans le cas de la forme apo, la réaction est plus complexe et des brins β non natifs, observés par spectroscopie infrarouge, sont formés transitoirement pendant la réaction [Troullier *et al.*, 2000].

1.3.1 L'état molten globule de l' α -lactalbumine à pH 2

Les structures secondaires de l'état molten globule à pH 2 ont été caractérisées par dichroïsme circulaire et spectroscopie infrarouge. Les expériences de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain indiquent que l'état molten globule contient des proportions de structures secondaires comparables à celles de l'état natif. La spectroscopie infrarouge, plus sensible aux structures en brins et coudes β , montre une légère diminution de la quantité de brins β [Troullier *et al.*, 2000]. Les bandes d'absorption du spectre infrarouge s'élargissent ce qui indique que les structures secondaires sont plus flexibles. La forme globale de l'état molten globule apparaît

également très proche de la forme native. Des mesures de viscosité intrinsèque, de diffusion quasi-élastique de lumière ainsi que des expériences de diffusion de rayons X aux petits angles suggèrent que l'état molten globule est presque aussi compact que l'état natif [Dolgikh *et al.*, 1985 ; Gast *et al.*, 1998]. Le rayon de giration pour la protéine native en présence de Ca^{2+} est de 15.7 Å et de 17.2 Å pour l'état molten globule [Kataoka *et al.*, 1997]. Des mesures de RMN dévoilent que certaines interactions natives entre les chaînes latérales persistent à pH 2 [Balbach *et al.*, 1997]. Par conséquent la topologie moyenne du molten globule est proche de celle de l'état natif. Cependant, les raies de résonance du spectre RMN de l'état molten globule sont plus larges, ce qui témoigne de l'existence de nombreux états conformationnels qui s'échangent entre eux sur une échelle de temps de l'ordre de la milliseconde [Alexandrescu *et al.*, 1993]. Contrairement à la forme native de la protéine, l'état molten globule expose les clusters hydrophobes au solvant. Il peut donc potentiellement interagir avec des partenaires hydrophobes comme les bicouches lipidiques. L'existence de ces clusters hydrophobes partiellement accessibles confère au molten globule les propriétés de lier des sondes hydrophobes fluorescentes comme l'ANS. Cette propriété est considérée comme un bon témoin de la présence de cet état intermédiaire [Kuwajima, 1989].

En définitive, les interactions à courte distance stabilisant les structures secondaires sont maintenues dans l'état molten globule. La forme et la topologie de la protéine sont conservées mais l'ensemble est très dynamique. De nombreuses conformations coexistent et peu d'interactions à longue distance stabilisant la structure tertiaire native sont encore présentes.

Les noyaux hydrophobes décrits dans la section précédente sont partiellement préservés dans l'état molten globule de l' α -lactalbumine. Il a été montré par RMN que les chaînes latérales de Y103, W104 et H107 (une partie du cluster II) forment toujours un cluster hydrophobe dans cet état [Alexandrescu *et al.*, 1993]. Très récemment, la technique de polarisation nucléaire dynamique induite photochimiquement et détectée par RMN a confirmé la persistance de ce noyau hydrophobe dans l'état molten globule [Mok *et al.*, 2005]. W26 et Y103 dans le cluster II sont très protégés du solvant alors que les tryptophanes 60, 104, 118 et la tyrosine 36 sont significativement exposés. Des expériences de mutagenèse dirigée ont démontré que le cluster I formé par les hélices A, B, et 3₁₀ joue également un rôle prédominant dans la stabilisation du molten globule [Wu & Kim, 1998]. En effet, les interactions entre les résidus hydrophobes sont globalement maintenues bien que la structure globale soit plus dynamique et expose davantage les noyaux hydrophobes au solvant dans l'état molten globule.

Les études structurales ont mis en évidence que le domaine α est principalement responsable de l'ensemble des caractéristiques structurales du molten globule. En effet, la délétion du domaine β par protéolyse limitée ne change pas la capacité de

l' α -lactalbumine à adopter un état molten globule stable à pH 2 [de Laureto *et al.*, 2005]. Bien que ce domaine soit discontinu dans la séquence, des interactions distales persistent entre les régions N et C-terminales. Les éléments stabilisateurs de la structure du molten globule pourraient être les ponts disulfures. Cependant, le mutant sans cystéine de l' α -lactalbumine adopte un état molten globule à pH 2 qui possède les mêmes caractéristiques spectroscopiques que la forme sauvage. Par conséquent, les ponts disulfures qui stabilisent la structure native n'interviennent pas dans la formation de l'état molten globule [Redfield *et al.*, 1999]. Le maintien de la structure en molten globule implique donc d'autres interactions stabilisatrices.

Les expériences d'échanges isotopique H/D permettent de localiser les structures secondaires et d'estimer leurs stabilités. Ces expériences associées à la RMN mesurent l'accessibilité au solvant à l'échelle du résidu et fournissent un profil de protection (cf. annexe sur les échanges H/D). Celui de la forme holo de l' α -lactalbumine est montré dans la Fig. II.2. La région la plus stable de la protéine est celle du site de liaison du calcium (coloré en rouge dans la Fig. II.2). Le feuillet β est également très protégé contre l'échange H/D dans l'état natif. La structure de l'état molten globule est très dynamique et par conséquent beaucoup plus exposée au solvant que l'état natif. De ce fait, les facteurs de protection sont beaucoup plus faibles dans le cas de l'état molten globule que pour l'état natif (Fig. II.2). Notons qu'une échelle logarithmique est utilisée pour l'état natif (Fig. II.2A) et une échelle linéaire pour l'état molten globule (Fig. II.2B). Cette baisse de plusieurs ordres de grandeur des facteurs de protection est reliée directement à la différence de stabilité entre les deux états, l'état molten globule étant le moins stable. Cependant, le site de liaison du Ca^{2+} apparaît encore partiellement structuré dans ce dernier état. En particulier, l'hélice αC est encore significativement protégée de l'échange isotopique [Forge *et al.*, 1999]. La persistance de structure dans le site de liaison du calcium est également observée dans l'état molten globule accumulé pendant la réaction de repliement de la protéine [Forge *et al.*, 1999 ; Kuwajima, 1989].

En résumé, l' α -lactalbumine possède un intermédiaire de repliement de type molten globule stabilisé à l'équilibre à pH 2. Les structures secondaires natives sont conservées en grande partie, mais les interactions tertiaires sont perdues. La topologie est globalement identique à la forme native bien que la protéine soit beaucoup plus dynamique. La structure du molten globule est stabilisée par le maintien d'interactions hydrophobes dans les deux noyaux hydrophobes de la protéine, bien que la structure soit globalement flexible. Enfin le site de liaison du calcium est encore partiellement structuré et conserve la propriété de lier Ca^{2+} .

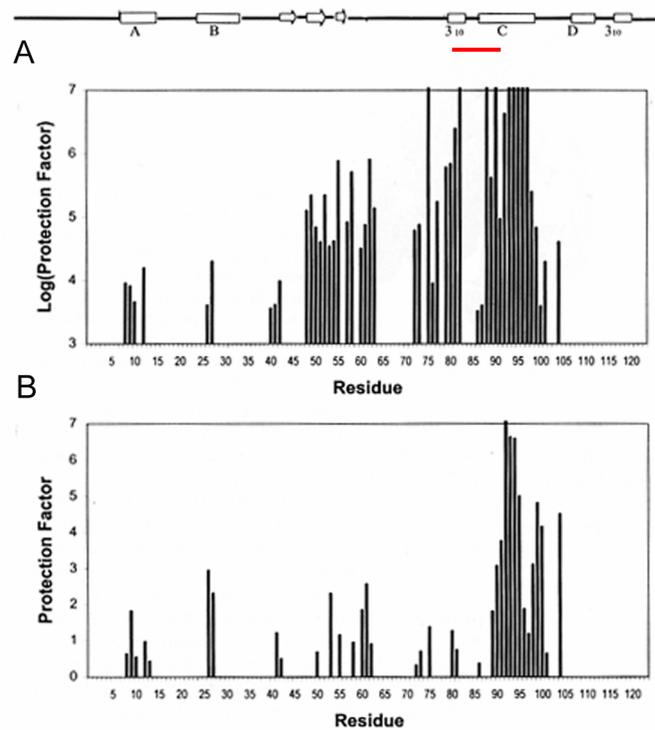


Fig. II.2 – Profils de protection de l' α -lactalbumine. (A) Forme holo de l'état natif (10 mM CaCl_2) ; (B) Etat molten globule (pH 2). Le site de liaison de l'ion calcium est indiqué par un trait rouge. D'après [Forge *et al.*, 1999].

1.4 Liaison de l' α -lactalbumine aux membranes

Les diverses fonctions de l' α -lactalbumine et les informations accumulées sur la structure de son état molten globule justifient son utilisation comme modèle de protéine amphitropiques.

In vivo, l'interaction de l' α -lactalbumine avec les membranes semble intervenir dans la régulation de la lactogénèse [Mitranic *et al.*, 1988]. En effet, la présence de lipides anioniques inhibe la galactosyltransférase et favorise l'interaction de l' α -lactalbumine avec les membranes. De plus, ses activités pro-apoptotiques et protectrice des parois gastro-intestinales nécessitent l'interaction de la protéine avec les membranes [Kohler *et al.*, 1999 ; Matsumoto *et al.*, 2001 ; Svensson *et al.*, 1999]. Par ailleurs, l' α -lactalbumine est un excellent modèle d'étude de l'insertion

membranaire des états partiellement repliés. En effet, les données disponibles sur l'insertion membranaire de nombreuses protéines amphitropiques telles que les colicines, la toxine diphtérique ou le cytochrome c suggèrent que la transition vers un état molten globule est un pré-requis nécessaire à l'insertion de ces protéines dans les membranes [Chenal *et al.*, 2002 ; Parker & Feil, 2005 ; Pinheiro & Watts, 1994 ; van der Goot *et al.*, 1991]. Or, les propriétés et la structure de l'état molten globule de l' α -lactalbumine sont très bien connues (cf. section précédente).

L'interaction de l' α -lactalbumine avec des membranes modèles (principalement des vésicules lipidiques) a fait l'objet de plusieurs travaux [Banuelos & Muga, 1996 ; Banuelos & Muga, 1996 ; Halskau *et al.*, 2002 ; Hanssens *et al.*, 1985 ; Kim & Kim, 1989]. Les expériences décrites dans ces articles ont été réalisées dans des conditions (pH, calcium, taille et composition de vésicules lipidiques) très variables. Ceci est probablement la raison principale de la grande diversité des résultats décrits et de l'incohérence apparente des interprétations proposées. Cependant, une synthèse de la littérature suggère que l'association de l' α -lactalbumine aux membranes est modulée par la composition lipidique, le pH, les propriétés physiques de la membrane et la présence d'ions calciques. D'une manière générale, l' α -lactalbumine interagit avec les membranes neutres ou anioniques, et présente au moins deux états liés aux membranes suivant les conditions : un état adsorbé sur la surface membranaire *via* des interactions dipolaires et un état plus profondément inséré dans la bicouche lipidique [Banuelos & Muga, 1996 ; Hanssens *et al.*, 1985 ; Lala *et al.*, 1995].

L'association à la surface de la membrane a été observée surtout pour la forme holo. La structure tertiaire de cette dernière est stabilisée par la liaison du Ca^{2+} et la protéine est peu flexible. Les résidus hydrophobes sont donc peu exposés au solvant et l'insertion dans le coeur hydrophobe de la membrane est rendue d'autant plus difficile. L'association de la forme holo aux membranes chargées négativement est observée lorsque le pH est inférieur au point isoélectrique de l' α -lactalbumine. La protéine s'organise à l'interface membranaire et interagit avec les lipides anioniques *via* des interactions électrostatiques [Banuelos & Muga, 1996]. Une adsorption électrostatique a également été décrite pour la forme apo à pH neutre [Hanssens *et al.*, 1985]. Lorsque le pH diminue, une transition conformationnelle vers un état molten globule favoriserait l'insertion de l' α -lactalbumine dans les membranes. En effet, l'état molten globule de l' α -lactalbumine se lie fortement aux membranes neutres ou anioniques et peut provoquer une fusion membranaire des vésicules lipidiques [Kim & Kim, 1989]. L' α -lactalbumine devient ainsi une protéine membranaire intrinsèque à pH acide.

Diverses études structurales se sont attachées à décrire la structure de l'état lié aux membranes à pH acide. Des expériences de résonance paramagnétique électronique avec des sondes nitroxydes enfouies dans les membranes ont montré

que les têtes polaires interagissent avec les groupements chargés de la protéine et que les chaînes acyles sont en contact avec les régions hydrophobes de la protéine [Montich & Marsh, 1995]. Les études par protéolyse ménagée de l'état inséré de l' α -lactalbumine à pH acide indiquent que les extrémités N et C-terminales sont exposées au solvant. En revanche, l'hélice 3_{10} du domaine β et l'hélice C sont protégées de la digestion par la pronase [Kim & Kim, 1989]. Les hélices amphiphiles αA et αC ont également été identifiées comme les sites d'ancrage à la membrane par des expériences de marquage photochimique et d'échanges H/D suivis par RMN [Banuelos & Muga, 1995 ; Halskau et al., 2002 ; Kim & Kim, 1989]. Tous ces travaux suggèrent que l' α -lactalbumine pénètre profondément dans les membranes neutres et anioniques. Le changement de conformation vers un état molten globule serait un pré-requis nécessaire à l'insertion membranaire. Cependant, certaines études révèlent la présence de structures natives de l'état en interaction avec la membrane [Cawthern et al., 1996]. Par ailleurs, le mécanisme d'insertion membranaire de l' α -lactalbumine impliquerait également l'augmentation du contenu en hélice α et une diminution du contenu en brins β [Banuelos & Muga, 1996].

En conclusion, il semble que les interactions de l' α -lactalbumine aux membranes et les différentes structures adoptées par la protéine liée à la bicouche lipidique dépendent de nombreux facteurs dont on connaît encore mal les influences.

CHAPITRE 2

BUT DU TRAVAIL

Selon les conditions physico-chimiques de l'environnement aqueux et lipidique, la littérature décrit plusieurs états structuraux pour l' α -lactalbumine liée aux membranes. Les structures de ces états ne sont pas encore claires. Dans la plupart des cas, la conformation de l' α -lactalbumine insérée dans la membrane est attribuée à un état molten globule. Cependant certains travaux relèvent la persistance de structure tertiaire [Cawthern *et al.*, 1996].

L'hétérogénéité des résultats obtenus vient pour une part du modèle de bicouche lipidique utilisé. En effet, les vésicules lipidiques de petite et grande taille sont utilisées indifféremment dans la plupart des études. Nous avons déjà reporté l'influence du rayon de courbure sur les interactions protéine-lipide et la structure des protéines insérées dans les membranes. Nous suggérons que la taille des vésicules et toutes les contraintes physiques qui en découlent, pourraient expliquer ces disparités de résultats. Nous proposons une étude exhaustive des différents facteurs qui influencent la liaison de l' α -lactalbumine aux membranes tels que les effets du calcium et du pH, ainsi que les propriétés physico-chimiques des bicouches lipidiques (le rayon de courbure et la charge des membranes).

De simples expériences de partition, de fluorescence intrinsèque et de dichroïsme circulaire dans différentes conditions de pH, charge et taille des vésicules devraient nous éclairer sur la nature des interactions mises en jeu et la diversité conformationnelle des états liés à la membrane.

Par ailleurs, nous tenterons d'identifier à l'échelle du résidu, le site d'interaction de l' α -lactalbumine liée à des LUVs anioniques dans des conditions où l'interaction est la plus favorable. L'expérience sera réalisée en sondant les résidus non accessibles à l'échange hydrogène/deutérium (H/D), car impliqués dans une interaction avec les membranes. L'expérience est largement facilitée par le relargage des protéines insérées après fixation du calcium. Cette réversibilité induite par la liaison du calcium justifie pour une part l'utilisation de l' α -lactalbumine comme modèle d'étude. Les échanges H/D seront suivis en RMN permettant une identification à l'échelle du résidu. Les résultats seront comparés à ceux obtenus par Halskau *et al.* avec des SUVs anioniques. Enfin, les expériences d'échanges H/D donnent accès à la thermodynamique des interactions protéine-membrane,

préalable à la compréhension des mécanismes de repliement et de stabilité des protéines dans les membranes.

En définitive, les objectifs principaux de ce travail se résument en quatre points :

- Etude des différents facteurs influençant la liaison de l' α -lactalbumine à la membrane. Effets du calcium, du pH, de la charge et de la courbure des membranes.
- Caractérisation de la diversité conformationnelle des états liés à la membrane.
- Identification à l'échelle du résidu du site d'interaction avec des LUVs anioniques à pH acide par des expériences d'échanges H/D suivies en RMN. Comparaison avec les données disponibles sur les SUVs.
- Interprétation thermodynamique de la partition de l' α -lactalbumine dans les membranes grâce aux expériences d'échanges H/D.

CHAPITRE 3

RESULTATS

Nous ne ferons qu'une brève description des résultats obtenus. Ceux-ci sont exposés en détail dans l'article 1.

Dans un premier temps, nous avons entrepris de déterminer qu'elles étaient les conditions de liaison de l' α -lactalbumine aux vésicules lipidiques. Les expériences de partition par centrifugation et les spectres de fluorescence intrinsèque indiquent que la liaison aux membranes est dépendante du pH quelles que soient les conditions utilisées. D'une manière générale, la forme apo de l' α -lactalbumine est requise pour la liaison aux membranes. En effet, les expériences de partition montrent que la forme holo se lie aux vésicules de taille variable uniquement en milieu très acide (pH 3) après relargage de son Ca^{2+} . C'est à dire lorsque la protéine a subi un changement conformationnel vers un état molten globule. La protéine dans cet état possède toutes les qualités requises pour l'optimisation des interactions entre la protéine et la bicouche lipidique. Ces propriétés sont : des structures secondaires formées (en particulier des hélices α), une topologie flexible et des régions hydrophobes accessibles.

D'autre part, nous avons démontré que la liaison aux membranes est dépendante de la taille des vésicules. L' α -lactalbumine se lie aux vésicules de grandes tailles (LUVs) de pH 6 à pH 4. Cette liaison nécessite la présence de lipides anioniques et met en évidence l'importance des interactions électrostatiques. La protéine se lie totalement à pH acide de manière coopérative et adopte un état molten globule observé par dichroïsme circulaire. L'accessibilité des régions hydrophobes de la protéine permet la mise en place d'interactions hydrophobes avec le cœur aliphatique de la bicouche lipidique. La structure de l' α -lactalbumine liée aux LUVs est donc stabilisée à la fois par des interactions dipolaires et hydrophobes.

Contrairement à la liaison aux LUVs, l'interaction de l' α -lactalbumine avec les SUVs exhibe une dépendance au pH beaucoup plus complexe. En effet, la présence de lipides anioniques ne semble pas être requise et la protéine est capable de se lier quel que soit le pH sur des SUVs neutres ou chargées. La liaison à ces différents pH n'est pas coopérative et les spectres de dichroïsme circulaire indiquent que la protéine peut se lier aux SUVs sous une forme native ou partiellement dépliée. De manière surprenante un état molten globule se forme et se lie aux SUVs à pH 7,

bien que la protéine soit chargée négativement à ce pH. Ces résultats suggèrent que les interactions hydrophobes entre la protéine dans l'état molten globule et les SUVs sont suffisantes pour obtenir une interaction et stabiliser l'état partiellement replié de la protéine au détriment de l'état natif. Il est probable que les SUVs, de par leur forte courbure membranaire, favorisent les interactions hydrophobes au dépend des interactions dipolaires attractives ou répulsives.

La caractérisation des états liés aux membranes a été entreprise par des expériences d'échanges H/D suivies par RMN. La méthode est basée sur le principe qu'un résidu en contact direct avec la membrane ne sera pas accessible au solvant et sa vitesse d'échange isotopique sera lente. Les cinétiques d'échanges des protons amides avec le solvant sont suivies en enregistrant l'intensité des raies de résonances du spectre RMN de la protéine après différents temps d'échange isotopique. Les protons amides ont été attribués sur les spectres COSY. Cette méthode permet la cartographie à l'échelle du résidu des sites d'interaction avec les membranes. La protection contre l'échange isotopique donne ainsi accès à un facteur de protection membranaire. Ce dernier est relié, dans le cas d'un mécanisme EX2, à l'énergie nécessaire pour stabiliser le système (cf. Annexe sur les échanges H/D). Cependant, comme dans toute étude thermodynamique l'état de référence doit être judicieusement choisi.

Les expériences ont été réalisées en présence de LUVs anioniques à pH acide, c.à.d lorsque la protéine est dans un état molten globule. Les facteurs de protection montrent que le domaine β est très exposé au solvant. Ce résultat n'est pas étonnant puisque ce domaine est aussi déstructuré dans l'état molten globule en solution [Forge *et al.*, 1999 ; Schulman *et al.*, 1995]. La faible protection de certains résidus suggère même que ce domaine est déstabilisé par les membranes. Les zones les plus protégées sont localisées dans le domaine α . Les hélices A et C apparaissent comme les points d'ancrage de la protéine sur les membranes *via* des résidus polaires et hydrophobes. Des expériences d'échanges H/D réalisées par Halskau *et al.* En présence de SUVs anioniques à pH 4.5 prédisent une zone d'interaction beaucoup plus étendue. Cependant, nous avons démontré que la protéine adopte un état natif dans les conditions expérimentales utilisées par Halskau *et al.*, alors que l'interprétation des résultats proposée dans cet article est basée sur l'hypothèse que la protéine liée aux membranes est dans l'état molten globule. Un nouveau traitement des données de ces auteurs avec la forme native comme état de référence dévoile que les hélices αA et αC sont également impliquées dans la liaison aux SUVs. Ce résultat démontre que cette zone est responsable du caractère amphitropique de l' α -lactalbumine.

Enfin, nous proposons une interprétation thermodynamique de la liaison de l' α -lactalbumine aux LUVs. Cette approche est rendue possible par la réversibilité de la liaison et par le fait que les expériences d'échanges H/D donnent accès aux

énergies de liaison dans le cas d'un mécanisme EX2. Le coût énergétique des changements de conformation induits par la liaison à la membrane peut être estimé en comparant la stabilité des différents états. Les stabilités obtenues par les expériences d'échanges pour les états solubles concordent avec celles déduites de courbes de dépliement de la protéine par le chlorure de guanidinium. Ceci valide notre méthode. La stabilité de l'état lié aux LUVs est estimée à $-3.3 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Cette valeur d'énergie libre est moins favorable que la stabilisation de la forme apo à pH neutre ($-3.7 \text{ kcal.mol}^{-1}$), ceci explique pourquoi l' α -lactalbumine ne peut pas se lier aux membranes dans ces conditions. Cependant ces deux valeurs sont proches, c'est probablement la raison pour laquelle une faible acidification du milieu en présence de LUVs stabilise l'état molten globule au dépend de la forme apo native. En présence d'une concentration élevée de calcium la forme native est fortement stabilisée (-9 kcal.mol^{-1}). Dans ce cas la différence d'énergie libre avec le molten globule lié aux LUVs est très grande et la liaison aux membranes n'est observée que lorsque le pH est suffisamment acide pour inhiber la liaison du calcium. Cette méthode apparaît donc très efficace pour sonder la stabilité et les structures des états liés aux membranes à l'échelle du résidu et permet de comprendre l'effet des conditions sur la liaison. Elle peut être appliquée à d'autres protéines amphitropiques dont on contrôle la réversibilité de la liaison aux membranes.

-ARTICLE 1-

Conformational States and Thermodynamics of α -Lactalbumin Bound to Membranes: A case Study of the Effects of pH, Calcium, Lipid Membrane Curvature and Charge

Grégory Vernier, Alexandre Chenal, Philippe Savarin, Natalia A. Bushmarina, Annabelle Gèze, Florent Guillain, Daniel Gillet and Vincent Forge (2005) *J. Mol. Biol* 349, 890-905

Conformational States and Thermodynamics of α -Lactalbumin Bound to Membranes: A Case Study of the Effects of pH, Calcium, Lipid Membrane Curvature and Charge

Alexandre Chenal^{1,2,†*}, Grégory Vernier^{1,†}, Philippe Savarin²
Natalia A. Bushmarina^{1,3}, Annabelle Gèze⁴, Florent Guillain¹
Daniel Gillet² and Vincent Forge^{1*}

¹*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*

²*Département d'Ingénierie et d'Études des Protéines CEA-Saclay, 91191 Gif sur Yvette cedex, France*

³*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences St. Petersburg 194064, Russia*

⁴*Département de Pharmacochimie Moléculaire UMR CNRS 5063, UFR Pharmacie, Université Joseph Fourier-Grenoble I, 5 av. de Verdun, F 38243, Meylan cedex France*

*Corresponding authors

The study of the conformational changes of bovine α -lactalbumin, switching from soluble states to membrane-bound states, deepens our knowledge of the behaviour of amphitropic proteins. The binding and the membrane-bound conformations of α -lactalbumin are highly sensitive to environmental factors, like calcium and proton concentrations, curvature and charge of the lipid membrane. The interactions between the protein and the membrane result from a combination of hydrophobic and electrostatic interactions and the respective weights of these interactions depend on the physicochemical conditions. As inferred by macroscopic as well as residue-level methods, the conformations of the membrane-bound protein range from native-like to molten globule-like states. However, the regions anchoring the protein to the membrane are similar and restricted to amphiphilic α -helices. H/²H-exchange experiments also yield residue-level data that constitute comprehensive information providing a new point of view on the thermodynamics of the interactions between the protein and the membrane.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: protein–membrane interactions; amphitropic proteins; α -lactalbumin; lipid vesicles; thermodynamics

† A.C. & G.V. contributed equally to this work.

Present address: P. Savarin, Laboratoire "Structure et reconnaissance des biomolécules", Département de Biologie, Université d'Évry Val d'Essonne, Bd François Mitterrand, 91025 Évry cedex, France.

Abbreviations used: BLA, bovine α -lactalbumin; aBLA, apo BLA; (D)aBLA, deuterated apo BLA; hBLA, holo BLA; LUVs, large unilamellar vesicles; *pF*, protection factors; SUVs, small unilamellar vesicles; ⁻SUVs, anionic SUVs; [±]SUVs, zwitterionic SUVs; MG, molten globule; EPC, egg phosphatidylcholine; EPA, egg phosphatidic acid.

E-mail addresses of the corresponding authors: chenald@dsvidf.cea.fr; forge@dsvsud.cea.fr

Introduction

Beside transmembrane proteins, some soluble proteins, the so-called amphitropic or peripheral proteins, are driven to interact with membranes at one stage of their biological activity. Such interactions between proteins and membranes regulate key biological functions such as apoptosis,¹ cell growth,² signal transduction³ and endocytosis.⁴ They also play an essential role during membrane fusion,^{5,6} protein translocation,⁷ secretion,⁸ and the initial steps of membrane protein refolding.^{9,10} These interactions, which modulate the structure and subsequently the function of these proteins, are highly dependent on the physicochemical

properties of the membrane such as its curvature and the charge of lipid head groups.^{11–16} Due to a lack of appropriate experimental procedures, the structural changes required for the binding of amphitropic proteins to membranes and, moreover, their structural changes in response to modifications of the physicochemical properties of the lipid bilayer remain largely unknown. Apart from structural characterisation, a better knowledge of the thermodynamics of the interaction is also needed to understand how the membrane properties modify the behaviour of these proteins.

α -Lactalbumin can be classified among amphitropic proteins, because it is a soluble protein, which is driven to interact with membranes to achieve some of its physiological functions. Its most documented function is its participation in the synthesis of lactose, through the regulation of β -1,4-galactosyltransferase activity, a Golgi resident membrane-bound enzyme.^{17–19} It has been proposed that the interaction of α -lactalbumin with membranes is involved in the regulation of lactose synthesis.^{20,21} α -Lactalbumin is also secreted in milk. This is the major protein in human breast milk and several functions have been ascribed to α -lactalbumin during the neonatal period.²² α -Lactalbumin is involved in the protective effect of breastfeeding during childhood, such as protection against some gastric mucosal injuries.^{23,24} Proteolytic fragments of α -lactalbumin display antibiotic activities.^{25,26} α -Lactalbumin also induces apoptosis in tumour cells while fully differentiated cells remain unaffected.^{27–30} These properties require physical interactions between α -lactalbumin and membranes of targeted cells and subcellular compartments.

Bovine α -lactalbumin (BLA) is a 123 amino acid residue protein, and its solution structure is organised in two domains, stabilised by four disulphide bridges.³¹ The β -domain contains a three-stranded β -sheet, a 3_{10} -helix and a long loop. The α -domain is made of four α -helices (α A, α B, α C and α D) and a 3_{10} -helix. The stability of the protein is increased upon binding of calcium as a cofactor to an EF hand-like site located between the 3_{10} -helix of the β -domain and α C.³¹ However, the binding of calcium has no major effect on the native structure of BLA. The interactions of BLA with large unilamellar vesicles (LUVs) as well as with small unilamellar vesicles (SUVs) has been the subject of numerous studies.^{21,32–39} The amphiphilic α -helices α A and α C have been identified as the anchoring sites of BLA to SUVs by photochemical labelling and more recently by H/²H-exchange experiments.^{32,35} However, the state of the membrane-bound protein is still unclear. In most cases the bound state is described as a molten globule-like state. However, numerous other articles have reported the persistence of tertiary structure within the membrane-bound state. It is noteworthy that SUVs are used as membrane models in these studies,²¹ while either SUVs or LUVs are used in the studies describing a molten globule-like state.^{33,35}

Indeed, both kinds of lipid vesicles, SUVs and LUVs, are often used in an undifferentiated way for the investigation of the membrane-bound state of BLA. This can be generalised to studies of interactions between proteins and membranes in general. We believe that this may lead to apparent discrepancies between the results reported in different papers. Indeed, the curvature of the lipid bilayer is very likely to have an effect on the interactions between the protein and the membranes and on the state of the bound protein.^{11,40}

We propose an exhaustive study of the interactions of BLA with lipid vesicles. The effects of the proton and calcium concentrations together with those of the physicochemical properties of the lipid bilayer, such as the curvature and the charge of the membrane, are investigated. We also present H/²H-exchange experiments performed to characterise the state of BLA when bound to LUVs and its site of interaction with the membrane. These results are compared with those published earlier on the state of the protein bound to SUVs. The H/²H-exchange experiments in the presence of LUVs also afford insight into the thermodynamics of the interactions of BLA with the membranes. This provides a new point of view on the thermodynamics of the interactions between proteins and membranes.

Results

Binding of BLA to LUVs

Two diameters of lipid vesicles were used: SUVs with a diameter of 50 nm and LUVs with a diameter of 150 nm (see Materials and Methods). The binding of the protein to LUVs was monitored by centrifugation. Partitioning experiments were done at a constant lipid/BLA ratio of 300. The binding of the apo-form (aBLA) and holo-form of BLA (hBLA), i.e. in the absence and in the presence of calcium, was studied. With zwitterionic LUVs (\pm LUVs), no binding was detected (Figure 1(a), triangles down). With anionic LUVs ($^-$ LUVs), aBLA was bound to lipid vesicles between pH 6 and 3 (Figure 1(a), triangles up). Between pH 4 and pH 3 the protein was completely bound to the $^-$ LUVs. Then, aBLA was progressively released at pHs lower than three when egg phosphatidic acids (EPAs) (EPA's $pK_a=2.9$) became protonated, thus neutralising the $^-$ LUVs. Taken together with the fact that no binding was detected in the presence of \pm LUVs, these data strongly suggest that the binding of BLA to LUVs requires electrostatic interactions, especially, the presence of anionic lipids. The calcium-containing BLA, hBLA, started to bind the $^-$ LUVs only below pH 4 (Figure 1(a), squares) and the binding was almost immediately inhibited by the protonation of EPAs.

In order to gain further insight into the binding of aBLA to $^-$ LUVs at pH 3.4, the partition was monitored either by centrifugation or by fluorescence. As reported by others,^{21,32–39} the binding of

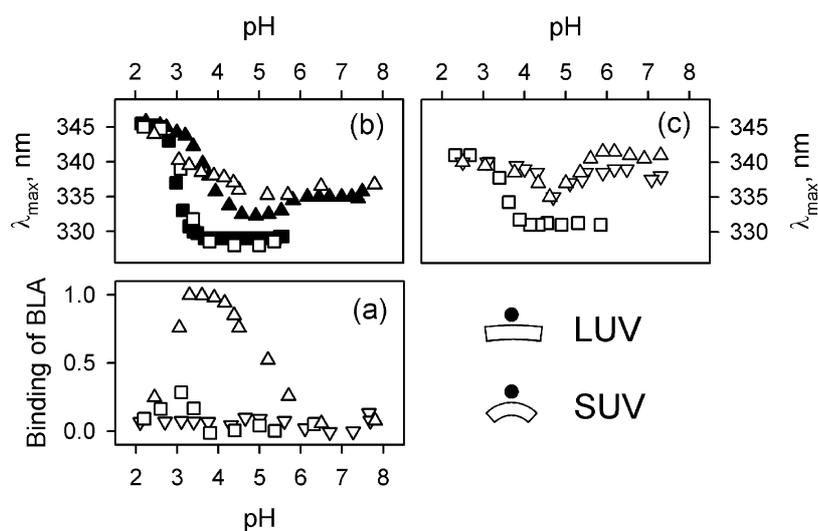


Figure 1. Effect of pH and calcium on the interaction of BLA with lipid vesicles. (a) Experiments on partitioning of BLA (1 μ M) between the buffer and LUVs (300 μ M lipids) as a function of pH studied by ultracentrifugation. (b) pH-induced λ_{max} changes of BLA (1 μ M), in the absence or presence of LUVs (300 μ M lipids). (c) pH-induced λ_{max} changes of BLA (1 μ M), in the absence or presence of SUVs (300 μ M lipids). aBLA and hBLA were obtained by addition of 5 mM EDTA and 10 mM CaCl_2 , respectively. The symbols represent respectively: aBLA (triangles); hBLA (squares); in the absence of membrane (filled symbols); in the presence of

LUVs or SUVs (EPC/EPA: 9/1 mol/mol) (open squares and open triangles up); in the presence of SUVs (EPC only) (open triangles down). In the bottom right corner, the size of BLA (5 nm) and the bilayer thickness (6 nm), as well as the curvature of a LUV (150 nm diameter) and a SUV (50 nm diameter), are sketched using the same scale.

BLA to LUVs induces changes in the intrinsic fluorescence of the protein. Figure 2(a) shows the amount of BLA bound to LUVs as a function of the lipid/BLA ratio according to centrifugation

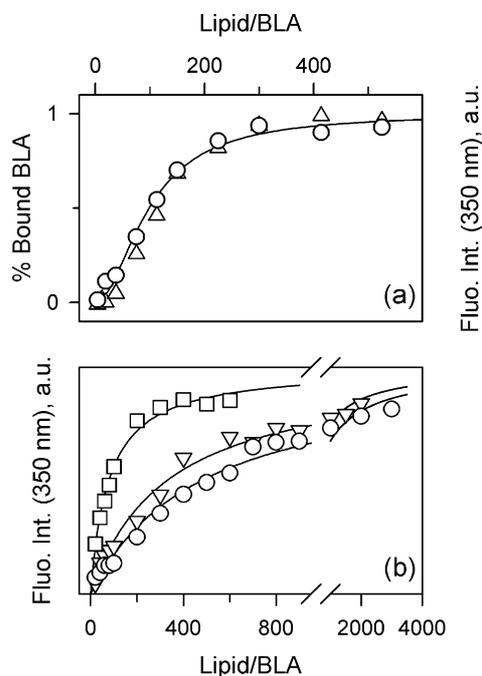


Figure 2. Effect of membrane curvature on the partitioning of BLA. (a) Experiments on partitioning of aBLA in the presence of LUVs at pH 3.4 followed by centrifugation (triangles) or by fluorescence (circles). (b) Experiments on partitioning of aBLA in the presence of SUVs followed by fluorescence at pH 7 (circles), 6.1 (triangles) and 4.7 (squares). Lipid/BLA is the ratio between the lipid and protein concentrations. The lines are the best fits of binding isotherm to the experimental data (see Materials and Methods for details).

experiments and to the changes of the fluorescence intensity at 350 nm. The two curves are similar; the binding seems cooperative and the apparent dissociation constant K_{LUV} is 98 μ M with a Hill coefficient around 2. One can note that for a lipid/BLA ratio equal to 300 (i.e. the one used for most of the experiments), more than 90% of the protein is bound to the LUVs.

