



HAL
open science

Hélices amphipathiques et transport vésiculaire

Vincent Morello

► **To cite this version:**

Vincent Morello. Hélices amphipathiques et transport vésiculaire. Biochimie [q-bio.BM]. Université Nice Sophia Antipolis, 2009. Français. NNT: . tel-00496960

HAL Id: tel-00496960

<https://theses.hal.science/tel-00496960>

Submitted on 2 Jul 2010

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

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

UNIVERSITE DE NICE SOPHIA ANTIPOLIS - UFR Sciences
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

pour obtenir le titre de

Docteur en Sciences

de l'Université de Nice-Sophia Antipolis

Discipline : Biochimie

présentée par

Vincent MORELLO

Hélices amphipathiques et transport vésiculaire

Thèse dirigée par le Dr. Bruno ANTONNY

à l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire

soutenue le 12 octobre 2009

devant le Jury suivant :

Pr. Laurent COUNILLON	<i>Président</i>
Pr. Catherine ETCHEBEST	<i>Rapporteur</i>
Dr. Arnaud ECHARD	<i>Rapporteur</i>
Dr. Cathy JACKSON	<i>Examineur</i>
Dr. Michel FRANCO	<i>Examineur</i>
Dr. Bruno ANTONNY	<i>Directeur de thèse</i>

Remerciements

Je souhaite remercier vivement Laurent Counillon d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse ainsi que Catherine Etchebest et Arnaud Echard d'avoir accepté d'en être les rapporteurs. Je tiens également à remercier mes deux examinateurs Cathy Jackson et Michel Franco.

J'exprime toute ma gratitude à mon directeur de thèse Bruno Antony pour ces quatre années passées dans son laboratoire. J'ai beaucoup appris à ses côtés tant sur le plan scientifique que méthodologique. Je suis également très reconnaissant qu'il ait permis de préparer mon avenir dans les meilleures conditions.

Je remercie vivement toute l'équipe, si dynamique et sympathique, pour leurs conseils avisés et leur sollicitude. Je salue amicalement Joëlle Bigay, Hélène Barelli, Danièle Stalder, Jean-François Casella, Guillaume Drin et Romain Gautier. J'ai également une pensée amicale pour mon ancien camarade thésard Bruno Mesmin.

Je salue la chaleureuse équipe voisine de Michel Franco et Frédéric Luton avec Julie Milanini, Maria Partisani, et Eric Macia.

Je remercie le personnel des services communs qui nous facilite la vie.

Je salue toutes les personnes de l'Institut que j'ai rencontrées au fil de ces années.

Je remercie le Ministère de la Recherche d'avoir financé ma thèse.

Enfin, je ne saurais remercier assez mes parents pour leur soutien constant au cours de cette thèse et, plus généralement, de mes études. Je leur dois tant et suis immensément reconnaissant de tout ce qu'ils ont fait pour moi. Je salue affectueusement mes sœurs, ma famille et mes amis.

Dans le cadre de mon monitorat, je remercie vivement Laurent Counillon et Eric Macia pour la confiance qu'ils m'ont témoignée. Grâce à eux, j'ai eu la chance d'enseigner la biochimie en travaux dirigés et en cours à la fois en licence, en master et à l'EPU.

En conclusion, c'est avec une certaine émotion que je quitte le laboratoire. Une page se tourne mais ces quatre années sont définitivement dans ma mémoire. Je n'ai aucun regret, bien au contraire. Je me permets de vous souhaiter à chacun d'entre vous une excellente continuation.

SOMMAIRE

<u>I Bref historique sur les manteaux protéiques</u>	5
<u>II Les premières hélices amphipathiques associées aux manteaux protéiques</u>	10
<u>III Généralités sur les interactions entre hélices amphipathiques et membranes</u>	13
A) Introduction.....	13
B) Rappel sur les membranes lipidiques.....	14
C) Interactions spécifiques entre protéines et lipides.....	16
D) Electrostatique des membranes.....	18
E) Géométrie des lipides et adsorption des hélices amphipathiques.....	20
<u>IV Les hélices amphipathiques dans le système COPI et la découverte du motif ALPS</u>	23
A) La petite protéine G Arf1.....	23
B) Bascule de l'hélice N-terminale d'Arf1 lors de l'échange GDP/GTP catalysé par des facteurs d'échange.....	26
C) ArfGAP1 et la découverte d'une hélice sensible à la courbure membranaire.....	27
1) <i>Hypersensibilité de la protéine ArfGAP1 à la courbure membranaire</i>	28
2) <i>ArfGAP1 est capable de reconnaître la courbure des membranes lipidiques</i>	29
3) <i>Mécanisme de reconnaissance de la courbure membranaire par le motif ALPS</i>	31
D) La bioinformatique, un tournant déterminant.....	34
<u>V La corde moléculaire GMAP-210 : un jeu à plusieurs hélices amphipathiques</u>	37
A) Introduction.....	37
1) <i>Historique de GMAP-210</i>	38
2) <i>Un motif ALPS à l'extrémité N-terminale de GMAP-210</i>	40
B) Matériel et méthodes.....	43
1) <i>Lipides et liposomes</i>	
2) <i>Purification des protéines et marquage</i>	
3) <i>Dichroïsme circulaire</i>	
4) <i>Flottaison</i>	
5) <i>Fluorescence NBD et FRET entre rhodamine et NBD</i>	
6) <i>Diffusion statique</i>	
C) Résultats.....	49

1) <i>L'extrémité C-terminale de GMAP-210 interagit directement avec Arf1GTP</i>	49
2) <i>Rôle de la courbure membranaire sur la stabilité de l'interaction entre GMAP-210 et Arf1GTP</i>	55
3) <i>Démonstration des capacités de connexion hétérotypique de GMAP-210</i>	58
4) <i>Questions sur le modèle</i>	59

VI Interactions GMAP-210 / membranes : durées de vie et compatibilité avec le manteau COPI.....66

1) <i>Compatibilité entre les extrémités N- et C-terminales de GMAP-210 avec le coatomer</i>	67
2) <i>Durée de vie des interactions des deux extrémités de la corde avec leurs membranes</i>	70
3) <i>Nouvelles questions sur GMAP-210</i>	80

VII Comparaison du motif ALPS et de l' α -synucléine pour la reconnaissance de la courbure membranaire.....83

A) Introduction	83
1) <i>α-synucléine et pathologie</i>	83
2) <i>Interaction α-synucléine – membrane lipidique</i>	84
3) <i>α-synucléine exprimée dans un microorganisme</i>	88
4) <i>Pourquoi comparer GMAP-210 et α-synucléine ?</i>	89
B) Résultats	91
1) <i>Titration de l'α-synucléine et de GMAP-210 sur liposomes</i>	91
2) <i>Le motif ALPS de GMAP-210 et l'α-synucléine sont sensibles à la courbure membranaire</i>	92
3) <i>Effet de la charge</i>	93
4) <i>Effet de la géométrie des lipides</i>	94
5) <i>Phospholipides polyinsaturés et cholestérol</i>	96
C) Questions sur les hélices amphipathiques	99

VIII Conclusion.....102

Liste des abréviations	104
Liste des figures	105
Références bibliographiques	109
Annexes	115

I Bref historique des manteaux protéiques

La cellule est une structure hautement compartimentée. La membrane plasmique délimite le cytoplasme au sein duquel se trouvent plusieurs organelles, telles que le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, définies également par des membranes lipidiques.

L'appareil de Golgi, riche réseau membranaire, a été identifié à la fin du XIX^{ème} siècle par histologie par Camillo Golgi. Au milieu du XX^{ème} siècle, l'avènement de la microscopie électronique a permis l'étude fine des systèmes endomembranaires. Très tôt, l'existence d'un tel réseau soulève la question de la biogenèse, du maintien et de la communication des structures membranaires.

George Palade publie en 1964 la première description de la voie sécrétoire (Caro and Palade, 1964). Par microscopie électronique, il suit le devenir des protéines. Les protéines en cours de synthèse sont transloquées dans le réticulum endoplasmique, puis transportées vers l'appareil de Golgi afin d'y subir des modifications post-traductionnelles avant de rejoindre leurs destinations finales. Quelques années plus tard, grâce à James Rothman et Lelio Orci, la reconstitution *in vitro* du transport des protéines au sein de l'appareil de Golgi révèle la présence de vésicules de transport (Orci et al., 1986). L'appareil de Golgi purifié, incubé avec du cytosol et une source d'énergie (de l'ATP), génère des vésicules de 70 nanomètres de diamètre (cf. figure 1). En suivant une protéine (du virus VSV) contenue initialement dans les saccules golgiens, les auteurs mettent en évidence qu'elles sont l'intermédiaire de transport entre les différents saccules golgiens.

La microscopie électronique montre que les vésicules, produites par bourgeonnement des membranes golgiennes, sont recouvertes d'un manteau qui diffère manifestement du manteau à clathrine connu depuis les années soixante (Roth and Porter, 1964). La découverte de ce nouveau manteau appelé COPI est une étape-clé dans l'étude du trafic intracellulaire. Des inhibiteurs sont rapidement mis en évidence, en particulier le GTP γ S. Dans le système reconstitué, le GTP γ S fige définitivement le manteau sur les vésicules et provoque donc leur accumulation. Même si ce mécanisme d'inhibition était à l'époque incompris, cette réaction avait l'avantage de permettre de purifier les vésicules. L'étude biochimique de ces vésicules révèle ensuite l'existence de huit protéines. Sept protéines appelées COP (coat protein) sont associées en un large complexe, le coatomer, formant la brique élémentaire du manteau (Serafini et al., 1991b). A ce complexe, est associée la petite protéine G Arf1. Elle est enrichie

dans les vésicules COPI par rapport aux membranes golgiennes et, est retrouvée en quantité stœchiométrique avec les composants du manteau. Or, Arf1 était connue pour osciller entre un état GDP cytosolique, et un état GTP lié aux membranes. C'est pourquoi Rothman (Serafini et al., 1991a) ainsi que Klausner (Donaldson et al., 1992) proposent indépendamment que la protéine Arf1 sous forme GTP est le « récepteur » du manteau qui recrute les protéines COPI sur les membranes. Le GTP γ S bloquant la protéine G sous forme active et attachée aux membranes, ceci expliquerait l'inhibition de la dissociation du manteau. La conclusion essentielle de ces études est que la protéine Arf1 par son cycle GDP/GTP contrôle le cycle d'assemblage et de désassemblage du manteau COPI.