The maximum emission wavelength of the intrinsic fluorescence spectrum of the protein (λ_{max}), which is sensitive to the tryptophan environment, was used to follow the structural changes of the protein either in solution or in the presence of lipid vesicles. In solution a partially folded state of both aBLA and hBLA is stabilised at pH 2. For comparison with the fluorescence changes monitored in the presence of lipid vesicles, the pH-induced conformational change in solution was also recorded using the fluorescence changes. The aim of this analysis was also to facilitate the comparison with the behaviour of the protein in the presence of SUVs, as we will see later. For pHs above 6, aBLA in solution had a λ_{max} at 335 nm (Figure 1(b); filled triangles). A small blue shift was observed between pH 6 and pH 5 (λ_{max} = 332 nm). We do not have a clear explanation for this effect. One possible explanation could be that proton binding to the calcium-binding site of aBLA stabilises a holo-like conformation of BLA. It has been shown that protons can inhibit the binding of calcium to BLA below pH 6 by direct competition for the calcium-binding site^{41,42} (Figure 1(b)). Finally, a red shift of λ_{max} from 332 nm to 345 nm was observed between pH 5 and pH 3. This shows that the tryptophan residues of the protein become more accessible to the solvent at acidic pH. This reflects the loss of tertiary structure, which leads to the formation of the MG state of BLA, stabilised around pH 3.

The pH-induced fluorescence changes of aBLA in the presence of $\bar{\text{LUVs}}$ were quite different from those recorded in solution (Figure 1(b); open triangles). However, their interpretation is not straightforward because several transitions are superimposed. The λ_{max} in the presence of $\bar{\text{LUVs}}$ (Figure 1(b); open triangles) started to be significantly different from that in solution below pH 6 (Figure 1(b); filled triangles). A kind of plateau was reached around pH 4 ($\lambda_{\text{max}}=338\text{--}339\text{ nm}$), before a second transition started up to the final λ_{max} (the same as the soluble MG state: 345 nm). The first transition can be attributed to the binding to $\bar{\text{LUVs}}$, according to partitioning experiments (Figure 1(a)); this implies that the MG state bound to $\bar{\text{LUVs}}$ has a λ_{max} around 337 nm. Hence, when the protein was bound to the membrane, the tryptophan residues were slightly less accessible to the solvent than in the MG state in solution. The second transition (from 337 nm to 345 nm) can be attributed to the appearance of the soluble MG state after the release of the protein from the membrane below pH 3 (see Figure 1(a)), due to the protonation of EPAs.

The pH-transition from the native state (329 nm) to the MG state (345 nm) of hBLA was monitored by fluorescence. The pH-transitions of hBLA in solution (Figure 1(b); filled squares) and in the presence of lipid bilayers (Figure 1(b); open squares) were superimposed whatever the charge of the vesicles; the equilibrium between the native state and the MG state of hBLA was not shifted in the presence of LUVs, although marginal partitioning was observed between pH 3.5 and pH 2.5 (Figure 1(a); open squares). The narrow pH-window of binding was delimited by the beginning of the pH-transition of hBLA (Figure 1(b), filled squares), leading to the release of the calcium and the accumulation of the MG state (able to bind $\bar{\text{LUVs}}$, as shown above for the MG state of aBLA) and by the protonation of EPAs. These results further support the fact that the MG state and electrostatic interactions *via* negatively charged lipids are required for the binding of BLA to LUVs.

Binding of BLA to SUVs

The partitioning of BLA in the presence of SUVs cannot be monitored by centrifugation because the density of these vesicles is close to that of water. However, as illustrated with LUVs, the binding of BLA to lipid bilayers can also be monitored by fluorescence. The pH dependence of λ_{max} in the presence of SUVs is shown in Figure 1(c). In the presence of $\bar{\text{SUVs}}$ (triangles up), λ_{max} of aBLA was above 340 nm for pHs between 6 and 7, instead of 335 nm in solution (Figure 1(b), filled triangles), suggesting that the interaction with $\bar{\text{SUVs}}$ in these conditions is already possible and induces a partial unfolding of the protein. A nearly symmetric effect was then observed around pH 4.5, the pI of BLA. Between pH 6 and pH 2, λ_{max} evolved from 340 nm to 334 nm at pH 4.5 and returned to 340 nm as the

pH decreased toward three. Interestingly, the pH dependence of λ_{max} in the presence of $\pm\text{SUVs}$ (Figure 1(c); triangles down) had a pattern similar to that observed in the case of $\bar{\text{SUVs}}$ (Figure 1(c); triangles up). This implies that BLA also binds to $\pm\text{SUVs}$ and, therefore, the presence of anionic phospholipids is not essential for the binding to SUVs. The most significant difference between $\pm\text{SUVs}$ and $\bar{\text{SUVs}}$ was a smaller shift of the λ_{max} at alkaline pH. In the case of the holo-form (Figure 1(c); squares), the pH dependence of λ_{max} was similar to that in the absence of SUVs (Figure 1(b); filled squares), except for the value of λ_{max} at pH 2, which was different from that of the MG state in solution (340 nm instead of 345 nm). This value was similar in the case of aBLA and did not depend on the charge of the lipid bilayer interface (Figure 1(c), triangles below pH 3). Therefore, below pH 3, the MG state of both hBLA and aBLA bound to membranes, whatever the charge of the SUVs. This is in contrast with the observation made in the presence of LUVs, which only bind BLA in the presence of anionic lipids (see above).

Around pH 4.5, the value of λ_{max} in the presence of SUVs (335 nm) was close to that of the protein in solution. There are two possibilities to explain this observation: either the protein is released from the membranes or the protein remains bound to the SUVs and the tryptophan residues are in an environment more hydrophobic than at the other pHs. To check this point, partitioning experiments recorded by fluorescence were performed at various pHs: 4.7, 6.1 and 7 (Figure 2(b); squares, triangles and circles, respectively). The pH was set at 4.7 instead of 4.5, the optimum for the blue shift of λ_{max} in the presence of SUVs (Figure 1(c)), in order to increase the fluorescence change induced by the binding. The apparent dissociation constant depended on the pH: $K_{\text{SUV}}=480\text{ }\mu\text{M}$ at pH 7, $330\text{ }\mu\text{M}$ at pH 6.1 and $80\text{ }\mu\text{M}$ at pH 4.7 (Figure 2(b)). Unlike the binding to LUVs, the binding to SUVs was not cooperative. The value of λ_{max} at saturation of the binding at pH 6.1 and pH 7 was around 350 nm. The apparent affinity of the binding was slightly higher at pH 6.1 than at pH 7. As a consequence, at the lipid/BLA ratio used to study the pH dependence of the binding of aBLA to SUVs (Lipid/BLA=300) (Figure 1(c)), the amount of bound BLA was higher at pH 6.1 than at pH 7. This explains the slight red-shift of λ_{max} detected from pH 7 to pH 6.1 in Figure 1(c). At pH 4.7, the affinity of the binding was much higher, and the value of λ_{max} was around 338 nm when the binding curve reached a plateau (Figure 2(b); squares). At the pI of BLA, the value of λ_{max} was around 335 nm in solution. Therefore, at least two forms of binding to SUVs can be distinguished. For pHs above 6, the binding is of moderate affinity and the tryptophan residues are quite accessible to the solvent when the protein is bound. The state of the protein bound to SUVs at pH lower than 4 is likely to be similar to that at alkaline pH. For pHs around 4.5, the protein is globally uncharged, its affinity for SUVs is quite

high and the tryptophan residues remain in a hydrophobic environment upon binding. Taken together, the fluorescence changes induced by the binding of BLA to lipid vesicles show that BLA can adopt various structures, which depend on the properties of the lipid bilayer (curvature and charges) and of the bulk solution (calcium and proton concentrations).

Structure of BLA bound to LUVs

We used circular dichroism in the far and near-UV to gain further insight into the structural changes involved in the interaction (Figure 3). At neutral pH, aBLA in solution is in the native state and possesses both tertiary and secondary structures. The presence of a signal in the near-UV with a minimum around 270 nm is indicative of the presence of the native tertiary structure of BLA (Figure 3(a); red line). The shape of the spectrum in the far-UV, with a minimum around 222 nm and a second one around 208 nm, is typical of a protein with a high amount of α -helices (Figure 3(b); red line). At pH 2, BLA is completely stabilised in the MG state in solution and its far-UV spectrum remains typical of α -helical secondary structures (Figure 3(f); black line), while the near-UV signal vanished as an indication of the destabilisation of the tertiary structure (Figure 3(e); black line). These

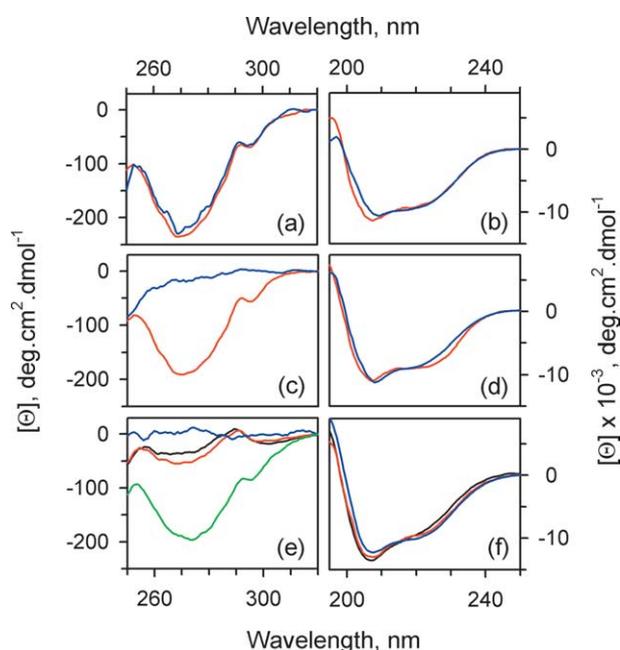


Figure 3. Effect of the presence of $\bar{\text{LUVs}}$ on the CD spectra of aBLA. (a), (c) and (e) Near-UV spectra. (b), (d) and (f) Far-UV spectra. (a) and (b) Spectra at pH 7.5. (c) and (d) Spectra at pH 4. (e) and (f) Spectra at pH 3.4. BLA in the absence of LUVs (red line); in the presence of $\bar{\text{LUVs}}$ (Lipid/BLA=300) (blue line). In (e) and (f), the spectra of the MG state at pH 2 are also shown (black line). In (e), the near-UV spectrum of the protein bound to $\bar{\text{LUVs}}$ at pH 3.4 and recovered upon addition of 10 mM CaCl_2 and a pH jump up to 4.1 is shown (green line).

are the main characteristics of the MG state, which contains native-like secondary structures but lacks a stable tertiary structure.⁴³

The spectra of BLA at pH 7.5 in the presence of $\bar{\text{LUVs}}$ are shown in Figure 3(a) and (b) (blue lines). At this pH, aBLA was not bound to $\bar{\text{LUVs}}$ according to partitioning experiments (Figure 1(a); triangles up) and kept its native structure, both secondary and tertiary. At pH 3.4 and pH 4, BLA was bound to $\bar{\text{LUVs}}$ (Figure 1(a); triangles up). At pH 4 aBLA was still mostly native in the absence of vesicles (Figure 3(c) and (d); red lines) and the addition of $\bar{\text{LUVs}}$ induced the stabilisation of the MG state (Figure 3(c) and (d); blue lines). Indeed, in the presence of $\bar{\text{LUVs}}$, there was no signal in the near-UV spectrum while the far-UV spectrum remained native-like (Figure 3(c) and (d); blue lines). This indicates that, at this pH, the native structure of aBLA can be destabilised to the benefit of the MG state by the binding to $\bar{\text{LUVs}}$. At pH 3.4, aBLA was already in the MG state in solution and the CD spectra were similar to those obtained at pH 2 (Figure 3(e) and (f), red lines). The protein remained in the MG state at pH 3.4 in the presence of $\bar{\text{LUVs}}$ (Figure 3(e) and (f); blue lines). However, when the spectra of the MG state either in solution or bound to $\bar{\text{LUVs}}$ were compared (Figure 3(e) and (f)), it seemed that there was a small signal in the near-UV for the MG state in solution (black and red lines) that disappeared in the presence of $\bar{\text{LUVs}}$ (blue line). There are two possible explanations: either a residual tertiary structure in the MG state in solution vanished upon binding to $\bar{\text{LUVs}}$, or the sensitivity of the measurement in the presence of lipid bilayers was too low. The two explanations are not mutually exclusive. The binding of aBLA to $\bar{\text{LUVs}}$ at pH 3.4 was reversible. The native structure of the protein was recovered upon the addition of calcium concomitantly with a pH jump up to 4.1 (Figure 3(e); green line). The reversibility of the binding will be particularly important when performing the $\text{H}/^2\text{H}$ -exchange experiments described later.

Structure of BLA bound to SUVs

The near-UV CD spectra of aBLA in the presence of $\bar{\text{SUVs}}$ at various pHs are shown in Figure 4(a). No larger changes than those described in the previous Figure were detected in the far-UV spectra (data not shown). The CD experiments were done with a lipid/BLA ratio of 300 to minimise light-scattering by the lipid vesicles. For such a ratio at pH 6.1 and pH 7, aBLA is not fully bound to the SUVs (Figure 2(b)). In addition, part of the signal is lost at these pHs (Figure 4(a); blue and red broken lines). The spectra in the absence of $\bar{\text{SUVs}}$ are shown for comparison (Figure 4(a); blue and red continuous lines). As shown in Figure 4(b), the percentage of the remaining signal in the near-UV at pH 6.1 and pH 7 in the presence of SUVs (Figure 4(a)) is correlated with the percentage of aBLA still in solution for a lipid/BLA ratio equal to

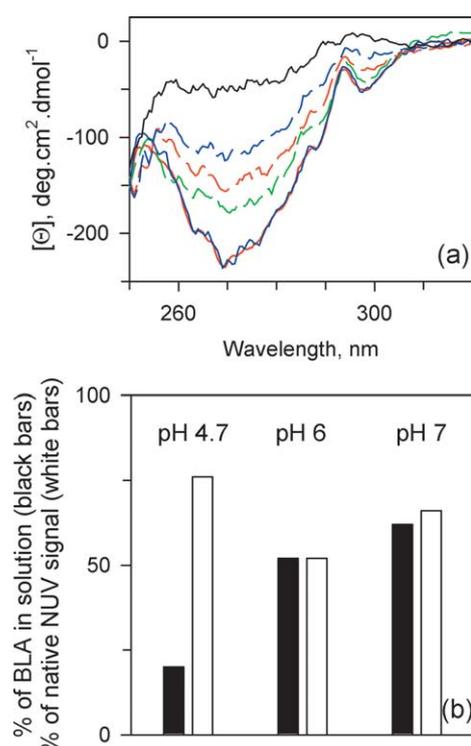


Figure 4. Effect of the presence of $\bar{\text{SUVs}}$ on the CD spectra of aBLA. (a) Near-UV spectra of aBLA (1 μM) in solution at pH 7 (continuous red line) and 6.1 (continuous blue line), and in the presence of $\bar{\text{SUVs}}$ (300 μM) at pH 7 (red broken line), 6.1 (blue broken line), 4.5 (green broken line) and 2 (black line). (b) Comparison between the remaining aBLA (black bars, 1 μM initial) in solution in the presence of $\bar{\text{SUVs}}$ (300 μM) (taken from Figure 2(b)) and the intensity of the near-UV signal at 270 nm (white bars, taken from (a)).

300 (taken from Figure 2(b)). This suggests that the protein bound to SUVs at these pHs has lost its tertiary structure. At pH 4.5, although a large majority of aBLA is bound to the SUVs at the lipid/BLA ratio used, a significant signal was still detected in the near-UV (Figure 4(a); green broken line). The amplitude of the signal was much higher than expected from the amount of protein still in solution in the conditions used (Figure 4(b)). This implies that aBLA bound to SUVs around pH 4.5 retains some tertiary structure.

The state of aBLA bound to SUVs at pH 4.5 is quite different from that bound to $\bar{\text{LUVs}}$ around pH 3–4. In the first case, the tryptophan residues are in a hydrophobic environment (Figure 1(c)) and tertiary structure elements remains (Figure 4), suggesting a native-like topology, while the protein bound to $\bar{\text{LUVs}}$ is in a MG-like state with the tryptophan residues quite accessible to the solvent (Figures 1(b) and 3(c)). The state of aBLA bound to $\bar{\text{SUVs}}$ at pH 4.5 has been recently characterised by $\text{H}/^2\text{H}$ -exchange methods.³⁵ As we settled an experimental approach to study the thermodynamics of aBLA interacting with $\bar{\text{LUV}}$, we

used our $\text{H}/^2\text{H}$ -exchange measurements to compare more accurately the effect of the membrane curvature on the states of the bound protein.

Identification of the interaction site of aBLA with $\bar{\text{LUVs}}$ by $\text{H}/^2\text{H}$ -exchange experiments

As described above, aBLA bound to $\bar{\text{LUVs}}$ adopts a MG-like state. In order to characterise the conformational changes that occur in the MG state leading to the binding to $\bar{\text{LUVs}}$, we performed $\text{H}/^2\text{H}$ -exchange experiments on the MG state in solution and bound to $\bar{\text{LUVs}}$, respectively. For a direct comparison it was important that both experiments were done at the same pH, as intrinsic $\text{H}/^2\text{H}$ -exchange rates are highly sensitive to pH.⁴⁴ The experiments were done at pH 3.4. At this pH, aBLA in solution was in the MG state according to the CD spectra (Figure 3(e) and (f); red line), and in the presence of $\bar{\text{LUVs}}$ the protein was completely bound to the membranes (Figure 1(a): triangles up, and Figure 2(a)).

The protocols of the $\text{H}/^2\text{H}$ -exchange experiments are detailed in Materials and Methods. In the initial state of the $\text{H}/^2\text{H}$ -exchange experiment the protein is fully deuterated, i.e. every labile amide group is deuterated. The exchange was done in H_2O . Therefore, the deuterons of the amide groups are exchanged for hydrogens. After a given time, the amount of the exchange for each residue depends on its accessibility to the solvent, which is related to the stability of the local structure. Following the $\text{H}/^2\text{H}$ exchange on aBLA, soluble or bound to $\bar{\text{LUV}}$, the amount of ^2H exchanged for H was only measured after returning the protein to its soluble holo-form (see Materials and Methods). This was done because it is necessary to record the NMR spectra with the most stable state of the protein to avoid significant exchange during the monitoring. As a consequence, residues not protected against the exchange in the holo-form could not be monitored. They were not even observed since the samples were dissolved in $^2\text{H}_2\text{O}$ to record the NMR spectra. The resonances of 18 amides were identified in the NMR spectra, and their intensities measured as a function of the time of exchange. Other amides monitored in previous studies were not detected in our spectra, due to overlapping with resonances attributed to residual phospholipids, or could not be assigned with assurance. Examples of NMR spectra are shown in Figure 5. Experiments in the presence of $\bar{\text{LUVs}}$ and control experiments on the soluble MG state are both shown (pH 3.4). For the shortest times of $\text{H}/^2\text{H}$ -exchange the protein was still predominantly deuterated, and then the peaks detected in the NMR spectra were quite weak. As the $\text{H}/^2\text{H}$ -exchange was ongoing the peak intensities corresponding to the residues monitored in this experiment increased. After 100 minutes of $\text{H}/^2\text{H}$ -exchange most of the peaks had recovered their intensities. Most of the peaks had similar intensities whether the $\text{H}/^2\text{H}$ -exchange experiments were done in the presence of $\bar{\text{LUVs}}$ or not

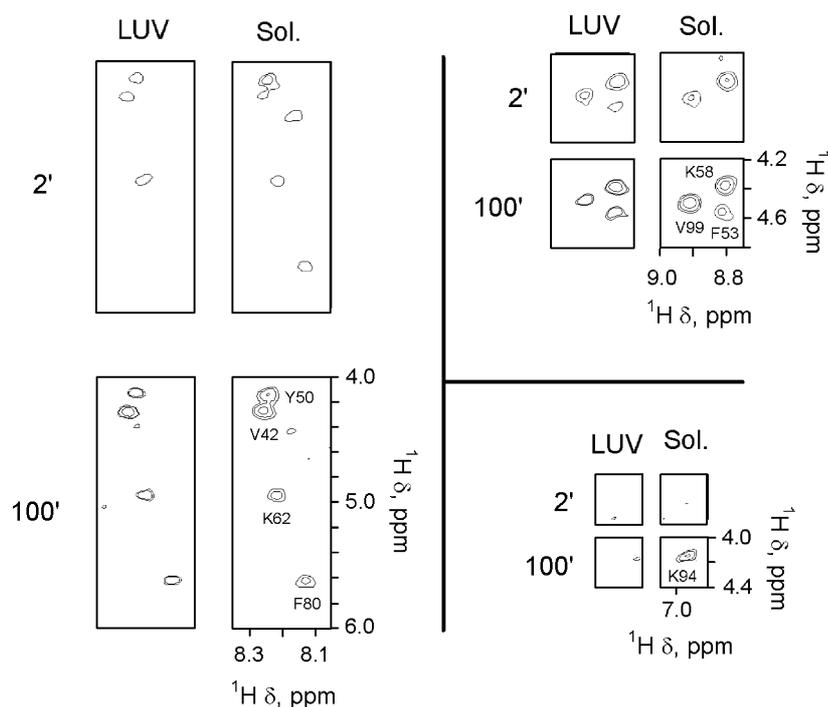


Figure 5. H/ 2 H-exchange experiments followed by NMR. The samples were prepared and the NMR spectra recorded as explained in Materials and Methods. Three sets of peaks are shown. For the three of them the left column shows the results of the experiments in the presence of $\bar{\text{LUVs}}$ and the right column those in solution. The top spectra are those obtained after two minutes of H/ 2 H-exchange and the bottom ones after 100 minutes. The assignment of the peaks is given in the spectra of the samples corresponding to 100 minutes of H/ 2 H-exchange on the MG state in solution.

(Figure 5). There were, however, a few exceptions. After 100 minutes of H/ 2 H-exchange the peak assigned to Val99, for instance, had a much lower intensity in the spectrum of the experiment in the presence of $\bar{\text{LUVs}}$ than in the control experiment in solution (Figure 5). This is even more striking in the case of Lys94. Its resonance was not detected after 100 minutes of exchange in the presence of $\bar{\text{LUVs}}$, while it was native-like in the control experiment.

Examples of exchange kinetics are shown in Figure 6. The effect of the binding to the membrane was not homogenous throughout the structure of the protein. Some of the residues had faster

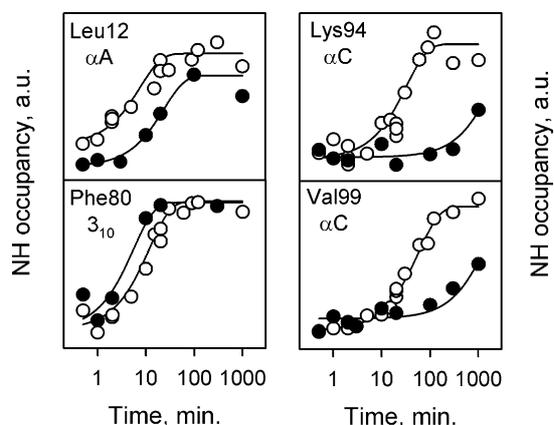


Figure 6. Comparison of hydrogen exchange kinetics of labile amide hydrogen atoms in the absence (open circles) and presence (filled circles) of $\bar{\text{LUVs}}$ at pH 3.4. Intensities of cross-peaks in the NMR spectra as a function of H/ 2 H-exchange time are reported. The continuous lines are the best fits of single exponential decays to the data.

exchange kinetics in the presence of membranes, while others had slower kinetics. As seen in the NMR spectra (Figure 5), the residues Lys94 and Val99 had obviously slower H/ 2 H-exchange kinetics in the presence of $\bar{\text{LUVs}}$ (Figure 6). The data were fitted as single exponential decays in order to calculate the exchange rates (Table 1). The effect of the binding to membranes on the structure of the MG state was estimated for each residue by the ratio between the exchange rate in solution and the exchange rate in the presence of $\bar{\text{LUVs}}$ (Table 1). It was possible to probe most of the secondary structures of the protein (Figure 7(a)), except the α -helix α B, from which residues were not detected in NMR spectra and, hence, could not be monitored in the H/ 2 H-exchange experiments.⁴⁵ Ratios higher than 1 indicate that the residues were more protected in the presence of $\bar{\text{LUVs}}$ than in solution. Only residues belonging to the α -helices α A and α C were in that case (Table 1 and Figure 7(a)). The ratios were around 10 for α A and 30 for α C. For the residues belonging to the β -domain the ratios were around 0.5 (Table 1 and Figure 7(a)). Interestingly, the ratios were quite homogenous all over the β -domain (Table 1).

Comparison between H/ 2 H-exchange kinetics recorded for BLA in the MG state either in solution or in the presence of $\bar{\text{LUVs}}$ shows that the anchoring sites of the protein to the membrane are the two amphiphilic α -helices. This is in agreement with the requirement of electrostatic interactions for the binding of aBLA to $\bar{\text{LUVs}}$. However, an important question still remains. Why is the equilibrium between the native state and the MG state shifted in the presence of membranes for aBLA but not for hBLA? The H/ 2 H-exchange experiments

Table 1. Hydrogen exchange rates of BLA amide groups in solution (k_{MG}), in the presence of LUVs (k_{LUV}) and their corresponding ratios: k_{MG}/k_{LUV}

Residue	k_{MG} (min^{-1})	k_{LUV} (min^{-1})	k_{MG}/k_{LUV}
<i>α-Helix A</i>			
Val8	3.3×10^{-2}	3.8×10^{-3}	9
Leu12	1.3×10^{-1}	4.2×10^{-2}	3
<i>β-Sheet</i>			
Val42	4.3×10^{-2}	5.9×10^{-2}	0.7
Thr48	8.5×10^{-1}	Too fast	<0.6
Tyr50	7.1×10^{-2}	1.35×10^{-1}	0.5
Phe53	7.4×10^{-2}	7.8×10^{-2}	0.9
<i>Long loop</i>			
Lys58	5.3×10^{-1}	Too fast	<0.4
Ile59	7.1×10^{-2}	2.4×10^{-1}	0.3
Cys61	2.2×10^{-1}	6.3×10^{-1}	0.4
Lys62	3.8×10^{-1}	8.8×10^{-1}	0.4
Cys73	4.7×10^{-1}	7.5×10^{-1}	0.6
Ile75	7.6×10^{-2}	1.5×10^{-1}	0.5
<i>3_{10}-Helix</i>			
Phe80	8.5×10^{-2}	1.8×10^{-1}	0.4
Leu81	1.3×10^{-1}	3.7×10^{-1}	0.4
<i>Calcium site</i>			
Asp82	Too fast	Too fast	-
<i>α-Helix C</i>			
Lys94	2.3×10^{-2}	5.1×10^{-4}	45
Lys98	1.2×10^{-1}	6.0×10^{-3}	20
Val99	1.7×10^{-2}	6.5×10^{-4}	26

The relative error for the ratios of exchange rates is 30%. The fastest rate accessible with our procedure is 1.5 min^{-1} . This value is used to calculate the limit of the ratio when needed. In the presence of $\bar{\text{LUVs}}$, the exchange of the residues belonging to αC is so slow that the kinetics are not finished after our longest experimental time. In that case, in order to estimate the exchange rate, we assume that the amplitudes of the kinetics are the same in the absence and presence of $\bar{\text{LUVs}}$. This assumption is verified for the residues that can be fully monitored in both conditions.

provide the possibility of gaining insight into the thermodynamics of the interaction and should help to answer this question.

Thermodynamics of the membrane interaction

Binding kinetics of aBLA to $\bar{\text{LUVs}}$ at pH 3.4, as well as release kinetics (by adding calcium and raising the pH to 4.1) were monitored by fluorescence (data not shown). The binding rate in our conditions was $2.9 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ and the release rate was $2.4 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$. Both the binding and the release rates are much faster than the intrinsic $\text{H}/^2\text{H}$ -exchange kinetics (around 10^{-3} s^{-1} at pH 3.4) in our experiments.⁴⁴ Therefore, we can consider that the $\text{H}/^2\text{H}$ -exchange follows a so-called EX2 mechanism, which allows the characterisation of the thermodynamics of the interaction.⁴⁶ The observed $\text{H}/^2\text{H}$ -exchange rates are controlled by the equilibrium between a closed conformation (with the amide groups unavailable for exchange) and an open conformation (with the amide groups available for exchange). Then, the protection factors (pF) are linked to the free energy difference between the two conformations: $\Delta G = -RT \ln(pF)$.⁴⁶ For proteins in solution, the exchange of the most protected NHs requires the global unfolding of the protein. Then

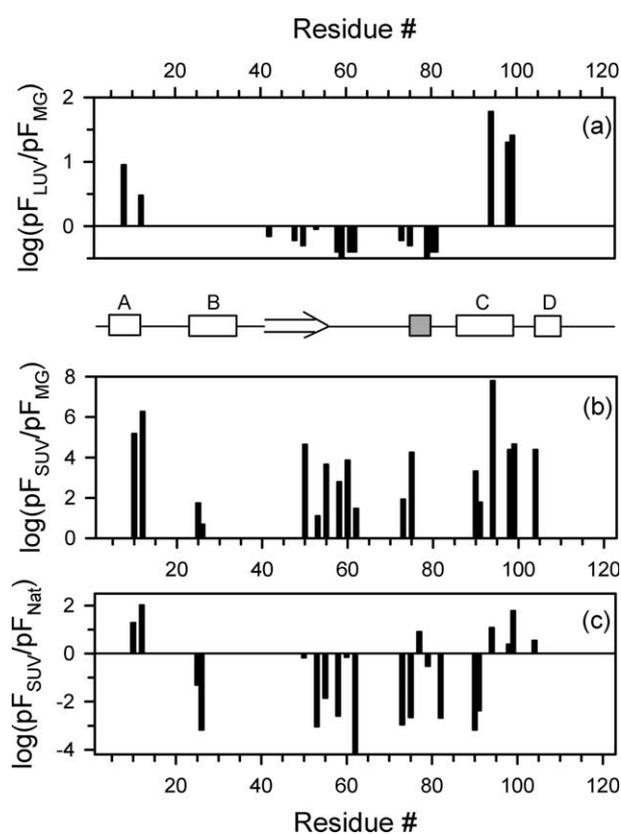


Figure 7. Effect of membrane binding on the $\text{H}/^2\text{H}$ -exchange protection pattern. Ratios of the protection factors in the presence of $\bar{\text{LUVs}}$ (pF_{LUV}) and in the absence of lipid vesicles (pF_{MG}) calculated by dividing the $\text{H}/^2\text{H}$ -exchange rates of the MG state in the absence of $\bar{\text{LUVs}}$ (k_{MG}) by the exchange rates in the presence of $\bar{\text{LUVs}}$ (k_{LUV}). The same calculations are done for the protection factors in the presence of SUVs (pF_{SUV}) compared either to the MG state (pF_{MG}) or the native state (pF_{Nat}). The values of k_{MG} and k_{MG-LUV} for the residues monitored here are reported in Table 1. The values of k_{SUV} are taken from Muga and colleagues.³⁵ The diagram locates the distribution of the four helices A to D (rectangles), the beta sheet region (arrow) and the 3_{10} -helix of the calcium-binding site (grey square) in BLA.

the ΔG calculated for the highest protection factors are in agreement with the ΔG obtained in analogous conditions from urea or guanidine-induced unfolding experiments.⁴⁶ In the case of BLA in solution, the ΔG s calculated from the highest protection factors measured for the native state as well as for the MG state⁴⁵ are in agreement with ΔG s obtained from equilibrium unfolding experiments⁴⁷ (Figure 8).

We investigated whether the same approach could be used to gain insight into the thermodynamics of the interaction between an amphitropic protein and a membrane. The reversibility of the membrane binding and the stability of the membrane system are two prerequisites to study the thermodynamics of protein-membrane interactions (see for instance Ladokhin *et al.*⁴⁸). From that point of view LUVs are more reliable than

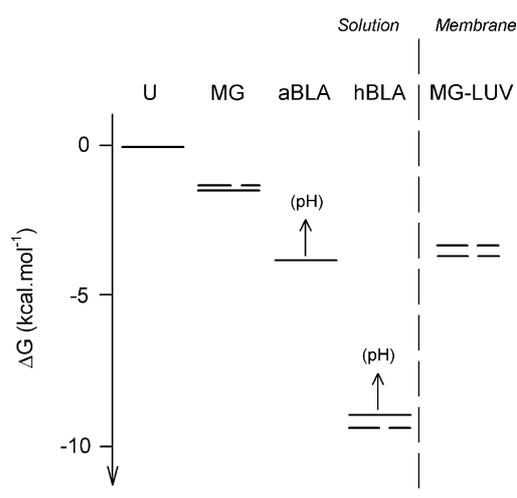


Figure 8. Stabilities of the various states of BLA. Continuous lines, Values of ΔG deduced from guanidine-induced unfolding experiments (taken from Paterson *et al.*⁵¹). Broken lines, Values of ΔG deduced from H/²H-exchange experiments either in solution (calculated according to the protection factors given by Halskau *et al.*³⁵) or bound to ⁻LUVs. The ΔG values are: $-1.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ (guanidine) or $-1.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ (H/²H-exchange) for the MG state; $-3.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ (guanidine) for aBLA; $-8.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ (guanidine) or $-9.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ (H/²H-exchange) for hBLA. The stability of BLA in the presence of ⁻LUVs ($\Delta G_{\text{MG-LUV/U}}$) is the sum of $\Delta G_{\text{MG/U}}$ and $\Delta G_{\text{MG-LUV/MG}}$ (see the text). It gives $-3.3 \text{ kcal mol}^{-1}$, or $-3.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ when the protection factors are corrected for local conditions within the membrane interface. Both values are marked with broken lines in the MG-LUV column. ΔG deduced from the partitioning experiments is indicated with a dotted line.

SUVs as models of membranes. LUVs are a stable lipid bilayer system by contrast with SUVs, which are metastable.^{49,50} Concerning the reversibility, the CD and fluorescence results showed that the native state of aBLA is converted to an MG-like state at pH 3.4 able to bind ⁻LUVs (Figures 1 and 3). Addition of calcium and raising the pH to 4.1 reversed the bound state of aBLA to the soluble and native state of hBLA (Figure 3(e)). The reversibility of the “back and forth membrane binding” reaction is also evidenced by the recovery of the chemical shifts of our NMR spectra before and after H/²H-exchange experiments in the presence of membrane (see Figure 5 for details of NMR spectra).

As described for the stabilisation of proteins induced by the binding of ligands,⁵¹ the free energy of the stabilisation of the structure due to the binding to ⁻LUVs ($\Delta G_{\text{MG-LUV/MG}}$) can be estimated using as internal probes the residues with the highest ratio between the protection factors in the presence and absence of ⁻LUVs. The calculation is done using the equation:

$$\begin{aligned} \Delta G_{\text{MG-LUV/MG}} &= \Delta G_{\text{MG-LUV/U}} - \Delta G_{\text{MG/U}} \\ &= -RT \ln(pF_{\text{LUV}}/pF_{\text{MG}}) = -RT \ln(k_{\text{MG}}/k_{\text{LUV}}). \end{aligned}$$

The exchange rates, k_{MG} and k_{LUV} (in the absence and presence of ⁻LUVs, respectively) are given in Table 1. Considering the ratios of the most protected region αC (Figure 7(a) and Table 1), the value of $\Delta G_{\text{MG-LUV/MG}}$ is -2 kcal mol^{-1} (here we take for the ratio of pF the average $pF_{\text{LUV}}/pF_{\text{MG}}=30$ from all the residues of αC monitored in our experiment). One should keep in mind that this value represents the stabilisation of the MG state due to the binding to ⁻LUVs. The value of ΔG accounting for the stability of the MG state in solution ($\Delta G_{\text{MG/U}} = -1.3 \text{ kcal mol}^{-1}$) must be added to estimate the overall stability of the MG-like state bound to ⁻LUVs: $\Delta G_{\text{MG-LUV/U}} = \Delta G_{\text{MG-LUV/MG}} + \Delta G_{\text{MG/U}} = -3.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Figure 8). The meaning of these values for the behaviour of the protein in the presence of ⁻LUVs will be discussed in detail in Discussion.

Discussion

Conformational diversity of BLA bound to membranes

The interactions of BLA with lipid vesicles have been characterised in detail. As illustrated in Figure 9(a), these interactions depend on the pH, the state of the protein, the membrane curvature and can be interpreted in terms of electrostatic and hydrophobic interactions. Let us describe first the interactions of aBLA with ⁻LUVs. At alkaline pH, the protein is folded and negatively charged. There is no possibility of hydrophobic interactions. Instead, there is dominant electrostatic repulsion with the negatively charged membranes and no binding is possible. As the pH decreases the protein loses its negative charges and the MG state becomes more populated. Hydrophobic and attractive electrostatic interactions become possible and the protein binds to the bilayer. The protein is then in the MG state in order to optimise both electrostatic and hydrophobic interactions. It is noteworthy that the binding of BLA to ⁻LUVs starts at pH 6 when the protein is still negatively charged. However, the global charge is already significantly decreased and local attractive electrostatic interactions between basic side-chains and EPA head groups are likely. At pH below 3, the EPA head groups lose their negative charges and the binding vanishes (Figures 1(a) and 9(a)). This implies that hydrophobic interactions, which are still possible since aBLA is in the MG state, are not enough for the binding, electrostatic interactions with EPA also being necessary.

In the case of SUVs, binding of aBLA is observed over a broader range of conditions because of enhanced hydrophobic interactions (Figure 9(a)). Here arises the main difference between SUVs and LUVs, i.e. membrane curvature. As the diameter of lipid vesicles increases, the membrane curvature decreases, affecting the distribution of lipids between the outer and inner leaflets. The outer to

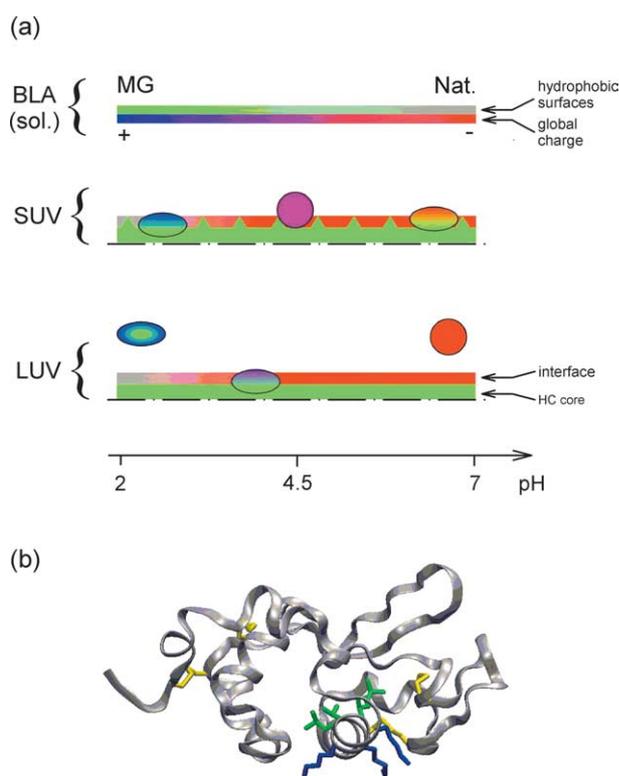


Figure 9. Illustration of the binding and conformational changes of BLA in the presence of lipid vesicles. (a) The state of the protein in the presence of lipid vesicles and the interactions involved are illustrated. The upper scale illustrates the pH dependence of the state of the protein in solution. The evolution from grey to green shows the appearance of hydrophobic regions on the surface of the protein upon the stabilisation of the MG state; the grey colour indicates the absence of such exposed hydrophobic regions when the protein is in the native state of aBLA. The blue-to-red scale indicates the pH dependence of the global charge of the protein: (blue) positive charge and (red) negative charge. The protein is drawn as a disk in the native state and as an ellipsoid for the MG state. In the case of the native state the colour of the disk corresponds to the global charge of the protein. In the case of the MG state two colours are shown: the red/blue one is related to the global charge of the protein and the green one illustrates the presence of hydrophobic regions on the surface of the protein. The outer leaflet is only shown for the membranes. The intensity of the red colour in the interface illustrates the amount of negative charge. The hydrophobic core is coloured green. The presence of green triangles in the membrane interface of SUVs indicates the occurrence of acyl groups in the interface (i.e. the possibility of hydrophobic interactions, see the text for explanations). (b) Three-dimensional structure of BLA (1HFZ).⁶⁷ The hydrophobic and basic side-chains of the residues located in the α -helix α C are shown as ball-and-stick structures. Basic and hydrophobic side-chains are shown in blue and green, respectively. The disulphide bridges are shown in yellow.

inner leaflet lipid ratio ranges from around 2/1 to 1/1 for SUVs and LUVs, respectively.⁵² The asymmetric distribution of lipids in SUVs leads to an increasing lipid order from the outer to the inner

leaflet, while the lipid packing of both leaflets of LUVs is equivalent.^{53–55} Hence, the lipid order is lower in the outer leaflet of SUVs than in LUVs.⁵⁶ In addition, the occurrence of the first methyl groups of the acyl chains within the membrane interface is enhanced as the bilayer curvature increases.⁵⁷ This leads to a higher exposure of hydrophobic acyl chains in the outer leaflet of SUVs as compared to LUVs (Figure 9(a)). Moreover, the lateral pressure exerted by the interfacial region and the acyl chains on the membrane-bound protein is also lower in the case of SUVs.^{58–61} Together, these properties favour hydrophobic interactions between the protein and the outer leaflet of SUVs. This effect is exemplified by the behaviour of BLA in the presence of SUV (Figure 9(a)). At alkaline pH, the binding of aBLA to SUV occurs despite the repulsive electrostatic interactions. Hydrophobic forces are strong enough to overwhelm the electrostatic repulsion. The MG state, which favours hydrophobic interactions, is stabilised at the expense of the native state. This is not observed for hBLA whose tertiary structure is more stable. The hydrophobic interactions are also preponderant at acidic pH and, in contrast to LUVs, the attractive electrostatic interactions with anionic phospholipids are not essential. Hence, the binding is still observed below pH 3. Surprisingly, around pH 4.5 (the pI of BLA), a native-like state is preserved upon binding to SUVs (Figures 4(b) and 7(c) and see discussion below). Figure 9(a) summarises how the membrane-bound states of BLA evolve through a conformational landscape, finely shaped by an ensemble of physicochemical parameters, such as the curvature and charge of the lipid bilayer, the presence of a cofactor (calcium) and the pH.

Conformation of BLA bound to SUVs at pH 4.5

The characterisation of the structure of BLA in interaction with $^-$ SUVs by H/²H-exchange methods has been recently reported.³⁵ The experiments were done at pH 4.5 and the holo-form of BLA was used. However, the calcium concentration was enough to saturate the binding site of BLA in solution but not to increase significantly the stability of the protein; to do so calcium concentrations on the order of millimolar are required,⁴³ as is the case for our experiments on the holo-form. Therefore, the conditions of these experiments are pretty similar to those described for the binding of aBLA to $^-$ SUVs at pH 4.5. If we consider the claim of the authors of this earlier study that BLA is in the MG state when bound to SUVs under these conditions, the same strategy as that described for the characterisation of the state bound to LUVs can be applied. Then, the ratio between the protection factors of the MG state in solution and those of the bound state are compared (Figure 7(b)). The protection factors obtained in the presence of $^-$ SUVs are between four and seven orders of magnitude larger than those of the soluble MG state and no clear pattern for the interacting region

can be detected. It looks like all parts of the protein in the MG state are engaged in the interaction in an equivalent way. This is unlikely. Rather this means that the H/ 2 H-exchange patterns of the MG state in solution and the state of BLA bound to $^-$ SUVs have no common features. In contrast to the claim of the authors of this earlier article, BLA is probably not in the MG state when bound to SUVs at pH 4.5.

According to CD spectra, BLA is in a native-like state when bound to SUVs at pH 4.5 (Figure 4). This is in agreement with earlier studies on the binding of BLA to SUVs.²¹ Moreover, in solution at pH 4.5 BLA is still in the native state (Figures 1 and 3). Therefore, the reference state in the study by Halskau *et al.*³⁵ must be the native state instead of the MG state. The ratios between the exchange rates of BLA in solution and membrane-bound can be calculated. As described in the presence of $^-$ LUVs, these ratios are equivalent to the ratios between the protection factors of the bound state and of the native state in solution (Figure 7(c)). For the majority of the residues, the protection factors of BLA bound to $^-$ SUVs are lower by four orders of magnitude than those of the native holo-form. Some of the residues are, however, less affected or gain protection against the exchange. They are located in the amphiphilic α -helices α A and α C, in the 3_{10} -helix of the calcium-binding site and in the β -domain. The largest protection factors are observed in α A and α C. Therefore, a clear pattern of interaction between the protein and the lipid bilayer is observed when the bound state is compared to the native state (Figure 7(c)) and not when the MG state is used as the reference state (Figure 7(b)). This confirms that BLA is in a native-like state when bound to $^-$ SUVs, while it is in the MG state when bound to $^-$ LUVs (Figure 4). However, the interacting site is pretty similar in both cases (Figure 7(a) and (c)). Hence, although the overall physicochemical parameters control the membrane-bound state of BLA, the same region of the protein carries the amphitropic character of the protein. This observation may be relevant to other amphitropic proteins.

Conformation of BLA bound to $^-$ LUVs

We used H/ 2 H-exchange experiments to identify the conformational changes undergone by the MG state bound to $^-$ LUVs. In classical H/ 2 H-exchange studies of a protein in a given state, the protection factors are determined from the H/ 2 H-exchange kinetics measured in that state compared to the exchange rate of the unfolded polypeptide.^{44,62} The native (the holo-form) and MG states of BLA in solution have already been characterised with these methods.⁴⁵ In the native state, the residues of both the α and the β -domains have high protection factors, as a result of the high stability of the native structure. In the MG state, which has a native-like topology,⁶³ only the α -helix α C exhibits effective protection against H/ 2 H-exchange.⁴⁵

In the presence of $^-$ LUVs, among the residues

monitored in this study only those located in the amphiphilic α -helices α A and α C gain protection against exchange in the presence of $^-$ LUVs (Figure 7(a)). This shows that these α -helices are the anchoring sites of the protein to the membrane. Protected residues have either hydrophobic or basic side-chains. This confirms the role of both hydrophobic and electrostatic interactions between the protein and the anionic phospholipids. There are two possibilities for a residue to be more protected in the presence of membranes: (i) the stability of the local secondary structure, in which the amide function of the residue is engaged, increases; and (ii) the residue is less accessible to the solvent. The effects we observe are probably the result of a combination of these two effects. One can notice here that α C, which displays the highest ratio of protection factors upon binding (Figure 7), is also the most stable region in the MG state in solution.⁴⁵

The H/ 2 H-exchange rate ratios of the residues belonging to the β -domain of BLA are around 0.5 (Table 1 and Figure 7(a)). These residues have slightly faster exchange kinetics when bound to $^-$ LUVs as illustrated by Phe80 (Figure 6). It is likely that the protection pattern of this region reflects differences in the local pH between the bulk and the bilayer interface rather than changes in the structure of the protein. Indeed, most of these residues already show protection factors around 1 for the MG state in solution.⁴⁵ Therefore, it is unlikely that such ratios reflect a further destabilisation of the β -domain due to the interaction with $^-$ LUVs. At the membrane surface the local pH can be more acidic by one or two units.^{64,65} Consequently the acid-catalysed H/ 2 H-exchange reaction occurs faster than in the bulk.^{44,62} Thus, the fact that all residues of the β -domain are affected in a similar way (Figure 7(a)) suggests that this domain remains close to the bilayer interface when the protein is bound to the membrane.

The requirement of both hydrophobic and electrostatic interactions explains the stabilisation of the MG state upon binding to $^-$ LUVs. The α -domain must open to expose the hydrophobic side-chains for interaction with the hydrophobic core of the membrane. Tertiary interactions between α -helices are broken in the process. Meanwhile the secondary structures are preserved, since the interaction occurs through α -helices. All these conditions are met in the soluble MG state. According to previous studies in solution, the secondary structure of the α -domain is conserved at acidic pH, but the native side-chain contacts between the α -helices are largely disrupted.⁴³ Then, the hydrophobic core of the α -domain becomes more accessible.⁴³ The energetic cost required for a conformational change, for instance an α -helix rotation, is lowered. This can be illustrated for α C (Figure 9(b)). In contrast to its position in the native state, the amphiphilic helix α C can rotate to make its hydrophobic residues available for contacts with the hydrophobic core of the membrane, and its basic side-chains for interaction with anionic

phospholipid head groups. One can imagine similar changes for αA at the membrane surface. Together, these conformational changes indicate that during the binding process, the structure of BLA evolves from a globular to a more expanded organisation. The native disulphide bridges do not prevent the opening of the α -domain and its sprawling on the membrane surface (Figure 9(b)). One can notice here that a way to check the sprawling of the α -domain in order to optimise the interactions between the amphiphilic helices and the membrane would be to add by mutagenesis a disulphide bridge between αC and the extremity of either αA or αB . It is obvious from Figure 9(b) that such a disulphide bridge would lock the α -domain.

Thermodynamics of the membrane interaction

According to the partition and fluorescence experiments, the transition between the native state of aBLA and the MG state occurs at more alkaline pHs in the presence of \bar{LUV} s than in the absence of membrane. Thus, the equilibrium between the native state of aBLA and the MG state is shifted toward the MG state because of the binding to the membranes (see also Discussion above). The energy cost of the conformational changes involved in the binding to the membranes can be estimated by measurements of the differences in the free energy (ΔG) of the different states. From these measurements, we may explain the effect of calcium on the binding of BLA to \bar{LUV} s.

For proteins in solution, H/ 2 H-exchange experiments provide information about their stability and about the thermodynamics of their interactions with ligands. In the case of BLA in solution, the stabilities of the native and MG states deduced from H/ 2 H-exchange experiments are in agreement with those determined by classical urea or guanidine unfolding experiments (Figure 8). We investigated whether the same approach could be used to gain insight into the thermodynamics of the interaction between a protein and a membrane. As mentioned in Results, our method meets the criteria (EX2 mechanism of exchange, stability of the membrane model, and reversibility of the reaction) required to extract thermodynamic parameters from our H/ 2 H-exchange experiments. The data provide an estimation of the additional stabilisation of the MG state due to binding to \bar{LUV} s: $\Delta G_{MG-LUV/MG} = -2 \text{ kcal mol}^{-1}$. This value becomes $-2.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ when corrected for the different local conditions within the membrane interface (as discussed above for the β -domain). From this value, and taking for reference the unfolded state of BLA in solution, it is possible to calculate the stability of the MG-like state bound to \bar{LUV} s: $\Delta G_{MG-LUV/U} = \Delta G_{MG-LUV/MG} + \Delta G_{MG/U} = -3.3 \text{ kcal mol}^{-1}$. Again, this value becomes $-3.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ after correction for the possible effect of the local conditions within the membrane interface. Then it is possible to compare the stabilities of the various states of BLA (Figure 8).

The stability of the MG state bound to \bar{LUV} s,

corrected or not, is close to that of the apo-form in solution (Figure 8). At neutral pH, however, the native state of aBLA is still slightly more stable than the MG state bound to \bar{LUV} s and, as a consequence, no binding is detected at this pH (Figure 3). Although the stabilisation of the MG state in solution at 293 K begins around pH 4 (Figure 3(b)), the native state (aBLA) is already destabilised for higher pHs.⁶⁶ According to temperature-induced unfolding experiments the native aBLA is less stable at pH 6 than at pH 7.4; the T_m of the unfolding is shifted by about 5 °C.⁶⁶ This is not a large effect but is enough to make the binding of the MG state to \bar{LUV} s more favourable than preserving the native state in solution. This explains why the binding of aBLA to membranes starts around pH 6 (Figure 3(a)), a pH much more alkaline than the one needed to stabilise the MG state in solution (Figure 3(b)). In the case of the holo-form, the difference in stability between the native state and the MG state bound to \bar{LUV} s is much larger (Figure 8), explaining why in the presence of calcium the formation of the MG state is not sensitive to the presence of \bar{LUV} s (Figure 3(b)).

Conclusions

In summary, the present study has shown that H/ 2 H-exchange experiments enhance understanding of the behaviour of proteins driven to interact with membranes. The stability of a protein bound to a membrane can be directly compared to its stability in solution because the same state, the unfolded state in solution, is used as reference. Moreover, the H/ 2 H-exchange experiments allied with NMR provide stabilities at the residue level. The combination of these methods with site-directed mutagenesis approaches seems particularly promising in efficiently defining the residues of a protein implicated into the interactions with a membrane and in measuring their respective stabilities. Finally, the results illustrate how the binding of BLA to lipid vesicles and the conformation of the bound state depend on the combination of hydrophobic and electrostatic interactions. These data emphasise the high sensitivity of protein behaviour to subtle changes in physicochemical conditions.

Materials and Methods

Materials

BLA was from Sigma (St Louis, MO) (type III), egg phosphatidylcholine (EPC, 830051) and egg phosphatidic acid (EPA, 830101) were from Avanti Polar-Lipids (Alabaster, AL), NBD-PE (N-360) and dansyl-DHPE (D-57) from Molecular Probes (Eugene, OR), deuterium oxide ($^2\text{H}_2\text{O}$, D214H), ^2HCl (E029P) and NaO^2H (E081P) from Eurisotop (St Aubin, France), thick wall polycarbonate centrifuge tubes (355630) from Beckman (Fullerton, CA). All the chemicals used in this study were of the highest purity grade. Experiments were done in 5 mM

citrate buffer at 22 °C. The apo-form of BLA (aBLA) and the holo-form (hBLA) were obtained by the addition of 5 mM EDTA and 10 mM CaCl₂, respectively.

Preparation of lipid vesicles

Vesicles were prepared at a lipid concentration of 24 mM from EPC, EPA and NBD-PE (only for the partitioning experiments by centrifugation and H/²H-exchange experiments) at a 90:10:0.5 molar ratio by reverse phase evaporation to obtain negatively charged LUVs (⁻LUVs) in 1 mM citrate buffer (pH 5).¹³ Neutral vesicles ([±]LUVs) were prepared from EPC and NBD-PE at a 100:0.5 molar ratio. The SUVs were prepared by sonication. A Zetasizer 3000 instrument (10 mV HeNe laser at 632.8 nm) (Malvern Instruments, Orsay, France) with a K7132 correlator was used for the size analysis of our lipid vesicles. The suspensions of SUVs and LUVs were monodisperse with mean hydrodynamic diameters of 50 nm and 150 nm, respectively.

Fluorescence experiments

Steady-state experiments were done as described.¹³ Partitioning experiments were done in the presence of 1 μ M aBLA in 1 ml of buffer at various pHs. Aliquots of LUVs or SUVs were added to each sample of BLA. Equilibrium was achieved by incubating the samples at 23 °C overnight. Blanks were prepared in a similar way, in the absence of BLA. Fluorescence was then measured at 320 nm, 350 nm and 360 nm, with an excitation wavelength of 295 nm and bandwidths of 5 nm. Association and dissociation kinetics were recorded by measuring the fluorescence of BLA (exc. 295 nm; em. 344 nm; bandwidth 5 nm) as a function of time. Association of aBLA with lipid vesicles was triggered by the addition of ⁻LUVs to the cell containing aBLA at pH 3.4. The dissociation was launched at pH 4 by the addition of calcium. For steady-state and kinetic measurements, protein (1 μ M) and lipid (300 μ M) concentrations were kept constant unless stated otherwise.

Circular dichroism experiments

The CD spectra were recorded on a JASCO J-810 spectropolarimeter (JASCO, Japan) either in the far-UV (195–250 nm) or in the near-UV (250–320 nm). The pathlength was 1 mm for the experiments in the far-UV and 1 cm for those in the near-UV. For the experiments on the soluble states of BLA the protein concentration was 15 μ M. The spectra were accumulated five times. For the experiments in the presence of lipid vesicles the ratio L/P was kept at 300. For the spectra in the near-UV, BLA concentration was 5 μ M and that of lipid was 1.5 mM. In the far-UV, the concentrations were halved in order to decrease the light-scattering due to the lipid vesicles up to a practicable level. The spectra were accumulated 30 times for the experiments in the presence of lipids. The spectra were processed with the software provided by JASCO, and the mean residue ellipticity was calculated.

Binding of BLA to LUVs studied by centrifugation

For the partitioning experiments at pH 3.4, the concentration of BLA was kept at 1 μ M and the concentration of lipids ranged from 50 μ M to 800 μ M. For the pH dependence of the binding, the concentration

of lipids was 300 μ M and that of BLA was 1 μ M. The samples were incubated in 4 ml for two hours at 22 °C. Samples were centrifuged in a Beckman L-70 ultracentrifuge using a Ti 70.1 rotor at 22 °C for 1.5 hour at 70,000 rpm (350,000g). The fluorescence of NBD-PE (exc. 464 nm; em. 500–600 nm) and BLA (exc. 295 nm; em. 300–400 nm) was measured before and after centrifugation (supernatant). The partition of BLA was determined as follows: $P = (F_0 - F)/F_0$, where F_0 and F are the fluorescence intensities of BLA before and after centrifugation, respectively. The fluorescence of the NBD-PE was checked to ensure the proper pelleting of LUVs.

Dissociation constant of the binding of BLA to lipid vesicles

The partition curves were fitted with the Hill equation: $f_{\text{bound}} = 1/(1 + (K/[L])^{nH})$, in order to estimate the dissociation constant (K). f_{bound} is the fraction of protein bound measured by centrifugation or by fluorescence. For the experiments in the presence of LUVs a Hill coefficient (nH) was used in order to take into account the cooperativity of the binding.

Hydrogen exchange experiments

For the H/²H-exchange experiments it is necessary:⁴⁴ first to label BLA with deuterium; second to allow the H/²H-exchange for various times either in solution or bound to ⁻LUVs; third to quench the H/²H-exchange and extract the protein from the membrane if necessary; and fourth to record the NMR spectra which allow monitoring of the H/²H-exchange kinetics at the residue level. The H/²H-exchange was quenched at given times by addition of calcium concomitant with a pH jump up to pH 4.1, which brings back the protein to its soluble holo-form (see Results). Then NMR spectra were recorded on the native state of the protein (the holo-form).

Preparation of deuterated BLA

For the feasibility of the H/²H-exchange experiments, authentic BLA was used instead of the recombinant ¹⁵N-labelled protein.⁶⁶ aBLA was dissolved in ²H₂O at 20 mg ml⁻¹. The p²H was lowered to 2.5 by addition of ²HCl. H/²H-exchange was done for three hours at 30 °C. Aliquots of NaO²H were added to reach p²H 3.4 ± 0.1. The concentration of deuterated aBLA ((D)aBLA) was measured with a spectrophotometer ($E_{280} = 28,360 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and aliquots of volumes corresponding to 10 mg were freeze dried. Samples of (D)aBLA were stored at -20 °C.

Experiments in the absence of ⁻LUV

A sample of 10 mg of (D)aBLA was dissolved in 500 μ l H₂O. The pH was kept at 3.4 ± 0.1. Hydrogen exchange was stopped by addition of 10 mM CaCl₂ and raising the pH to 4.1 by addition of NaOH. BLA was freeze dried and stored at -20 °C before NMR measurements.

Hydrogen exchange experiments in the presence of ⁻LUVs

Samples of 10 mg of freeze dried (D)aBLA were vortexed until a fine powder was obtained. The pH of a solution of ⁻LUVs was adjusted to 3.4 with HCl. Freeze dried (D)aBLA was vigorously mixed with ⁻LUVs at a

300:1 lipid/BLA molar ratio in a final volume of 15 ml (the final concentration of BLA was 50 μ M). H/ 2 H-exchange experiments were done at 22 °C in 50 ml Falcon tubes, which were constantly shaken, for times ranging from 0.5 to 1000 minutes. Hydrogen exchange was stopped by addition of 80 mM CaCl₂ and NaOH to bring the pH to 4.1. A large part of the calcium was chelated by the anionic phospholipids and an eightfold excess must be added to get a calcium concentration of 10 mM in solution (data not shown). The following steps were performed at 4 °C. Samples of 5 ml were placed in three centrifuge tubes and centrifuged in a Beckman L-70 ultracentrifuge using a Ti 70.1 rotor at 4 °C for 1.5 hour at 350,000g. Four millilitres of supernatant containing BLA were taken carefully from each centrifuge tube, avoiding any carry-over of the pellet of γ -LUVs. Supernatants were pooled and freeze dried. BLA was then dissolved in 2.5 ml of H₂O. Excess CaCl₂ was removed by buffer exchange with 5 mM CaCl₂ in H₂O adjusted to pH 4.1 on two Sephadex® G-25 Superfine Hitrap™ Desalting columns of 5 ml (Amersham Biosciences) connected in series. Then, BLA was immediately frozen, freeze dried and stored at -20 °C before NMR experiments. Between the quenching of the exchange and the final freeze drying the protein stayed about four hours in solution at 4 °C in the presence of a large concentration of calcium (at least 5 mM). The exchange that may occur during this period is negligible. Indeed, in this experiment only NHs protected in the holo-form were monitored, of which those belonging to α A were the least protected.⁴⁵ According to a rough estimation based on the protection factors of these residues in the holo-form,⁴⁵ much less than 1% are exchanged during the preparation of the samples after the quenching of the H/ 2 H-exchange. Control experiments were performed using NMR on hBLA at 293 K and no exchange was detected over four hours (data not shown).

NMR experiments

BLA samples were dissolved in 0.4 ml of 2 H₂O, giving final concentrations ranging from 0.7 mM to 1 mM at p 2 H 4.1 \pm 0.1. Residual NH signals were followed by absolute value correlated spectroscopy (COSY) experiments. Spectra were recorded on a Bruker (Rheinstetten, Germany) DRX600 (600 MHz) spectrometer at 298 K. The dependences of the NH signal intensities on the H/ 2 H-exchange time were determined as described by Wijesinha-Bettoni *et al.*⁶⁶ The intensities were corrected for the protein concentrations of the samples. The resonance frequencies were assigned on the basis of experiments done at p 2 H 6.3.⁴⁵ In order to assign the spectra of exchange experiments done at p 2 H 4.1, the chemical shifts of NH signals were followed as a function of pH. COSY experiments at 293 K and at 1 mM BLA were recorded at p 2 H 6.3, 5.3, 4.3, 3.7 and 3, the p 2 H being lowered by the addition of 2 HCl. The exchange kinetics shown are the results of five different series.

Acknowledgements

We thank A. Ménez for critical reading of the manuscript. A.C. was supported by the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie and the Ligue Nationale Contre le Cancer, and P.S. by the Commissariat à l'Énergie

Atomique. This work was supported by the CNRS and the CEA, and by grants from INTAS (2001-2347) and MCB RAS (Molecular and cell biology).

References

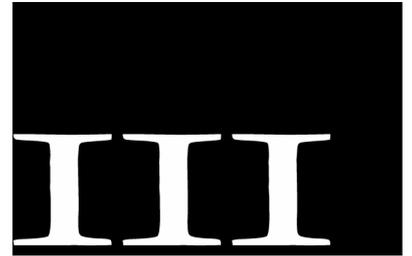
- Newmeyer, D. D. & Ferguson-Miller, S. (2003). Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*, **112**, 481–490.
- Wiederkehr, A., Staple, J. & Caroni, P. (1997). The motility-associated proteins GAP-43, MARCKS, and CAP-23 share unique targeting and surface activity-inducing properties. *Expt. Cell Res.* **236**, 103–116.
- Johnson, J. E. & Cornell, R. B. (1999). Amphitropic proteins: regulation by reversible membrane interactions (review). *Mol. Membr. Biol.* **16**, 217–235.
- Conner, S. D. & Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, **422**, 37–44.
- Kweon, D.-H., Kim, C. S. & Shin, Y.-K. (2003). Regulation of neuronal SNARE assembly by the membrane. *Nature Struct. Biol.* **10**, 440–447.
- Jahn, R., Lang, T. & Südhof, T. C. (2003). Membrane fusion. *Cell*, **112**, 519–533.
- Matouschek, A. (2003). Protein unfolding—an important process *in vivo*? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 98–109.
- Nickel, W. (2003). The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur. J. Biochem.* **270**, 2109–2119.
- Watts, A. (1995). Biophysics of the membrane interface. *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 959–965.
- Booth, P. J. & Curran, A. R. (1999). Membrane protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 115–121.
- Epanand, R. M. (1998). Lipid polymorphism and protein-lipid interactions. *Biochim. Biophys. Acta*, **1376**, 353–368.
- Huang, H., Schroeder, F., Zeng, C., Estes, M. K., Schoer, J. K. & Ball, J. M. (2001). Membrane interactions of a novel viral enterotoxin: rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4. *Biochemistry*, **40**, 4169–4180.
- Chenal, A., Savarin, P., Nizard, P., Guillain, 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.
- Johnson, J. E., Xie, M., Singh, L. M., Edge, R. & Cornell, R. B. (2003). Both acidic and basic amino acids in an amphitropic enzyme, CTP:phosphocholine cytidyltransferase, dictate its selectivity for anionic membranes. *J. Biol. Chem.* **278**, 514–522.
- Yoshida, Y., Kinuta, M., Abe, T., Liang, S., Araki, K., Cremona, O. *et al.* (2004). The stimulatory action of amphiphysin on dynamin function is dependent on lipid bilayer curvature. *EMBO J.* **23**, 3483–3491.
- Bigay, J., Gounon, P., Robineau, S. & Antonny, B. (2003). Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature*, **426**, 563–566.
- Gastinel, L. N., Cambillau, C. & Bourne, Y. (1999). Crystal structures of the bovine β 4galactosyltransferase catalytic domain and its complex with uridine diphosphogalactose. *EMBO J.* **18**, 3546–3557.
- Ramakrishnan, B., Shah, P. S. & Qasba, P. K. (2001). α -Lactalbumin (LA) stimulates milk β -1,4-galactosyltransferase I (β 4Gal-T1) to transfer glucose from

- UDP-glucose to N-acetylglucosamine. Crystal structure of β 4Gal-T1 x LA complex with UDP-Glc. *J. Biol. Chem.* **276**, 37665–37671.
19. Ramakrishnan, B. & Qasba, P. K. (2001). Crystal structure of lactose synthase reveals a large conformational change in its catalytic component, the β 1,4-galactosyltransferase-I. *J. Mol. Biol.* **310**, 205–218.
 20. Mitranic, M. M., Pâquet, M. R. & Moscarello, M. A. (1988). The interaction of bovine milk galactosyltransferase with lipid and α -lactalbumin. *Biochim. Biophys. Acta*, **956**, 277–284.
 21. Cawthern, K. M., Permyakov, E. & Berliner, L. J. (1996). Membrane-bound states of α -lactalbumin: implications for the protein stability and conformation. *Protein Sci.* **5**, 1394–1405.
 22. Lönnerdal, B. & Lien, E. L. (2003). Nutritional and physiologic significance of α -lactalbumin in infants. *Nutr. Rev.* **61**, 295–305.
 23. Matsumoto, H., Shimokawa, Y., Ushida, Y., Toida, T. & Hayasawa, H. (2001). New biological function of bovine α -lactalbumin: protective effect against ethanol- and stress-induced gastric mucosal injury in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 1104–1111.
 24. Ushida, Y., Shimokawa, Y., Matsumoto, H., Toida, T. & Hayasawa, H. (2003). Effects of bovine α -lactalbumin on gastric defense mechanisms in naive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 577–583.
 25. Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Hunziker, P. & von Fellenberg, R. (1999). Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine alpha-lactalbumin molecule. *Biochim. Biophys. Acta*, **1426**, 439–448.
 26. Pihlanto-Leppala, A., Marnila, P., Hubert, L., Rokka, T., Korhonen, H. J. & Karp, M. (1999). The effect of α -lactalbumin and β -lactoglobulin hydrolysates on the metabolic activity of *Escherichia coli* JM103. *J. Appl. Microbiol.* **87**, 540–545.
 27. Svensson, M., Hakansson, A., Mossberg, A. K., Linse, S. & Svanborg, C. (2000). Conversion of α -lactalbumin to a protein inducing apoptosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 4221–4226.
 28. Hakansson, A., Andreasson, J., Zhivotovsky, B., Karpman, D., Orrenius, S. & Svanborg, C. (1999). Multimeric α -lactalbumin from human milk induces apoptosis through a direct effect on cell nuclei. *Expt. Cell Res.* **246**, 451–460.
 29. Kohler, C., Gogvadze, V., Hakansson, A., Svanborg, C., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B. (2001). A folding variant of human α -lactalbumin induces mitochondrial permeability transition in isolated mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **268**, 186–191.
 30. Permyakov, S. E., Pershikova, I. V., Khokhlova, T. I., Uversky, V. N. & Permyakov, E. A. (2004). No need to be HAMLET or BAMLET to interact with histones: binding of monomeric α -lactalbumin to histones and basic poly-amino acids. *Biochemistry*, **43**, 5575–5582.
 31. Chrysina, E. D., Brew, K. & Acharya, K. R. (2000). Crystal structures of apo- and holo-bovine α -lactalbumin at 2.2 Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions. *J. Biol. Chem.* **275**, 37021–37029.
 32. Kim, J. & Kim, H. (1989). Interaction of α -lactalbumin with phospholipid vesicles as studied by photo-activated hydrophobic labelling. *Biochim. Biophys. Acta*, **983**, 1–8.
 33. Banuelos, S. & Muga, A. (1995). Binding of molten globule-like conformations to lipid bilayers. Structure of native and partially folded α -lactalbumin bound to model membranes. *J. Biol. Chem.* **270**, 29910–29915.
 34. Lala, A. K., Kaul, P. & Ratnam, P. B. (1995). Membrane-protein interaction and the molten globule state: interaction of α -lactalbumin with membranes. *J. Protein Chem.* **14**, 601–609.
 35. Halskau, Ø., Frøystein, N. Å., Muga, A. & Martínez, A. (2002). The membrane-bound conformation of α -lactalbumin studied by NMR-monitored ^1H exchange. *J. Mol. Biol.* **321**, 99–110.
 36. Agasøster, A. V., Halskau, Ø., Fuglebakk, E., Frøystein, N. Å., Muga, A., Holmsen, H. & Martínez, A. (2003). The interaction of peripheral proteins and membranes studied with α -lactalbumin and phospholipid bilayers of various compositions. *J. Biol. Chem.* **278**, 21790–21797.
 37. Chaudhuri, D., Narayan, M. & Berliner, L. J. (2004). Conformation-dependent interaction of α -lactalbumin with model and biological membranes: a spin-label ESR study. *Protein J.* **23**, 95–101.
 38. Hanssens, I., van Ceunebroek, J. C., Pottel, H., Preaux, G. & van Cauwelaert, F. (1985). Influence of the protein conformation on the interaction between α -lactalbumin and dimyristoylphosphatidylcholine vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **817**, 154–164.
 39. Montich, G. G. & Marsh, D. (1995). Interaction of α -lactalbumin with phosphatidylglycerol. Influence of protein binding on the lipid phase transition and lipid acyl chain mobility. *Biochemistry*, **34**, 13139–13145.
 40. Razinkov, V. I., Melikyan, G. B., Epand, R. M., Epand, R. F. & Cohen, F. S. (1998). Effects of spontaneous bilayer curvature on influenza virus-mediated fusion pores. *J. Gen. Physiol.* **112**, 409–422.
 41. Bratcher, S. C. & Kronman, M. J. (1984). Metal ion binding to the N and A conformers of bovine α -lactalbumin. *J. Biol. Chem.* **259**, 10875–10886.
 42. Lala, A. K. & Kaul, P. (1992). Increased exposure of hydrophobic surface in molten globule state of α -lactalbumin. Fluorescence and hydrophobic photolabeling studies. *J. Biol. Chem.* **267**, 19914–19918.
 43. Arai, M. & Kuwajima, K. (2000). Role of the molten globule state in protein folding. *Advan. Protein Chem.* **53**, 209–282.
 44. Englander, S. W. & Mayne, L. (1992). Protein folding studied using hydrogen-exchange labeling and two-dimensional NMR. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**, 243–265.
 45. Forge, V., Wijesinha, R. T., Balbach, J., Brew, K., Robinson, C. V., Redfield, C. & Dobson, C. M. (1999). Rapid collapse and slow structural reorganisation during the refolding of bovine α -lactalbumin. *J. Mol. Biol.* **288**, 673–688.
 46. Huyghues-Despointes, B. M. P., Sholtz, J. M. & Pace, C. N. (1999). Protein conformational stabilities can be determined from hydrogen exchange rates. *Nature Struct. Biol.* **6**, 910–912.
 47. Ikeguchi, M., Kuwajima, K. & Sugai, S. (1986). Ca^{2+} -induced alteration in the unfolding behavior of α -lactalbumin. *J. Biochem. (Tokyo)*, **99**, 1191–1201.
 48. Ladokhin, A. S., Legmann, R., Collier, R. J. & White, S. H. (2004). Reversible refolding of the diphtheria toxin T-domain on lipid membranes. *Biochemistry*, **43**, 7451–7458.
 49. Lichtenberg, D., Freire, E., Schmidt, C. F., Barenholz, Y., Felgner, P. L. & Thompson, T. E. (1981). Effect of surface curvature on stability, thermodynamic behavior, and osmotic activity of dipalmitoylphosphatidylcholine single lamellar vesicles. *Biochemistry*, **20**, 3462–3467.
 50. Wong, M., Anthony, F. H., Tillack, T. W. & Thompson,

- T. E. (1982). Fusion of dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles at 4 degrees C. *Biochemistry*, **21**, 4126–4132.
51. Paterson, Y., Englander, S. W. & Roder, H. (1990). An antibody binding site on cytochrome *c* defined by hydrogen exchange and two-dimensional NMR. *Science*, **249**, 755–759.
52. Cullis, P. R., Fenske, D. B. & Hope, M. J. (1996). Physical properties and functional roles of lipids in membranes. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (Vance, D. E. & Vance, J. E., eds), pp. 1–33, Elsevier Science B.V., The Netherlands.
53. Swairjo, M. A., Seaton, B. A. & Roberts, M. F. (1994). Effect of vesicle composition and curvature on the dissociation of phosphatidic acid in small unilamellar vesicles—a ^{31}P -NMR study. *Biochim. Biophys. Acta*, **1191**, 354–361.
54. Lepore, L. S., Ellena, J. F. & Cafiso, D. S. (1992). Comparison of the lipid acyl chain dynamics between small and large unilamellar vesicles. *Biophys. J.* **61**, 767–775.
55. Korstanje, L. J., van Faassen, E. E. & 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.
56. Talbot, W. A., Zheng, L. X. & 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.
57. Heerklotz, H. & Epand, R. M. (2001). The enthalpy of acyl chain packing and the apparent water-accessible apolar surface area of phospholipids. *Biophys. J.* **80**, 271–279.
58. Booth, P. J., Riley, M. L., Flitsch, S. L., Templer, R. H., Farooq, A., Curran, A. R. *et al.* (1997). Evidence that bilayer bending rigidity affects membrane protein folding. *Biochemistry*, **36**, 197–203.
59. Dan, N. & Safran, S. A. (1998). Effect of lipid characteristics on the structure of transmembrane proteins. *Biophys. J.* **75**, 1410–1414.
60. Brumm, T., Jorgensen, K., Mouritsen, O. G. & 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.
61. Cantor, R. S. (1997). Lateral pressures in cell membranes: a mechanism for modulation of protein function. *J. Phys. Chem. B.* **101**, 1723–1725.
62. Bai, Y., Milne, J. S., Mayne, L. & Englander, S. W. (1993). Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins*, **17**, 75–86.
63. Troullier, A., Reinstadler, D., Dupont, Y., Naumann, D. & Forge, V. (2000). Transient non-native secondary structures during the refolding of α -lactalbumin detected by infrared spectroscopy. *Nature Struct. Biol.* **7**, 78–86.
64. Prats, M., Teissié, J. & Tocanne, J.-F. (1986). Lateral proton conduction at lipid water interfaces and its implications for the chemiosmotic-coupling hypothesis. *Nature*, **322**, 756–758.
65. Beschiaschvili, G. & Seelig, J. (1992). Peptide binding to lipid bilayers. Nonclassical hydrophobic effect and membrane-induced pK shifts. *Biochemistry*, **31**, 10044–10053.
66. Wijesinha-Bettoni, R., Dobson, C. M. & Redfield, C. (2001). Comparison of the structural and dynamical properties of holo and apo bovine α -lactalbumin by NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **307**, 885–898.
67. Kraulis, P. J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallog.* **24**, 946–950.