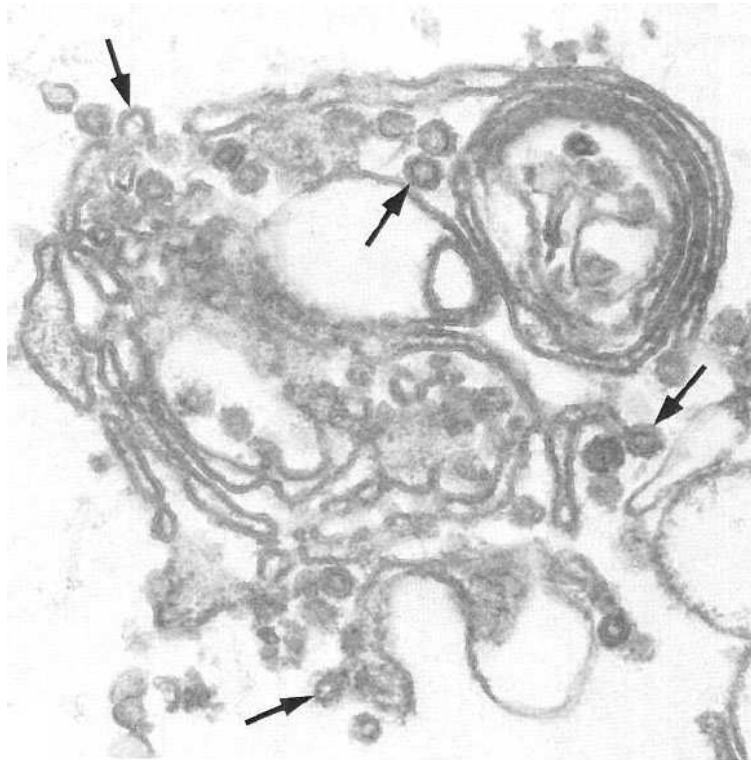


Figure 1 : Photographie de microscopie électronique (Orci et al., 1986) montrant des vésicules de 70 nm formées à partir de fractions golgiennes incubées en présence d'ATP.

En parallèle aux études *in vitro*, le rôle du coatomer dans le transport membranaire au niveau de l'appareil de Golgi est établi *in vivo* par Schekman par des études de génétique dans la levure. Ainsi, parmi les gènes essentiels à la fonction sécrétoire *in vivo*, on retrouve dans la levure Sec21, l'homologue d'une sous unité essentielle du coatomer de mammifère (Hosobuchi et al., 1992). Pour l'anecdote, le premier mutant Sec1 (protéine de liaison à une SNARE) avait été identifié en 1979. En 2004, en hommage à George Palade, Schekman et

Novick publie dans *Cell* « 23 genes, 23 years later » où ils reviennent sur la liste des mutants de sécrétion identifiés alors (Schekman and Novick, 2004).

Initialement décrit pour assurer le transport antérograde des protéines de la face cis à la face trans de l'appareil de Golgi, la fonction du manteau COPI a été depuis réévaluée (Lippincott-Schwartz et al., 1989). Il semble ainsi que le manteau COPI est également impliqué dans le transport rétrograde des enzymes golgiennes et permet également un transport de l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique. Il sera montré ensuite que ce manteau est capable de reconnaître des protéines transmembranaires exposant dans leurs extrémités cytosoliques un motif consensus centré sur deux lysines. Ce motif contribue en retour à la stabilité du manteau sur les membranes (Cosson and Letourneur, 1994).

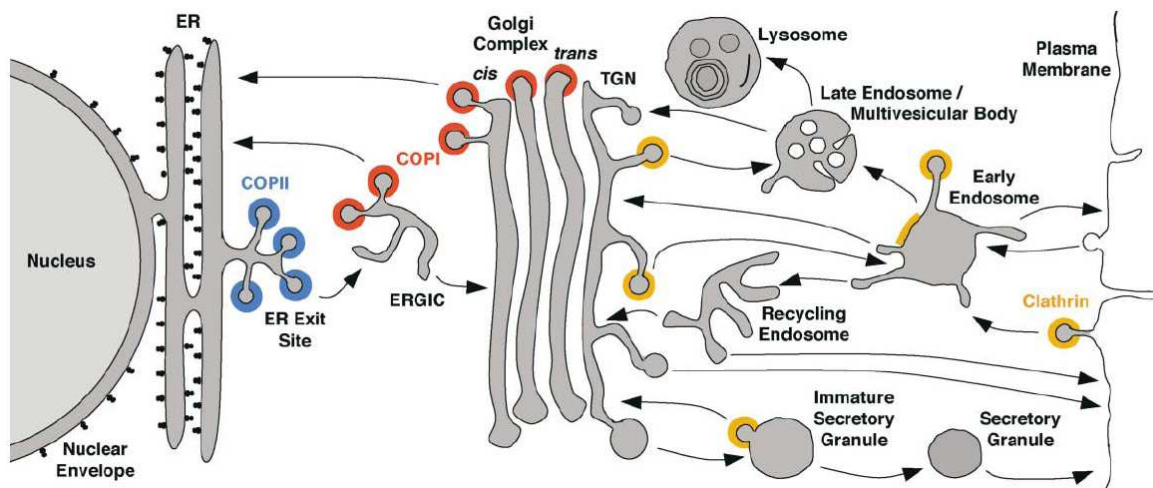


Figure 2 : Illustration du trafic vésiculaire de type COPI, COPII et clathrine (Bonifacino and Glick, 2004)

Il existe d'autres manteaux capables de générer des vésicules : les manteaux COPII et les manteaux à clathrine. Les manteaux COPII interviennent au niveau du réticulum endoplasmique et permettent le transport vésiculaire antérograde entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Les manteaux à clathrine ont une distribution plus large comprenant le réseau trans-golgien, les endosomes et la membrane plasmique (cf. figure 2).

La formation des vésicules COPII est initiée par l'activation de la petite protéine G Sar1. Comme Arf1, Sar1 se lie aux membranes en présence de GTP. Sar1GTP recrute alors l'hétérodimère Sec23/24 qui lui-même recrute le complexe Sec13/31 (cf. figure 3). L'ensemble forme un manteau, c'est-à-dire un assemblage régulier provoquant le bourgeonnement d'une petite vésicule.

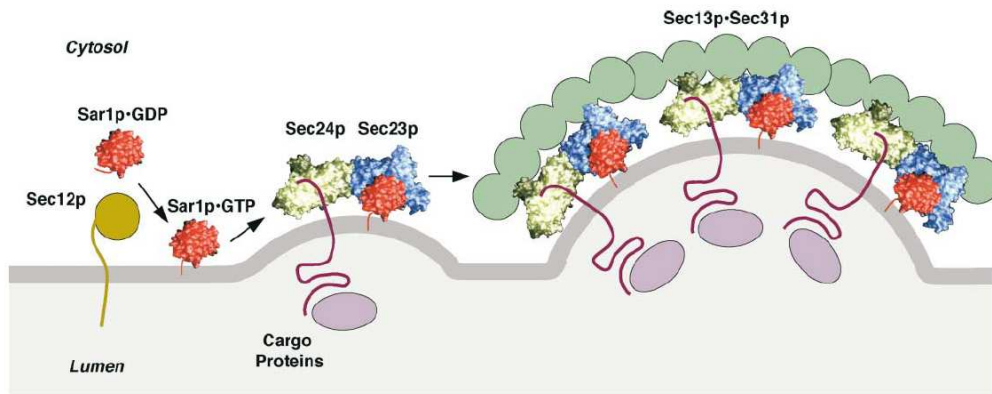


Figure 3: Illustration du recrutement du manteau COPII à la surface membranaire (Bonifacino and Glick, 2004)

A la différence de celle du manteau COPI, la structure des manteaux COPII et des manteaux à clathrine est résolue à ce jour (cf figure 4). La cristallographie et la microscopie électronique révèlent que la structure du manteau COPII repose sur un cuboctaèdre, une forme géométrique avec 8 triangles et 6 carrés (Stagg et al., 2006). Cette géométrie permet d'expliquer la formation de vésicules de 60 nanomètres de diamètres telles que celles observées en microscopie électronique. D'autres études structurales suggèrent une certaine plasticité de l'architecture du manteau pouvant générer des vésicules de plus grand diamètre transportant par exemple les fibres de collagène. Quant aux manteaux à clathrine connus depuis longtemps (Vigers et al., 1986), ils reposent sur une géométrie d'hexagones et de pentagones dont l'unité de base est un triskèle. Leur assemblage fait intervenir de larges complexes appelés adaptateurs et éventuellement des petites protéines G.

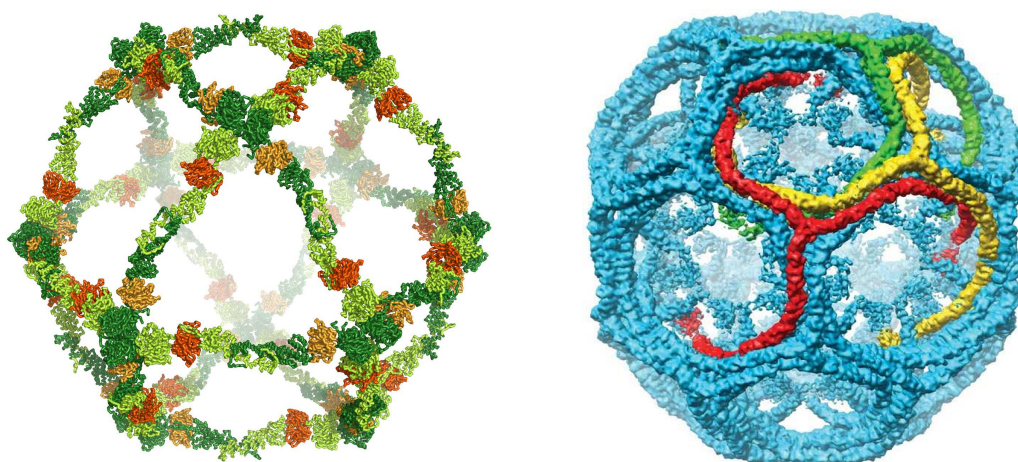


Figure 4: Cage COPII (gauche) (Fath et al., 2007) et cage de clathrine (droite) dont un triskèle (Fotin et al., 2004)

Pendant des années, la formation des vésicules de transport a été présentée comme étant le résultat de la polymérisation de complexes protéiques (coatomer, clathrine, COPII) à la surface d'une membrane. Autrement dit, les manteaux sont comme des moules mécaniques qui imposent, par leur structure sphérique intrinsèque, une forte courbure à la membrane. Ce schéma a perduré jusqu'à la découverte du rôle d'hélices amphipathiques dans la genèse et le contrôle de la courbure membranaire. Ainsi, à la fin des années 1990, McMahon, de Camilli et Antony révèlent indépendamment sur des protéines différentes que des hélices amphipathiques contribuent à la liaison des manteaux et éventuellement à la déformation des membranes. Depuis, la liste des hélices amphipathiques intervenant dans la courbure membranaire s'est étoffée. Dans le paragraphe suivant, je vais détailler les premières études sur de telles hélices amphipathiques.

II Les premières hélices amphipathiques associées aux manteaux protéiques

L'epsine est une protéine impliquée dans l'endocytose à clathrine. Les différentes isoformes de l'epsine présentent un domaine commun appelé ENTH « Epsin NH2-terminal homology », conservé chez les mammifères et dans la levure. Ce domaine reconnaît spécifiquement le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂). Comme le révèlent des expériences de cosédimentation avec des liposomes de composition définie, la liaison de la protéine est spécifique du PIP₂. La structure cristallographique en présence d'IP₃, l'analogue soluble du PIP₂, a permis d'élucider le mécanisme (Ford et al., 2002). Le domaine ENTH est constitué d'un domaine structuré en hélice alpha juxtaposé d'une séquence de 15 acides aminés intrinsèquement non-structurés. L'IP₃ induit précisément la structuration en hélice alpha de ce motif (dite H0), hélice qui vient compléter la poche de reconnaissance de la tête polaire du phosphoinositide (cf. figure 5).