Edited by I. B. Holland

(Received 22 December 2004; received in revised form 8 April 2005; accepted 18 April 2005)



Liaison de l'apo-myoglobine aux membranes

Intérêt physiologique et généralisation aux
protéines amphitropiques de la famille des
globines

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

La myoglobine est une hémoprotéine qui joue le rôle de réserve d'oxygène dans le muscle strié. Elle est constituée de deux parties : l'apo-myoglobine qui comprend la chaîne polypeptidique et un groupement prosthétique héminique enfoui dans une poche hydrophobe de la structure protéique. L'apo-myoglobine est une protéine soluble capable de se lier à des membranes zwitterioniques et anioniques [Basov *et al.*, 2004 ; Lee & Kim, 1992]. Cette interaction pourrait intervenir dans la liaison de l'hème afin de constituer la myoglobine fonctionnelle. Par ailleurs, l'apo-myoglobine est l'archétype structural des protéines possédant un repliement de type globine. Ce type de repliement totalement en hélice α est retrouvé très fréquemment dans la structure de nombreuses protéines amphitropiques, notamment chez les toxines bactériennes ou les protéines de la famille Bcl-2 [Parker & Feil, 2005]. Toutes ces protéines semblent arborer un mécanisme commun d'insertion dans les membranes : la conversion d'un état soluble à un état lié aux membranes sollicite un échange conformationnel vers un état molten globule compétent pour interagir avec les membranes. L'apo-myoglobine est un modèle protéique très populaire pour les biophysiciens : sa structure, son mécanisme de repliement et les propriétés de ses états partiellement repliés sont très bien connus. Par conséquent, l'apo-myoglobine se révèle être un excellent modèle pour détailler les mécanismes de liaison aux membranes des protéines de type globine.

1.1 Fonction physiologique de la myoglobine

L'apport d'oxygène par les érythrocytes est insuffisant lorsque les muscles striés se contractent pour une longue période [Wittenberg & Wittenberg, 2003]. La demande d'oxygène mitochondriale est alors comblée par l'oxygène mis en réserve dans le réticulum sarcoplasmique. La myoglobine séquestre l'oxygène à l'intérieur du réticulum sarcoplasmique et assure sa diffusion jusqu'aux mitochondries. L'affinité de la myoglobine pour l'oxygène permet de constituer une réserve d'oxygène mobilisable en cas d'effort musculaire. La liaison de l'oxygène sur la myoglobine est possible grâce à la présence d'un cofacteur héminique. L'étape

finale de la biosynthèse de la myoglobine implique la combinaison de la chaîne polypeptidique (l'apo-myoglobine) avec l'hème. Ce dernier est formé par incorporation du fer à l'intérieur de la protoporphyrine IX. La réaction est catalysée par une ferrochelatase localisée dans la membrane interne mitochondriale [Granick & Beale, 1978]. L'hème est une molécule hydrophobe, une fois synthétisée, elle sera donc beaucoup plus stable dans une bicouche lipidique ou dans le site de liaison à l'hème de l'apo-myoglobine. Dans la dernière étape, l'hème doit être transféré de la membrane mitochondriale à l'apo-myoglobine présente au niveau du réticulum sarcoplasmique. La liaison de l'hème est très rapide en solution et la liaison est très stable (la constante de dissociation mesurée à pH 8 où l'hème est soluble est égale à 2.8×10^{-14}). L'équipe de Olson a démontré que l'apo-myoglobine est capable d'extraire l'hème enfoui dans la bicouche de vésicules lipidiques [Light & Olson, 1990 ; Rose *et al.*, 1985]. Ceci suggère que la fixation de l'hème dans la dernière étape de formation de la forme active de la myoglobine pourrait requérir une interaction directe entre l'apo-myoglobine et la membrane mitochondriale. Cependant, certains auteurs pensent que ce transfert de l'hème de la membrane mitochondriale à l'apo-myoglobine est uniquement dû aux différences d'affinité pour l'hème [Rose *et al.*, 1985] ou encore à l'intervention de transporteurs intracellulaires d'hème [Jakoby, 1978]. L'étude des interactions entre l'apo-myoglobine et les membranes permettra d'éclaircir le mécanisme de la dernière étape de synthèse de la myoglobine.

1.2 Structure de l'apo-myoglobine

L'apo-myoglobine est composée de 153 résidus structurés en 8 hélices α notées de A à H. Ces dernières sont connectées entre elles par 7 boucles (Fig. III.1). L'apo-myoglobine contient deux tryptophanes localisés sur l'hélice A. Les spectres d'émission de fluorescence du tryptophane sont alors le reflet de la structure et de l'environnement de cette hélice. Les tryptophanes participent à la formation du cœur hydrophobe de la protéine. Celui-ci est composé des hélices A, G, H et une partie de l'hélice B (noyau hydrophobe noté A(B)GH). Par ailleurs, c'est une protéine particulièrement basique (pI théorique = 8.7 pour l'apo-myoglobine de cachalot) où les résidus basiques représentent plus de 20% de la séquence. Pour cette raison, la protéine est stabilisée en présence de sel.

Bien que la forme apo soit moins stable que la forme holo et expose une plus grande partie des groupes hydrophobes au solvant, l'apo-myoglobine présente une structure tertiaire très proche de la forme liée à l'hème. En effet, les spectres RMN attestent que les hélices A, B, C, D, E, G et H sont intactes dans la forme native de l'apo-myoglobine. Par ailleurs, la dispersion des déplacements chimiques dans le

spectre RMN [Eliezer & Wright, 1996 ; Loh *et al.*, 1995], les expériences de calorimétrie, le dichroïsme circulaire dans l'UV proche [Gast *et al.*, 1994 ; Nishii *et al.*, 1994], et les spectres d'émission de fluorescence des tryptophanes [Jamin & Baldwin, 1998] sont caractéristiques d'une structure compacte et stable. La plupart des hydrogènes amides du squelette protéique sont protégés de l'échange hydrogène/deutérium de la même façon que pour la myoglobine. Cependant, les spectres RMN et les expériences de protéolyse ménagée indiquent que l'hélice F est désordonnée et subit des fluctuations conformationnelles sur des temps de la microseconde à la milliseconde [Bernad *et al.*, 2004].

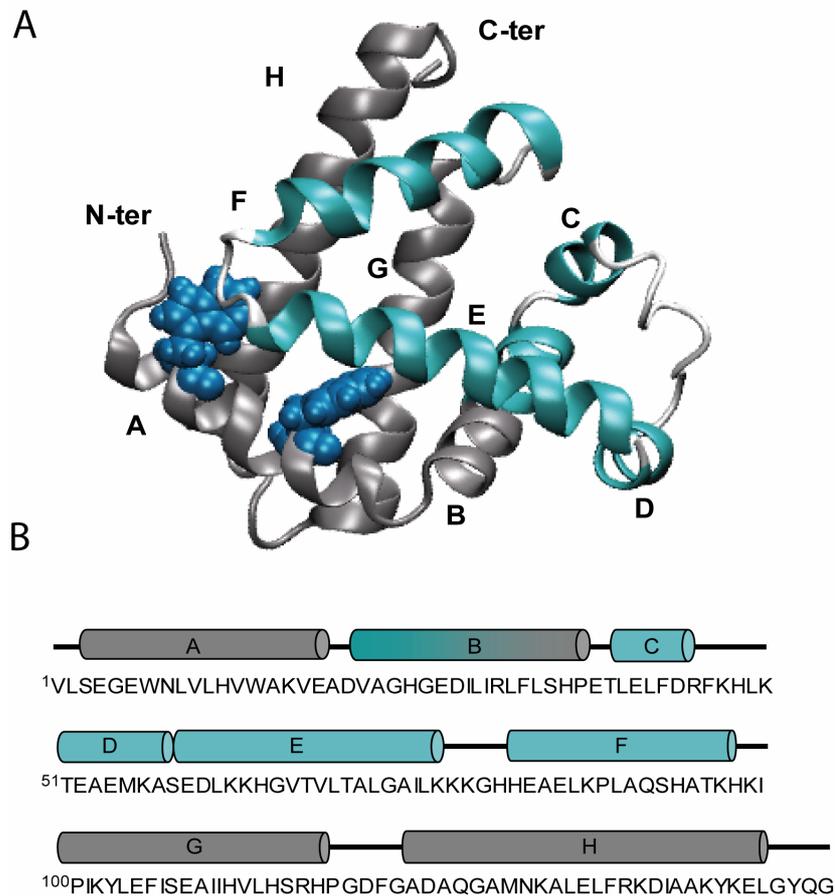


Fig. III.1 – (A) Structure cristallographique de l'apo-myoglobine de cachalot. Le cœur hydrophobe de la protéine est représenté en gris. Il comprend les hélices A, G, H et une partie de l'hélice B. Les tryptophanes sont en bleu foncé. (B) Représentation des structures secondaires en fonction de la séquence.

1.3 Le repliement de l'apo-myoglobine

L'apo-myoglobine est abondamment utilisée comme modèle de repliement des protéines. Nos travaux s'intéressent aux interactions apo-myoglobine-membrane dépendantes du pH. Par conséquent nous nous focaliserons sur le repliement et le dépliement de la protéine induit par des pH acides. La dénaturation et la renaturation de l'apo-myoglobine par le pH entre la forme native à pH 6 et la forme dénaturée à pH 2 ne sont pas coopératives. Des intermédiaires ont été détectés dans les études cinétiques et à l'équilibre. Les cinétiques de repliement suivies par fluorescence et dichroïsme circulaire ont permis d'identifier un état intermédiaire partiellement replié [Griko *et al.*, 1988]. Cet état, accumulé durant les premières millisecondes, présente toutes les spécificités d'un état molten globule. Néanmoins, ce dernier comprend deux formes en interconversion rapide (quelques dizaines de millisecondes) : I_a et I_b [Jamin & Baldwin, 1998]. De légères différences sont observables entre les formes I_a et I_b . La structure hélicoïdale étant mieux définie dans I_a que dans I_b . Ces deux conformations sont très proches et nous considérons le mélange des deux formes comme un état molten globule unique.

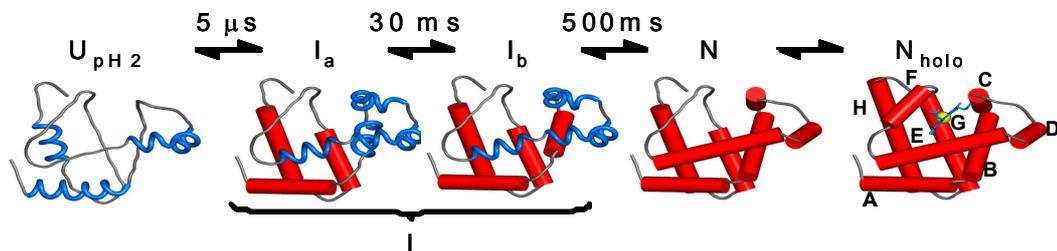


Fig. III.2 – Intermédiaires de repliement de l'apo-myoglobine. Les constantes de vitesses de formation de chaque état sont indiquées. Les cylindres rouges représentent la localisation des hélices stables alors que les repliements en forme d'hélice bleue représentent la localisation des hélices instables et fluctuantes. U représente la forme dépliée, I le molten globule, N la forme native à pH 6 et N_{holo} la protéine native après fixation d'hème.

L'état molten globule est stabilisable à pH 4 et présente les mêmes caractéristiques structurales que l'intermédiaire cinétique [Hughson *et al.*, 1990 ; Jennings & Wright, 1993]. Les structures des états intermédiaires cinétiques et à l'équilibre ont été explorées par spectroscopie RMN et par des expériences d'échanges H/D [Eliezer *et al.*, 2000 ; Eliezer & Wright, 1996 ; Eliezer *et al.*, 1998 ; Yao *et al.*, 2001]. Un résumé des données structurales disponibles est présenté dans la figure III.2.

L'état molten globule de l'apo-myoglobine a une structure compacte avec un rayon de giration de 23.5 Å à 20°C [Gast *et al.*, 1994 ; Uzawa *et al.*, 2004]. Il contient près de 60% des hélices de la forme native mais pas ou peu de structuration tertiaire. Sa caractérisation détaillée par spectroscopie RMN montre que c'est un ensemble de conformations avec un noyau hydrophobe A(B)GH stable [Eliezer *et al.*, 2000 ; Eliezer *et al.*, 1998]. Dans ce noyau, le mouvement du squelette est restreint mais les extrémités des hélices sont plus mobiles et moins structurées que dans l'état natif. La formation rapide de ce noyau hydrophobe pendant la réaction de repliement suggère que les forces hydrophobes dirigent la compaction et la formation du molten globule. Par ailleurs, une partie du noyau hydrophobe, composé par quelques résidus des hélices A et H, persiste encore à pH 2. La persistance d'un noyau hydrophobe constitué d'hélices α dans les états partiellement repliés apparaît propice à l'insertion membranaire de la protéine.

1.4 Interaction des globines avec les membranes

Très peu de travaux se sont intéressés à la liaison de l'apo-myoglobine aux membranes. Lee & Kim ont observé l'interaction de l'apo-myoglobine avec des SUVs et LUVs composées de dimyristoylphosphatidylcholine en suivant la fragmentation des vésicules sous forme de micelles. Cette micellisation n'est visible que pour des pH acides et entraîne la formation de gros complexes micellaires observables en microscopie électronique [Lee & Kim, 1992]. Basova *et al.* ont mis en évidence que l'état molten globule de l'apo-myoglobine se liait sur des SUVs composées uniquement de lipides anioniques [Basov *et al.*, 2004]. Dans ces conditions, la liaison de l'apo-myoglobine aux membranes suivrait un mécanisme classique pour les protéines amphitropiques : l'acidité du milieu induit une transition conformationnelle vers un état molten globule compétant pour interagir avec les membranes.

D'autre part l'apo-myoglobine possède un repliement de type globine homologue à celui de plusieurs protéines amphitropiques très étudiées comme les toxines bactériennes. En effet, bien qu'il n'y ait pas d'identité de séquence, les alignements structuraux des globines indiquent que de nombreuses toxines procaryotiques et eucaryotiques telles que les colicines, la toxine diphtérique, l'hémolysine E ou l'équinatoxine, appartiennent à cette famille [Holm & Sander, 1993 ; Holm & Sander, 1993]. Le repliement de type globine est également retrouvé chez les protéines de la famille des protéines apoptotiques Bcl-2. Toutes ces protéines possèdent une structure favorable à l'insertion des polypeptides dans les membranes. La résolution de la structure cristallographique de la colicine A et d'autres toxines bactériennes du même type qui ont suivies a révélé une

organisation en trois couches : une couche d'hélices hydrophobes antiparallèles est complètement enfouie entre deux couches d'hélices amphiphiles [Parker *et al.*, 1989]. En milieu aqueux, les hélices hydrophobes sont protégées du solvant par les couches amphiphiles. En présence d'une bicouche lipidique et si les conditions physico-chimiques permettent une flexibilité conformationnelle suffisante, la couche hydrophobe peut s'exposer au solvant et est alors susceptible de s'insérer dans la membrane. Cette caractéristique structurale a suggéré le modèle d'insertion membranaire en "parapluie". Dans ce mécanisme une boucle hydrophobe initie l'insertion dans la membrane qui est suivie par l'insertion transmembranaire des hélices hydrophobes. Les autres hélices sont alors étalées sur la surface membranaire.

Ce type de mécanisme a été particulièrement bien étudié dans le cas des toxines bactériennes et plus particulièrement dans le cas des colicines et de la toxine diphtérique [Chenal *et al.*, 2002 ; Senzel *et al.*, 2000 ; Umata & Mekada, 1998 ; Zakharov & Cramer, 2002 ; Zakharov *et al.*, 1998].

1.4.1 Insertion membranaire des colicines

Les colicines sont produites par *E. coli* et se lient sur la membrane de diverses bactéries à Gram-négatif. Elles sont sécrétées dans l'espace extracellulaire, se lient spécifiquement à un récepteur et sont transportées dans l'espace périplasmique des cellules cibles. La spécificité dépend essentiellement des récepteurs membranaires présents mais également de la composition lipidique de la membrane plasmique. Les colicines exercent une activité lytique sur les cellules cibles en déstabilisant la membrane cytoplasmique.

Il existe différentes colicines classées suivant le type de récepteur avec lequel elles forment un complexe. Toutes sont organisées en trois domaines : un domaine translocateur (domaine T), un domaine récepteur (R) et un domaine spécialisé dans la formation de pores (C). Les domaines C des différentes colicines ont des structures homologues de type globine suggérant un mécanisme d'action commun [Elkins *et al.*, 1997 ; Holm & Sander, 1993 ; Johnson & Cornell, 1999 ; Parker *et al.*, 1989 ; Wiener *et al.*, 1997]. Le mécanisme d'insertion membranaire du domaine C de la colicine E1 est le mieux connu.

Ce dernier comprend 178 résidus et compte 10 hélices α . Les hélices 8 et 9 qui n'ont pas de chaînes latérales chargées forment la couche hydrophobe. L'insertion de domaine C de la Colicine E1 conduit à la formation d'un canal ionique responsable de la dépolarisation de la membrane cytoplasmique cible [Cleveland *et al.*, 1983]. De nombreuses études structurales utilisant des techniques spectroscopiques telles que le transfert de fluorescence (FRET), l'atténuation de

fluorescence ou le dichroïsme circulaire ont permis de détailler la liaison et l'insertion membranaire de ce domaine isolé [Zakharov & Cramer, 2002]. La figure III.3 résume les différentes étapes de l'insertion du domaine C de la colicine E1 dans la membrane mises en évidence par ces différentes techniques. Dans une première étape, le domaine est replié dans sa conformation native soluble (Fig. III.3A ; P_{soluble}) et se lie *via* des interactions électrostatiques sur une surface membranaire comprenant des têtes polaires anioniques (Fig. III.3A ; P_{bound}). La liaison est déclenchée *in vitro* par un environnement acide. A pH ~ 4 , le domaine protéique est chargé positivement (charge effective, +7) et interagit avec les lipides anioniques. Les cinétiques de liaison aux membranes montrent que cette première étape est la plus rapide du mécanisme d'insertion membranaire [Zakharov *et al.*, 1999].

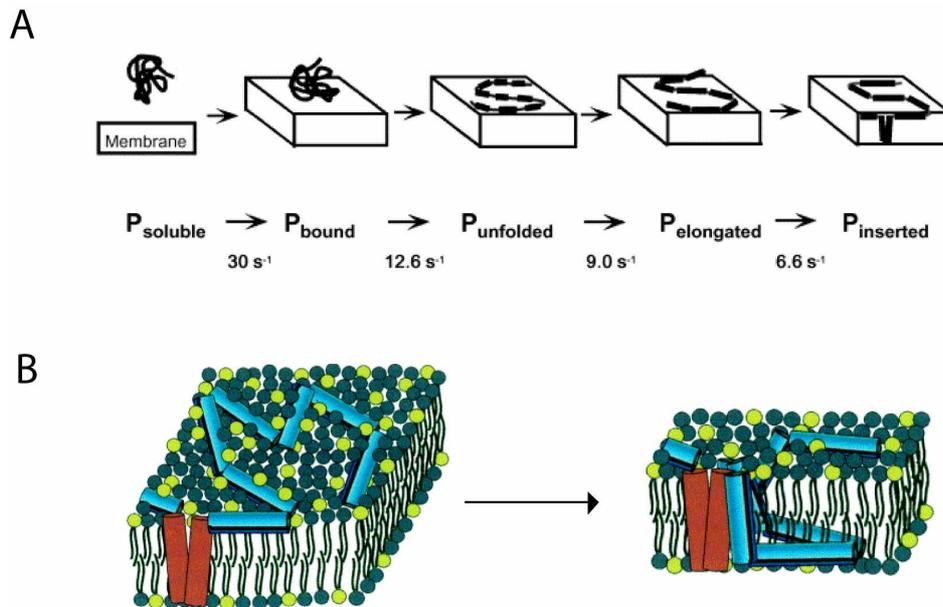


Fig. III.3 – Mécanisme d'insertion de la colicine E1 sur des bicouches lipidiques anioniques à pH 4. (A) Description des premières étapes aboutissant à une insertion en parapluie dans la membrane. Les constantes de vitesse sont indiquées pour chaque étape. (B) Transition conformationnelle aboutissant à la formation du pore fonctionnel. Les hélices hydrophobes 8 et 9 sont représentées en rouge et les hélices amphiphiles sont représentées en bleu. Les lipides anioniques sont en jaune. Extrait de [Zakharov & Cramer, 2002].

Les conditions physico-chimiques à l'interface déstabilisent ensuite la protéine qui se déplie et s'étale sur la surface (Fig. III.3A ; P_{unfolded}). Les hélices hydrophobes

sont alors exposées et leur insertion dans le coeur hydrophobe est la solution énergétique la plus favorable (Fig. III.3A ; P_{inserted}). Cette insertion est toutefois précédée de la croissance de plusieurs hélices (Fig. III.3A ; $P_{\text{elongated}}$). En effet, les hélices, composées en moyenne de 13 résidus sont trop courtes pour traverser la membrane. *Zakharov et al.* ont mis en évidence par dichroïsme circulaire et spectroscopie infrarouge un allongement hélicoïdale moyen de 4 résidus [*Zakharov et al.*, 1998]. La formation du pore fonctionnel intervenant dans une dernière étape est induite par un échange conformationnel vers un état plus compact (Fig. III.3B). Ce changement de conformation est sensible au potentiel de membrane et à la présence de lipides anioniques dans la bicouche lipidique [*Zakharov & Cramer*, 2002].

Ce mécanisme d'interaction à deux états liés à la membrane est également observé dans le cas du domaine de translocation de la toxine diphtérique.

1.4.2 Cas de la toxine diphtérique

La toxine diphtérique, protéine de 535 résidus, est sécrétée par la bactérie *Corynebacterium diphtheriae*. Elle infecte et tue les cellules de mammifères en inactivant le facteur d'élongation EF-2 et par conséquent la synthèse des protéines [*Collier*, 1975].

Comme les colicines, la toxine diphtérique est composée de 3 domaines [*Bennett et al.*, 1994] : un domaine N-terminal catalytique (domaine C), un domaine translocateur (domaine T) et un domaine C-terminal de liaison au récepteur (domaine R). L'infection par la toxine diphtérique se déroule en quatre étapes. (i) Dans un premier temps, la protéine se fixe au récepteur HB-EGF via son domaine R [*Shen et al.*, 1994]. (ii) Le complexe est ensuite internalisé et suit la voie de l'endocytose [*Morris & Saelinger*, 1985 ; *Moya et al.*, 1985]. La maturation des vésicules de transport endocytique conduit à une acidification du milieu intravésiculaire. (iii) Le pH acide induit la séparation du complexe toxine-récepteur et la liaison à la membrane du domaine T [*Lemichéz et al.*, 1997]. (iv) L'insertion dans la membrane du domaine T permet la translocation du domaine C, létal pour la cellule.

Le domaine T est constitué de 9 hélices α (TH1 à TH9) et constitue une entité structurale et fonctionnelle [*Zhan et al.*, 1994]. Comme le domaine C des colicines, l'ensemble est globulaire et replié en trois couches. La couche hydrophobe est constituée des hélices TH8 et TH9.

Le mécanisme d'insertion du domaine T dans la membrane est déclenché par l'acidification du milieu intravésiculaire. Deux états liés à la membrane ont été

distingués : un état adsorbé sur la surface membranaire et un état fonctionnel profondément inséré dans la bicouche. Plusieurs auteurs suggèrent que l'acidité du milieu induit une transition du domaine T vers un état molten globule [Chenal *et al.*, 2002 ; Malenbaum *et al.*, 1998 ; Zhan *et al.*, 1994]. Par ailleurs, la baisse de pH augmente l'hydrophobicité de la protéine en neutralisant les résidus acides.

Dans une première étape, un pH légèrement acide (pH 6) induit la liaison sur une membrane anionique, laquelle met en jeu l'insertion dans la bicouche lipidique des hélices TH8 et TH9 *via* des forces hydrophobes [Chenal *et al.*, 2002]. Dans une deuxième phase, le pH diminue et modifie la balance des interactions dipolaires attractives et répulsives entre la partie N-terminale de la protéine et la membrane. La partie N-terminale rendue plus hydrophobe autorise une insertion plus profonde dans la membrane [Chenal *et al.*, 2002]. Le domaine T est alors transmembranaire et fonctionnel. Dans cet état, les résidus acides de la boucle entre les hélices TH8 et TH9 sont en contact avec le cytosol à pH 7 et sont déprotonés à ce pH. Leur polarité augmente et ils ne pourront pas retransiter à travers le centre hydrophobe de la membrane. Ce mécanisme permet le blocage du domaine T en configuration transmembranaire [Umata & Mekada, 1998].

Contrairement aux colicines, les différents états liés à la membrane du domaine T de la toxine diphtérique sont stabilisables à l'équilibre : (i) le premier état adsorbé sur la surface membranaire est stabilisé à pH 6 et (ii) le pore fonctionnel est stabilisé autour de pH 4 [Chenal *et al.*, 2002]. De nombreux auteurs se sont alors attachés à détailler les structures des états liés à la membrane [Cabiaux *et al.*, 1994 ; Malenbaum *et al.*, 1998 ; Senzel *et al.*, 2000]. Les résultats les plus récents pour l'état transmembranaire à pH4 sont schématisés dans la figure III.4.

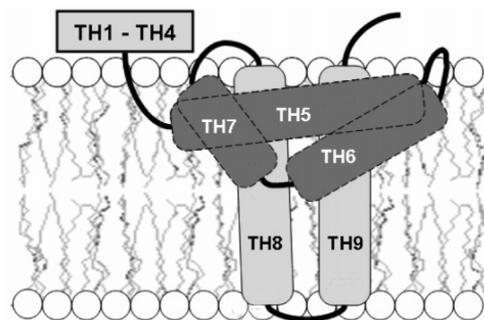


Fig. III.4 – Diagramme schématisique de la topographie du domaine T dans son état transmembranaire. Les hélices hydrophobes TH8 et TH9 traversent la membrane. Les hélices TH5 à TH7 forment un ensemble compact inséré profondément dans la zone hydrophobe de la membrane. Les hélices TH1 à TH4 sont flexibles et étalées sur la surface membranaire. Extrait de [Zhao & London, 2005].

Les études sur la toxine diphtérique, les colicines et les autres toxines en hélices α suggèrent un mécanisme commun d'insertion en deux étapes induit par des pH acides. Une transition conformationnelle vers un état partiellement replié semble être un pré-requis nécessaire à l'insertion de ces protéines [*Chenal et al.*, 2002 ; *van der Goot et al.*, 1991]. De même, les colicines et la toxine diphtérique nécessitent la croissance de certaines hélices pour traverser la membrane. Par ailleurs, les interactions protéines-lipides sont peu spécifiques. Néanmoins, la composition lipidique et principalement la présence de lipides anioniques est un facteur essentiel de l'insertion membranaire et de la stabilité des protéines amphitropiques.

CHAPITRE 2

BUT DE L'ETUDE

L'apo-myoglobine a été identifiée comme une protéine amphitropique. Cependant, les conditions de la liaison aux membranes ne sont pas encore établies. Ainsi, nous proposons de déterminer les facteurs et les forces qui influencent le partitionnement de l'apo-myoglobine dans des vésicules lipidiques. Les LUVs ont été préférées aux SUVs comme modèle membranaire car les vésicules de grande taille sont plus stables et le rayon de courbure est plus proche de la réalité physiologique.

La dépendance au pH de la liaison aux membranes sera examinée en détail par des expériences de fluorescence intrinsèque et des mesures de partition par centrifugation. Une éventuelle insertion de la protéine dans les bicouches lipidiques sera observable par des expériences de perméabilisation de vésicules. Les diverses conditions de force ionique et de charge des membranes devraient permettre la caractérisation des interactions mises en jeu. L'investigation structurale des états liés à la membrane sera entreprise par dichroïsme circulaire ainsi que par des expériences d'échanges H/D suivis en spectrométrie de masse. Nous essaierons de déterminer avec une résolution de quelques résidus les régions de la protéine qui sont en interaction avec les membranes.

Le mécanisme de liaison de l'apo-myoglobine aux membranes sera comparé aux mécanismes des insertions membranaires connus pour les colicines et la toxine diphtérique. En effet, de nombreuses toxines bactériennes et d'autres protéines physiologiquement très importantes comme les protéines de la famille Bcl-2 présentent un repliement de type globine. L'apo-myoglobine est la protéine dont la structure et les changements conformationnels sont les mieux connus dans cette famille. L'étude mécanistique et structurale de la liaison de l'apo-myoglobine aux membranes devrait donc être informative sur les modes d'interactions entre les protéines de type globine et les membranes.

Par ailleurs, la liaison de l'apo-myoglobine sur les membranes pourrait être impliquée, *in vivo*, dans la conversion de la forme apo vers la forme holo fonctionnelle. Puisque l'hème est contenu dans les membranes mitochondriales, la liaison de l'apo-myoglobine sur les membranes faciliterait le transfert de l'hème vers son site de liaison protéique. Nous proposons de vérifier cette hypothèse par

des expériences de relargage d'hème contenu dans des vésicules lipidiques en présence d'apo-myoglobine.

En définitive, trois objectifs principaux se dessinent :

- Etude du mécanisme de liaison de l'apo-myoglobine aux membranes.
- Comparaison de ce mécanisme avec des protéines amphitropiques de la famille des globines.
- Rôle physiologique de la liaison aux membranes dans la conversion vers la forme holo de la myoglobine.

CHAPITRE 3

RESULTATS :

Mécanisme de liaison de l'apo-myoglobine aux membranes

La liaison de l'apo-myoglobine aux membranes a été observée par des expériences de centrifugation et de spectroscopie de fluorescence des tryptophanes. De manière à sonder l'influence des interactions électrostatiques et hydrophobes sur cette liaison, les expériences ont été réalisées en présence de LUVs zwitterioniques ou anioniques. De plus, des variations de la force ionique ont permis d'examiner la balance entre ces deux types d'interactions.

Les interactions électrostatiques sont nécessaires à la liaison de la protéine aux membranes

La liaison de l'apo-myoglobine aux membranes est déclenchée par l'acidification du milieu. A basse force ionique, une liaison faible est observée pour des pH entre 4 et 3 en présence de LUVs neutres, alors que la totalité de la fraction protéique est liée aux LUVs anioniques dès pH 5.5. Ce résultat met en évidence l'importance des interactions électrostatiques entre la protéine globalement chargée positivement à pH acide et les têtes polaires des lipides acides chargées négativement.

Un processus en deux étapes : liaison et insertion membranaire

D'une manière très similaire à la toxine diphtérique [Chenal *et al.*, 2002], deux étapes dépendantes du pH peuvent être distinguées dans les interactions de l'apo-myoglobine avec les LUVs anioniques. La première étape, détectée par des expériences de centrifugation, correspond à la liaison de la protéine sur la membrane à un pH faiblement acide. Cette liaison n'a pas d'influence significative sur les spectres de fluorescence et de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain. Ce résultat indique que l'environnement des tryptophanes et les structures secondaires de la protéine ne sont pas modifiés par la liaison à la membrane.

La deuxième étape, détectée par fluorescence intrinsèque entre pH 5.2 et pH 3.5 (dans le cas d'une faible force ionique), est associée à la pénétration des tryptophanes dans un environnement très hydrophobe. L'apo-myoglobine provoque alors la perméabilisation des vésicules lipidiques par micellisation. Ces observations suggèrent une insertion de la protéine dans la bicouche lipidique *via* des forces hydrophobes. Le spectre de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain montre que le contenu en hélices α de la forme liée à pH 4 est supérieur à celui de la forme soluble. Cette stabilisation des structures secondaires de l'état inséré dans les membranes a également été observée pour les colicines et la toxine diphtérique [Chenal *et al.*, 2002 ; Zakharov *et al.*, 1999]. La croissance de certaines hélices leur permettrait d'adopter une configuration transmembranaire. Cependant, aucune preuve directe ne montre la présence d'hélices transmembranaires pour l'apo-myoglobine liée aux membranes à pH 4. Les déplacements du spectre d'émission de fluorescence des tryptophanes et les changements de structure secondaire observés suggèrent qu'une transition conformationnelle vers un état partiellement replié soit nécessaire pour l'insertion membranaire. En effet, les deux tryptophanes sont localisés dans l'hélice A de l'apo-myoglobine au sein du coeur hydrophobe. La stabilisation d'un état partiellement replié permettrait d'exposer ce coeur hydrophobe, et faciliterait son insertion dans la bicouche lipidique. De plus, cette seconde étape a lieu dans des conditions dénaturantes de pH, favorables au dépliement de la protéine. Dans le cas de nombreuses protéines amphitropiques de la même famille structurale, cet état est apparenté à un état molten globule [Parker & Feil, 2005].

En parallèle, nous avons suivi, la formation de la myoglobine par spectroscopie UV-visible. Les cinétiques de transfert de l'hème contenu dans la bicouche lipidique de LUVs anioniques vers l'apo-myoglobine ont été enregistrées à différents pH. Les résultats montrent que la vitesse de transfert est maximale lorsque la protéine est en solution à pH neutre. En revanche, la vitesse de fixation de l'hème est ralentie lorsque la protéine est liée aux vésicules. Par conséquent, la liaison de l'apo-myoglobine sur les membranes à pH acide n'est pas favorable à la formation de la forme holo.

Le mécanisme de transfert de l'hème est illustré dans la figure III.5. La fixation de l'hème sur l'apo-myoglobine nécessite que le site de liaison soit structuré. Par conséquent, la forme native de la protéine est requise. Si la protéine se liait aux vésicules sous une forme native très favorable à la fixation de l'hème, le rapprochement des deux partenaires devrait accélérer le transfert du cofacteur. Cependant, le résultat contraire est observé. La liaison de la protéine aux membranes initiée par des pH acides stabilise alors un état partiellement replié. La fixation de l'hème apparaît limitée par le relargage de la protéine insérée dans la membrane vers une forme en solution favorable à la liaison de l'hème. A pH 4, les deux états, solubles et membranaires, sont incapables de lier l'hème. Ainsi, ce

résultat valide notre hypothèse précédente qui suggérait que la liaison de l'apo-myoglobine aux membranes stabilise un état molten globule.