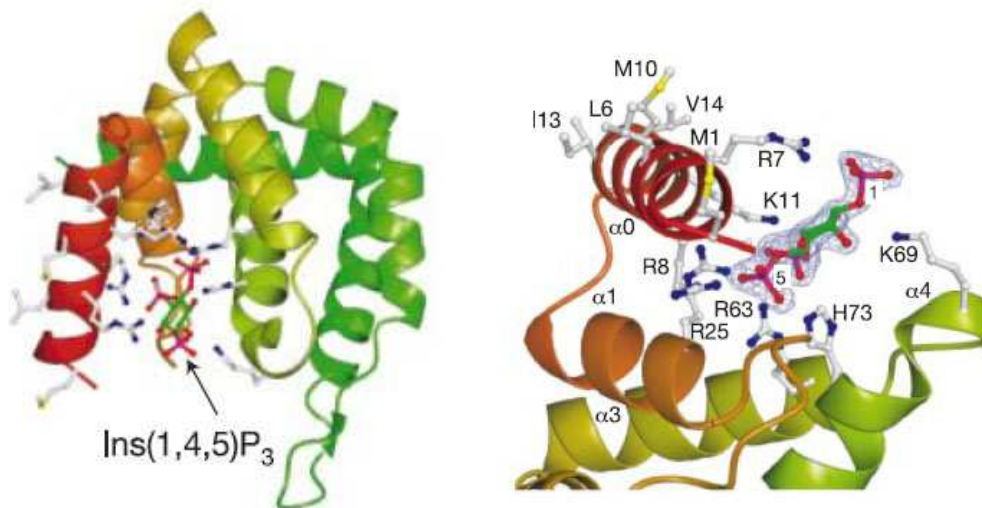


Figure 5 : Structure du domaine ENTH. Mise en évidence de l'hélice H0 en rouge. Du fait de l'exposition des acides aminés hydrophobes de l'hélice H0, le plan de la membrane est vraisemblablement au dessus de la vue montrée à droite. (Ford et al., 2002)

En microscopie électronique, la surprise a été de voir que l'interaction du domaine ENTH sur les liposomes PIP₂ induit leur déformation en tubes de 19 nanomètres de diamètre (cf. figure 6). Autrement dit, non seulement la protéine lie le PIP₂ sur la membrane mais cette liaison contribue également à déformer la membrane. Plusieurs résidus basiques de cette hélice, dite H0, sont déterminants dans la reconnaissance du PIP₂ (cf. figure 5). Sur l'autre face de l'hélice, se trouvent trois résidus hydrophobes dont la mutation entraîne la perte de

tubulation des liposomes. Il semble donc que l'hélice amphipathique, en se structurant à la surface de la membrane et en utilisant des résidus hydrophobes, courbe la membrane. Le mécanisme de déformation proposé est dit mécanisme bilame. Les acides aminés hydrophobes s'inséreraient dans le feuillet exposé de la membrane, ce qui accroîtrait sa surface au détriment du feuillet opposé. Par conséquent, pour concilier cet écart de surface, la membrane se courbe. Dans ces expériences *in vitro*, l'epsine se retrouve à forte densité à la surface des liposomes. L'insertion de chaque hélice crée une courbure positive, l'effet de l'ensemble de ces hélices conduit à transformer un liposome en tube. Dans le processus d'endocytose, c'est bien entendu la clathrine par sa structure en cage qui est responsable de la formation de la vésicule mais l'étude réalisée par l'équipe de McMahon montre que l'epsine par son hélice amphipathique est capable d'induire la courbure de la membrane et donc de contribuer à l'invagination de la membrane.

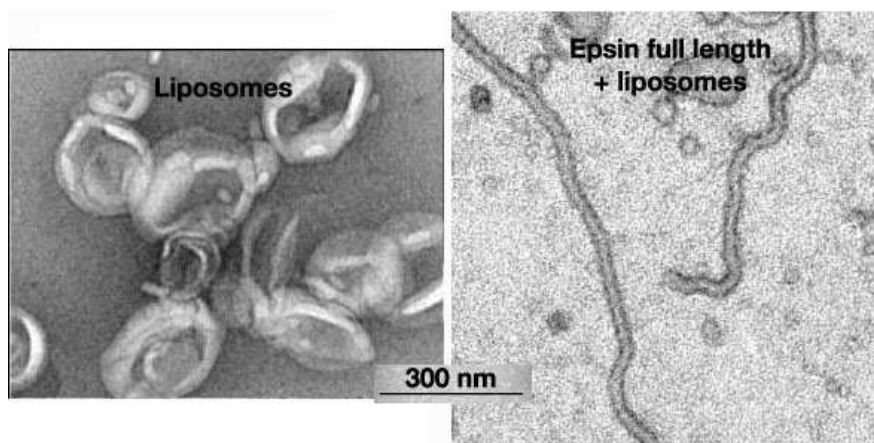


Figure 6 : Microscopie électronique de liposomes seuls ou incubés avec l'epsine (Ford et al., 2002)

L'endophiline contribue également à l'endocytose à clathrine, particulièrement pour la formation des vésicules synaptiques. Des études *in vitro* menées par l'équipe de Pietro de Camilli montrent que l'incubation de liposomes en présence d'endophiline les transforme en tubes (Farsad et al., 2001). Le motif de liaison aux membranes lipidiques, non structuré en solution, est une hélice amphipathique dont la face polaire a une charge globale fortement positive (cf. figure 7). Ce motif contribue, telle l'hélice H0 de l'epsine, à induire la courbure par pénétration de résidus hydrophobes dans un feuillet de la membrane. En effet, la mutation d'un résidu hydrophobe en résidu acide bloque la liaison de la protéine, et par conséquent la déformation des liposomes. Une hélice similaire à celle de l'endophiline est également

présente dans l'amphiphysine, une autre protéine neuronale (cf. figure 7). Située à l'extrémité N-terminale de la protéine, elle contribue à créer de la courbure positive, laquelle va être épousée par le domaine BAR, domaine en forme de banane, situé en aval de l'hélice.

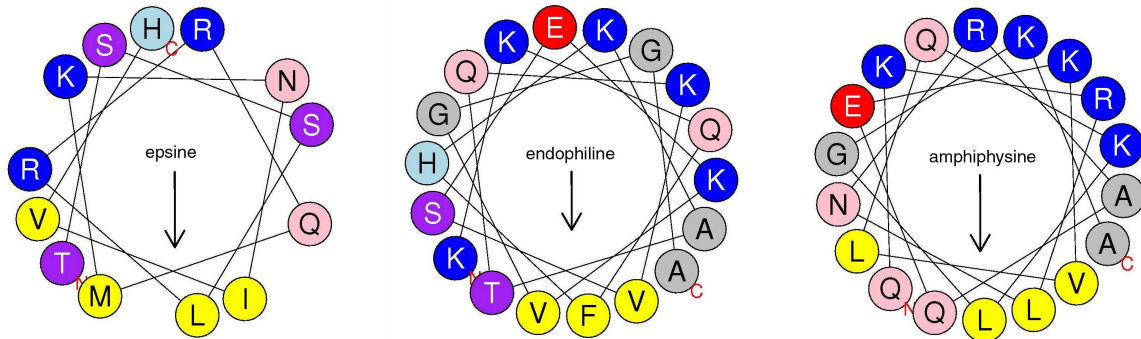


Figure 7: Hélices de l'epsine, de l'endophiline et de l'amphiphysine (le vecteur représente le moment hydrophobe de l'hélice).

En conclusion, l'histoire des manteaux protéiques s'est longtemps faite sans soupçonner l'implication des hélices amphipathiques. A présent, de telles hélices s'avèrent être des acteurs essentiels à l'attachement des manteaux aux membranes et à l'induction de la courbure. Dans le cas du manteau COPI, le mécanisme d'interaction d'Arf1 avec les membranes repose également sur une hélice amphipathique; j'y reviendrai. Mes travaux de thèse ont contribué à étendre l'implication des hélices amphipathiques dans le trafic vésiculaire. A présent, il est donc nécessaire de décrire le mode général d'interaction d'une hélice amphipathique avec une membrane lipidique modèle.

III Généralités sur les interactions entre hélices amphipathiques et membranes

A) Introduction

Les hélices amphipathiques s'adsorbant sur les membranes ont été étudiées depuis bien longtemps et ceci en dehors du contexte des manteaux protéiques et de la courbure membranaire. La biochimie structurale de ces hélices requiert une approche particulière. En effet, beaucoup d'hélices amphipathiques sont non structurées en solution et l'interface avec les membranes lipidiques rend impossible toute étude cristallographique. La structure en hélice alpha est particulièrement adaptée à la complexité de la bicouche lipidique. Chacune des faces de l'hélice se situe dans un environnement très différent. La face hydrophobe rencontre les différentes chaînes grasses des phospholipides alors que la face polaire est dans une interface complexe d'environ 15 angströms composée de groupements chimiques très divers et de molécules d'eau (cf. figure 8).

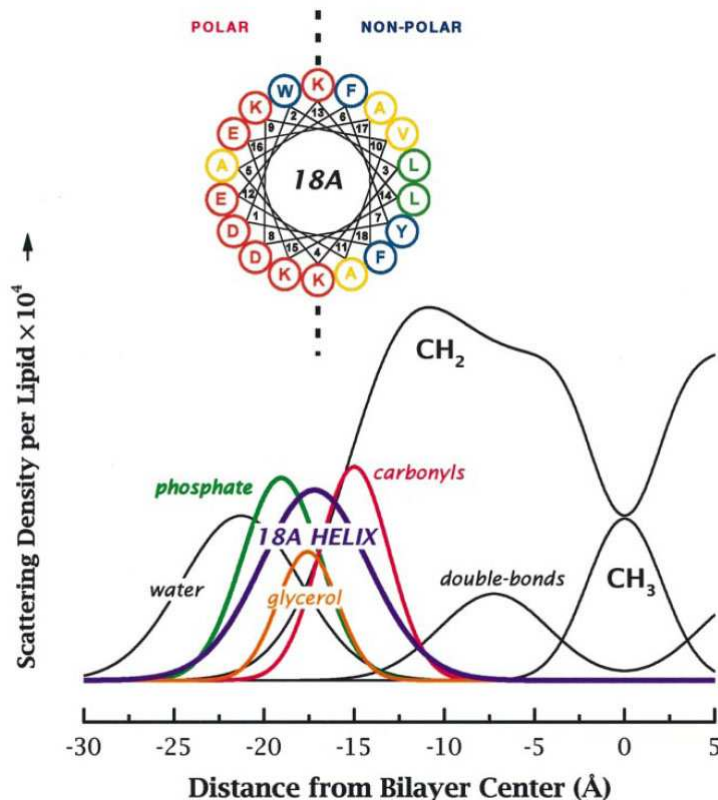


Figure 8 : Position d'une hélice modèle (segment d'une apolipoprotéine) dans une bicouche lipidique (dioléylphosphatidylcholine) par des méthodes de diffraction aux rayons X. (Hristova et al., 1999)

Dans ce paragraphe, je veux souligner ce qui distingue d'une façon générale les hélices amphipathiques des autres systèmes de liaison protéines/membranes. En particulier, à la différence de domaines protéiques reconnaissant la tête polaire de lipides tels que le PIP₂, les hélices amphipathiques pénètrent plus profondément dans la bicouche. Ceci exige donc une description précise des membranes lipidiques.