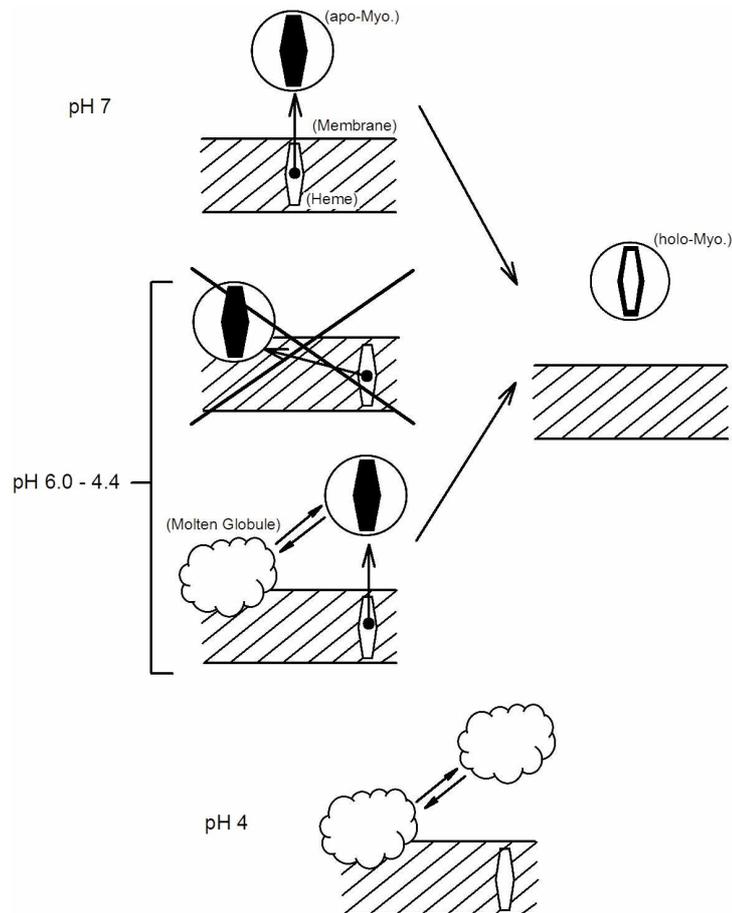


Fig. III.5 – Schéma proposé pour le transfert de l'hème contenu dans la bicouche lipidique vers le site de liaison de l'apo-myoglobine. A pH 7, la protéine est soluble et native. La vitesse de transfert de l'hème est maximale. Bien que l'hème soit peu soluble en milieu aqueux, la forte affinité de l'apo-myoglobine pour l'hème entraîne la diffusion de ce dernier vers son site de liaison. Lorsque le pH s'acidifie, le transfert est moins efficace. Par conséquent, la protéine ne se lie pas aux membranes sous une forme native. En effet, la protéine est en équilibre entre un état molten globule lié à la membrane et une forme native soluble. L'hème ne se fixe que sur la protéine native soluble. La vitesse de transfert de l'hème est alors limitée par le relargage du molten globule lié vers la forme native soluble. A pH 4, les deux formes, liées et libres, sont dans un état molten globule incapable de lier l'hème.

En définitive, pour une faible force ionique, deux états liés aux membranes anioniques sont détectés en fonction de l'acidité du milieu. Dans le premier état à pH 5.5, la totalité des protéines est attachée aux membranes et stabilisée dans un état molten globule avec les tryptophanes dans un environnement relativement hydrophobe. Dans le second état à pH 4, la protéine s'insère plus profondément dans la bicouche lipidique. Les deux transitions, liaison et insertion, sont déplacées vers des pH plus acides lorsque la force ionique augmente. Cette sensibilité à la force ionique souligne l'importance des interactions électrostatiques pour la stabilisation des deux états liés. Par ailleurs, pour des pH très acides (pH < 3), la protéine est relarguée des membranes. Ce relargage est dû à la neutralisation des membranes à ce pH, entraînant la rupture des interactions électrostatiques entre la protéines et les lipides anioniques. Cet effet est concomitant avec la dénaturation de l'apo-myoglobine. Le mécanisme général de liaison aux membranes tel que nous le proposons est schématisé dans la figure III.6. L'étude structurale des états liés à la membrane est envisagée dans le chapitre 4.

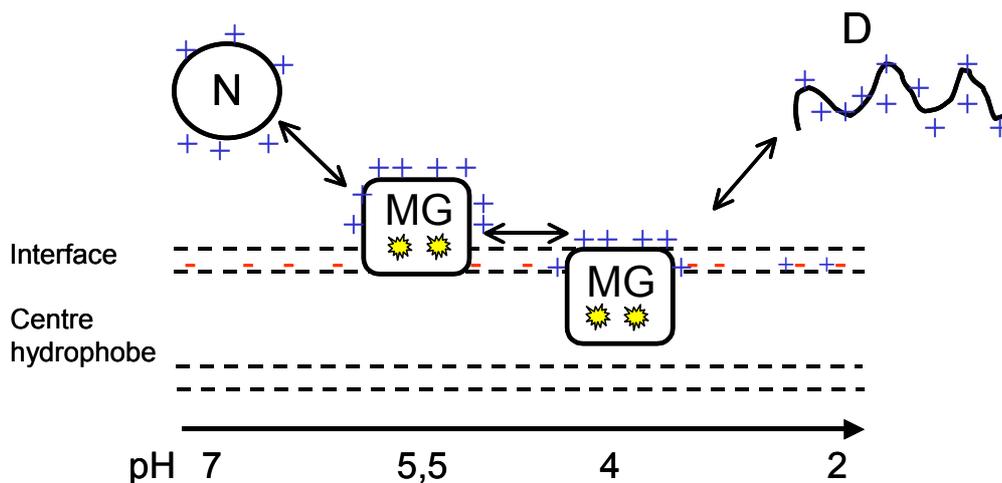


Fig. III.6 – Mécanisme de liaison de l'apo-myoglobine sur des LUVs anioniques en fonction du pH. N, MG et D représentent respectivement l'état natif, l'état molten globule et l'état dénaturé de l'apo-myoglobine. Les tryptophanes sont schématisés en jaune. A pH 7, l'apo-myoglobine est native et soluble. La liaison à la membrane est induite par l'acidification du milieu et stabilise un état molten globule. Ce dernier est lié aux membranes dès pH 5.5. Il semble être stabilisé essentiellement par des interactions électrostatiques de surface entre les nombreuses charges positives de la protéine à ce pH et les têtes polaires anioniques. L'état inséré à pH 4 est stabilisé par un ensemble d'interactions électrostatiques et hydrophobes. A pH 2, l'acide phosphatidique est protoné. La membrane est alors globalement neutre et les interactions électrostatiques sont rompues. L'apo-myoglobine est alors relarguée et se dénature.

Ce mécanisme d'insertion membranaire en deux étapes, déclenché par des pH acides, semble être une caractéristique commune aux protéines amphitropiques possédant un repliement de type globine. En effet, l'acidité du milieu permet la protonation de résidus acides et rend plus hydrophobes certaines hélices amphiphiles. L'insertion de ces dernières dans la bicouche lipidique devient alors favorable. Dans le cas de l'apo-myoglobine, la protonation de trois résidus glutamates rend l'hélice A plus hydrophobe, comme en attestent nos calculs de profils d'hydrophobicité à pH neutre et acide. Le même comportement est observé pour les hélices amphiphiles N-terminales du domaine C de la colicine E1 et du domaine T de la toxine diphtérique.

L'interaction apo-myoglobine-membrane n'est pas impliquée dans la fixation de l'hème

Une des problématiques de ce travail était de comprendre la dernière étape de synthèse de la myoglobine, à savoir la fixation de l'hème. Ce dernier est, *in vivo*, contenu dans les membranes mitochondriales. Par conséquent, la liaison de l'apo-myoglobine sur les membranes pourrait faciliter la fixation de l'hème. *In vitro*, nous avons déjà proposé que la fixation de l'hème soit limitée par le relargage de la protéine insérée dans la membrane vers une forme native en solution. La vitesse de transfert de l'hème de la bicouche lipidique vers la protéine est donc gouvernée par une meilleure affinité de l'hème pour la protéine native en solution que pour la bicouche lipidique. *In vitro*, la liaison de la protéine sur les membranes n'est donc pas nécessaire pour accélérer la formation de la forme holo.

-ARTICLE 2-

**Interactions of Apomyoglobin with Membranes:
Mechanisms and Effects on Heme Uptake.**

Grégory Vernier, Alexandre Chenal, Heidi Vitrac, Roya Barumandzadhe,
Caroline Montagner, and Vincent Forge.

Protein Science

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

GRÉGORY VERNIER,^{1,2} ALEXANDRE CHENAL,^{1,3} 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

¹These authors contributed equally.

Present addresses: ²Harvard Medical School, Department of Microbiology and Molecular Genetics, 200 Longwood Avenue, Boston, MA 02115, USA. ³Biochemistry 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; ⁻LUVs: anionic LUVs; [±]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 (O₂). Hemoglobin carries oxygen in red blood cells, and myoglobin transports it in the cytosol of O₂-consuming myocytes, such as those of cardiac muscles and red skeletal muscle fibers (Wittenberg and Wittenberg 2003). The physiological process of O₂ transport requires the reversible binding of O₂ 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 α -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 α -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

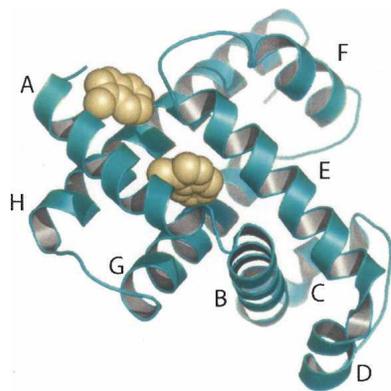


Figure 1. Ribbon representation of aMb. The α -helices are marked with letters from A to H. The side chains of Trp7 and Trp14 located within the α -helix A are shown in yellow.

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 α -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 α -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 α -helix (α A) (Fig. 1). The maximum emission wavelength of the intrinsic fluorescence spectrum (λ_{\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 λ_{\max} for the protein in solution (triangles)

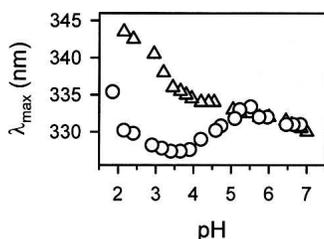


Figure 2. Changes in the maximum emission wavelength (λ_{\max}) of the fluorescence emission spectrum as a function of the pH. aMb (1 μ M) in the absence (triangles) or presence (circles) of \neg LUVs (300 μ M). Both experiments were performed in the presence of 30 mM NaCl.

and in the presence of anionic LUVs (\neg LUVs) (circles). In solution, we obtained the λ_{\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 λ_{\max} is around 330 nm, showing that the Trps located in the helix A are within a hydrophobic environment. As the pH decreases, λ_{\max} is shifted toward higher values. A first transition is observed between pH 7 and pH 4, leading to a value of λ_{\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, λ_{\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 \neg 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 \neg LUVs, the decrease in λ_{\max} below pH 5 indicates that the Trps enter a more hydrophobic environment. The lowest value of λ_{\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) ($pK_a = 2.9$), leading to the disappearance of the electrical charge on the surface of the membrane. Besides λ_{\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 \neg LUVs at low ionic strength, the same conditions as in Figure 2. Both λ_{\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 \neg LUVs (Fig. 3A, open circles). The changes recorded with aMb in solution (Fig. 3A, open triangles), and in the presence of \neg 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 \neg 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

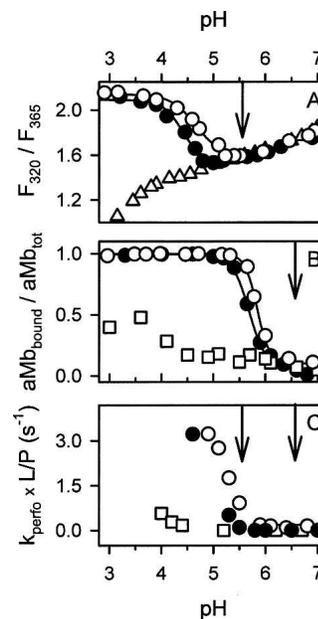


Figure 3. Effects of charge and ionic strength on the interaction of aMb with LUVs as a function of pH. All experiments were carried out with a protein concentration equal to 1 μ M, in the absence of membrane (triangles), in the presence of \neg LUVs (circles), or in the presence of \pm LUVs (EPC only) (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_{perfo}) 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 \neg 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 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 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 LUVs. At low salt concentration (Fig. 3B, open circles), partition measurements indicated that aMb was completely bound to 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 LUVs (LUVs), 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 LUVs . Curve fitting of the data obtained in the presence of 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 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 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 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 LUVs. In experiments with anionic and zwitterionic 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_{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 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 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 LUVs (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 ($L/P \cong 300$) was much lower than that commonly used in the case of bacterial toxins ($L/P \cong 3000$) (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 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 $\bar{\text{LUV}}$ s 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 $\bar{\text{LUV}}$ s 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 α -helix content. In the presence of $\bar{\text{LUV}}$ s (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

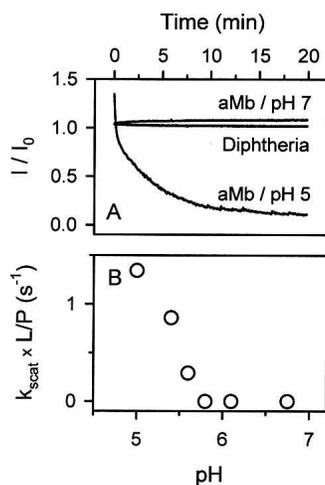


Figure 4. Light scattering changes. (A) Light scattering was monitored by the ratio between the light intensity measured as a function of time and that before the addition of the protein (I/I_0). Shown are the kinetics with aMb (1 μM ; L/P = 350) in the presence of 30 mM NaCl at pH 7 and pH 5, and with the translocation domain of the diphtheria toxin (100 nM; L/P = 3000) at pH 5. (B) Observed rate constants of light scattering changes (k_{scat}) as a function of pH.

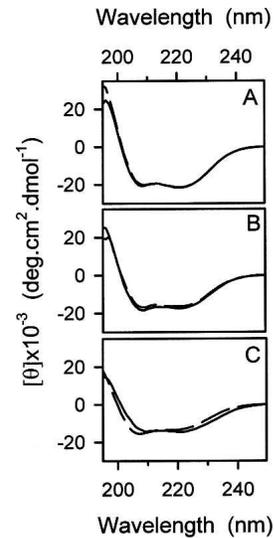


Figure 5. Far-UV CD spectra of aMb in the presence of $\bar{\text{LUV}}$ s at various pHs. (Dashed lines) aMb (2.5 μM) in solution. (Continuous lines) aMb (2.5 μM) in the presence of $\bar{\text{LUV}}$ s (L/P = 300). (A) pH 7; (B) pH 5.5; (C) pH 4.

native state at pH 7. No significant change was observed in the spectrum recorded in the presence of $\bar{\text{LUV}}$ s (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 $\bar{\text{LUV}}$ s (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 $\bar{\text{LUV}}$ s at pH 7 and 100% for pHs lower than 6 (Fig. 6B, closed circles). The binding of heme to aMb was

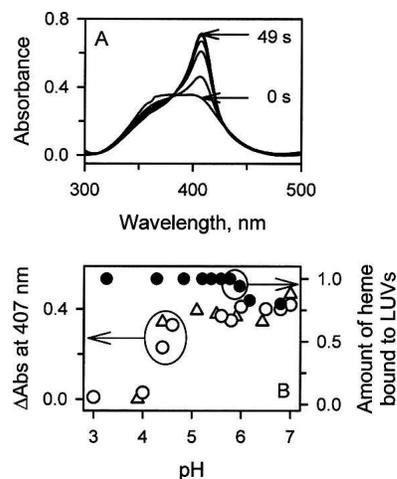


Figure 6. (A) The effect of the binding to aMb on the absorbance spectrum of heme is illustrated with absorbance spectra recorded during the heme uptake at pH 5.6 in the presence of LUVs. The spectrum at “0 s” corresponds to the heme incorporated in LUVs in a preliminary step. The intensity of the Soret 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 μ M) in the presence of $\bar{\text{LUVs}}$ (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 μ M) in the absence of $\bar{\text{LUVs}}$ (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 $\bar{\text{LUVs}}$ (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 $\bar{\text{LUVs}}$, 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 $\bar{\text{LUVs}}$ (Fig. 7). The pH range of the investigation was 7–4.4 in the presence of $\bar{\text{LUVs}}$, and 7–5.5 in the absence of membrane. Difficulties in heme handling impair the experiments at lower pH in the absence of $\bar{\text{LUVs}}$. 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 $\bar{\text{LUVs}}$ (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 $\bar{\text{LUVs}}$ (Fig. 7B). This suggests that the binding of aMb to $\bar{\text{LUVs}}$, 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 $\bar{\text{LUVs}}$ described earlier (Figs. 3A,B). This suggests that a first deceleration of the heme uptake occurs upon the binding of aMb to $\bar{\text{LUVs}}$ (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 $\bar{\text{LUVs}}$ 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

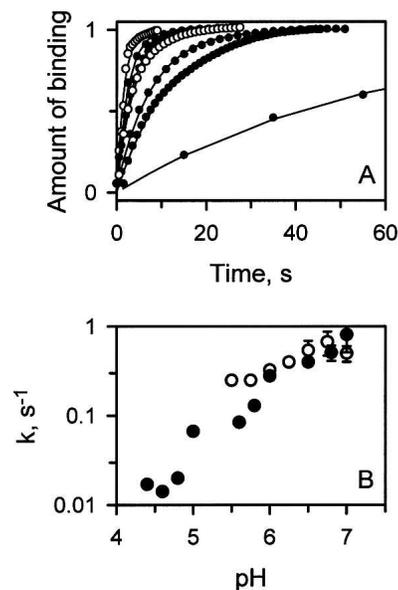


Figure 7. (A) Kinetics of heme uptake by apomyoglobin. The conditions are the same as in Figure 6. Kinetics (open circles) in the absence of LUVs: The fastest kinetics were recorded at pH 6.5 and the slowest at pH 5.5. Kinetics (closed circles) in the presence of $\bar{\text{LUVs}}$: From the fastest 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 $\bar{\text{LUVs}}$.

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 $\bar{\text{LUVs}}$, 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 in 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 $\bar{\text{LUVs}}$ (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 α -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 α -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 α -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 α -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 $\bar{\text{LUVs}}$. 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 O₂ 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 $\epsilon_{280\text{nm}} = 15,200 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ and $\epsilon_{288\text{nm}} = 10,800 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. 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 (λ_{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 $100 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$. 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_{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_{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_{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 μM of aMb with L/P = 350 or 100 nM of diphtheria toxin domain with L/P = 3000. The observed rate constants (k_{scat}) 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 μM 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 μM . 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_{bh}) was determined as follows: $f_{\text{bh}} = (A_0 - A)/A_0$, 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 μM in 10 mM NaOH. LUVs (120 μM) were loaded with heme at a final concentration of 3 μM (lipid/heme = 40). The heme uptake kinetics were initiated by adding aMb (3 μM) (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 μM aMb/3 μM 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'Energie Atomique (Programme: Protéines Membranaires).

References

- Barrick, D. and Baldwin, R.L. 1993. Three-state analysis of sperm whale apomyoglobin folding. *Biochemistry* **32**: 3790–3796.
- Basova, L.V., Tiktopulo, 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.
- Bennett, 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., Paternostre, 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 Antonny, B. 2003. Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature* **426**: 563–566.
- Cannon, J.B., Kuo, 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 α -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.
- Dailey, 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.
- Epanand, R.M. 1998. Lipid polymorphism and protein–lipid interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1376**: 353–368.
- Falnes, P.O., Madshus, 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 Kutysenko, 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 Epanand, R.M. 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, phycocyanins 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 Cornell, 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., Pattus, F., Tucker, A.D., and Tsernoglou, 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. 1. 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 Pattus, F. 1991. A “molten-globule” membrane-insertion intermediate of the pore-forming domain of colicin A. *Nature* **354**: 408–410.
- Weisbuch, S., Gerard, F., Padeloup, M., Cappadoro, J., Dupont, Y., and Jamin, M. 2005. Cooperative sub-millisecond folding kinetics of apomyoglobin pH 4 intermediate. *Biochemistry* **44**: 7013–7023.
- 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., Araki, 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.

CHAPITRE 4

STRUCTURE DES ETATS LIES A LA MEMBRANE :

Expériences d'échanges H/D suivies par spectrométrie de masse – Résultats non publiés

Les résultats présentés ci-dessous sont préliminaires et ne sont qu'une première approche d'une étude structurale et thermodynamique plus aboutie sur les états liés à la membrane mis en évidence dans le chapitre précédent. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le laboratoire de spectrométrie de masse des protéines de l'IBS à Grenoble dirigé par Eric Forest.

4.1 Objectifs

D'une manière similaire aux expériences d'échanges H/D réalisées dans la partie II, le but est de localiser les régions de la protéine en contact avec les lipides. Cependant, contrairement aux expériences réalisées avec l' α -lactalbumine, l'échange isotopique ne sera pas suivi par spectroscopie RMN mais par spectrométrie de masse. Ce type d'expérience est couramment utilisé pour sonder la structure et la dynamique des protéines solubles [Burns-Hamuro *et al.*, 2005 ; Cravello *et al.*, 2003 ; Wales & Engen, 2005]. Certains auteurs ont déjà utilisé cette méthode pour étudier la structure de peptides synthétiques ancrés dans des bicouches lipidiques [de Planque *et al.*, 2003 ; Demmers *et al.*, 2000 ; Demmers *et al.*, 2001]. Cependant, elle n'a jamais été appliquée à une protéine entière liée aux membranes. L'échange d'un hydrogène contre un deutérium entraîne un changement de masse de la protéine facilement observable par cette technique. Dans une première étape préliminaire, les vitesses d'échanges isotopique ne sont pas suivies à l'échelle du résidu comme en spectroscopie RMN mais à l'échelle globale. Par la suite, l'objectif sera d'obtenir une résolution à l'échelle de quelques résidus par une protéolyse ménagée de l'apo-myoglobine réalisée après les échanges. Ainsi, les peptides issus de la digestion enzymatique qui apparaîtront plus protégés contre l'échange isotopique en présence de lipides seront directement

impliqués dans les interactions protéines-lipides. Ce type d'expérience a déjà été réalisé sur des protéines solubles [Cravello *et al.*, 2003]. Notre travail sera donc de mettre au point la méthode en présence de lipides. Pour cela, la digestion enzymatique de l'apo-myoglobine devra être effectuée dans des conditions où les vitesses d'échanges H/D sont très ralenties. L'identification des fragments peptidiques sera obtenue par des expériences de spectrométrie de masse en tandem. Contrairement à la spectroscopie RMN, la spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF peut-être utilisée en présence de lipides. Cette technique ouvre alors la possibilité d'étudier les interactions protéines-lipides dans les cas où la liaison de la protéine aux membranes est difficilement réversible. Ce type de comportement est notamment observé pour les colicines et la toxine diphtérique. Par conséquent, les expériences d'échanges H/D suivies en spectrométrie de masse pourront être appliquées à de nombreuses protéines amphitropiques.

4.2 Matériels et méthodes

4.2.1 Principe général de l'expérience

Dans un premier temps, l'expérience, décrite dans la figure III.7, a été effectuée à pH 4 en présence d'une faible force ionique, c.à.d sur l'état de l'apo-myoglobine le plus profondément inséré dans la bicouche lipidique. Nous avons réalisé un échange inverse deutérium/hydrogène 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 préparés dans des tampons deutérés.

Les expériences ont été réalisées dans la glace de manière à ralentir les vitesses d'échanges isotopique. La réaction d'échange D/H est précédée d'une étape d'incubation : la protéine deutérée et lyophilisée est dissoute dans du tampon deutéré avec et sans LUVs, puis incubée 2 heures. Les deux essais, en présence ou en absence de lipides, sont réalisés dans les mêmes conditions de pD. Ils seront de cette manière directement comparables. Le pD des différentes solutions est mesuré sur un pH-mètre standardisé avec des solutions hydrogénées. La correspondance est donnée par l'équation suivante : $pD = pH_{\text{mesuré}} + 0.4$ [Glasoe & Long, 1960]. La réaction d'échange D/H est ensuite amorcée par la dilution du mélange précédent dans du tampon citrate hydrogéné à pH 4. L'échange isotopique est stoppé (cette étape est appelée "quenching") à différents temps par un saut de pH jusqu'à pH 2.2 où les échanges sont très limités [Bai *et al.*, 1993] (cf. annexe sur les échanges H/D). Les échantillons sont ensuite congelés et conservés avant l'analyse en

spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight ; cf. section 4.2.2, page 87). L'utilisation d'une ionisation de type MALDI est peu courante dans le cas des expériences d'échanges H/D. Cependant, elle est justifiée dans notre cas car la présence de lipides rend l'utilisation d'une source de type électrospray très difficile.

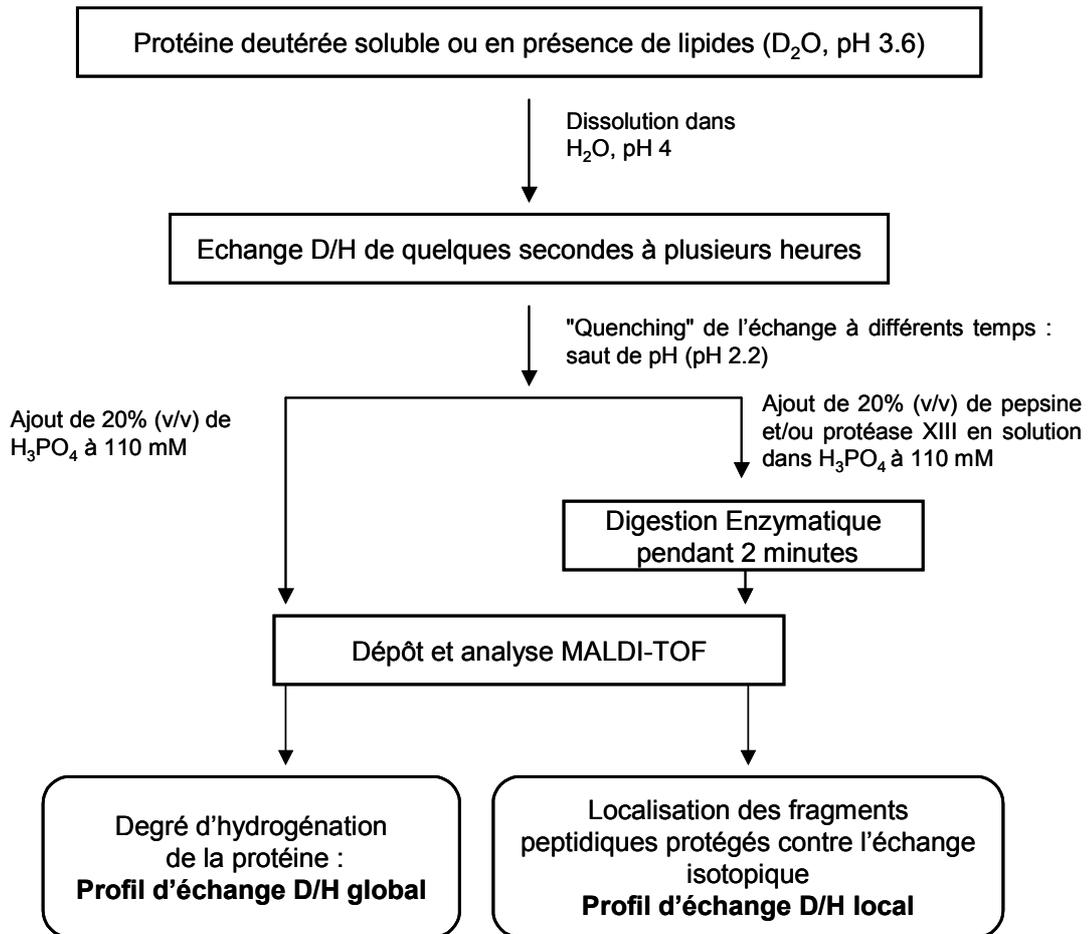


Fig. III.7 – Protocole de notre expérience d'échanges D/H en marquage continu en présence ou non de lipides.

Dans le travail présenté, seules l'expérience d'échange D/H sur la protéine entière a été réalisée. Elles nous informent sur la protection globale de la protéine insérée dans la membrane contre l'échange isotopique. Cependant, elles ne permettent pas de localiser les régions enfouies dans la bicouche lipidique ou, au contraire, exposées au solvant. L'objectif final est d'obtenir un profil de protection

membranaire à l'échelle de quelques acides-aminés. La protéine doit donc subir une protéolyse ménagée après l'échange. Pour cela, le "quenching" de l'échange est accompagné d'une digestion enzymatique. Ces expériences ne sont pas complètes à ce jour mais nous avons déjà mis au point la digestion enzymatique de l'apo-myoglobine et le séquençage des peptides issus de la digestion. La pepsine et la protéase de type XIII d'*Aspergillus saitoi* ont été utilisées. Ces deux enzymes sont actives à pH 2.2 et à basse température, c.à.d dans des conditions où l'échange isotopique est très ralenti. Ces protéases sont peu spécifiques mais des travaux précédents sur des protéines de hauts poids moléculaires ont montré une très bonne reproductibilité des sites de coupure [Cravello *et al.*, 2003]. La distribution des différents peptides obtenus est déterminée par analyse MALDI-TOF/TOF (cf. section 4.2.6.1, page 90) pour la protéine soluble. De manière similaire à l'expérience sur la protéine entière, le degré d'hydrogénation de chaque peptide identifié est aisément déterminé par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

4.2.2 Deutération de la protéine

Une solution d'apo-myoglobine à 200 μM dans l'eau pure est diluée 20 fois dans du D_2O à pD 7. Après 15 heures d'incubation, la solution est lyophilisée. Trois cycles successifs sont réalisés.

4.2.3 Incubation

L'incubation est réalisée à un pH mesuré de 3.6 de manière à obtenir un pD égale à 4. La protéine deutérée et lyophilisée est diluée à 60 μM final dans du tampon deutéré (citrate 4 mM avec 30 mM de NaCl) en présence et en absence de vésicules. La concentration est estimée grâce à l'absorbance à 280 nm. Les concentrations finales de protéine et de lipides sont respectivement de 20 μM et 6 mM, soit un rapport molaire lipide sur protéine de 300 ($L/P = 300$). Dans ces conditions, la totalité des protéines est liée aux vésicules. L'incubation dure 2 heures en présence de lipides. Quelques minutes suffisent pour la protéine en solution.

4.2.4 Cinétique d'échange D/H globale et "quenching"

La cinétique d'échange isotopique débute lorsque les solutions précédentes (avec et sans LUVs) sont diluées 10 fois dans un tampon citrate 4 mM, NaCl 30 mM/ H_2O , pH 4. A différents temps d'échange allant de 10 secondes à 1h30, 80 μl de solution sont mélangés à 20 μl d'acide phosphorique à 110 mM. La concentration finale de protéines est de 1.6 μM à pH 2.2. Les échantillons sont

ensuite congelés dans l'azote liquide et conservés à -20°C en attendant l'analyse par spectrométrie de masse.

4.2.5 Analyse par spectrométrie de masse

4.2.5.1 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. Tous les spectromètres de masse comprennent 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 extraits sont ensuite séparés dans l'analyseur selon leur rapport m/z puis un détecteur mesure les quantités respectives des ions séparés.

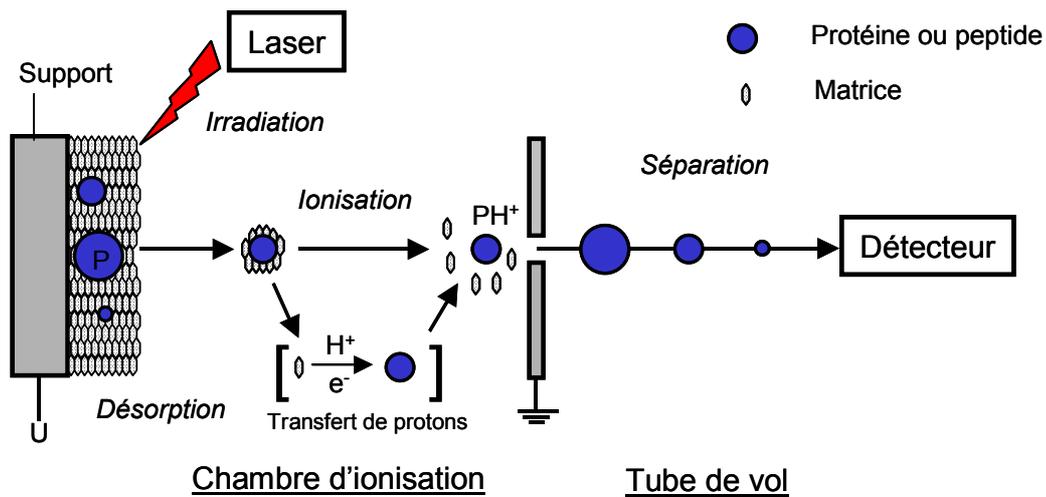


Fig. III.8 – Principe du spectromètre de masse de type MALDI-TOF. Les molécules de la matrice et les protéines sont désorbées d'un support métallique par une impulsion laser. La matrice transfère des charges sur les peptides qui sont accélérés par une différence de potentiel et séparés selon leurs masses dans le tube de vol. Le temps entre la désorption et l'analyse permet la détermination du rapport m/z pour chaque ion séparé.

Nous avons utilisé un spectromètre de masse de type MALDI-TOF (Fig. III.8). Dans ce cas, une désorption assistée par un rayonnement laser permet l'ionisation des molécules. L'échantillon protéique est déposé sur une surface métallique et

co-cristallise avec une matrice. Cette matrice a la particularité de capter l'énergie lumineuse d'un faisceau monochromatique et de la transmettre aux molécules à ioniser. Les cristaux sont soumis à une impulsion laser de courte durée (1 à 10 ns) qui entraîne une évaporation rapide des molécules de la matrice, provoquant ainsi leur excitation et le transfert de protons et d'électrons entre la matrice et la protéine. Les molécules ainsi désorbées, sont accélérées grâce à l'application d'une haute tension. Les ions sont séparés puis analysés par l'analyseur TOF. Cet analyseur est un long tube droit sous un vide poussé, où les ions transitent jusqu'au détecteur. Les ions accélérés ont une énergie cinétique dépendante de leur masse et de leur charge pour une différence de potentiel constante. Connaissant la longueur du tube de vol, il suffit de mesurer le temps séparant l'éjection de la source et l'arrivée sur le détecteur pour déterminer le rapport m/z de l'ion suivant l'équation suivante :

$$t = [d / (2V)^{1/2}] \times (m/z)^{1/2}$$

où t est le temps de vol, V la tension d'accélération et d la distance parcourue.

L'intérêt majeur de la technique MALDI est de produire des ions pour la plupart monochargés, ce qui représente un avantage considérable pour l'analyse de mélanges peptidiques complexes. Par ailleurs, c'est une technique simple et rapide qui tolère la présence de sels, détergents, tampons et évite ainsi une étape de dessalage. La rapidité de la mesure est un avantage de poids pour les expériences d'échanges H/D. De plus la concentration de matériel protéique nécessaire est relativement faible (environ $10 \text{ pmoles} \cdot \mu\text{l}^{-1}$).

4.2.5.2 Protocole

Les échantillons précédemment congelés sont décongelés à température ambiante. $0.5 \mu\text{l}$ de solution est prélevé et mélangé avec $0.5 \mu\text{l}$ d'acide sinapinique saturé dans 50 % d'acétonitrile, TFA 0,3 %. Le mélange est ensuite déposé sur les puits de la plaque. Les mesures sont ensuite réalisées le plus rapidement possible de manière à éviter les échanges H/D : le temps estimé entre la décongélation et la mesure en MALDI-TOF est d'environ 5 minutes. Les spectres de masse ont également été enregistrés pour la protéine soluble complètement deutérée et complètement hydrogénée. L'influence de la présence des lipides sur les spectres de masse a été étudiée pour la protéine complètement hydrogénée à pH 4 et pH 5.5 avec un rapport molaire lipide/protéine identique à celui utilisé dans les expériences d'échanges isotopique.