B) Rappel sur les membranes lipidiques

Toutes les membranes cellulaires sont des bicouches composées principalement de glycérophospholipides. De par leur nature amphiphile, les phospholipides s'agencent dans l'eau en bicouche, les deux chaînes carbonées de chaque phospholipide orientées vers l'intérieur de la membrane, les têtes polaires vers l'extérieur. Les glycérophospholipides cohabitent avec d'autres familles de lipides, en particulier des sphingolipides et des stérols, présentes en quantité variable selon le type cellulaire et l'organelle considérée. La membrane est une structure fluide (phase cristalline liquide) et dynamique, la vitesse de diffusion latérale d'un phospholipide est d'environ $1\mu\text{m}^2/\text{sec}$. Visible en microscopie électronique, l'épaisseur d'une membrane est d'environ 5 nanomètres.

Comme la nomenclature l'indique, les glycérophospholipides sont des molécules de glycérol estérifiées par deux acides carboxyliques aliphatiques en position 1 et 2, et phosphorylées en position 3. Notons que c'est approximativement au niveau de ce glycérol que se situe l'axe d'une hélice amphipathique. La diversité des lipides repose d'une part sur la nature des chaînes carbonées (leurs longueurs et leurs insaturations) et d'autre part sur la chimie de la tête polaire. Les acides gras estérifiés sont très divers; l'acide gras en position 1 est généralement saturé (C16:0 ou C18:0) alors que l'acide gras en position 2 est extrêmement variable (de 14 à 22 carbones et de 0 à 6 insaturations). Le plus complexe est l'acide gras docosahexanoïque (C22:6), également appelé ω 3.

Parmi les différents phospholipides, le phospholipide le plus simple est l'acide phosphatique portant seulement un phosphate. La diversité des phospholipides provient des groupements chimiques greffés sur le phosphate (la choline, la sérine, l'inositol, l'éthanolamine et le glycérol) qui confèrent des propriétés différentes aux phospholipides. La phosphatidylsérine (PS), le phosphatidylglycérol (PG), l'acide phosphatidique (PA) et les

phosphoinositides (PI) ont une charge globale négative tandis que la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE) sont neutres (cf. figure 9).

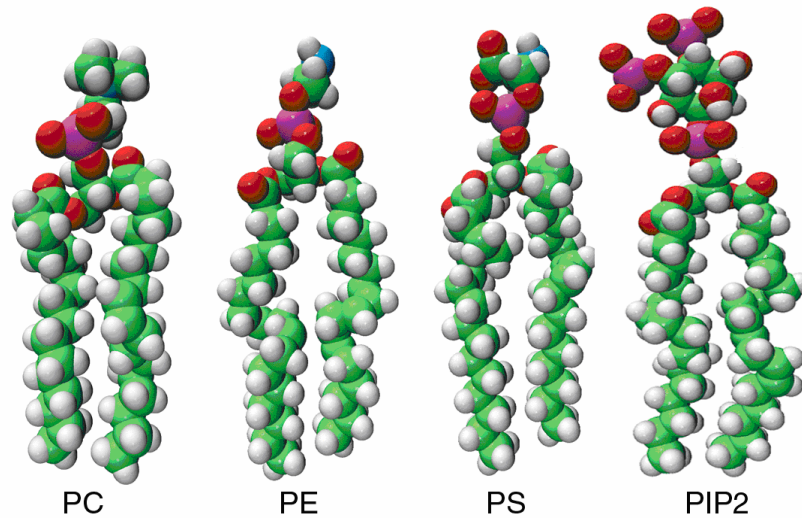


Figure 9 : Représentation de différents phospholipides : phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylsérine (PS) et phosphatidylinositol 4,5-bis phosphate (PIP₂)

La phosphatidylcholine est présente en quantité importante dans toutes les membranes (40-50 mol %). La répartition de la phosphatidyléthanolamine est assez homogène également. En revanche, la phosphatidylsérine est concentrée au niveau de la membrane plasmique et maintenue de façon asymétrique sur le feuillet interne. La sphingomyéline, lipide basé non pas sur un glycérol mais sur la sphingosine, et dont la structure est relativement proche de la phosphatidylcholine est enrichie dans les membranes plasmiques. A la différence des phospholipides synthétisés au niveau du réticulum endoplasmique, la sphingomyéline est synthétisée au niveau de l'appareil de Golgi. Quant au cholestérol, synthétisé au niveau du réticulum endoplasmique, c'est l'un des lipides dont l'abondance dans les organelles varie le plus : il est abondant dans la membrane plasmique et présent en quantité moindre dans les compartiments de la voie sécrétoire précoce.

D'une façon générale, la cartographie des membranes cellulaires, qui reste encore à affiner, révèle des différences significatives dans la composition en lipides des organelles (van Meer et al., 2008) (cf. figure 10). Les membranes comme celles de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique sont peu chargées négativement, pauvres en cholestérol (rapport molaire cholestérol/phospholipides = 0.2) et symétriques tandis que la membrane plasmique et les endosomes ont une charge négative beaucoup plus importante, un niveau de cholestérol

plus élevé (rapport molaire cholestérol/phospholipides = 1) et sont asymétriques. L'identité lipidique des membranes évolue donc au cours de la voie sécrétoire.

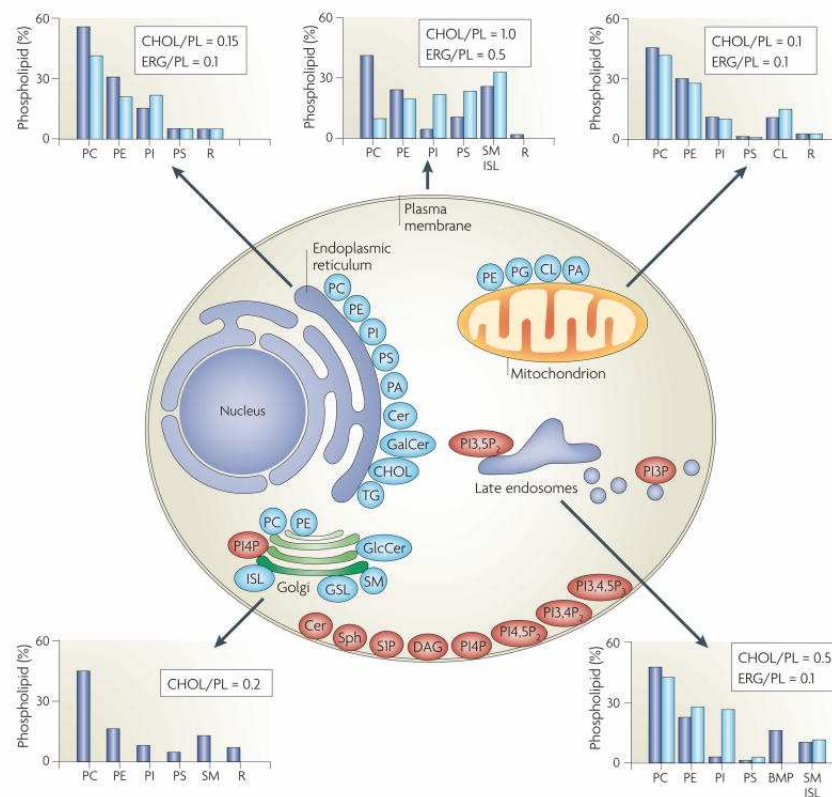


Figure 10: Cartographie des lipides membranaires : quantification et distribution chez les mammifères et dans la levure (respectivement bleu foncé, bleu clair) (van Meer et al., 2008)

En terme d'identité membranaire, les phosphoinositides, bien que peu abondants, jouent un rôle majeur. Le niveau et la position des phosphorylations donnent une grande variété de phosphoinositides, chaque type se trouvant sur un compartiment membranaire défini (Di Paolo and De Camilli, 2006). Par exemple, le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate est localisé à la membrane plasmique, alors que le phosphatidylinositol 4-phosphate est localisé au niveau de l'appareil de Golgi. De multiples phosphatases et kinases spécifiques permettent d'interconvertir les différentes espèces de phosphoinositides.

C) Interactions spécifiques entre protéines et lipides

Les phosphoinositides, de part leurs diversités (phosphorylations de l'inositol) et leurs localisations très strictes, sont les lipides de choix pour la reconnaissance spécifique par des

domaines protéiques. Par exemple, le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate est reconnu par des protéines possédant un domaine PH, les ciblant ainsi à la membrane plasmique. Les protéines à domaine FYVE reconnaissent le phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) présent à la surface des endosomes. La structure du domaine FYVE a été co-cristallisée avec l'analogue soluble du PI3P, l'inositol 1,3-bisphosphate (l'IP₂) (Dumas et al., 2001). La spécificité d'interaction pour ce phosphoinositide repose sur un résidu acide (D1352) faisant face aux groupements hydroxyles non phosphorylés de l'inositol de l'IP₂ (cf. figure 11). D'une façon générale, de par la grosseur de l'inositol et de la forte exposition des groupements phosphates, les domaines protéiques spécifiques associés restent au dessus de la membrane. Leur interaction ressemble à celle d'un ligand sur un récepteur et peut être décrite par un simple équilibre binaire.

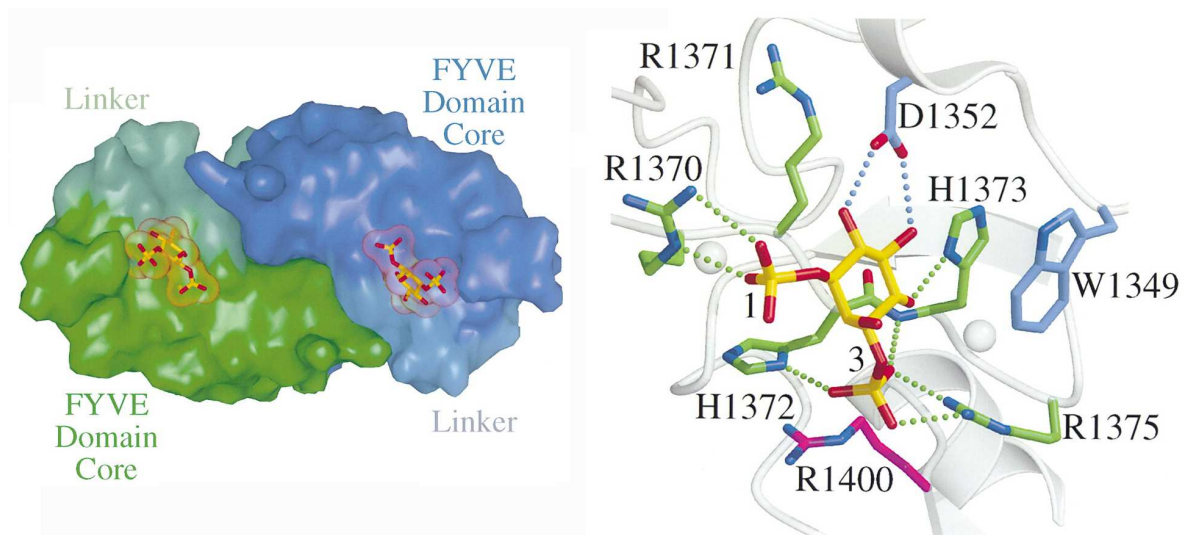


Figure 11 : Structure du domaine FYVE. Vue de la poche de stéréospécificité du PI3P (Dumas et al., 2001)

Les hélices amphipathiques en s'enfonçant plus profondément dans les membranes sont peu concernées par des interactions spécifiques avec la tête polaire des lipides. L'exception notable est l'epsine, mais nous avons vu plus haut qu'il s'agit d'une interaction complexe combinant l'enfoncement d'une hélice sous la tête polaire du PI_{4,5}P₂ et l'interaction spécifique d'une autre partie de la protéine avec cette même tête polaire. Plus important donc que la composition exacte d'une membrane, deux paramètres semblent déterminants pour l'adsorption des hélices amphipathiques : la charge des membranes et l'agencement des lipides.

D) Electrostatique des membranes

La charge est un discriminant important des différents types de membranes cellulaires. En utilisant des sondes basiques portant différentes charges globales positives, l'équipe de Sergio Grinstein a mis en évidence un gradient très net de phospholipides chargés négativement depuis la membrane plasmique jusqu'aux autres membranes des organelles (cf. figure 12). Le noyau, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les mitochondries ne sont pas marqués par les sondes basiques suggérant que ces organelles sont pauvres en lipides chargés négativement. A l'inverse, la membrane plasmique et dans une moindre mesure, les endosomes, sont facilement marqués par les sondes positives (Yeung et al., 2006).

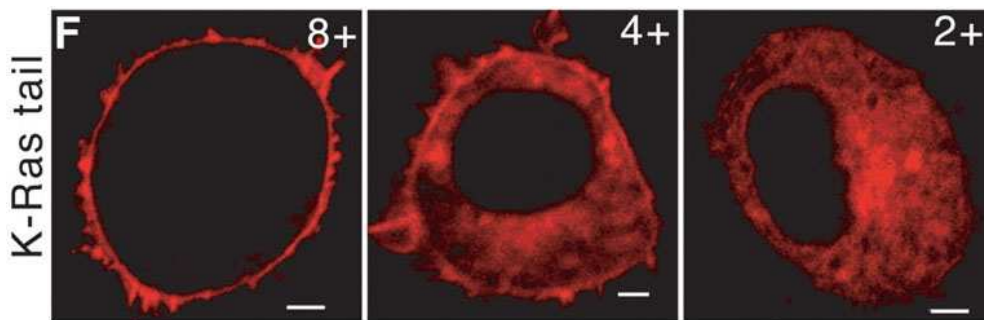


Figure 12: Macrophages transfectés par des sondes basiques présentant 2, 4, ou 8 résidus basiques. (barre 2 μ m) (Yeung et al., 2006)

La phosphatidylsérine et le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate sont deux marqueurs de la membrane plasmique et contribuent à la charge extrêmement négative de cette membrane. Une conséquence importante de ces différences de charges entre organelles est que l'électrostatique doit elle-même être ajustée lors de la maturation des différents compartiments. Un bon exemple de cette maturation membranaire est donnée par la phagocytose au cours de laquelle de grandes quantités membranaires sont internalisées afin d'englober les particules à dégrader. Les membranes entourant le phagosome perdent leur identité membranaire initiale. Ainsi, on observe une diminution drastique du niveau de PIP₂ et une baisse de la concentration en phosphatidylsérine (Yeung et al., 2008). Ce changement du potentiel de surface permet d'expliquer, par exemple, la redistribution de protéines périmembranaires tels K-Ras ou Rac1 dont les queues C-terminales sont des chaînes polaires particulièrement basiques (respectivement 8 et 6 résidus basiques). La chute de la quantité de phospholipides anioniques engendre la dissociation de ces protéines de la membrane. Ces

études montrent donc très clairement la corrélation entre la localisation de protéines périmembranaires et le potentiel de surface.

Positionnées sous les têtes polaires des phospholipides, les hélices amphipathiques sont idéalement placées pour interagir avec les charges négatives des lipides anioniques tels que la phosphatidylsérine. Ceci a été très bien démontré dans le cas des peptides antimicrobiens, les molécules canoniques des biochimistes des hélices amphipathiques. Les études de dichroïsme circulaire montrent qu'au contact de membranes, ces peptides se structurent en hélice alpha afin d'interagir avec les lipides. Les interactions sont de deux types, d'une part, les résidus basiques interagissent électrostatiquement avec les charges négatives des têtes polaires des phospholipides, d'autre part les acides aminés hydrophobes pénètrent entre les chaînes grasses des phospholipides. Cette synergie d'interaction est déterminante pour la partition du peptide dans la bicouche c'est-à-dire la rencontre entre des molécules amphipathiques. Il existe plusieurs dizaines de peptides de ce type (cf. deux exemples dans la figure 13).

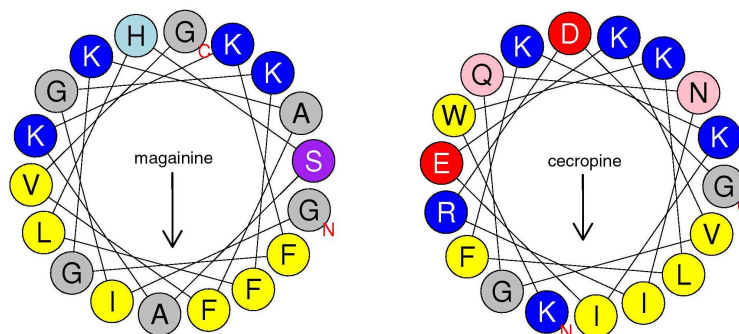


Figure 13: Représentation de deux hélices amphipathiques de deux peptides antimicrobiens (magainine, cecropine). Notons l'abondance de résidus chargés dans ces hélices amphipathiques.

L'action antimicrobienne est due à la déstabilisation des membranes des bactéries. Sécrétés à des concentrations élevées, les peptides s'adsorbent sur la membrane et, lorsque le rapport protéine/lipide est suffisamment élevé, ils perméabilisent la membrane. Les hélices amphipathiques initialement situées à la surface membranaire forment alors un pore dans la bicouche. L'activité antimicrobienne de ces peptides présente un intérêt thérapeutique manifeste. Sur la base de ces peptides (la charge, l'hydrophobicité, la fréquence et la

distribution des différents résidus, ou encore la longueur des hélices), de nombreux peptides artificiels ont été construits pour cibler avec une efficacité donnée différents pathogènes. Si l'électrostatique semble déterminante pour l'interaction des peptides amphipathiques antimicrobiens avec les membranes, nous verrons cependant que toutes les hélices amphipathiques ne sont pas dépendantes de ce type d'interaction et que ceci peut avoir des conséquences fonctionnelles importantes (courbure, localisation).

E) Géométrie des lipides et adsorption des hélices amphipathiques

Le second paramètre important pour l'insertion des hélices amphipathiques est la géométrie des lipides et leur adaptation à la forme générale de la bicouche. Le volume de la tête polaire, la longueur et le niveau d'insaturation des chaînes grasses permettent de classer les lipides en trois catégories : coniques, cylindriques, et coniques inverse. Un exemple de protéine sensible au « packing » de la membrane est la protéine CCT (C_{ITP}-phosphocholine cytidyltransferase). CCT est une enzyme impliquée dans la synthèse de la phosphatidylcholine au niveau du noyau et du réticulum endoplasmique (Kalmar et al., 1990). C'est un homodimère dont chaque monomère est constitué d'un domaine catalytique, d'un domaine de liaison aux membranes et d'un signal de translocation nucléaire. La protéine, inactive en solution, est active une fois liée à la membrane. L'interaction de la protéine avec la membrane repose sur la structuration d'une hélice amphipathique d'une cinquantaine de résidus. La face polaire, zwitterionique, est constituée de résidus basiques et de résidus acides situés respectivement à l'interface (entre les faces hydrophobe et polaire) et au sommet de l'hélice. La présence d'acides aminés chargés positivement à l'interface rend l'interaction de la protéine avec la membrane dépendante de phospholipides chargés négativement. L'adsorption électrostatique de l'hélice et la pénétration des résidus hydrophobes entre les lipides sont nécessaires à l'activation de CCT. En effet, en utilisant des bicouches composées de lipides chargés non pas à l'état fluide mais à l'état de gel dans lesquelles les résidus hydrophobes ne peuvent s'insérer, Cornell a montré que la protéine se lie mais reste inactive (Arnold and Cornell, 1996).

Une observation intéressante est que la liaison de la protéine CCT dépend de la quantité de phosphatidylcholine présente dans les membranes. La phosphatidylcholine, dont CCT est responsable de la synthèse, inhibe la liaison alors que des lipides également neutres

comme la phosphatidyléthanolamine ou le diacylglycérol favorisent l'interaction membranaire. Ces effets peuvent être expliqués par la géométrie de ces lipides. De forme conique, la phosphatidyléthanolamine et le diacylglycérol sont peu adaptés à un agencement en bicouche. Lorsqu'ils sont présents en quantité suffisante dans les membranes, ils provoquent des défauts d'arrangement entre les molécules lipidiques (« lipid packing defects ») qui favorisent la liaison de CCT. Une autre façon d'expliquer ce phénomène est d'évoquer le stress de courbure que subit la membrane du fait de la présence de ces lipides particuliers. Le terme courbure, ici, ne doit pas être confondu avec la courbure réelle de la membrane. Le stress de courbure correspond au stress élastique dû à l'inadéquation entre la géométrie plane de la bicouche et la courbure spontanée (négative) qu'aurait chaque monocouche en raison des lipides coniques. La liaison de l'hélice à la membrane par l'intercalation des résidus hydrophobes entre les lipides diminue le stress de la membrane rendant l'interaction très favorable (cf. figure 14) (Attard et al., 2000).

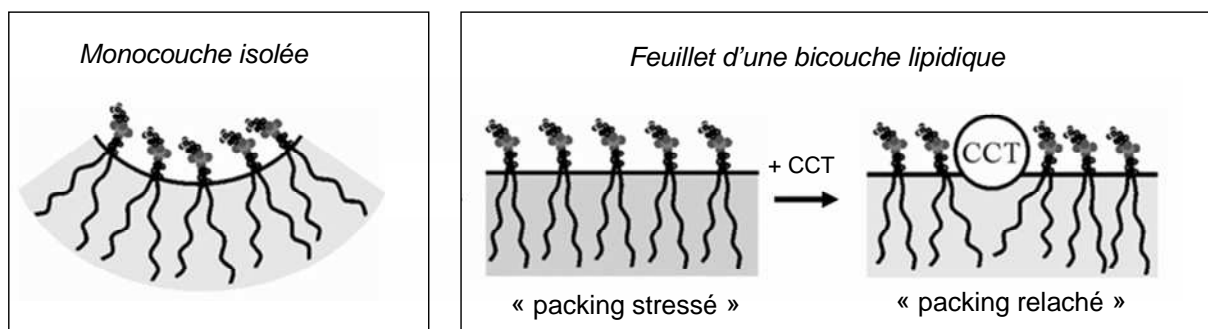


Figure 14 : L'agencement de phospholipides coniques dans le feuillet d'une bicouche lipidique est une situation coûteuse énergétiquement : le feuillet subit un stress élastique qui est aboli par l'insertion de l'hélice de CCT.

Le taux de lipides coniques et cylindriques présents dans une membrane est finement régulé. Dans une levure, la déplétion du phospholipide cylindrique majoritaire, la phosphatidylcholine, entraîne une modification des chaînes latérales de la phosphatidyléthanolamine (Boumann et al., 2006). Les chaînes latérales de ce phospholipide initialement conique sont raccourcies et moins insaturées diminuant ainsi le stress élastique de la membrane. La cellule adapte la géométrie des lipides membranaires afin de conserver un « packing » convenable, c'est-à-dire un packing ni trop exact ce qui empêcherait toute insertion ni trop imparfait car ce serait au détriment de la stabilité de la bicouche.