Les analyses ont été effectuées à l'aide du spectromètre de masse MALDI-TOF Voyager Elite XI (Perseptive Biosystems, Framingham, MA, USA) équipé d'un délai d'extraction et d'un laser à azote émettant à 337 nm. Les spectres enregistrés

sont la moyenne de 200 tirs obtenus en mode linéaire positif avec un potentiel d'accélération de 20 kV et un délai d'extraction de 1000 ns. La calibration externe a été réalisée avec les protéines standard de la société Applied Biosystems. Leurs masses pour les ions monochargés sont de 5734 Da, 11674 Da et 16952 Da.

4.2.6 Digestion enzymatique et cartographie peptidique

4.2.6.1 Principe

La digestion enzymatique de l'apo-myoglobine par la pepsine et la protéase XIII a été réalisée sur la protéine soluble à pH 4 et pH 5.5 ainsi que sur l'état lié à la membrane aux mêmes pH. Les enzymes ont été utilisées séparément et de façon concomitante. L'identification de ces peptides a été réalisée par spectrométrie de masse en tandem MALDI-TOF/TOF sur les fragments obtenus à partir de l'apo-myoglobine soluble à pH 4. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr. Gérard Bolbach du laboratoire de Synthèse, Structure et Fonction de Molécules Bioactives de l'Université Pierre et Marie Curie.

Ce type de spectroscopie en tandem comprend un spectromètre MALDI-TOF classique suivi d'une chambre de collision où a lieu une fragmentation des peptides et un deuxième analyseur TOF permettant de séparer les ions fils issus de la fragmentation. Chaque ion parent (ou peptide issu de la digestion enzymatique de l'apo-myoglobine) est sélectionné par une fenêtre temporelle jusqu'à la cellule de collision et est ensuite fragmenté par un jet de gaz. La présence du gaz n'est pas essentielle car les ions formés par l'ionisation MALDI sont métastables et une partie se fragmente spontanément. Les différents fragments susceptibles de se former dans la cellule de collision sont présentés dans la figure III.9. Trois types de fragments se distinguent : les fragments N-terminaux, C-terminaux et les fragments internes [Roepstroff & Fohlman, 1984]. Les pointillés montrent le lieu de clivage des liaisons de la chaîne polypeptidique et les flèches indiquent quel fragment devient chargé. Les fragments N-terminaux (a_n , b_n , c_n) sont les fragments obtenus en rompant une liaison et en conservant la charge de l'ion sur la partie N-terminale du peptide. Les fragments C-terminaux (x_n , y_n , z_n) sont les fragments obtenus en rompant une liaison et en conservant la charge de l'ion sur la partie C-terminale du peptide. La fragmentation la plus courante produit les ions b et/ou y.

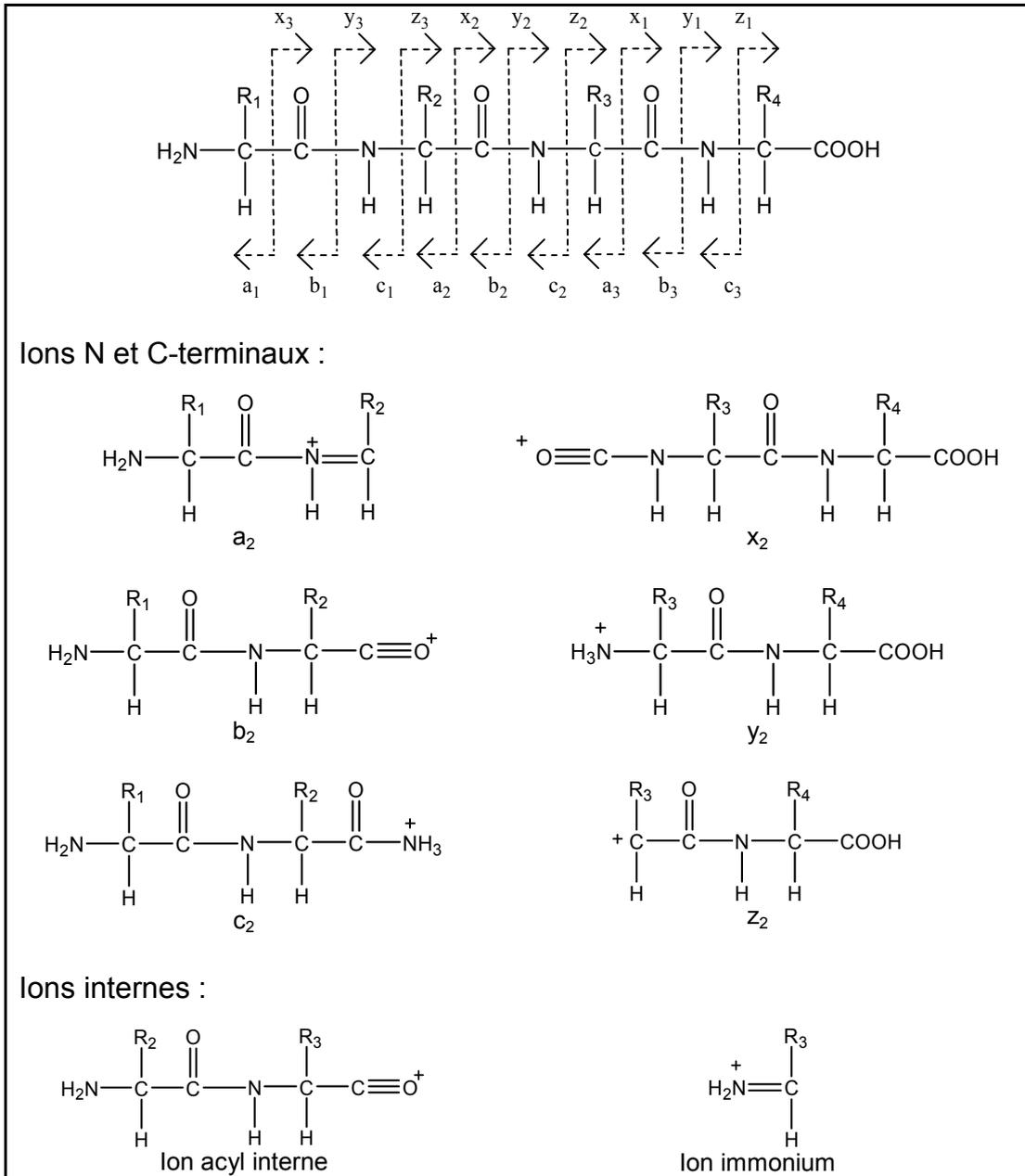


Fig. III.9 – Fragmentation peptidique par spectrométrie de masse en tandem. Les structures des fragments N et C-terminaux ainsi que celles des fragments internes sont représentées [Coligan, 1997].

4.2.6.2 Protocole

Les enzymes sont en solution dans l'acide phosphorique 110 mM à pH 2. 20 μ l de solution de protéases contenant de la pepsine ou de la protéase XIII (ou 10 μ l de chaque solution pour l'essai utilisant les deux enzymes simultanément) sont ajoutés à 80 μ l d'apo-myoglobine soluble à 4 μ M dans du tampon citrate pH 4 et pH 5.5. Les rapports massiques protéase/apo-myoglobine finaux sont respectivement de 1 pour la pepsine et 12.5 pour la protéase XIII. La digestion est effectuée dans la glace pendant 2 minutes. 0.5 μ l de solution est ensuite prélevé et mélangé avec 0.5 μ l d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique saturé dans 50% d'acétonitrile, TFA 0,3% sur le puit de la plaque. L'analyse des peptides obtenus a été réalisée sur le spectromètre MALDI-TOF Voyager Elite XI. La calibration externe a été réalisée avec les peptides standard de la société Applied Biosystems. Ces peptides ont des masses moyennes pour les ions monochargés de 1297.51 Da, 2094.46 Da, 2466.72 Da, 3660.19 Da et 5734.59 Da.

L'identification des peptides a été obtenue sur le système tandem MALDI-TOF/TOF 4700 Proteomics de la société Applied Biosystems. Pour les études en MALDI-TOF/TOF, il faut déposer un nombre d'échantillons plus important car l'énergie du laser est beaucoup plus élevée que celle utilisée en MALDI-TOF et par conséquent la durée de production d'ions pour un échantillon se trouve limitée. En général, quatre dépôts sont nécessaires pour faire l'analyse MALDI-TOF/TOF de dix peptides. Les spectres sont enregistrés avec gaz (pression d'azote de ~ 4 à 7×10^{-7} torr dans la chambre de collision) et sans gaz (pression de 2×10^{-8} torr). L'avantage du gaz est de permettre l'observation d'ions immoniums et d'ions de basses masses. Les spectres tandems ont été étalonnés avec les fragments connus de l'angiotensine I.

Différentes séquences candidates sont proposées pour chaque peptide obtenu par protéolyse ménagée. Le logiciel Ion Fragmentation Calculator permet ensuite de calculer les différents fragments de type b, y et les fragments internes pour chaque peptide. La série de fragments calculés est ensuite comparée aux spectres expérimentaux.

4.3 Résultats et discussion

Les spectres de masse de la protéine soluble et en présence de lipides ont été enregistrés à partir des solutions incubées à pH 4 et à pH 5.5 dans un milieu complètement hydrogéné. Les spectres de masse des états liés et solubles à pH 4 sont présentés dans la figure III.10.

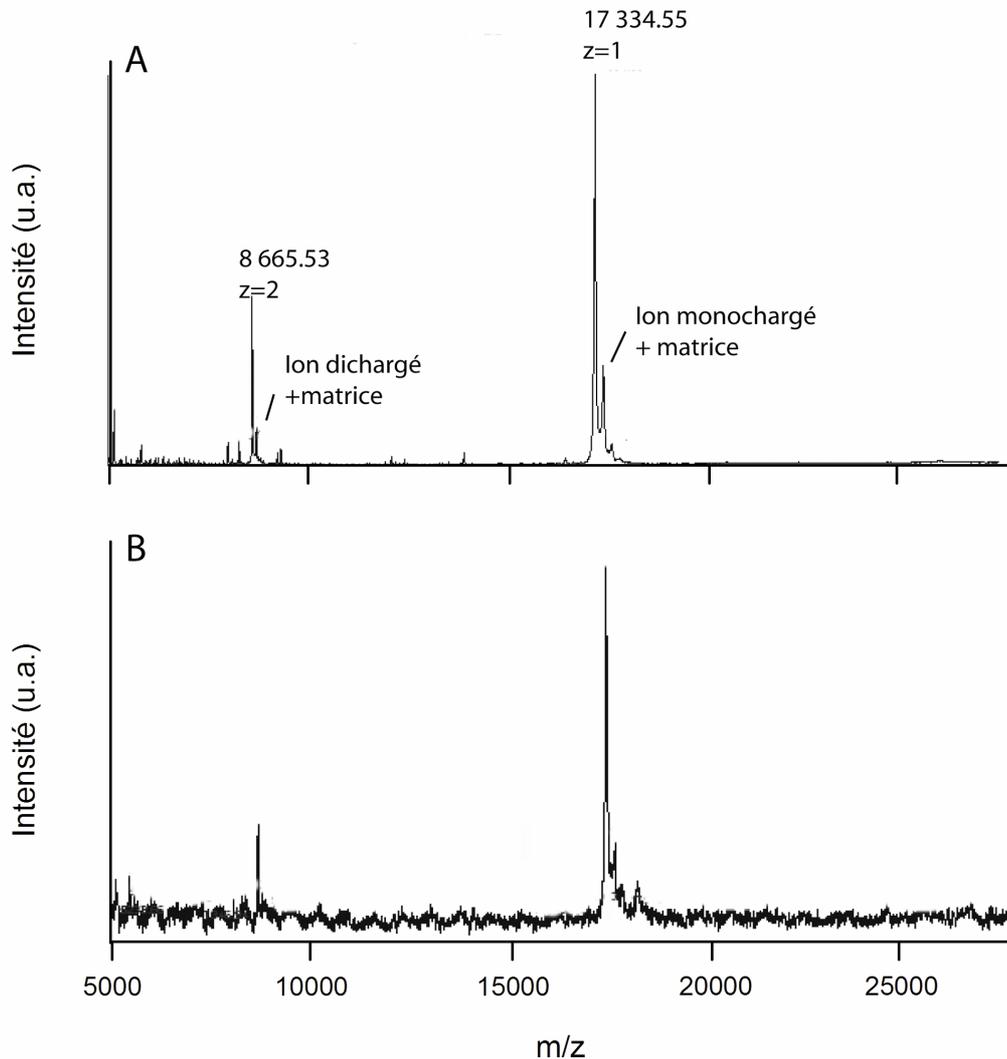


Fig. III.10 – Spectres de masse de l'apo-myoglobine soluble (A) et en présence de LUVs anioniques (B) à partir des états à pH 4.

Les deux spectres présentent un pic principal avec un m/z de 17335 Da et un pic secondaire avec un m/z de 8666 Da. Le pic principal correspond à l'ion moléculaire de l'apo-myoglobine avec un état de charge égal à 1 alors que le pic secondaire correspond à un état de charge égal à 2. Par ailleurs, un pic de faible intensité et de masse légèrement plus élevée est associé à l'ion moléculaire de l'apo-myoglobine. La différence de masse est de 210 Da et permet d'attribuer ce pic à l'association d'une molécule de la matrice (l'acide sinapinique) sur l'apo-myoglobine. Les masses moléculaires mesurées sont très proches de la masse moléculaire attendue de l'apo-myoglobine qui est de 17331 Da. De plus, le pourcentage d'erreur en

spectrométrie MALDI-TOF est évalué à 0.1%. Par conséquent, la masse mesurée de l'apo-myoglobine est considérée égale à la masse moléculaire théorique. Bien que le rapport signal sur bruit soit inférieur, la présence de lipides ne semble pas influencer les valeurs de masses mesurées. La diminution du rapport signal sur bruit peut s'expliquer par une désorption des molécules moins efficace en présence de lipides. Les spectres mesurés à partir des échantillons incubés à pH 5.5 sont identiques. Ces résultats montrent que les spectres de masse MALDI-TOF peuvent être réalisés sans séparation préalable des complexes apo-myoglobine-vésicule.

4.3.1 Cinétique d'échange D/H global

Les expériences d'échanges D/H ont été réalisées sur la protéine soluble et liée aux membranes à pD 4 selon le protocole présenté dans la section 4.2 (page 85). Des exemples de l'évolution des spectres de masse en fonction du temps d'échange isotopique sont montrés pour la protéine soluble et liée dans la figure III.11.

Les spectres au temps zéro (c.à.d avant la dilution dans le tampon hydrogéné) correspondent à la protéine complètement deutérée. Les masses mesurées pour la protéine complètement deutérée sont respectivement 17537 Da et 17541 Da pour la forme soluble et la forme liée aux membranes. Dans les deux cas, une différence de 202 Da sépare la protéine deutérée de la protéine hydrogénée. L'apo-myoglobine comprend 265 protons échangeables dont 149 protons amides. Cependant, d'après les masses mesurées, seulement 202 hydrogènes ont été échangés contre des deutérons. Après trois cycles de deutération, il est très probable que tous les protons sont échangés. Cette différence, entre la valeur théorique et la valeur expérimentale, est attribuée à un échange rapide des deutérons des chaînes latérales lors du dépôt sur la plaque de mesure. En effet, la protéine est en solution dans un tampon deutérée et ensuite mélangée avec la matrice qui est en solution dans H₂O. Par conséquent, les deutérons les plus labiles des chaînes latérales sont échangés rapidement pendant les quelques secondes nécessaires à la cristallisation de l'échantillon. Pour cette raison, la masse mesurée pour l'état complètement deutéré est inférieure à la valeur attendue. Cet effet est accentué dans les cinétiques d'échange D/H mesurées (Fig. III.12). En effet, aux temps d'échange les plus courts, les cinétiques semblent converger vers une masse de 17480-17490 Da qui correspond à la valeur attendue dans le cas où seules les fonctions amides des liaisons peptidiques sont deutérés (17485 Da). Il semble donc que tous les deutérons des chaînes latérales sont échangés pendant le temps mort des mesures cinétiques. Par conséquent, nous n'observons que l'échange des deutérons amides pendant la cinétique. Ces derniers sont ceux communément utilisés pour caractériser les structures des protéines par les méthodes d'échange H/D.

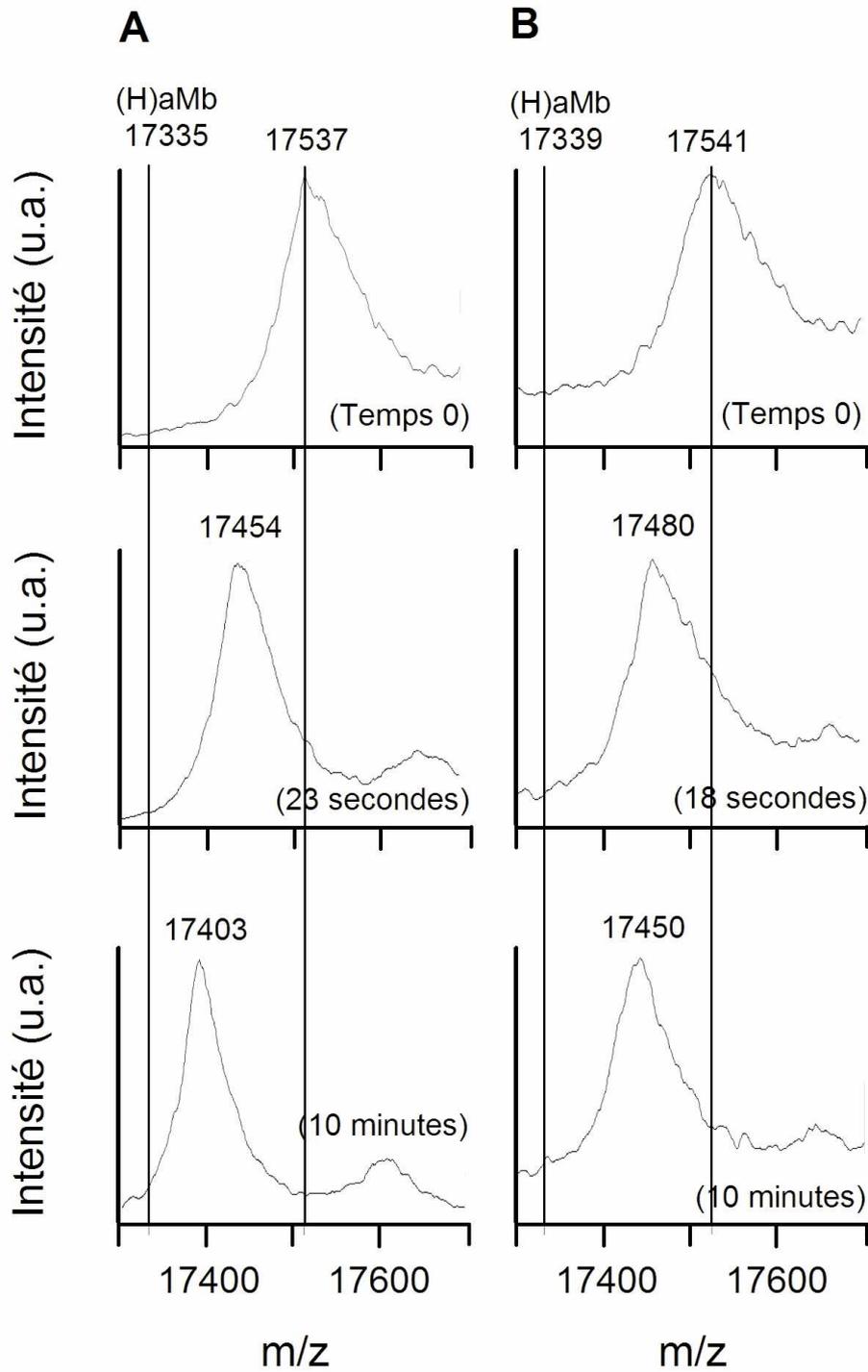


Fig. III.11 – Evolution des spectres de masse de la protéine entière pendant l'échange D/H après incubation dans un tampon à pD 4, en absence (A) et en présence de lipides (B). Les masses de la protéine complètement hydrogénée ((H)aMb) et deutérée sont représentées par des traits verticaux.

La figure III.11 montre l'évolution des masses au cours de l'échange D/H. La masse de l'ion moléculaire diminue avec le temps d'échange pour les formes libres et liées de la protéine. L'allure des spectres est identique pour la protéine liée aux membranes, bien que le rapport signal sur bruit soit inférieur comme nous l'avons déjà souligné. Un seul pic correspondant à l'ion moléculaire principal ($z = 1$) est observé pendant la réaction d'échange. Ce résultat indique un mécanisme d'échange de type EX2 (cf. annexe sur les échanges H/D). En effet, deux mécanismes d'échange isotopique sont possibles pour les polypeptides : les cinétiques de type EX1 et les cinétiques de type EX2. Dans les deux cas, la protéine doit se déplier localement ou globalement de façon à rendre accessible au solvant ses protons échangeables. Ces deux mécanismes sont facilement différenciables en spectrométrie de masse [Engen & Smith, 2000]. Lorsque l'échange suit une cinétique de type EX1, les vitesses de fluctuations structurales responsables des échanges H/D sont lentes devant les vitesses intrinsèques d'échanges. L'échange isotopique est alors complet chaque fois qu'un segment du polypeptide se déplie. En conséquence, plusieurs populations seront présentes sur les spectres de masse mesurés pendant les cinétiques d'échanges. En revanche, si le mécanisme d'échange est de type EX2, la dynamique structurale de la protéine est beaucoup plus rapide que l'échange isotopique : une seule population est observable pour la protéine dont la masse évolue progressivement avec l'échange [Deng & Smith, 1999]. De manière similaire aux expériences réalisées sur l' α -lactalbumine (cf. partie II), ce type de mécanisme peut être très informatif sur la thermodynamique des interactions apo-myoglobine-vésicule.

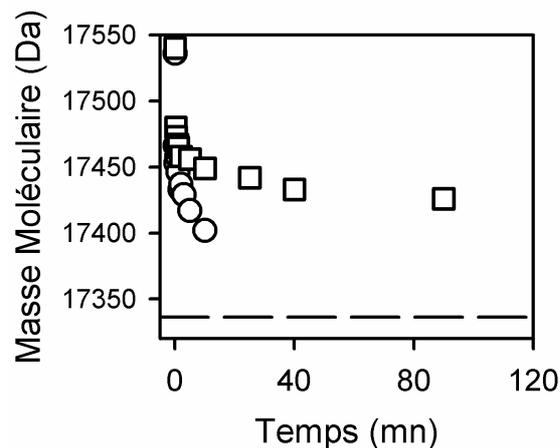


Fig. III.12 – Cinétique d'échange D/H de l'apo-myoglobine soluble (○) et l'apo-myoglobine liée aux membranes (□) dans du tampon citrate pH 4, 30 mM de NaCl. La ligne horizontale pointillée correspond à la masse moléculaire de la protéine complètement hydrogénée.

Les cinétiques d'échanges isotopique à pH 4 sont montrées dans la figure III.12, pour la forme liée aux membranes (Fig. III.12, □) et la forme soluble (Fig. III.12, ○). Les cinétiques d'échanges D/H sont caractérisées par une décroissance de la masse moléculaire de la protéine en fonction du temps. Une baisse rapide de la masse moléculaire est observée entre le temps zéro et les premiers points de la cinétique. Elle est attribuée à l'échange des deutérons portés par les chaînes latérales (cf. ci-dessus page 113). Sans prendre en compte le point au temps zéro, les cinétiques semblent ajustables par une simple fonction exponentielle décroissante. Cependant, nous avons mesuré une cinétique d'échange isotopique globale, laquelle correspond à la somme des cinétiques d'échange sur tous les deutérons amides. A l'échelle d'un résidu (ou d'un groupe de résidus homogènes), les profils cinétiques suivent une décroissance mono-exponentielle. Dans le cas d'un échange isotopique global, la fonction décroissante est plus complexe et comprend une distribution de constantes de vitesse de premier ordre. Par conséquent, nous ne pouvons pas ajuster ces courbes de façon simple et en extraire des constantes de vitesse. Des cinétiques simples pourront éventuellement être observables au niveau local après une digestion enzymatique. Néanmoins, les vitesses d'échanges des deutérons amides devront être proches pour tous les résidus du peptide considéré. Dans ce cas, puisque le régime d'échange est de type EX2, l'énergie de liaison protéine-membrane pourra éventuellement être évaluée en comparant les constantes de vitesses d'échange local entre les états soluble et lié aux membranes (cf. Partie II).

La cinétique d'échange apparaît clairement plus rapide en absence de membrane. De plus, bien que le plateau de la cinétique ne soit pas visible pour la forme soluble, ce dernier semble tendre vers la masse moléculaire de la protéine complètement hydrogénée (Fig. III.12, ligne brisée à 17339 Da). En revanche, la protéine liée aux membranes semble atteindre un plateau minimum à 17427 Da. La différence de 88 Da entre cette dernière valeur et la masse moléculaire de la protéine hydrogénée correspond à la persistance de deutérons amides protégés contre l'échange isotopique dans la protéine liée aux membranes. En première approximation, près de 90 résidus sont inaccessibles au solvant aqueux lorsque la protéine est insérée dans la membrane à pH 4.

L'information principale reste que l'apo-myoglobine liée aux membranes à pH 4 apparaît fortement protégée contre l'échange isotopique. Ce résultat corrobore nos expériences précédentes (cf. Article 2) suggérant une insertion d'une partie de la protéine dans le cœur hydrophobe de la bicouche lipidique à ce pH.

4.3.2 Digestion enzymatique et cartographie peptidique

La pepsine, la protéase de type XIII et un mélange des deux enzymes ont été utilisés pour digérer l'apo-myoglobine en solution et en présence de lipide. Les temps de digestion et les concentrations de protéases utilisées ont été optimisés de manière à obtenir une digestion reproductible de l'apo-myoglobine. La digestion est réalisée à pH 2.2 et 0°C après une incubation des échantillons à pH 5.5 et pH 4. Les spectres de masse sont mesurés immédiatement après la protéolyse ménagée. Toutes les expériences de digestion ont été réalisées plusieurs fois et les spectres de masse et se sont révélés parfaitement reproductibles. Dans tous les cas les spectres obtenus sont identiques pour une incubation de la protéine à pH 4 ou pH 5.5. En effet, le saut de pH réalisé pendant la digestion enzymatique induit une transition conformationnelle vers un état dénaturé identique et le relargage de la protéine pour les expériences en présence de LUVs. Ces changements sont rapides devant les temps de digestion (la constante de vitesse de dénaturation de l'état soluble à pH 4.2 est égale estimée à 47 s^{-1} [Weisbuch *et al.*, 2005]). Ainsi, les futures expériences d'échanges H/D couplées à la digestion enzymatique seront directement comparables entre les différents pH.

La figure III.13 donne un exemple des spectres de masse obtenus après la protéolyse par la protéase de type XIII de l'apo-myoglobine liée et libre. Les peptides obtenus ont des masses comprises entre 900 et 3500 Da. Certains peptides correspondent à une autolyse des protéases. Ces derniers sont facilement identifiables sur les spectres de masse des protéases seules en solution. Cette autolyse a été surtout observée pour la pepsine. Excepté des dimères de phospholipides visible autour de 1500 Da, les spectres de masse en absence et en présence de lipides sont très similaires (Fig. III.13). La majorité des peptides obtenus sont communs aux deux expériences. Ce résultat s'explique par le relargage de la protéine liée aux membranes et sa dénaturation à pH 2.2 (cf. chapitre 3). Les états finaux pendant la digestion enzymatique sont donc identiques dans les deux cas. L'homogénéité des digestions enzymatiques entre les formes soluble et liée aux membranes de l'apo-myoglobine sera très utile pour les expériences d'échanges D/H à l'échelle des peptides. Ainsi, les taux d'incorporation des hydrogènes sur chaque peptide pourront être comparés directement entre les deux formes. L'identification des régions de la protéine protégées de l'échange isotopique par la liaison aux membranes en sera facilitée.

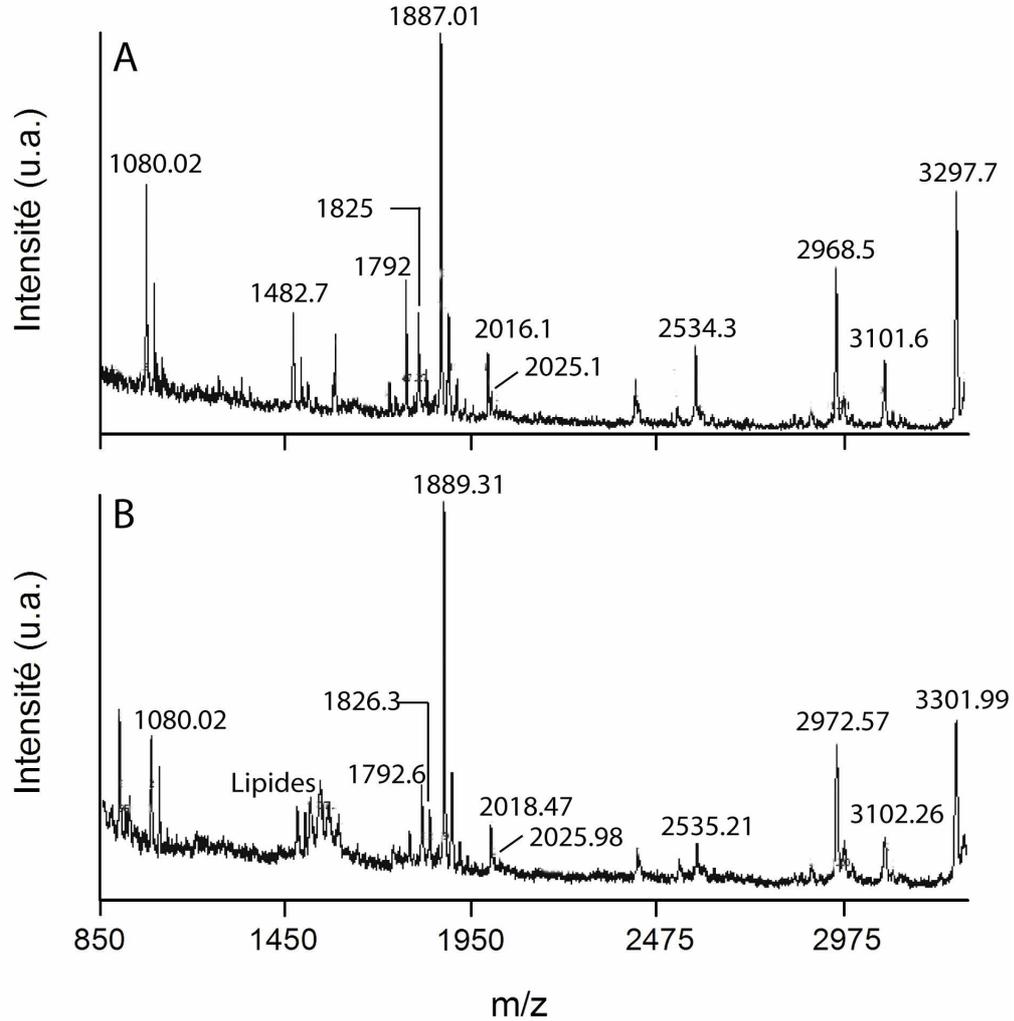


Fig. III.13 – Spectres de masse après protéolyse de l'apo-myoglobine à pH 4 par la protéase de type XIII. (A) Expérience sur la protéine en solution. (B) Expérience en présence de LUVs anioniques (L/P = 300). Les masses des peptides identifiés sans ambiguïté par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF sont indiquées.

Bien que certains sites de coupure soient communs, les profils de digestion de l'apo-myoglobine sont relativement différents pour les deux enzymes utilisés. La protéolyse par la pepsine et la protéase de type XIII, de manière séparée et concomitante, a permis d'obtenir une large gamme de peptides d'une dizaine à une trentaine de résidus recouvrant toute la séquence de la protéine. L'identification des peptides obtenus pour chaque digestion a été entreprise par spectroscopie MALDI-TOF/TOF sur la forme soluble. Un exemple de spectre de masse issu de la fragmentation du peptide à 1887 Da est présenté dans la figure III.14.

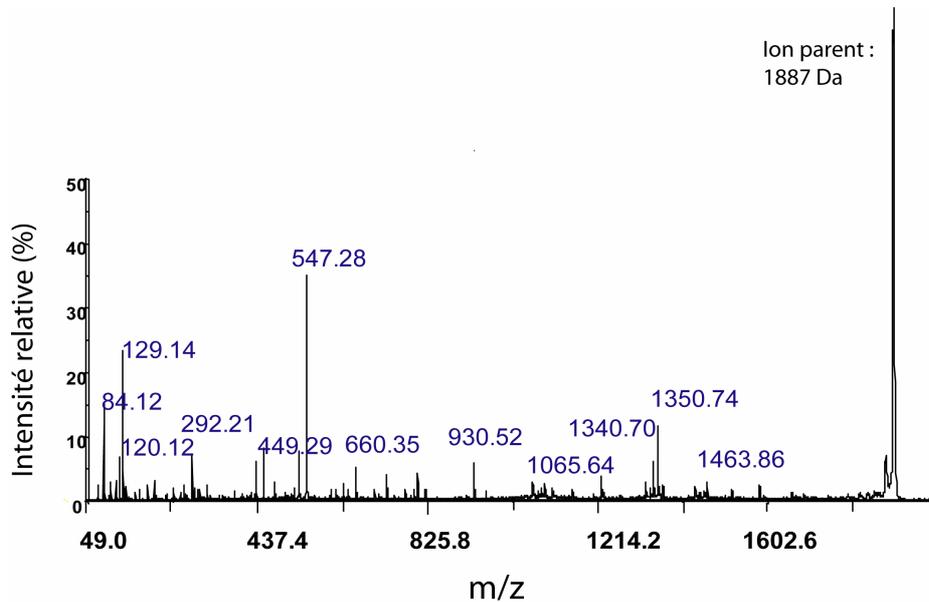


Fig. III.14 – Exemple d'un spectre de masse MALDI-TOF/TOF sur le peptide de 1887 Da (F139-G154) obtenu par digestion de l'apo-myoglobine par la protéase de type XIII. L'ion parent à 1887 Da est l'ion majoritaire. Chaque ion fils représente un fragment de type b ou y. L'intensité des pics des ions fils est donnée en pourcentage de l'intensité du pic de l'ion parent.

Dans la plupart des cas, les fragmentations des peptides aboutissent à des fragments de type b ou y comparés avec les fragments b et y calculés. Le séquençage des différents peptides obtenus après digestion de l'apo-myoglobine par la protéase de type XIII est présenté sur le tableau III.1.

L'ensemble des résultats pour les différentes digestions utilisées est illustré sur la figure III.15. La combinaison des protéases a permis une couverture de la séquence à 100 %. L'utilisation combinée de ces deux enzymes apparaît très avantageuse pour les expériences d'échanges D/H. Ces deux protéases ont des activités maximales à pH acides et sont encore efficaces à faible température. Les conditions de travail sont alors compatibles avec l'arrêt des réactions d'échanges isotopique. Toutes les régions de la protéine sont représentées avec une résolution spatiale de 6 à 35 résidus. Les hélices D, E, F et une moitié de l'hélice G sont les régions de la protéine les plus protégées contre la protéolyse enzymatique. Une structuration résiduelle des hélices A, D et H persistent encore à ce pH, mais ce n'est pas le cas pour les hélices E, F et G [Eliezer *et al.*, 2000 ; Eliezer *et al.*, 1998]. Par conséquent, il est probable que la protection observée contre la digestion enzymatique ne soit pas due à un manque d'accessibilité des sites de coupure, mais plutôt une présence plus faible de ces sites dans cette région. Par ailleurs, une

résolution très acceptable est atteinte dans la région du cœur hydrophobe de la protéine correspondant aux hélices A, B, G et H. Cette région est la plus susceptible d'interagir directement avec le centre de la bicouche lipidique et devrait donc apparaître plus protégée contre l'échange isotopique que le reste de la protéine.

Masse	Peptide	Position
1080.02	WQLVLHVW	8-15
1482.70	SEGEWQLVLHVW	4-15
1681.90	SEGEWQLVLHVWAK	4-17
1792.00	AKVEADVAGHGQDILIR	16-32
1825.02	MVLSEGEWQLVLHVW	1-15
1887.01	FRKDIAAKYKELGYQG	139-154
2016.10	IRLFKSHPETLEKDFR	31-46
2025.10	MVLSEGEWQLVLHVWAK	1-17
2534.30	VLHSRHPGDFGADAQGAMNKALEL	115-138
2968.50	AI IHVLHSRHPGDFGADAQGAMNKALEL	111-138
3101.60	AKVEADVAGHGQDILIRLFKSHPETLEK	16-43
3297.70	ISEAIIHVLHSRHPGDFGADAQGAMNKALEL	108-138

Tableau III.1 – Résultat de l'identification des peptides obtenus par digestion de l'apo-myoglobine par la protéase de type XIII.