En conclusion de ces généralités sur les membranes et les hélices amphipathiques, cette structure secondaire très répandue dans les protéines est bien adaptée pour interagir avec une membrane lipidique. Avec son axe approximativement positionné au niveau du glycérol des phospholipides, les acides aminés de la face polaire peuvent interagir électrostatiquement avec les têtes polaires des lipides alors que les acides aminés hydrophobes s'intercalent entre les chaînes d'acides gras. Néanmoins, il n'y a rien de plus trompeusement simple qu'une hélice amphipathique. Nous verrons que les hélices amphipathiques présentent des caractères physicochimiques très différents. En particulier selon le type d'hélice, l'électrostatique et l'hydrophobicité contribuent de façon tout à fait inégale à l'adsorption, suggérant une adaptation des hélices amphipathiques aux différents types de membranes rencontrés dans une cellule. Ces spécificités d'interactions restent très largement à explorer, et c'est l'un des objectifs de cette thèse.

IV Les hélices amphipathiques dans le système COPI

L'orchestration du transport vésiculaire de type COPI dépend de nombreuses hélices amphipathiques qui ont des rôles très divers. Je détaillerai en particulier l'hélice amphipathique N-terminale d'Arf1 et les hélices de type ALPS.

A) La petite protéine G Arf1

Comme nous l'avons vu précédemment, Arf1 est un interrupteur moléculaire oscillant entre deux états, GTP périmembranaire et GDP cytosolique. Arf1GTP recrute, entre autres, le coatomer, et permet ainsi la formation des vésicules de transport. Cette fonction est connue depuis une quinzaine d'années, mais le mécanisme exact d'attachement d'Arf1GTP aux membranes lipidiques est resté longtemps mal compris, en particulier le rôle de la myristoylation. En effet, contrairement à d'autres petites protéines G, Arf1 se distingue par la présence d'un court acide gras de 14 carbones greffé de façon covalente à la glycine N-terminale. L'hypothèse initiale fut que le myristate de la forme GDP était inaccessible, et que le switch GDP/GTP libérait cette ancre lipidique l'autorisant ainsi à s'insérer dans la membrane (cf. figure 15).

Possible mechanism of ARF binding to Golgi

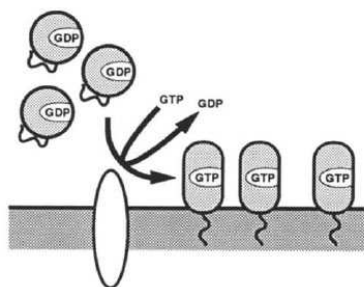


Figure 15 : Schéma publié dans Cell en 1991 suggérant une bascule du myristate dans Arf entre la forme GDP et la forme GTP (Serafini et al., 1991a)

Cette hypothèse a été infirmée par Michel Franco et Sonia Paris. En 1993, ils ont montré que le myristate n'est pas requis pour la liaison d'Arf1GTP à la membrane (Franco et al., 1993). Deux ans plus tard, ils ont mis en évidence que le myristate est accessible dans la forme GDP mais que dans ces conditions nucléotidiques, la liaison aux membranes est faible

(Franco et al., 1995). Ils suggèrent alors que la différence de liaison des deux conformations d'Arf1 dépend d'une hélice amphipathique N-terminale caractéristique de la famille Arf. Notons que l'un des avantages de ce modèle était d'expliquer pourquoi Sar1, la petite protéine G du manteau COPII, se comporte comme Arf1. En effet, Sar1 n'est pas myristylée, mais possède, comme Arf1, une hélice amphipathique N-terminale.

L'hélice amphipathique d'Arf1 est constituée des 12 premiers résidus de la protéine dont le premier acide aminé, la glycine, porte le myristate. La délétion de l'hélice, à la différence de la délétion du myristate, abolit toute interaction d'Arf1GTP avec les membranes. Le myristate renforce globalement l'interaction de la protéine avec la membrane, qu'elle soit sous forme GDP ou GTP. Il est d'ailleurs à noter que le myristate, de par sa faible longueur, n'ancre jamais solidement une protéine à une membrane et intervient généralement en synergie avec d'autres interactions (Resh, 1999).

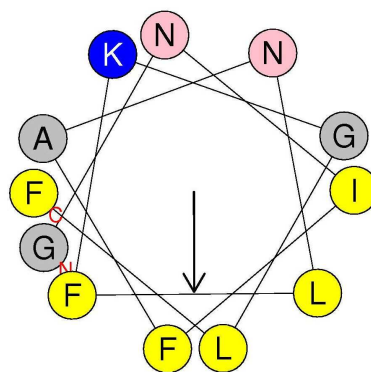


Figure 16 : Représentation de l'alpha hélice N-terminale de la petite protéine G Arf1

L'analyse de la séquence primaire GNIFANLFKGLF est intéressante du fait de la répétition périodique de deux résidus hydrophobes dont la volumineuse phénylalanine. Représentée en hélice alpha, ces six résidus se retrouvent sur une même face. La face opposée est peu chargée avec seulement une lysine centrale. A la différence des hélices de l'endophiline ou de l'epsine vues précédemment, l'hélice amphipathique d'Arf1 est donc très peu chargée. Ceci reflète sans doute l'adaptation de la protéine Arf1 aux membranes peu chargées de l'appareil de Golgi.

Pour démontrer l'implication directe de l'hélice amphipathique d'Arf1 dans son attachement avec les membranes lipidiques, Bruno Antony a réalisé en 1997 des mesures cinétiques permettant de quantifier l'interaction d'Arf1 avec les membranes. Le principe est le

suivant : Arf1 est recruté sur des liposomes contenant un phospholipide fluorescent (DPH). Cette liaison provoque alors un transfert de fluorescence (FRET) entre les tryptophanes d'Arf1 et le fluorophore (cf. figure 17). A l'issue de l'activation d'Arf1, des liposomes non marqués sont ajoutés en excès. La translocation spontanée de la protéine de la population marquée au DPH aux liposomes non marqués engendre une diminution du FRET dont la cinétique indique alors la vitesse de désorption (le k_{off} d'Arf1). Cette vitesse est un très bon indice de la solidité de l'interaction entre protéines et membranes. Dès lors, l'effet de mutations de différents résidus de l'hélice amphipathique ou l'effet de modifications de la composition des liposomes peut ainsi être étudié de façon très quantitative.

L'interaction d'Arf1 sur les membranes repose essentiellement sur l'hydrophobicité (Antonny et al., 1997a). La mutation de la phénylalanine 9 en alanine, résidu le moins hydrophobe, accélère la dissociation d'un facteur 7 et la double mutation leucine 8 – phénylalanine 9 d'un facteur 100. (cf. figure 17). A la différence de l'hydrophobicité pour la liaison d'Arf1, l'électrostatique est peu importante. La vitesse de dissociation de la protéine G Arf1 dépend peu de la charge des membranes, l'ajout de 30% de phospholipides chargés négativement ralentit seulement d'un facteur 3 le temps de dissociation (Antonny et al., 1997a).

J'utiliserai moi-même des mesures similaires reposant d'une part sur le FRET et d'autre part sur l'échange entre populations de liposomes pour caractériser l'interaction d'autres systèmes d'hélices amphipathiques avec la membrane.

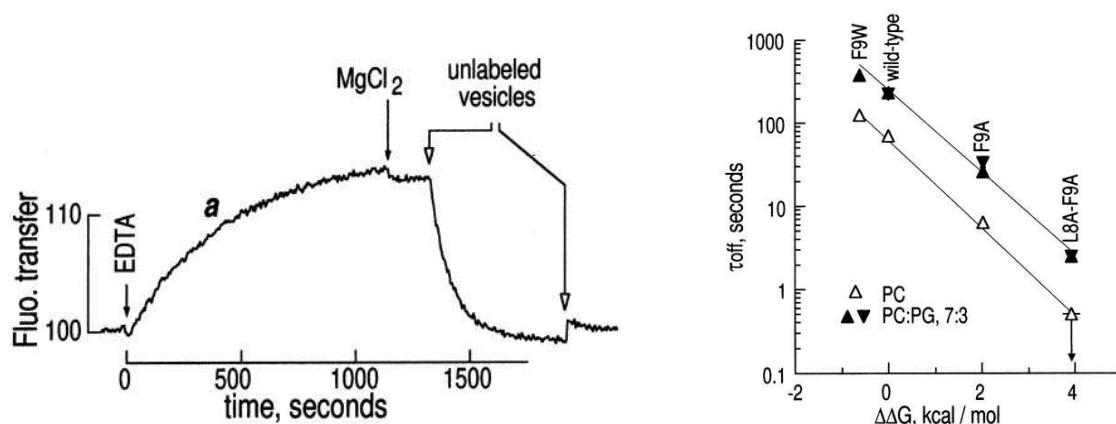


Figure 17 : Cinétique (suivie par FRET) de recrutement et de dissociation d'Arf1 de liposomes. Représentation du temps de dissociation d'Arf1 et de mutants suivant la composition lipidique des liposomes (PC ou PC/PG) en fonction du changement d'hydrophobicité induit par chaque mutation (Antonny et al., 1997a)

B) Bascule de l'hélice N-terminale d'Arf1 lors de l'échange GDP/GTP catalysé par des facteurs d'échange

L'échange intrinsèque nucléotidique GDP/GTP des petites protéines G est une réaction très lente (de l'ordre de 30 minutes dans le cas d'Arf1). L'activation des protéines G requiert une enzyme catalysant cet échange. Il existe une grande diversité de facteurs d'échange, adaptés d'une part, à la protéine G et d'autre part, à la membrane cible. Dans le cas des protéines G de la famille Arf, leurs facteurs d'échange sont caractérisés par un domaine catalytique appelé Sec7. L'interaction entre la protéine Arf et le domaine Sec7 repose sur l'insertion des régions switch d'Arf dans une gorge hydrophobe caractéristique du domaine Sec7. La réaction d'échange repose sur la déstabilisation du GDP d'Arf1 par un « doigt glutamate » porté par le domaine Sec7 (Beraud-Dufour et al., 1998). Cette déstabilisation permet l'échange rapide du GDP par le GTP plus concentré dans le cytosol. Bien que l'hélice N-terminale soit sur la face opposée aux régions switch et n'interagisse pas avec le domaine Sec7, elle ressent l'effet de l'échange GDP/GTP. En effet, les régions switch sont couplées à deux brins beta qui traversent toute la protéine et qui, par glissement, viennent obturer le site de liaison de l'hélice N-terminale contre la protéine. Ainsi l'échange nucléotidique GDP/GTP et la bascule de l'hélice N-terminale sont deux phénomènes strictement couplés (Goldberg, 1998) (cf. figure 18).