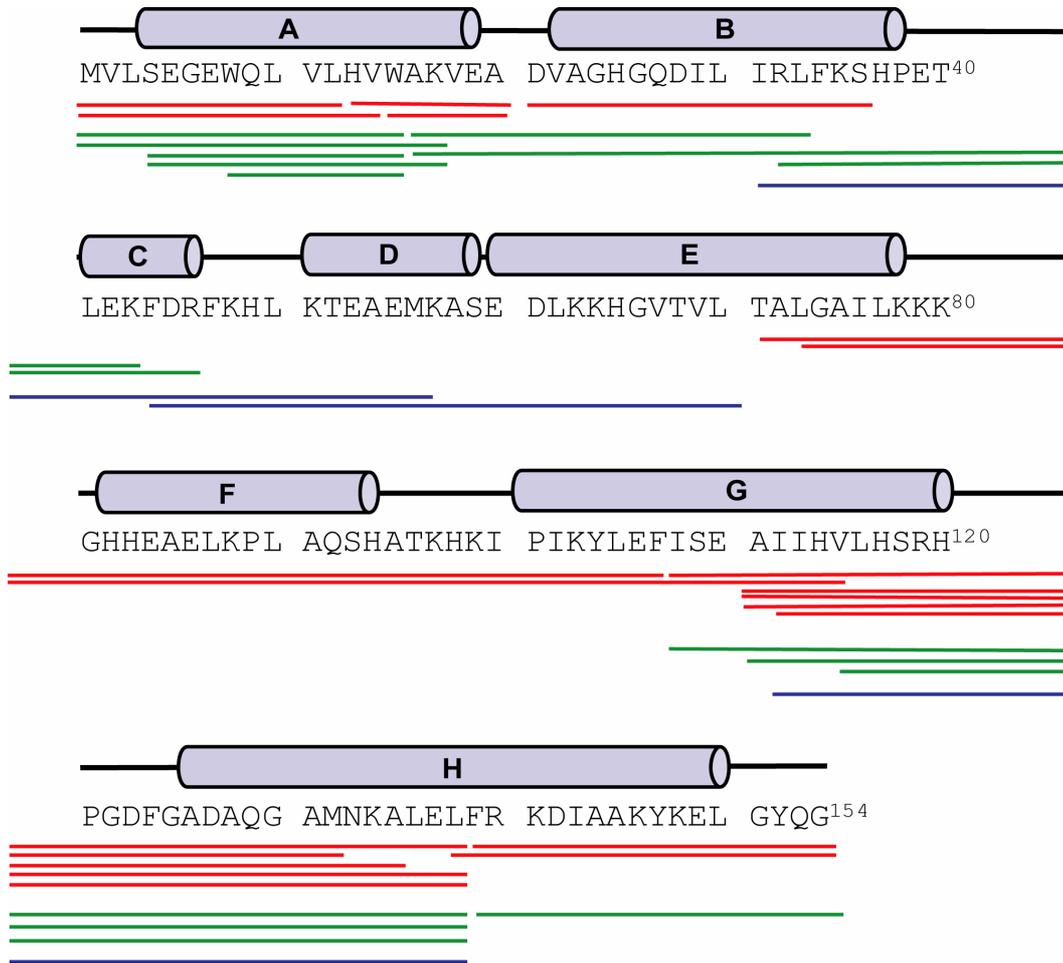


Fig. III.15 – Cartographie peptidique de la digestion enzymatique de l'apo-myoglobine par la pepsine (rouge), la protéase de type XIII (vert) et un mélange des deux enzymes (bleu).

L'identification des peptides issus de la double digestion enzymatique et le recouvrement total de la séquence par ces peptides sont très encourageant pour l'obtention d'un profil d'échange D/H à l'échelle locale. Par ailleurs, les expériences d'échanges D/H global sont encore inachevées. La comparaison des cinétiques d'échanges isotopique entre les états liés aux vésicules anioniques à pH 5.5 et pH 4 et les formes solubles, permettront une première caractérisation de la structure des états liés aux membranes.



Conclusion Générale et Perspectives

Les protéines sont capables de se replier de manière autonome et spontanée parce que la structure native et fonctionnelle correspond à un minimum d'énergie libre de la molécule dans des conditions données [Anfinsen, 1973]. Cependant, un polypeptide néo-synthétisé doit aussi trouver rapidement le bon chemin de repliement parmi de nombreuses voies alternatives [Levinthal, 1968]. Toutes les informations nécessaires sur la structure et la stabilité de l'état final, ainsi que sur le chemin de repliement à emprunter, sont contenues dans la séquence de la protéine. Cet axiome est valable pour les protéines solubles et membranaires.

Les protéines amphitropiques sont des modèles pertinents pour aborder les mécanismes de repliement des protéines dans les membranes.

De nombreux travaux s'intéressent à la compréhension des mécanismes de repliement des protéines solubles car ces dernières sont facilement manipulables. Les protéines membranaires sont par nature insolubles en milieu aqueux. De ce fait, les études expérimentales sur la stabilité et le repliement de ces protéines sont beaucoup plus rares et délicates. La meilleure stratégie consiste alors à utiliser des systèmes modèles plus facilement manipulables. De nombreux travaux décrivent l'association et la structuration de petits peptides dans les membranes [Mishra *et al.*, 1994 ; Vogel, 1981]. L'utilisation de ces peptides a permis d'aborder le rôle des structures secondaires dans l'insertion membranaire des polypeptides [Ladokhin & White, 1999 ; Wimley *et al.*, 1998]. La formation des structures secondaires est facilitée à l'interface membranaire afin de masquer les groupements polaires de la liaison peptidique. L'insertion des structures secondaires est alors dépendante de l'hydrophobicité des chaînes latérales. Ce mécanisme de couplage entre repliement et partition dans la membrane peut être extrapolé aux protéines membranaires intrinsèques. Cependant, les peptides sont dépourvus de structure tertiaire et par conséquent donnent peu d'informations sur les changements conformationnels des protéines au sein des bicouches lipidiques.

Les protéines amphitropiques sont facilement manipulables et leurs états membranaires sont tout à fait comparables à ceux des protéines membranaires intrinsèques. Elles apparaissent alors très utiles pour étudier les transitions conformationnelles dans les membranes. Nous avons pu mettre en évidence la diversité conformationnelle des états liés de l' α -lactalbumine. Leurs structures sont dépendantes du pH et de la taille des vésicules. Ces deux facteurs sont, dans certains cas (endocytose, trafic membranaire...), ajustables par la cellule. Nos données soulignent la sensibilité des protéines aux subtils changements physico-chimiques de l'environnement. Par ailleurs, la présence de lipides anioniques est nécessaire pour une partition complète de l' α -lactalbumine et de l'apo-myoglobine dans les membranes. La stabilisation des protéines dans les bicouches lipidiques fait donc intervenir des interactions électrostatiques entre des résidus basiques et les lipides

anioniques. Ce fait semble être une caractéristique commune à beaucoup de protéines amphitropiques [Johnson *et al.*, 2003 ; Garcia-Saez *et al.*, 2004 ; Parker & Feil, 2005 ; Pinheiro & Watts, 1994]. Ce résultat n'est pas aberrant au niveau cellulaire en considérant que les membranes biologiques sont composées en moyenne de 10 à 20% de lipides anioniques. En outre, les protéines membranaires intrinsèques sont également stabilisées par des forces dipolaires au niveau de l'interface membranaire [Lee, 2003]. En définitive, les protéines amphitropiques possèdent de nombreux avantages pour explorer les principes généraux de repliement dans les bicouches lipidiques.

Le molten globule : un état membranaire ubiquitaire chez les protéines amphitropiques ?

Nous avons démontré que l' α -lactalbumine et l'apo-myoglobine sont stabilisées dans les membranes dans un état molten globule, la formation de cet état étant facilitée par des pH acides. La transition conformationnelle vers un état molten globule permet aux protéines d'exposer au solvant leurs régions hydrophobes tout en conservant leurs structures secondaires, et facilite ainsi l'insertion membranaire. Ce type de comportement est également courant chez les protéines amphitropiques. D'autre part, nos expériences sur l'apo-myoglobine ont montré que la topologie de la forme native guide le mécanisme d'insertion membranaire. Ainsi, des protéines homologues aux fonctions biologiques très éloignées et ne présentant pas de similarité de séquence peuvent avoir des mécanismes de liaison aux membranes très proches.

Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les protéines membranaires établissent peu de liaisons hydrogène intramoléculaires (cf. Introduction générale, section 2.1.2, page 30). En effet, les interactions hydrophobes ne sont pas spécifiques et représentent les principales forces qui stabilisent les structures des protéines membranaires. Par conséquent, la nature physico-chimique des résidus (principalement l'hydrophobicité) est plus importante que la structure locale de la protéine. De ce fait, l'insertion membranaire de protéines amphitropiques ne présentant pas de similarité de séquence peut être gouvernée par des forces identiques.

Rôle des hélices amphiphiles dans le mécanisme d'insertion membranaire

Les états liés aux membranes de l' α -lactalbumine et de l'apo-myoglobine sont stabilisés à la fois par des interactions électrostatiques et hydrophobes avec la bicouche lipidique. Ces interactions sont dirigées par des hélices amphiphiles. Nous avons trouvé que les hélices amphiphiles αA et αC de l' α -lactalbumine

interviennent directement dans l'ancrage de la protéine sur les membranes *via* des résidus basiques et hydrophobes. Pour l'apo-myoglobine, nous avons également montré que l'hélice amphiphile N-terminale est impliquée dans l'étape d'insertion membranaire à pH acide. Un comportement similaire est observé chez certaines protéines homologues. L'acidité du milieu permet la neutralisation des résidus acides présents dans les hélices qui doivent pénétrer dans la bicouche lipidique. L'hélice est ainsi rendue plus hydrophobe et facilite cette intercalation avec le cœur hydrophobe des membranes.

Thermodynamique des interactions protéines-membranes

Les expériences d'échanges H/D suivies par RMN à l'échelle du résidu, nous ont permis de décrire la structure et la stabilité de l'état membranaire de l' α -lactalbumine. Ces expériences sont basées sur le principe que les acides aminés de la protéine en contact avec les lipides sont protégés contre l'échange isotopique. Cette protection donne accès à un facteur de protection membranaire. Cette approche est rendue possible par la réversibilité de la liaison et par le fait que le mécanisme d'échange H/D soit de type EX2. Ainsi, nous avons pu déterminer la stabilité de l'état lié aux membranes et la variation d'énergie libre associée à l'insertion de la protéine. Ce type d'expérience pourrait être élargie à toutes les protéines amphitropiques pour lesquelles les conditions précédentes sont respectées. C'est également la seule technique capable de donner des valeurs de stabilité à l'échelle du résidu. Elle peut, par conséquent, être très informative sur la thermodynamique des interactions protéines-membranes.

Une expérience préliminaire du même type a été initiée sur les états liés aux membranes de l'apo-myoglobine. Dans ce cas, les échanges isotopiques sont suivis par spectrométrie de masse. La résolution est inférieure mais le couplage de ces expériences avec une protéolyse ménagée pourrait fournir un profil de protection membranaire à l'échelle de quelques résidus. Les premiers résultats ont montré une forte protection contre l'échange isotopique pour l'état lié à pH 4. Une résolution à l'échelle locale n'est cependant pas encore atteinte. De manière intéressante, ces expériences pourraient nous permettre de comparer la structure des états liés à pH 5.5 et pH 4. Une caractérisation structurale plus précise de ces deux formes liées de l'apo-myoglobine sera très utile pour comprendre les mécanismes d'insertion membranaire des protéines de la famille des globines. Une fois mises au point sur l'apo-myoglobine, ces études pourront être étendues à des protéines amphitropiques pour lesquelles la liaison à la membrane est difficilement réversible (dans des conditions où l'échange isotopique est ralenti). Ce comportement est notamment retrouvé chez les colicines, la toxine diphtérique et d'autres toxines bactériennes [Parker *et al.*, 1989]. De manière générale, la méthode est plus simple qu'en spectroscopie RMN et applicable à des protéines amphitropiques dont la liaison à la

membrane est impliquée dans des processus biologiques importants. Par exemple, les protéines régulatrices de l'apoptose de la famille Bcl-2 présentent une topologie en trois feuillets très proche de l'apo-myoglobine. La liaison de ces protéines aux membranes est impliquée dans la régulation de l'apoptose [*Garcia-Saez et al.*, 2004].

Les mécanismes de liaison aux membranes ont été détaillés de manière assez exhaustive sur nos deux modèles. L'environnement physico-chimique influence la diversité conformationnelle des protéines insérées dans les membranes. Cependant, la topologie des protéines insérées reste encore incertaine. Par exemple, la profondeur d'insertion de la protéine dans la bicouche lipidique est inconnue. Cette étude pourrait être envisagée par des expériences de transfert de fluorescence intermoléculaires entre des résidus marqués et un marqueur fluorescent localisé sur les chaînes acyles de la bicouche lipidique. La liaison aux membranes de nos systèmes d'étude est maintenant bien caractérisée. De nombreuses études structurales peuvent être envisagées avec des méthodes spectroscopiques telles que la spectroscopie infrarouge sur support orienté (ATR-FTIR), la RMN du solide, la réflectométrie neutronique....



Annexes

LES ÉCHANGES HYDROGÈNE/DEUTÉRIUM (H/D)

Les vitesses d'échanges H/D sont sensible à la stabilité et la conformation des protéines. La mesure de ces vitesses d'échanges isotopique permet d'identifier les régions de la protéine qui sont enfouies ou exposées au solvant. La spectroscopie RMN et la spectrométrie de masse sont les principales techniques qui permettent de suivre les cinétiques d'échanges H/D.

Principe

Certains hydrogènes des chaînes polypeptidiques sont échangeables avec les hydrogènes d'un solvant protique (Fig. V.1). Si le solvant est deutéré, les hydrogènes échangeables seront remplacés par du deutérium. Les différences de masse ou de caractéristiques magnétiques entre les deux isotopes permettent de détecter l'incorporation de deutérium dans la protéine. Les protons échangeables des protéines sont les hydrogènes labiles des chaînes latérales et les hydrogènes des liaisons peptidiques. Les vitesses d'échanges des hydrogènes des chaînes latérales sont trop rapides pour être mesurées contrairement aux hydrogènes des liaisons peptidiques. Ces derniers sont présents sur toute la longueur de la chaîne peptidique. L'étude de l'échange H/D des protons amides reflète par conséquent la structure globale et locale des protéines.

La vitesse des échanges est dépendante de l'environnement, de la structure de la protéine et de l'accessibilité au solvant. Les protons amides d'une protéine non structurée sont échangés en quelques secondes dans le D₂O à pH neutre alors que le temps d'échange d'un proton amide impliqué dans une liaison hydrogène peut aller jusqu'à un mois. La diminution des vitesses d'échanges isotopique due à l'existence de liaisons hydrogène intramoléculaires et à la restriction de l'accès au solvant (cas d'une poche hydrophobe dans une protéine repliée) confère à l'échange de l'hydrogène amide une très grande sensibilité pour détecter et localiser les régions enfouies dans le cœur des protéines.

La vitesse d'échange H/D est également très sensible aux propriétés physico-chimiques de l'environnement. Le pH, la nature des résidus voisins et la température sont les principaux facteurs influençant les vitesses d'échanges des hydrogènes amides.

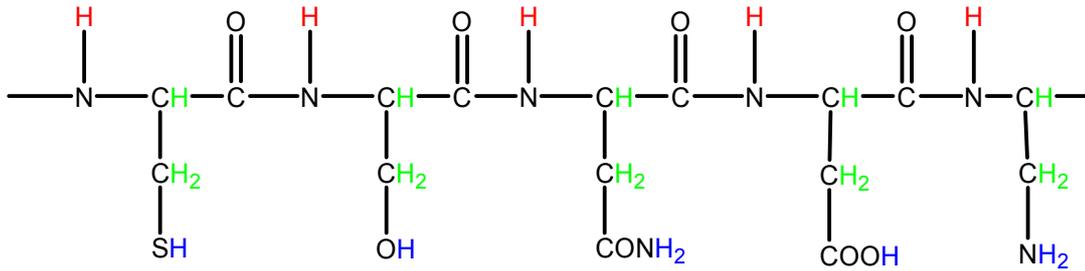


Fig. V.1 – Localisation des protons échangeables sur une chaîne peptidique. Les hydrogènes liés de façon covalente aux carbones (vert) ne sont pas échangeables, les hydrogènes des chaînes latérales (en bleu) s'échangent à une vitesse trop rapide pour être détectée et les hydrogènes en position amide des liaisons peptidiques (en rouge) s'échangent à une vitesse mesurable.

Le pH est sûrement le facteur le plus important. En effet le mécanisme d'échange des protons amides avec le solvant est le résultat d'une catalyse acide et basique par les molécules d'eau. La vitesse d'échange k_{ex} peut être exprimée comme une somme des composantes acides et basiques :

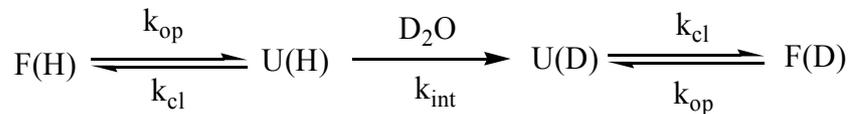
$$k_{\text{ex}} = k_{\text{H}}[\text{H}^+] + k_{\text{OH}}[\text{OH}^-]$$

où k_{H} et k_{OH} sont les constantes de vitesse d'échange respectivement en milieu acide et basique. La catalyse basique est beaucoup plus rapide. La dépendance en pH des vitesses d'échanges indique que l'échange est minimal entre pH 2 et 3. En dehors de cette zone, une modification d'une unité pH entraîne une variation de la vitesse d'échange d'un facteur 10 [Bai *et al.*, 1993]. Les variations de pH sont donc très utilisées pour faire varier les vitesses d'échanges, ou même arrêter les échanges. De même, une baisse de température de 10°C entraîne une diminution des vitesses d'échanges par un facteur 3.

En plus de la sensibilité au pH et à la température, les vitesses d'échanges des hydrogènes amides sont affectées par la polarité et la taille des chaînes latérales des résidus voisins, mais sont relativement insensibles aux chaînes latérales plus distantes. Des mesures de vitesse d'échanges par RMN ont été effectuées pour chaque acide aminé dans diverses séquences peptidiques. Ces expériences ont fourni les valeurs de vitesse d'échange intrinsèque (k_{int}) pour un résidu donné et pour un environnement peptidique donné [Bai *et al.*, 1993].

Mécanismes et limites cinétiques des échanges isotopiques

L'échange isotopique dans une protéine structurée est complexe du fait de l'inhomogénéité de l'environnement. Pour qu'un proton amide puisse s'échanger facilement avec le solvant, il est nécessaire que ce dernier ne soit pas enfoui dans la structure de la protéine et qu'il n'établisse pas de liaison hydrogène avec son environnement. Certains protons amides présents sur la surface de la protéine et dans des régions déstructurées sont assimilables à ce schéma. Cependant, une protéine structurée présente peu de protons amides directement accessibles car ils sont souvent impliqués dans les liaisons hydrogène stabilisant les structures secondaires ou ils sont enfouis dans le cœur hydrophobe de la protéine. Pour ceux là, un dépliement local ou à plus grande échelle est nécessaire pour rendre accessible les protons au solvant [Engen & Smith, 2000]. En effet, même dans des conditions de stabilité optimales, l'agitation thermique donne aux protéines une dynamique structurale importante. Des dépliements de plus ou moins grandes amplitudes permettent d'ouvrir la structure au solvant. L'échange isotopique sur un résidu profondément enfoui dans la protéine demandera un dépliement global alors que l'échange dans une région facilement accessible nécessitera un dépliement local de faible amplitude. La vitesse de l'échange dépendra donc directement de la structure et de la dynamique de la protéine. Le mécanisme d'échange H/D suit alors le mécanisme suivant :



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

La constante de vitesse observée d'un tel échange (k_{ex}) est décrite par la relation suivante :

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

L'équation (1) est simplifiée en considérant que k_{cl} est très grand devant k_{op} pour une protéine native. Part ailleurs la vitesse d'échange varie entre 2 limites suivant les valeurs de k_{cl} et k_{int} [Hvidt & Nielsen, 1966]. Dans le cas limite appelé EX1, les fluctuations structurales sont lentes devant la vitesse d'échange, soit $k_{cl} \ll k_{int}$. La relation (1) s'écrit alors :

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

Les cinétiques EX1 sont caractérisées par la corrélation entre échange isotopique et dépliement de la protéine et elles sont indépendantes du pH. Comme l'échange isotopique lié au dépliement est plus rapide que le repliement, l'échange isotopique est complet chaque fois qu'un segment du polypeptide se déplie. Les mesures effectuées dans ces conditions sont informatives sur la cinétique de dénaturation [Yi & Baker, 1996]. Cependant les cinétiques de type EX2 sont plus courantes pour les protéines.

Dans le cas limite EX2 qui est le plus probable pour une protéine structurée, les fluctuations structurales sont beaucoup plus rapides que la vitesse d'échange ($k_{cl} \gg k_{int}$). (2) s'écrit alors :

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

où K_{unf} est la constante d'équilibre du processus de dépliement. La détermination de k_{ex} avec les valeurs de k_{int} disponibles dans la littérature donne directement accès à la constante d'équilibre. Par conséquent, les mesures des vitesses d'échanges dans le cas EX2 donne accès à la thermodynamique des changements conformationnels puisque :

$$K_{unf} = k_{ex} / k_{int} \quad (4)$$

et par conséquent

$$\Delta G_{HD} = -RT \ln K_{unf} \quad (5)$$

La mesure de la vitesse d'échange donne ainsi accès à la variation d'énergie libre de dépliement de la protéine. Elle peut être comparée aux valeurs de ΔG_u obtenues par des techniques de dénaturation classiques. L'égalité $\Delta G_{HD} = \Delta G_u$ indique que l'échange H/D est consécutif à un dépliement global et lorsque $\Delta G_{HD} < \Delta G_u$, l'échange est dû à des fluctuations locales.

Analyse des échanges isotopiques

Deux principales méthodes sont sensibles à l'échange isotopique : la RMN et la spectrométrie de masse. La RMN permet d'évaluer la vitesse d'échange H/D à l'échelle du résidu. En effet les spectres RMN bidimensionnels donnent un signal de résonance distinct pour chaque proton amide attribué sur le spectre. En revanche, les deutérons sont invisibles. Par conséquent, si le proton amide est échangé contre un deutérium, l'intensité du pic RMN diminue en fonction du temps en suivant la loi : $I = I_0 \exp(-k_{\text{ext}}t)$, où I_0 est l'intensité initiale du pic avant échange et I l'intensité du pic au temps t . K_{unf} est alors facilement calculable (4) dans le cas d'un mécanisme EX2. Dans ce contexte, l'inverse de K_{unf} est appelée facteur de protection ($P = k_c / k_{\text{ex}}$). Plus cet indice est élevé et plus le proton amide considéré est enfoui dans la structure et peu accessible au solvant. Le report du facteur de protection en fonction de la séquence est appelé profil de protection. Ce dernier donne un aperçu précis des zones protégées du solvant et des stabilités locales pour la protéine étudiée.

Puisque l'échange isotopique induit un changement de la masse moléculaire, les échanges H/D peuvent être suivis par spectrométrie de masse. Cette dernière n'est pas aussi résolutive que la RMN, cependant elle permet de mesurer facilement les vitesses d'échanges H/D pour la protéine entière ou des fragments de quelques résidus obtenus après digestion enzymatique. Nous avons déjà détaillé ces expériences dans la partie III.

En définitive, les expériences d'échanges H/D sont très informatives sur la structure et la stabilité des protéines. Les vitesses d'échanges sont essentiellement suivies par RMN et spectrométrie de masse. Le principal avantage de la RMN réside dans sa capacité à déterminer les vitesses d'échanges isotopique des protons amides à l'échelle du résidu. Au contraire, l'analyse par spectrométrie de masse ne permet de distinguer que des constantes de vitesse moyennes à l'intérieur de peptides. En revanche, elle a l'avantage d'être facilement mise en œuvre et utilisable pour de faible quantité de matériel protéique.

PREPARATION DES VESICULES LIPIDIQUES

Les méthodes de préparation de vésicules lipidiques sont nombreuses et peuvent aboutir à la formation de plusieurs types de liposomes différents par leur taille, leur structure et leur capacité d'encapsulation. Nous ne décrivons que les techniques utilisées dans ce travail pour synthétiser des vésicules de type SUVs et LUVs.

Principe

Toutes les méthodes de préparation des liposomes font appel aux étapes suivantes :

- (i) Evaporation sous vide d'une solution organique de lipides,
- (ii) Dispersion des lipides séchés dans une phase aqueuse,
- (iii) Sélection de la taille des vésicules.

Les différentes étapes de la formation des vésicules lipidiques sont résumées dans la figure V.1. Les vésicules lipidiques sont formées lorsque des films lipidiques sont hydratés : les feuillettes de bicouches lipidiques dans l'état "cristal liquide" deviennent fluides et gonflent. Ainsi hydratés, les feuillettes se détachent pendant l'agitation et s'individualisent pour former de grandes vésicules unilamellaires (MLVs). L'apparition de bicouches lipidiques empêche l'interaction directe de l'eau avec les chaînes hydrocarbonées hydrophobes du phospholipide. 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).

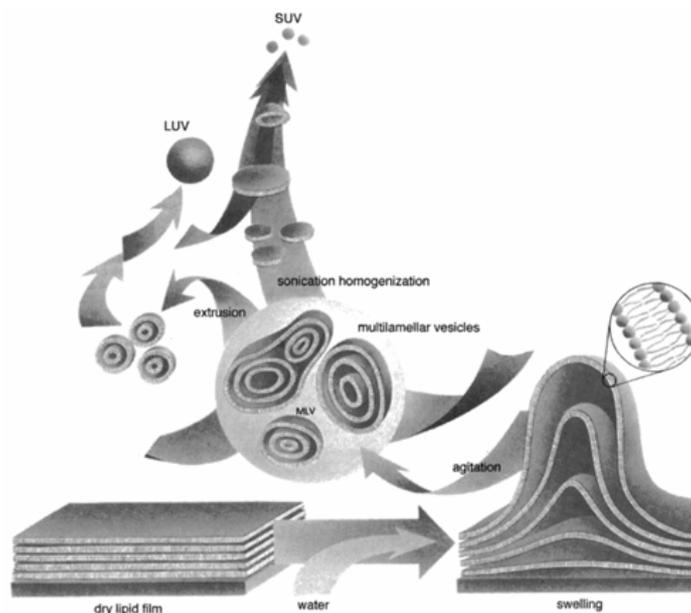


Fig. V.1 – Formation de vésicules de type MLVs, LUVs et SUVs à partir de films lipidiques secs. D'après [www.avantilipids.com]

Matériels et méthodes

Produits utilisés

Les phospholipides employés dans ce travail sont des phosphatidylcholines (Egg-PC ou EPC, $M = 760 \text{ g.mol}^{-1}$ en moyenne) et des acides phosphatidiques (Egg-PA ou EPA 697 g.mol^{-1} en moyenne) extraits du blanc d'œuf. Les phospholipides sont vendus en solution chloroformique par Avanti Polar (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA). Des vésicules zwitterioniques ont été synthétisées uniquement avec de l'EPC. Des vésicules globalement chargées négativement ont été synthétisées avec un mélange de EPC et EPA à un rapport molaire de 9/1 (EPC/EPA). Les lipides sont conservés à -20°C sous argon de manière à limiter les phénomènes d'oxydation des liaisons insaturées des chaînes acylées des phospholipides. De manière générale, les diverses étapes de formation de vésicules lipidiques sont entrecoupées de passage sous flux d'argon.

Des lipides aux vésicules multilamellaires

Evaporation : les lipides en solution chloroformique sont déposés dans un ballon Pyrex de volume 10 à 20 fois supérieur au volume final de solution de liposomes. L'évaporation du solvant organique s'effectue à l'aide d'un évaporateur rotatif, équipée d'un bain thermostaté maintenu à 30°C. La pression est graduellement diminuée jusqu'à la plus faible pression possible. Le ballon est agité afin d'obtenir la plus grande surface d'évaporation. Cette étape dure environ 30 minutes. Lorsque le solvant organique est entièrement éliminé, on obtient un film lipidique sur les parois du ballon.

Dispersion : une évaporation en phase inverse a été réalisée. Le film lipidique précédent est dissout dans une solution d'éther éthylique. La phase aqueuse (tampon citrate pH 6) est ensuite ajoutée à la phase organique dans un rapport éther/ tampon 1/1 (v/v). A ce stade, les phospholipides se placent à l'interface des deux phases non miscibles. Après action des ultrasons pendant 5 minutes, une émulsion eau/huile se forme, dans laquelle les phospholipides s'organisent sous forme de micelles inverses entourant des compartiments aqueux. La réussite de cette émulsion est une condition fondamentale. L'élimination du solvant tout d'abord sous pression réduite (200-400 mmHg) conduit au rapprochement des micelles inverses puis à la formation d'un gel. Au cours de l'étape suivante, la pression est réduite davantage afin de favoriser l'évaporation totale de l'éther. Ceci entraîne la rupture de la phase gel. Au moment de la rupture du gel, les monocouches se rapprochent pour former des bicouches. L'éther est alors évaporé jusqu'à disparition complète du solvant. Le vide est ensuite cassé par un flux d'argon. Les MLVs ainsi obtenus sont de tailles très variables (0.2 à 1 µm). Les MLV sont ensuite utilisés pour former des vésicules unilamellaires de type LUVs ou SUVs.

Des MLVs aux SUVs

Afin de réduire et sélectionner une taille homogène de vésicules, la suspension de MLVs peut être soumise à l'action d'une sonde à ultrason. Cette méthode qui aboutit à l'obtention de SUVs, a été introduite par *Saunders* en 1962 [*Saunders et al.*, 1962]. La sonication fournit une énergie élevée de manière à briser les MLVs et à générer des SUVs. De manière à limiter les phénomènes oxydatifs, la sonication a lieu dans un bain de glace.

Les cycles de sonication appliqués sont les suivants :

- Nombre de cycle : 8
- Energie : 80 W
- Durée de chaque cycle : 3 min

- Durée de l'impulsion : 2 s
- Intervalle entre chaque impulsion : 1 s

Cette technique possède certains inconvénients. En effet, elle peut conduire d'une part à la dégradation des phospholipides et d'autre part à la libération de particules métalliques dans la solution. De manière à éliminer ces particules et des MLVs résiduels, une centrifugation à 100 000 x g pendant une heure a été réalisée.

Des MLVs aux LUVs

La sélection de vésicules de grandes tailles unilamellaires a été réalisée par extrusion. Cette technique consiste à faire passer une solution de MLVs à travers des filtres de polycarbonate pour générer des vésicules unilamellaires ayant un diamètre proche de la taille des pores du filtre utilisé [Szoka *et al.*, 1980]. Le passage à travers les filtres déforme les liposomes et n'entraîne pas de rupture de la structure vésiculaire mais une réduction progressive du nombre de lamelles des vésicules. Pour ce travail nous avons utilisé un système manuel où la pression est appliquée par une seringue. Environ 10 passages à travers des filtres de 0.22 μm sont nécessaires pour obtenir une population homogène de LUVs.

Caractérisation des vésicules

La taille et l'homogénéité des vésicules lipidiques sont les critères de qualité essentiels d'une préparation de liposomes. De nombreuses techniques permettent de déterminer la valeur moyenne de la taille et la distribution de cette dernière. Les principales sont la microscopie électronique et la diffusion quasi-élastique de la lumière (ou diffusion dynamique de la lumière, DLS). Pour nos préparations, des mesures de DLS 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 particules 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.

La figure V.2 présente un exemple de résultats de caractérisation sur des préparations de SUVs et LUVs anioniques à 10 mM dans un tampon citrate 4 mM pH 7.

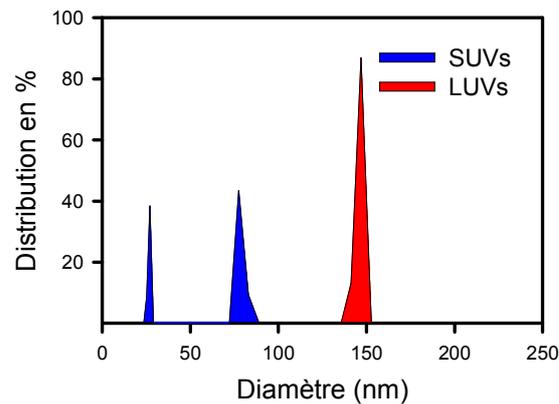


Fig. V.2 – Formation de vésicules de type MLVs, LUVs et SUVs à partir de films lipidiques secs. Les vésicules lipidiques sont composées d'un mélange de EPC/EPA (rapport molaire : 9/1).

La préparation de vésicules de grandes tailles apparaît monodisperse. Une seule population est visible centrée sur $145 \text{ nm} \pm 6 \text{ nm}$. La préparation de LUVs semble excellente et très reproductible. En revanche, la préparation de SUVs est quelquefois polydisperse. De plus, les SUVs sont des objets métastables dont la taille évolue sur une échelle de temps de quelques heures. Dans l'exemple proposé, la population majoritaire est centrée sur $75 \text{ nm} \pm 8 \text{ nm}$. Cependant, pour les expériences proposées dans ce travail, nous n'avons utilisé que des préparations de SUVs monodisperses.



Références bibliographiques

A

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, 10944-53.

Alexandrescu, A. T., Evans, P. A., Pitkeathly, M., Baum, J., and Dobson, C. M. (1993) Structure and dynamics of the acid-denatured molten globule state of alpha-lactalbumin: a two-dimensional NMR study. *Biochemistry* 32, 1707-18.

Alves, I. D., Park, C. K., and Hruby, V. J. (2005) Plasmon resonance methods in GPCR signaling and other membrane events. *Curr Protein Pept Sci* 6, 293-312.

Anderson, R. G., and Jacobson, K. (2002) A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 296, 1821-5.

Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-30.

Arbuzova, A., Wang, J., Murray, D., Jacob, J., Cafiso, D. S., and McLaughlin, S. (1997) Kinetics of interaction of the myristoylated alanine-rich C kinase substrate, membranes, and calmodulin. *J Biol Chem* 272, 27167-77.

Arnold, R. S., and Cornell, R. B. (1996) Lipid regulation of CTP: phosphocholine cytidyltransferase: electrostatic, hydrophobic, and synergistic interactions of anionic phospholipids and diacylglycerol. *Biochemistry* 35, 9917-24.

Ashcroft, R. G., Coster, H. G., and Smith, J. R. (1981) The molecular organisation of bimolecular lipid membranes. The dielectric structure of the hydrophilic/hydrophobic interface. *Biochim Biophys Acta* 643, 191-204.

B

Bai, J., and Pagano, R. E. (1997) Measurement

of spontaneous transfer and transbilayer movement of BODIPY-labeled lipids in lipid vesicles. *Biochemistry* 36, 8840-8.

Bai, Y., Milne, J. S., Mayne, L., and Englander, S. W. (1993) Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins* 17, 75-86.

Balbach, J., Forge, V., Lau, W. S., Jones, J. A., van Nuland, N. A., and Dobson, C. M. (1997) Detection of residue contacts in a protein folding intermediate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7182-5.

Balbach, J., Forge, V., Lau, W. S., van Nuland, N. A., Brew, K., and Dobson, C. M. (1996) Protein folding monitored at individual residues during a two-dimensional NMR experiment. *Science* 274, 1161-3.

Bangham, A. D., Standish, M. M., and Watkins, J. C. (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 13, 238-52.

Banuelos, S., and Muga, A. (1995) Binding of molten globule-like conformations to lipid bilayers. Structure of native and partially folded alpha-lactalbumin bound to model membranes. *J Biol Chem* 270, 29910-5.

Banuelos, S., and Muga, A. (1996) Interaction of native and partially folded conformations of alpha-lactalbumin with lipid bilayers: characterization of two membrane-bound states. *FEBS Lett* 386, 21-5.

Banuelos, S., and Muga, A. (1996) Structural requirements for the association of native and partially folded conformations of alpha-lactalbumin with model membranes. *Biochemistry* 35, 3892-8.

Basov, L. V., Tiktopulo, E. I., Kashparov, I. A., and Bychkova, V. E. (2004) [Conformational status of apomyoglobin in the presence of phospholipid vesicles at neutral pH]. *Mol Biol (Mosk)* 38, 323-32.

Behan-Martin, M. K., Jones, G. R., Bowler, K., and Cossins, A. R. (1993) A near perfect temperature adaptation of bilayer order in vertebrate brain membranes. *Biochim Biophys Acta* 1151, 216-22.