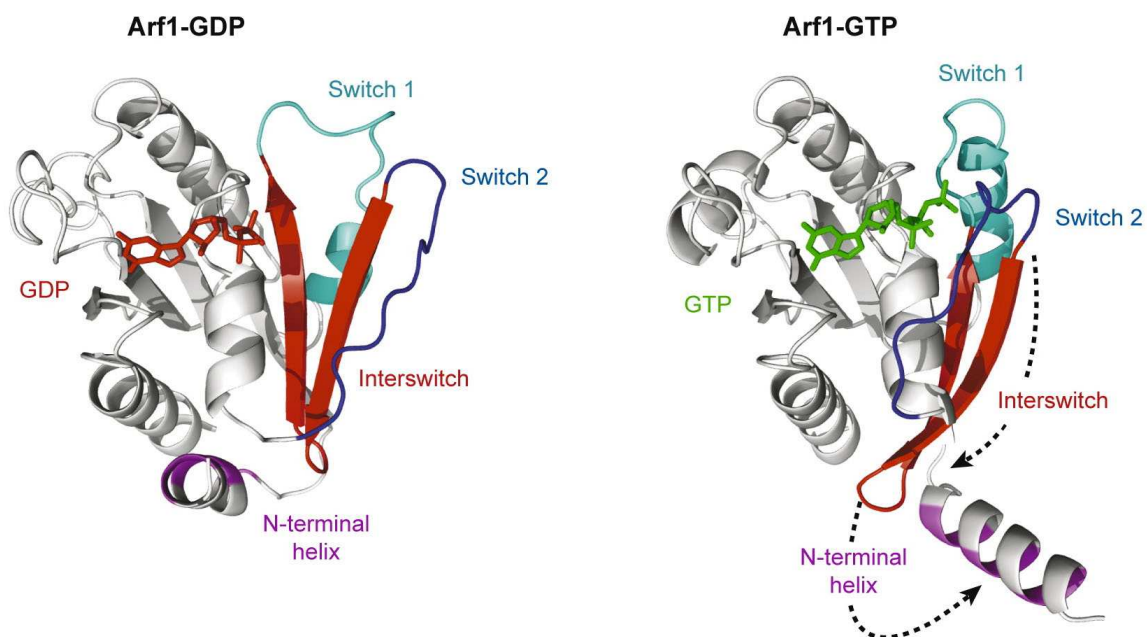


Figure 18 : Changements conformationnels induits lors de l'échange GDP/GTP induisant la libération de l'hélice amphipathique N-terminale. (Gillingham and Munro, 2007)

Une conséquence importante de ce couplage est que les facteurs d'échange d'Arf ne sont actifs qu'à la surface d'une membrane lipidique. De nombreux efforts sont donc faits pour comprendre comment les facteurs d'échange interagissent avec les membranes. Les progrès les plus notables ont été réalisés sur les facteurs d'échange de la famille des cytohésines dont fait partie ARNO (ARF nucleotide-binding-site opener). Ces protéines possèdent un domaine d'interaction avec la membrane bien caractérisé, le domaine PH. Ce domaine PH est recruté à la membrane plasmique en reconnaissant un phosphoinositide membranaire (PIP₂ et/ou PI_{3,4,5}P₃). De plus, il a été récemment montré que ce même domaine PH peut aussi interagir simultanément avec la protéine Arf6GTP (Cohen et al., 2007). L'activation d'Arf1 par ARNO dépend donc d'un lipide membranaire et d'Arf6GTP. Par cette double interaction, ARNO agit comme un intégrateur de signaux assurant ainsi une activation spatio-temporelle fine d'Arf1. En revanche, l'activation d'Arf1 au niveau de l'appareil de Golgi reste non élucidée à ce jour. Des facteurs d'échange spécifiques de l'appareil de Golgi tels que GBF1 et BIG1/2 ont été identifiés mais leurs mécanismes de recrutement aux membranes sont encore mal connus (Casanova, 2007).

C) ArfGAP1 et la découverte d'une hélice sensible à la courbure membranaire

ArfGAP1 catalyse l'hydrolyse du GTP de la protéine G Arf1, ce qui conduit au détachement d'Arf1 de la membrane. Nous avons vu précédemment que la protéine Arf1 est responsable du recrutement du coatomer, et donc de la formation des vésicules COPI. L'hydrolyse du GTP dans Arf1 va donc déterminer la durée de vie du manteau COPI sur la membrane. Or, l'assemblage de ce manteau est complexe et comprend plusieurs étapes : d'abord, la formation de complexes individuels entre Arf1GTP et le coatomer, ensuite la polymérisation de ces complexes en manteaux, puis le bourgeonnement membranaire et enfin la scission de la vésicule. Une fois la vésicule formée, le manteau peut se détacher et être recyclé. Pour que ce cycle d'assemblage/désassemblage coïncide avec la formation d'une vésicule, l'hydrolyse du GTP doit être finement réglée. Trop rapide, l'hydrolyse du GTP conduirait au désassemblage du manteau avant polymérisation. Trop lente, elle bloquerait la vésicule dans un état trop stable où le manteau perdurerait et empêcherait la fusion de la vésicule avec la membrane cible. En 2003, l'équipe de Bruno Antonny a proposé un

mécanisme original de régulation de l'hydrolyse du GTP reposant sur la détection de la courbure membranaire par la protéine ArfGAP1 (Bigay et al., 2003).

1) *Hypersensibilité de la protéine ArfGAP1 à la courbure membranaire*

L'expérience réalisée a été la suivante : des liposomes de rayon défini dont la composition s'approche de celle des membranes golgiennes sont recouverts d'Arf1GTP puis l'hydrolyse du GTP par ArfGAP1 est suivie par fluorescence des tryptophanes. Au cours du changement conformationnel engendré par le switch GTP/GDP, deux tryptophanes se positionnent différemment permettant de suivre l'état actif (périmembranaire) ou inactif (cytosolique) de la protéine. La fluorescence de la protéine G Arf1 diminue lorsque le GTP est hydrolysé en GDP. Comme le montre la figure 19a, l'hydrolyse du GTP d'Arf1 est, de façon spectaculaire, extrêmement dépendante du rayon des liposomes. La réduction du rayon des liposomes d'un facteur 4, à savoir d'une centaine de nanomètres à une trentaine de nanomètres, augmente l'activité d'un facteur 30 à 50.

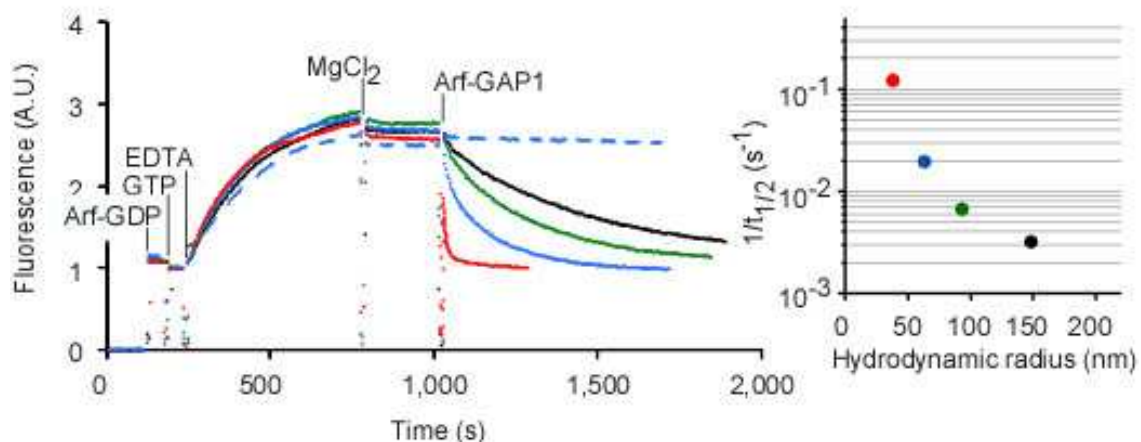


Figure 19a : Mesure par fluorescence des tryptophanes de la vitesse de l'hydrolyse du GTP d'Arf1 en fonction du rayon de courbure des liposomes. Représentation sur une échelle logarithmique de la vitesse d'hydrolyse en fonction du rayon des liposomes (Bigay et al., 2003)

Cette dépendance à la courbure se retrouve dans un système plus complexe, avec des liposomes recouverts d'Arf1GTP et de coatomer mimant une vésicule COPI. Plus le rayon est faible, plus la vitesse de dissociation du manteau augmente (figure 19b). Ces expériences montraient donc que l'activité d'ArfGAP1 est directement couplée à la courbure des membranes.

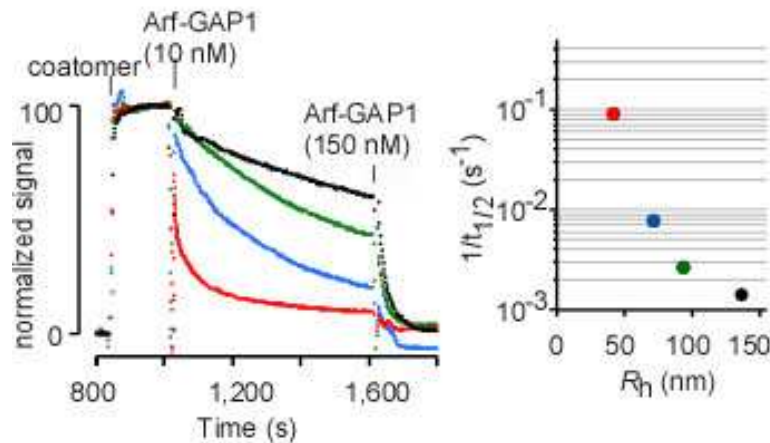


Figure 19b : Mesure par diffusion statique de la cinétique du désassemblage du manteau en fonction du rayon de courbure des liposomes. Représentation sur une échelle logarithmique de la vitesse de dissociation du manteau en fonction du rayon (Bigay et al., 2003)

2) ArfGAP1 est capable de reconnaître la courbure des membranes lipidiques

Par quel mécanisme l'activité d'ArfGAP1 est-elle modulée par la courbure membranaire ? Le mécanisme fut découvert en 2005 par Joëlle Bigay au laboratoire. Il repose sur une courte séquence spécifique d'ArfGAP1 qui fut appelée motif ALPS et qui reconnaît spécifiquement les membranes courbées. La figure 20 montre une mesure directe de liaison d'ArfGAP1 sur des liposomes de différents rayons.

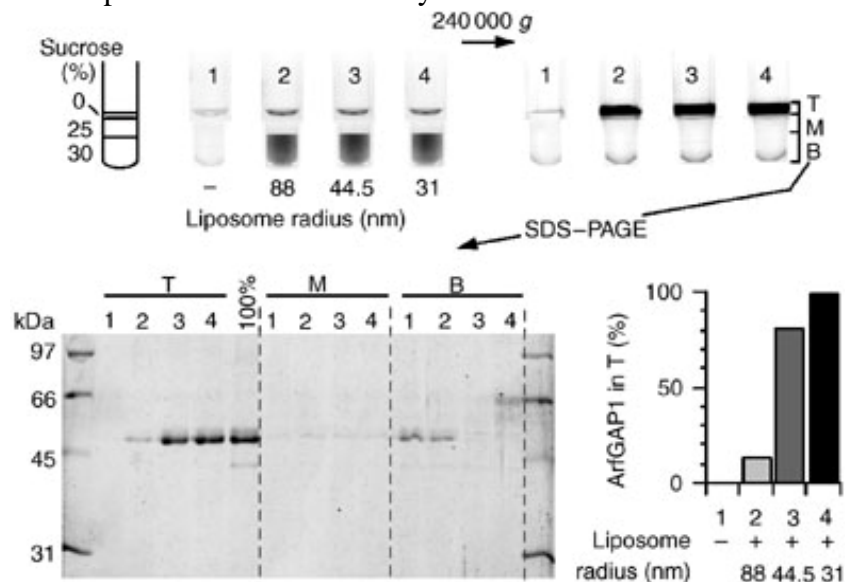


Figure 20 : Expérience de flottaison d'ArfGAP1 : des liposomes de différents rayons de courbure sont incubés avec ArfGAP1. Les liposomes (visibles par leur fluorescence) sont contenus dans une couche de sucrose de 30% superposée de deux couches de densité décroissante. Après ultracentrifugation, ils flottent à la surface. Les différentes fractions sont déposées sur gel pour analyser les protéines associées aux liposomes et les protéines libres. La liaison de protéine est ensuite quantifiée et normalisée. (Bigay et al., 2005)

On observe que la protéine reste soluble en présence de liposomes d'une centaine de nanomètre de rayon, alors qu'elle est totalement liée sur des liposomes d'une trentaine de nanomètre, ce rayon correspondant au rayon des vésicules de transport. La régulation de l'activité d'ArfGAP1 semblait donc reposer sur un mode d'interaction protéine/membrane original contrôlé directement par la courbure membranaire.