- Bennett, M. J., Choe, S., and Eisenberg, D. (1994)** Refined structure of dimeric diphtheria toxin at 2.0 Å resolution. *Protein Sci* 3, 1444-63.
- Ben-Shaul, A., Ben-Tal, N., and Honig, B. (1996)** Statistical thermodynamic analysis of peptide and protein insertion into lipid membranes. *Biophys J* 71, 130-7.
- Ben-Tal, N., Ben-Shaul, A., Nicholls, A., and Honig, B. (1996)** Free-energy determinants of alpha-helix insertion into lipid bilayers. *Biophys J* 70, 1803-12.
- Bernad, S., Oellerich, S., Soulimane, T., Noinville, S., Baron, M. H., Paternostre, M., and Lecomte, S. (2004)** Interaction of horse heart and thermus thermophilus type c cytochromes with phospholipid vesicles and hydrophobic surfaces. *Biophys J* 86, 3863-72.
- 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, 563-6.
- Booth, P. J., and Curran, A. R. (1999)** Membrane protein folding. *Curr Opin Struct Biol* 9, 115-21.
- Booth, P. J., Riley, M. L., Flitsch, S. L., Templer, R. H., Farooq, A., Curran, A. R., Chadborn, N., and Wright, P. (1997)** Evidence that bilayer bending rigidity affects membrane protein folding. *Biochemistry* 36, 197-203.
- Brew, K., Vanaman, T. C., and Hill, R. L. (1968)** The role of alpha-lactalbumin and the A protein in lactose synthetase: a unique mechanism for the control of a biological reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 59, 491-7.
- Briggs, M. S., Gierasch, L. M., Zlotnick, A., Lear, J. D., and DeGrado, W. F. (1985)** In vivo function and membrane binding properties are correlated for Escherichia coli lamB signal peptides. *Science* 228, 1096-9.
- 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.*
- 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, 6058-63.
- Cabiaux, V., Quertenmont, P., Conrath, K., Brasseur, R., Capiou, C., and Ruyschaert, J. M. (1994)** Topology of diphtheria toxin B fragment inserted in lipid vesicles. *Mol Microbiol* 11, 43-50.
- Caffrey, M., and Feigenson, G. W. (1981)** Fluorescence quenching in model membranes. 3. Relationship between calcium adenosinetriphosphatase enzyme activity and the affinity of the protein for phosphatidylcholines with different acyl chain characteristics. *Biochemistry* 20, 1949-61.
- ## C
- Cawthern, K. M., Narayan, M., Chaudhuri, D., Permyakov, E. A., and Berliner, L. J. (1997)** Interactions of alpha-lactalbumin with fatty acids and spin label analogs. *J Biol Chem* 272, 30812-6.
- Cawthern, K. M., Permyakov, E., and Berliner, L. J. (1996)** Membrane-bound states of alpha-lactalbumin: implications for the protein stability and conformation. *Protein Sci* 5, 1394-405.
- 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, 43425-32.
- Chenal, A., Vernier, G., Savarin, P., Bushmarina, N. A., Geze, A., Guillain, 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.

Chrysina, E. D., Brew, K., and Acharya, K. R. (2000) Crystal structures of apo- and holo-bovine alpha-lactalbumin at 2.2-Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions. *J Biol Chem* 275, 37021-9.

Cleveland, M. V., Slatin, S., Finkelstein, A., and Levinthal, C. (1983) Structure-function relationships for a voltage-dependent ion channel: properties of COOH-terminal fragments of colicin E1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 3706-10.

Coligan, J. E. (1997) *Current Protocols in Proteins*, John Wiley & Sons, New York.

Collier, R. J. (1975) Diphtheria toxin: mode of action and structure. *Bacteriol Rev* 39, 54-85.

Conner, S. D., and Schmid, S. L. (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37-44.

Cornell, R. B., and Northwood, I. C. (2000) Regulation of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase by amphitropism and relocalization. *Trends Biochem Sci* 25, 441-7.

Cowan, S. W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Paupit, R. A., Jansonius, J. N., and Rosenbusch, J. P. (1992) Crystal structures explain functional properties of two E. coli porins. *Nature* 358, 727-33.

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, 2387-93.

Cullis, P. R., and de Kruijff, B. (1979) Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim Biophys Acta* 559, 399-420.

D

Dangreau, H., Joniau, M., De Cuyper, M., and Hanssens, I. (1982) An intramolecular excimer forming probe used to study the interaction of

alpha-lactalbumin with model membranes. *Biochemistry* 21, 3594-8.

Daum, G., and Vance, J. E. (1997) Import of lipids into mitochondria. *Prog Lipid Res* 36, 103-30.

de Kruijff, B. (1997) Lipid polymorphism and biomembrane function. *Curr Opin Chem Biol* 1, 564-9.

de Laureto, P. P., Frare, E., Battaglia, F., Mossuto, M. F., Uversky, V. N., and Fontana, A. (2005) Protein dissection enhances the amyloidogenic properties of alpha-lactalbumin. *Febs J* 272, 2176-88.

de Planque, M. R., Bonev, B. B., Demmers, J. A., Greathouse, D. V., Koeppe, R. E., 2nd, Separovic, F., Watts, A., and Killian, J. A. (2003) Interfacial anchor properties of tryptophan residues in transmembrane peptides can dominate over hydrophobic matching effects in peptide-lipid interactions. *Biochemistry* 42, 5341-8.

Deisenhofer, J., Remington, S. J., and Steigemann, W. (1985) Experience with various techniques for the refinement of protein structures. *Methods Enzymol* 115, 303-23.

Demmers, J. A., Haverkamp, J., Heck, A. J., Koeppe, R. E., 2nd, and Killian, J. A. (2000) Electrospray ionization mass spectrometry as a tool to analyze hydrogen/deuterium exchange kinetics of transmembrane peptides in lipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3189-94.

Demmers, J. A., van Duijn, E., Haverkamp, J., Greathouse, D. V., Koeppe, R. E., 2nd, Heck, A. J., and Killian, J. A. (2001) Interfacial positioning and stability of transmembrane peptides in lipid bilayers studied by combining hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry. *J Biol Chem* 276, 34501-8.

Deng, Y., and Smith, D. L. (1999) Rate and equilibrium constants for protein unfolding and refolding determined by hydrogen exchange-mass spectrometry. *Anal Biochem* 276, 150-60.

Dolgikh, D. A., Abaturov, L. V., Bolotina, I. A., Brazhnikov, E. V., Bychkova, V. E., Gilmanishin, R. I., Lebedev Yu, O., Semisotnov,

G. V., Tiktopulo, E. I., Ptitsyn, O. B., and et al. (1985) Compact state of a protein molecule with pronounced small-scale mobility: bovine alpha-lactalbumin. *Eur Biophys J* 13, 109-21.

Dolgikh, D. A., Gilmanshin, R. I., Brazhnikov, E. V., Bychkova, V. E., Semisotnov, G. V., Venyaminov, S., and Ptitsyn, O. B. (1981) Alpha-Lactalbumin: compact state with fluctuating tertiary structure? *FEBS Lett* 136, 311-5.

E

Eisenberg, D. (1984) Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. *Annu Rev Biochem* 53, 595-623.

Eisenberg, M., Gresalfi, T., Riccio, T., and McLaughlin, S. (1979) Adsorption of monovalent cations to bilayer membranes containing negative phospholipids. *Biochemistry* 18, 5213-23.

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, 2894-901.

Eliezer, D., and Wright, P. E. (1996) Is apomyoglobin a molten globule? Structural characterization by NMR. *J Mol Biol* 263, 531-8.

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, 148-55.

Elkins, P., Bunker, A., Cramer, W. A., and Stauffacher, C. V. (1997) A mechanism for toxin insertion into membranes is suggested by the crystal structure of the channel-forming domain of colicin E1. *Structure* 5, 443-58.

Engelman, D. M., Steitz, T. A., and Goldman, A. (1986) Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu Rev Biophys Chem* 15, 321-53.

Engen, J. R., and Smith, D. L. (2000) Investigating the higher order structure of proteins. Hydrogen exchange, proteolytic fragmentation,

and mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 146, 95-112.

Epand, R. F., Martinou, J. C., Fornallaz-Mulhauser, M., Hughes, D. W., and Epand, R. M. (2002) The apoptotic protein tBid promotes leakage by altering membrane curvature. *J Biol Chem* 277, 32632-9.

Epand, R. M., and Epand, R. F. (2001) Factors contributing to the fusogenic potency of foamy virus. *Biochem Biophys Res Commun* 284, 870-4.

F

Fattal, D. R., and Ben-Shaul, A. (1993) A molecular model for lipid-protein interaction in membranes: the role of hydrophobic mismatch. *Biophys J* 65, 1795-809.

Fisher, L. E., Engelman, D. M., and Sturgis, J. N. (2003) Effect of detergents on the association of the glycoprotein a transmembrane helix. *Biophys J* 85, 3097-105.

Forge, V., Wijesinha, R. T., Balbach, J., Brew, K., Robinson, C. V., Redfield, C., and Dobson, C. M. (1999) Rapid collapse and slow structural reorganisation during the refolding of bovine alpha-lactalbumin. *J Mol Biol* 288, 673-88.

G

Ganong, B. R., and Bell, R. M. (1984) Transmembrane movement of phosphatidylglycerol and diacylglycerol sulfhydryl analogues. *Biochemistry* 23, 4977-83.

Garcia-Saez, A. J., Mingarro, I., Perez-Paya, E., and Salgado, J. (2004) Membrane-insertion fragments of Bcl-xL, Bax, and Bid. *Biochemistry* 43, 10930-43.

Gast, K., Damaschun, H., Misselwitz, R., Muller-Frohne, M., Zirwer, D., and Damaschun, G. (1994) Compactness of protein molten globules: temperature-induced structural changes of the apomyoglobin folding intermediate. *Eur Biophys J* 23, 297-305.

Gast, K., Zirwer, D., Muller-Frohne, M., and Damaschun, G. (1998) Compactness of the

kinetic molten globule of bovine alpha-lactalbumin: a dynamic light scattering study. *Protein Sci* 7, 2004-11.

Gastinel, L. N., Cambillau, C., and Bourne, Y. (1999) Crystal structures of the bovine beta4galactosyltransferase catalytic domain and its complex with uridine diphosphogalactose. *Embo J* 18, 3546-57.

Glasoe, P. K., and Long, F. A. (1960) Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide. *J. Phys. Chem* 64, 188-190.

Goormaghtigh, E., Raussens, V., and Ruyschaert, J. M. (1999) Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes. *Biochim Biophys Acta* 1422, 105-85.

Gouaux, E. (1997) Channel-forming toxins: tales of transformation. *Curr Opin Struct Biol* 7, 566-73.

Granick, S., and Beale, S. I. (1978) Hemes, chlorophylls, and related compounds: biosynthesis and metabolic regulation. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 46, 33-203.

Griko, Y. V., Privalov, P. L., Venyaminov, S. Y., and Kutysenko, V. P. (1988) Thermodynamic study of the apomyoglobin structure. *J Mol Biol* 202, 127-38.

H

Halskau, O., Froystein, N. A., Muga, A., and Martinez, A. (2002) The membrane-bound conformation of alpha-lactalbumin studied by NMR-monitored ¹H exchange. *J Mol Biol* 321, 99-110.

Hanssens, I., van Ceunebroeck, J. C., Pottel, H., Preaux, G., and van Cauwelaert, F. (1985) Influence of the protein conformation on the interaction between alpha-lactalbumin and dimyristoylphosphatidylcholine vesicles. *Biochim Biophys Acta* 817, 154-64.

Hao, M., and Maxfield, F. R. (2000) Characterization of rapid membrane internalization and recycling. *J Biol Chem* 275, 15279-86.

Helenius, A., and Aebi, M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291, 2364-9.

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, 2717-25.

Hiraoka, Y., Segawa, T., Kuwajima, K., Sugai, S., and Murai, N. (1980) alpha-Lactalbumin: a calcium metalloprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 95, 1098-104.

Holm, L., and Sander, C. (1993) Globin fold in a bacterial toxin. *Nature* 361, 309.

Holm, L., and Sander, C. (1993) Structural alignment of globins, phycocyanins and colicin A. *FEBS Lett* 315, 301-6.

Holthuis, J. C., and Burger, K. N. (2003) Sensing membrane curvature. *Dev Cell* 5, 821-2.

Hong, W. (2005) SNAREs and traffic. *Biochim Biophys Acta* 1744, 493-517.

Honig, B. H., Hubbell, W. L., and Flewelling, R. F. (1986) Electrostatic interactions in membranes and proteins. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 15, 163-93.

Huang, H., Ball, J. M., Billheimer, J. T., and Schroeder, F. (1999) Interaction of the N-terminus of sterol carrier protein 2 with membranes: role of membrane curvature. *Biochem J* 344 Pt 2, 593-603.

Huang, K. S., Bayley, H., Liao, M. J., London, E., and Khorana, H. G. (1981) Refolding of an integral membrane protein. Denaturation, renaturation, and reconstitution of intact bacteriorhodopsin and two proteolytic fragments. *J Biol Chem* 256, 3802-9.

Hughson, F. M., Wright, P. E., and Baldwin, R. L. (1990) Structural characterization of a partly folded apomyoglobin intermediate. *Science* 249, 1544-8.

Hunt, J. F., Rath, P., Rothschild, K. J., and Engelman, D. M. (1997) Spontaneous, pH-

dependent membrane insertion of a transbilayer alpha-helix. *Biochemistry* 36, 15177-92.

Hvidt, A., and Nielsen, S. O. (1966) Hydrogen exchange in proteins. *Adv Protein Chem* 21, 287-386.

J

Jacobs, R. E., and White, S. H. (1987) Lipid bilayer perturbations induced by simple hydrophobic peptides. *Biochemistry* 26, 6127-34.

Jahn, R., Lang, T., and Sudhof, T. C. (2003) Membrane fusion. *Cell* 112, 519-33.

Jahnig, F. (1983) Thermodynamics and kinetics of protein incorporation into membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 3691-5.

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* 12, 229-34.

Jamin, M., and Baldwin, R. L. (1998) Two forms of the pH 4 folding intermediate of apomyoglobin. *J Mol Biol* 276, 491-504.

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, 6068-78.

Janin, J. (1996) For Guldberg and Waage, with love and cratic entropy. *Proteins* 24, i-ii.

Jennings, P. A., and Wright, P. E. (1993) Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of apomyoglobin. *Science* 262, 892-6.

Johnson, E. A., and McCarty, R. E. (2002) The carboxyl terminus of the epsilon subunit of the chloroplast ATP synthase is exposed during illumination. *Biochemistry* 41, 2446-51.

Johnson, J. E., and Cornell, R. B. (1999) Amphitropic proteins: regulation by reversible

membrane interactions (review). *Mol Membr Biol* 16, 217-35.

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 cytidyltransferase, dictate its selectivity for anionic membranes. *J Biol Chem* 278, 514-22.

K

Kataoka, M., Kuwajima, K., Tokunaga, F., and Goto, Y. (1997) Structural characterization of the molten globule of alpha-lactalbumin by solution X-ray scattering. *Protein Sci* 6, 422-30.

Kharakoz, D. P., and Bychkova, V. E. (1997) Molten globule of human alpha-lactalbumin: hydration, density, and compressibility of the interior. *Biochemistry* 36, 1882-90.

Kim, J., and Kim, H. (1989) Interaction of alpha-lactalbumin with phospholipid vesicles as studied by photoactivated hydrophobic labeling. *Biochim Biophys Acta* 983, 1-8.

Kohler, C., Hakansson, A., Svanborg, C., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (1999) Protease activation in apoptosis induced by MAL. *Exp Cell Res* 249, 260-8.

Kuwajima, K. (1989) The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins* 6, 87-103.

Kuwajima, K., Ogawa, Y., and Sugai, S. (1979) Application of the pH-jump method to the titration of tyrosine residues in bovine alpha-lactalbumin. *Biochemistry* 18, 878-82.

Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* 157, 105-32.

L

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, 13617-26.

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, 1363-9.

Lala, A. K., Kaul, P., and Ratnam, P. B. (1995) Membrane-protein interaction and the molten globule state: interaction of alpha-lactalbumin with membranes. *J Protein Chem* 14, 601-9.

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, 354-61.

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, 445-57.

Lemmon, M. A., Treutlein, H. R., Adams, P. D., Brunger, A. T., and Engelman, D. M. (1994) A dimerization motif for transmembrane alpha-helices. *Nat Struct Biol* 1, 157-63.

Lenaz, G. (1987) Lipid fluidity and membrane protein dynamics. *Biosci Rep* 7, 823-37.

Levine, Y. K., and Wilkins, M. H. (1971) Structure of oriented lipid bilayers. *Nat New Biol* 230, 69-72.

Levy, D., Gulik, A., Bluzat, A., and Rigaud, J. L. (1992) Reconstitution of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase: mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. *Biochim Biophys Acta* 1107, 283-98.

Light, W. R., 3rd, and Olson, J. S. (1990) Transmembrane movement of heme. *J Biol Chem*

265, 15623-31.

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 U S A* 92, 5446-50.

Lindblom, G., Rilfors, L. (1989) Cubic phases and isotropic structures formed by membranes lipids. *Biochim Biophys Acta* 988, 221-56.

Lucero, H. A., and Robbins, P. W. (2004) Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. *Arch Biochem Biophys* 426, 208-24.

Luzzati, V., Gülik-Krywicki, T., Tardieu, A. (1968) Polymorphism of lecithins. *Nature* 218, 1031-34.

Lundbaek, J. A., Maer, A. M., and Andersen, O. S. (1997) Lipid bilayer electrostatic energy, curvature stress, and assembly of gramicidin channels. *Biochemistry* 36, 5695-701.

M

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, 250-61.

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, 17915-22.

Matko, J., Szollosi, J., Tron, L., and Damjanovich, S. (1988) Luminescence spectroscopic approaches in studying cell surface dynamics. *Q Rev Biophys* 21, 479-544.

Matsumoto, H., Shimokawa, Y., Ushida, Y., Toida, T., and Hayasawa, H. (2001) New biological function of bovine alpha-lactalbumin: protective effect against ethanol- and stress-induced gastric mucosal injury in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 65, 1104-11.

McAuley, K. E., Fyfe, P. K., Ridge, J. P., Isaacs, N. W., Cogdell, R. J., and Jones, M. R. (1999)

Structural details of an interaction between cardiolipin and an integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14706-11.

Miller, C. E., Majewski, J., Kjaer, K., Weygand, M., Faller, R., Satija, S., and Kuhl, T. L. (2005) Neutron and X-ray scattering studies of cholera toxin interactions with lipid monolayers at the air-liquid interface. *Colloids Surf B Biointerfaces* 40, 159-63.

Milne, J. C., and Collier, R. J. (1993) pH-dependent permeabilization of the plasma membrane of mammalian cells by anthrax protective antigen. *Mol Microbiol* 10, 647-53.

Mishra, V. K., Palgunachari, M. N., Segrest, J. P., and Anantharamaiah, G. M. (1994) Interactions of synthetic peptide analogs of the class A amphipathic helix with lipids. Evidence for the snorkel hypothesis. *J Biol Chem* 269, 7185-91.

Mitranic, M. M., Paquet, M. R., and Moscarello, M. A. (1988) The interaction of bovine milk galactosyltransferase with lipid and alpha-lactalbumin. *Biochim Biophys Acta* 956, 277-84.

Mok, K. H., Nagashima, T., Day, I. J., Hore, P. J., and Dobson, C. M. (2005) Multiple subsets of side-chain packing in partially folded states of alpha-lactalbumins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8899-904.

Montich, G. G., and Marsh, D. (1995) Interaction of alpha-lactalbumin with phosphatidylglycerol. Influence of protein binding on the lipid phase transition and lipid acyl chain mobility. *Biochemistry* 34, 13139-45.

Morris, R. E., and Saelinger, C. B. (1985) Route of pseudomonas and diphtheria toxin entry into mammalian cells: basis for susceptibility to toxin. *Surv Synth Pathol Res* 4, 34-43.

Moya, M., Dautry-Varsat, A., Goud, B., Louvard, D., and Boquet, P. (1985) Inhibition of coated pit formation in Hep2 cells blocks the cytotoxicity of diphtheria toxin but not that of ricin toxin. *J Cell Biol* 101, 548-59.

Mozsolits, H., Lee, T. H., Clayton, A. H.,

Sawyer, W. H., and Aguilar, M. I. (2004) The membrane-binding properties of a class A amphipathic peptide. *Eur Biophys J* 33, 98-108.

Murakami, K., Andree, P. J., and Berliner, L. J. (1982) Metal ion binding to alpha-lactalbumin species. *Biochemistry* 21, 5488-94.

N

Newmeyer, D. D., and Ferguson-Miller, S. (2003) Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112, 481-90.

Nishii, I., Kataoka, M., Tokunaga, F., and Goto, Y. (1994) Cold denaturation of the molten globule states of apomyoglobin and a profile for protein folding. *Biochemistry* 33, 4903-9.

Nozaka, M., Kuwajima, K., Nitta, K., and Sugai, S. (1978) Detection and characterization of the intermediate on the folding pathway of human alpha-lactalbumin. *Biochemistry* 17, 3753-8.

P

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., Pattus, F., Tucker, A. D., and Tsernoglou, D. (1989) Structure of the membrane-pore-forming fragment of colicin A. *Nature* 337, 93-6.

Pebay-Peyroula, E., Rummel, G., Rosenbusch, J. P., and Landau, E. M. (1997) X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science* 277, 1676-81.

Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Hunziker, P., and von Fellenberg, R. (1999) Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine alpha-lactalbumin molecule. *Biochim Biophys Acta* 1426, 439-48.

Permyakov, E. A., and Berliner, L. J. (2000) alpha-Lactalbumin: structure and function. *FEBS Lett* 473, 269-74.

Permyakov, E. A., Grishchenko, V. M., Kalinichenko, L. P., Orlov, N. Y., Kuwajima, K., and Sugai, S. (1991) Calcium-regulated interactions of human alpha-lactalbumin with bee venom melittin. *Biophys Chem* 39, 111-7.

Petrov, J. G., and Radoev, B. P. (1981) *Coll. Polym. Scie* 259, 753-760.

Pinheiro, T. J., and Watts, A. (1994) Lipid specificity in the interaction of cytochrome c with anionic phospholipid bilayers revealed by solid-state ³¹P NMR. *Biochemistry* 33, 2451-8.

Popot, J. L., and Engelman, D. M. (2000) Helical membrane protein folding, stability, and evolution. *Annu Rev Biochem* 69, 881-922.

Popot, J. L., and Engelman, D. M. (1990) Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry* 29, 4031-7.

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, 33-6.

R

Redfield, C., Schulman, B. A., Milhollen, M. A., Kim, P. S., and Dobson, C. M. (1999) Alpha-lactalbumin forms a compact molten globule in the absence of disulfide bonds. *Nat Struct Biol* 6, 948-52.

Richard, P., and Graber, P. (1992) Kinetics of ATP synthesis catalyzed by the H(+)-ATPase from chloroplasts (CF0F1) reconstituted into liposomes and coreconstituted with bacteriorhodopsin. *Eur J Biochem* 210, 287-91.

Rietveld, A., van Kemenade, T. J., Hak, T., Verkleij, A. J., and de Kruijff, B. (1987) The effect of cytochrome c oxidase on lipid polymorphism of model membranes containing cardiolipin. *Eur J Biochem* 164, 137-40.

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, 12427-33.

Rigaud, J., Chami, M., Lambert, O., Levy, D., and Ranck, J. (2000) Use of detergents in two-dimensional crystallization of membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1508, 112-28.

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, 373-82.

Rigaud, J. L., Pitard, B., and Levy, D. (1995) Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1231, 223-46.

Roepstroff, P., and Fohlman, J. (1984) Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *biomed. Mass Spectrom* 11, 601.

Rose, G. D. (1978) Prediction of chain turns in globular proteins on a hydrophobic basis. *Nature* 272, 586-90.

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, 6632-40.

Roth, M. G., Bi, K., Ktistakis, N. T., and Yu, S. (1999) Phospholipase D as an effector for ADP-ribosylation factor in the regulation of vesicular traffic. *Chem Phys Lipids* 98, 141-52.

S

Saunders, L., Perrin, J., and Gammack, D. (1962) Ultrasonic irradiation of some phospholipids sols. *J Pharm Pharmacol* 14, 567-72

Schiffer, M., Chang, C. H., and Stevens, F. J. (1992) The functions of tryptophan residues in membrane proteins. *Protein Eng* 5, 213-4.

Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A. V., Witke, W., Huttner, W. B., and Soling, H. D. (1999) Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic

acid. *Nature* 401, 133-41.

Schroeder, R. J., Ahmed, S. N., Zhu, Y., London, E., and Brown, D. A. (1998) Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. *J Biol Chem* 273, 1150-7.

Schulman, B. A., Kim, P. S., Dobson, C. M., and Redfield, C. (1997) A residue-specific NMR view of the non-cooperative unfolding of a molten globule. *Nat Struct Biol* 4, 630-4.

Schulman, B. A., Redfield, C., Peng, Z. Y., Dobson, C. M., and Kim, P. S. (1995) Different subdomains are most protected from hydrogen exchange in the molten globule and native states of human alpha-lactalbumin. *J Mol Biol* 253, 651-7.

Seigneuret, M., and Devaux, P. F. (1984) ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 3751-5.

Senzel, L., Gordon, M., Blaustein, R. O., Oh, K. J., Collier, R. J., and Finkelstein, A. (2000) Topography of diphtheria Toxin's T domain in the open channel state. *J Gen Physiol* 115, 421-34.

Shen, W. H., Choe, S., Eisenberg, D., and Collier, R. J. (1994) Participation of lysine 516 and phenylalanine 530 of diphtheria toxin in receptor recognition. *J Biol Chem* 269, 29077-84.

Simmonds, A. C., East, J. M., Jones, O. T., Rooney, E. K., McWhirter, J., and Lee, A. G. (1982) Annular and non-annular binding sites on the (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 693, 398-406.

Simons, K., and Ikonen, E. (2000) How cells handle cholesterol. *Science* 290, 1721-6.

Singer, S. J., and Nicolson, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-31.

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, 504-13.

Starling, A. P., East, J. M., and Lee, A. G. (1995) Effects of gel phase phospholipid on the Ca(2+)-ATPase. *Biochemistry* 34, 3084-91.

Svensson, M., Sabharwal, H., Hakansson, A., Mossberg, A. K., Lipniunas, P., Leffler, H., Svanborg, C., and Linse, S. (1999) Molecular characterization of alpha-lactalbumin folding variants that induce apoptosis in tumor cells. *J Biol Chem* 274, 6388-96.

Szoka, F., Olson, F., Health, T., Vail, W., and Mayhew, E. (1980) Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1-0.2 μm) by a combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim Biophys Acta* 601, 559-71.

T

Tristram-Nagle, S., Yang, C. P., and Nagle, J. F. (1986) Thermodynamic studies of purple membrane. *Biochim Biophys Acta* 854, 58-66.

Troullier, A., Reinstadler, D., Dupont, Y., Naumann, D., and Forge, V. (2000) Transient non-native secondary structures during the refolding of alpha-lactalbumin detected by infrared spectroscopy. *Nat Struct Biol* 7, 78-86.

U

Umata, T., and Mekada, E. (1998) Diphtheria toxin translocation across endosome membranes. A novel cell permeabilization assay reveals new diphtheria toxin fragments in endocytic vesicles. *J Biol Chem* 273, 8351-9.

Uzawa, T., Akiyama, S., Kimura, T., Takahashi, S., Ishimori, K., Morishima, I., and Fujisawa, T. (2004) Collapse and search dynamics of apomyoglobin folding revealed by submillisecond observations of alpha-helical content and compactness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1171-6.

V

Valiyaveetil, F. I., Zhou, Y., and MacKinnon, R. (2002) Lipids in the structure, folding, and function of the KcsA K⁺ channel. *Biochemistry*

41, 10771-7.

van den Besselaar, A. M., de Druijff, B., van den Bosch, H., and van Deenen, L. L. (1978) Phosphatidylcholine mobility in liver microsomal membranes. *Biochim Biophys Acta* 510, 242-55.

van der Goot, F. G., Gonzalez-Manas, J. M., Lakey, J. H., and Pattus, F. (1991) A 'molten-globule' membrane-insertion intermediate of the pore-forming domain of colicin A. *Nature* 354, 408-10.

van Helvoort, A., de Brouwer, A., Ottenhoff, R., Brouwers, J. F., Wijnholds, J., Beijnen, J. H., Rijneveld, A., van der Poll, T., van der Valk, M. A., Majoor, D., Voorhout, W., Wirtz, K. W., Elferink, R. P., and Borst, P. (1999) Mice without phosphatidylcholine transfer protein have no defects in the secretion of phosphatidylcholine into bile or into lung airspaces. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 11501-6.

van Meer, G. (1998) Lipids of the Golgi membrane. *Trends Cell Biol* 8, 29-33.

Verkleij, A. J., and Ververgaert, P. H. (1978) Freeze-fracture morphology of biological membranes. *Biochim Biophys Acta* 515, 303-27.

Vogel, H. (1981) Incorporation of melittin into phosphatidylcholine bilayers. Study of binding and conformational changes. *FEBS Lett* 134, 37-42.

W

Wales, T. E., and Engen, J. R. (2005) Hydrogen exchange mass spectrometry for the analysis of protein dynamics. *Mass Spectrom Rev.*

Wallin, E., Tsukihara, T., Yoshikawa, S., von Heijne, G., and Elofsson, A. (1997) Architecture of helix bundle membrane proteins: an analysis of cytochrome c oxidase from bovine mitochondria. *Protein Sci* 6, 808-15.

Wallin, E., and von Heijne, G. (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci* 7, 1029-38.

Wang, Y., Botelho, A. V., Martinez, G. V., and

Brown, M. F. (2002) Electrostatic properties of membrane lipids coupled to metarhodopsin II formation in visual transduction. *J Am Chem Soc* 124, 7690-701.

Watts, A., Straus, S. K., Grage, S. L., Kamihira, M., Lam, Y. H., and Zhao, X. (2004) Membrane protein structure determination using solid-state NMR. *Methods Mol Biol* 278, 403-73.

Weisbuch, S., Gerard, F., Padeloup, M., Cappadoro, J., Dupont, Y., and Jamin, M. (2005) Cooperative sub-millisecond folding kinetics of apomyoglobin pH 4 intermediate. *Biochemistry* 44, 7013-23.

White, S. H., Ladokhin, A. S., Jayasinghe, S., and Hristova, K. (2001) How membranes shape protein structure. *J Biol Chem* 276, 32395-8.

White, S. H., and Wimley, W. C. (1998) Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces. *Biochim Biophys Acta* 1376, 339-52.

White, S. H., and Wimley, W. C. (1999) Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28, 319-65.

White, S. H., Wimley, W. C., Ladokhin, A. S., and Hristova, K. (1998) Protein folding in membranes: determining energetics of peptide-bilayer interactions. *Methods Enzymol* 295, 62-87.

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, 103-16.

Wiener, M., Freymann, D., Ghosh, P., and Stroud, R. M. (1997) Crystal structure of colicin Ia. *Nature* 385, 461-4.

Wiener, M. C., King, G. I., and White, S. H. (1991) Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. I. Scaling of neutron data and the distributions of double bonds and water. *Biophys J* 60, 568-76.

Wiener, M. C., and White, S. H. (1992) Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. II. Distribution and packing of terminal methyl groups. *Biophys J* 61, 428-33.

Wiener, M. C., and White, S. H. (1992) Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. III. Complete structure. *Biophys J* 61, 437-47.

Wimley, W. C., Hristova, K., Ladokhin, A. S., Silvestro, L., Axelsen, P. H., and White, S. H. (1998) Folding of beta-sheet membrane proteins: a hydrophobic hexapeptide model. *J Mol Biol* 277, 1091-110.

Wimley, W. C., and White, S. H. (1996) Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat Struct Biol* 3, 842-8.

Wimley, W. C., and White, S. H. (1993) Quantitation of electrostatic and hydrophobic membrane interactions by equilibrium dialysis and reverse-phase HPLC. *Anal Biochem* 213, 213-7.

Wittenberg, J. B., and Wittenberg, B. A. (2003) Myoglobin function reassessed. *J Exp Biol* 206, 2011-20.

Wu, L. C., and Kim, P. S. (1998) A specific hydrophobic core in the alpha-lactalbumin molten globule. *J Mol Biol* 280, 175-82.

Wu, L. C., Schulman, B. A., Peng, Z. Y., and Kim, P. S. (1996) Disulfide determinants of calcium-induced packing in alpha-lactalbumin. *Biochemistry* 35, 859-63.

Y

Yao, J., Chung, J., Eliezer, D., Wright, P. E., and Dyson, H. J. (2001) NMR structural and dynamic characterization of the acid-unfolded

state of apomyoglobin provides insights into the early events in protein folding. *Biochemistry* 40, 3561-71.

Yi, Q., and Baker, D. (1996) Direct evidence for a two-state protein unfolding transition from hydrogen-deuterium exchange, mass spectrometry, and NMR. *Protein Sci* 5, 1060-6.

Z

Zakharov, S. D., and Cramer, W. A. (2002) Colicin crystal structures: pathways and mechanisms for colicin insertion into membranes. *Biochim Biophys Acta* 1565, 333-46.

Zakharov, S. D., Lindeberg, M., and Cramer, W. A. (1999) Kinetic description of structural changes linked to membrane import of the colicin E1 channel protein. *Biochemistry* 38, 11325-32.

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, 4282-7.

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, 11254-63.

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, 4488-98.

Zimmerberg, J. (2000) Are the curves in all the right places? *Traffic* 1, 366-8.

Proteines Amphitropiques : Diversité Conformationnelle et Versatilité des Interactions Protéines-Lipides

Cas d'étude de l' α -lactalbumine et de l'apo-myoglobine

Résumé :

Certaines protéines, appelées protéines amphitropiques, sont solubles en milieux aqueux et capables de se lier aux membranes pour leurs activités biologiques. Ces protéines apparaissent comme d'excellents modèles pour la compréhension des principes généraux de stabilité et de repliement des protéines membranaires intrinsèques. L' α -lactalbumine et l'apo-myoglobine ont été choisies comme modèles de protéines amphitropiques. Nous proposons une étude exhaustive des facteurs qui influencent la liaison aux membranes de ces deux protéines telles que le pH, la présence de cofacteurs, la force ionique, la charge et la courbure des membranes. Une description macroscopique des mécanismes de liaison a été entreprise par des expériences de centrifugation et de fluorescence. Enfin, la structure et la stabilité des états liés aux membranes ont été sondées par des expériences d'échanges hydrogène/deutérium (H/D).

L'état conformationnel de l' α -lactalbumine liée aux membranes s'est révélé très dépendant de la courbure membranaire. Nous avons identifié deux hélices amphiphiles qui sont directement impliquées dans les interactions α -lactalbumine-lipides. D'autre part, nos expériences d'échanges H/D permettent une description thermodynamique de la liaison à la membrane. Dans le cas de l'apo-myoglobine, nos résultats suggèrent un mécanisme commun d'insertion membranaire pour les protéines qui possèdent une topologie de type globine. Par ailleurs, la liaison de l'apo-myoglobine aux membranes ne semble pas nécessaire pour la fonction biologique de cette protéine. Une description des structures membranaires de l'apo-myoglobine a été entreprise par des expériences d'échanges H/D suivies par spectrométrie de masse.

Mots-clefs :

α -lactalbumine, apo-myoglobine, protéines amphitropiques, vésicules lipidiques, interactions protéines-lipides, échanges H/D.

Abstract :

Besides transmembrane proteins, some soluble proteins, the so-called amphitropic proteins, are driven to interact with membranes at one stage of their biological activity. Such proteins are excellent models to provide insight into the interactions between proteins and membranes. α -lactalbumin and apomyoglobin was chosen as model of amphitropic proteins. The effect of the proton and cofactor together with those of the physicochemical properties of the lipid bilayer, such as the curvature and the charge of the membrane, are investigated. We performed centrifugation and fluorescence measurements to follow the binding of proteins to membranes. We also present H/D exchange experiments performed to characterise the state of the proteins when bound to vesicles and their sites of interaction with the membranes.

Our results show that the conformational state of α -lactalbumin depends of membrane curvature. The regions anchoring the protein to the membrane are restricted to amphiphilic helices. H/D exchange experiments monitored by NMR also yield residue-level data that constitute comprehensive information providing a new point of view on the thermodynamics of the interactions between the protein and the membrane. In the case of apomyoglobin, our results suggest some inherent properties of the globin fold propitious to the interactions with lipid bilayers. In addition, the binding of apomyoglobin to membranes does not seem necessary for its biological activity. A molecular description of the membrane-binding states has been undertaken using H/D exchange experiments monitored by mass spectrometry.

Key words :

α -lactalbumin, apomyoglobin, amphitropic proteins, liposomes, proteins-lipids interactions, H/D exchange.