La recherche de similarité entre les différentes sous-familles de protéines de type ArfGAP a révélé que, hormis le domaine catalytique en doigt de zinc, les autres séquences sont généralement peu conservées. Cependant, Joëlle Bigay a observé une similarité d'une région centrale de 60 acides aminés entre ArfGAP1 et Gcs1, une protéine de levure. Par contre, d'autres protéines comme ASAP ne présentaient aucune similarité de séquence en dehors du domaine catalytique. Or, les mesures expérimentales révélèrent que comme ArfGAP1, Gcs1 présentait une liaison et une activité fortement dépendante du rayon des liposomes, ce qui n'était pas le cas de la protéine ASAP. Ces résultats suggéraient que la région conservée entre ArfGAP1 et Gcs1 pouvait être responsable de la liaison courbure-dépendante.

Par troncations successives et protéolyse ménagée, un peptide nécessaire et suffisant possédant les caractéristiques de liaison de la protéine entière a été alors identifié. Il s'agit d'une séquence d'environ 40 acides aminés, qui couplée par exemple à une GST, présente une liaison aux liposomes très dépendante de leur taille. En présence de protéases, cette construction est dégradée en solution alors qu'en présence de liposomes fortement courbés, la protéine reste intacte. Par conséquent, le peptide est non replié en solution et se structure en présence de membranes très courbées. La représentation en hélice de ce peptide met en évidence une hélice amphipathique (cf. figure 21). La comparaison de ce motif dans différentes espèces montre que la face hydrophobe est conservée, en particulier une leucine, une phénylalanine et un tryptophane. La mutation de chacun de ces résidus en alanine a des effets drastiques sur la sensibilité à la courbure, particulièrement la mutation du tryptophane qui engendre la perte de l'activité catalytique sur les membranes courbées. Enfin, la triple mutation de la leucine, du tryptophane et de la phénylalanine abolit l'interaction : les chaînes latérales de ces 3 acides aminés sont donc nécessaires à la reconnaissance de membranes courbées. Le dichroïsme circulaire a ensuite confirmé que ce peptide non structuré en solution se structure en alpha hélice sur des membranes courbées (figure 21).

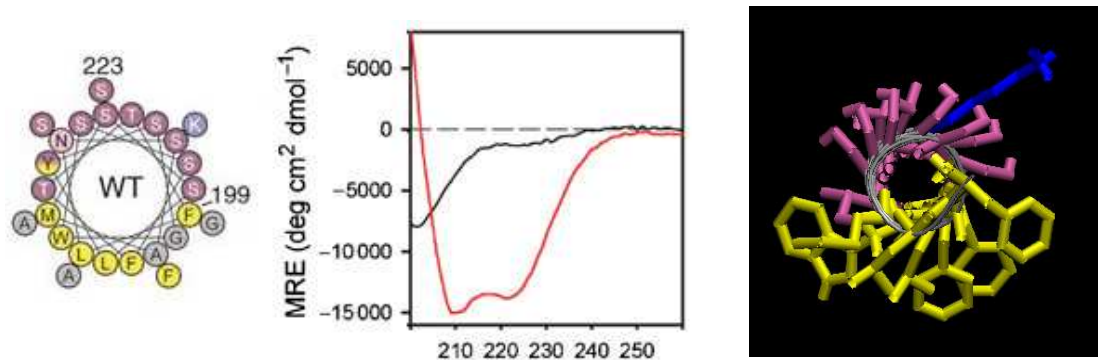


Figure 21: Représentation en hélice alpha de l'ALPS1 d'ArfGAP1 et dichroïsme circulaire du peptide en solution (spectre noir) ou en présence de liposomes très courbés (spectre rouge). (Drin et al., 2007) Modélisation structurale de l'hélice ALPS (les résidus hydrophobes en jaune et sérines/thréonines en rose).

En conclusion, ces études ont mis en évidence dans ArfGAP1 et dans son homologue de levure Gcs1 la présence d'une région centrale assez conservée aux propriétés d'hélice amphipathique capable de reconnaître la courbure des membranes. Cette région a été appelée ALPS pour Amphipathic Lipid Packing Sensor.

3) Mécanisme de reconnaissance de la courbure membranaire par le motif ALPS

Il restait ensuite à comprendre pourquoi la liaison et le repliement du motif ALPS d'ArfGAP1 étaient si sensibles à la courbure des membranes. En effet, si de nombreuses hélices amphipathiques étaient connues depuis longtemps, jamais on avait associé une hélice amphipathique à la reconnaissance de la courbure membranaire. Le laboratoire s'est alors intéressé à la face polaire tout à fait atypique du motif qui présente très peu d'acides aminés chargés et majoritairement des sérines, des thréonines et des glycines. Comme nous l'avons vu précédemment, les hélices amphipathiques classiques contiennent de nombreux résidus chargés positivement. L'hypothèse a été que l'absence de charges rend impossible les interactions électrostatiques avec les têtes polaires des phospholipides. Par conséquent, cette hélice « hémiplegique » a besoin de phospholipides suffisamment espacés, conséquence directe de la courbure, pour que les résidus hydrophobes puissent s'insérer dans le feuillet lipidique (cf. figure 22). Cette hypothèse permettait de comprendre une observation plus ancienne sur le comportement d'ArfGAP1 en présence de liposomes. Dès 1997, il avait été observé que la liaison et l'activité d'ArfGAP1 augmentaient fortement en présence de dioléoylglycérol (Antonny et al., 1997b). Comme rien n'indiquait qu'il s'agissait d'une

liaison spécifique, il avait été suggéré que ce lipide conique avec une tête polaire réduite à sa plus simple expression (un groupement hydroxyle) permette la pénétration des résidus hydrophobes de la protéine dans le feuillet de la membrane.

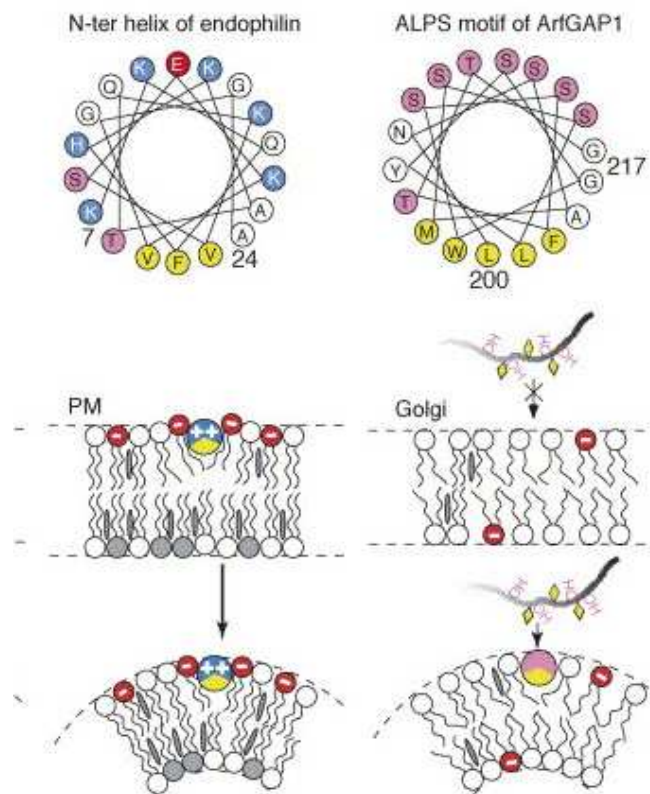


Figure 22 : Conséquences de la physicochimie d'une hélice amphipathique sur la liaison aux membranes. Une hélice amphipathique classique (telle l'endophiline), grâce à sa face polaire basique, peut se lier à des membranes chargées négativement alors que la liaison des hélices ALPS dépourvues de résidus chargés requiert une forte courbure membranaire (Antonny, 2006)

Cette hypothèse a été validée par Guillaume Drin en ajoutant des résidus basiques dans l'hélice ALPS (cf. figure 23). L'introduction d'acides aminés chargés positivement à l'interface de l'hélice rend le motif ALPS insensible à la courbure membranaire : c'est-à-dire qu'il s'adsorbe aussi bien à la surface de gros liposomes que des petits. L'ALPS muté se comporte alors comme une hélice amphipathique classique. La position de la charge introduite a des conséquences différentes sur la sensibilité à la courbure, par exemple la présence de deux lysines au sommet de la face polaire a très peu d'effet. Idéalement placées à l'interface, les lysines sont particulièrement adaptées à l'interaction avec les membranes lipidiques. Par leurs longues chaînes carbonées, et par leurs charges positives à l'extrémité,

les lysines agissent comme un périscope (effet « snorkel »). Par conséquent, l'hélice ALPS est sensible à la courbure en raison de l'absence d'interactions électrostatiques avec les têtes polaires des phospholipides.

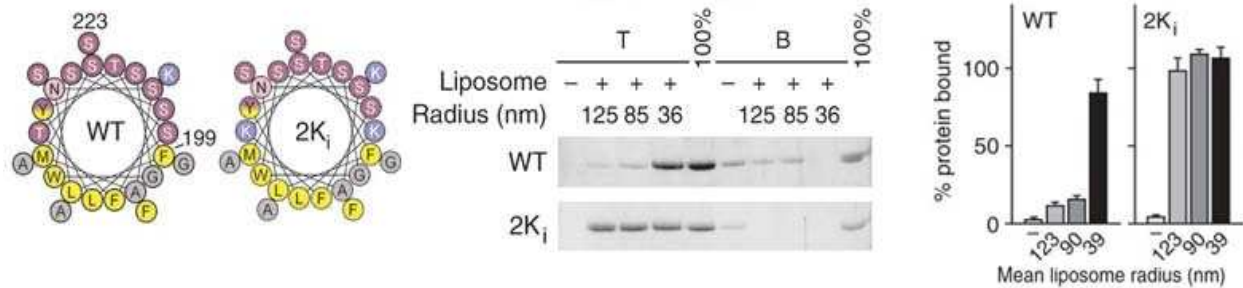


Figure 23: Représentation de l'ALPS1 d'ArfGAP1 et du mutant portant deux lysines à l'interface. Gel de flottaison des deux formes en fonction de la courbure et quantification. (Drin et al., 2007)

La régulation d'ArfGAP1 par la courbure membranaire via son motif ALPS semble donc un mécanisme extrêmement simple : une membrane courbée présente des défauts de packing favorisant la structuration en hélice alpha de l'ALPS dont la face polaire est exclusivement constituée de sérines, thréonines et glycines. Les défauts de packing permettent la pénétration des résidus hydrophobes (leucine, phénylalanine, tryptophane) déterminants à la liaison de l'ALPS (cf. figure 24).

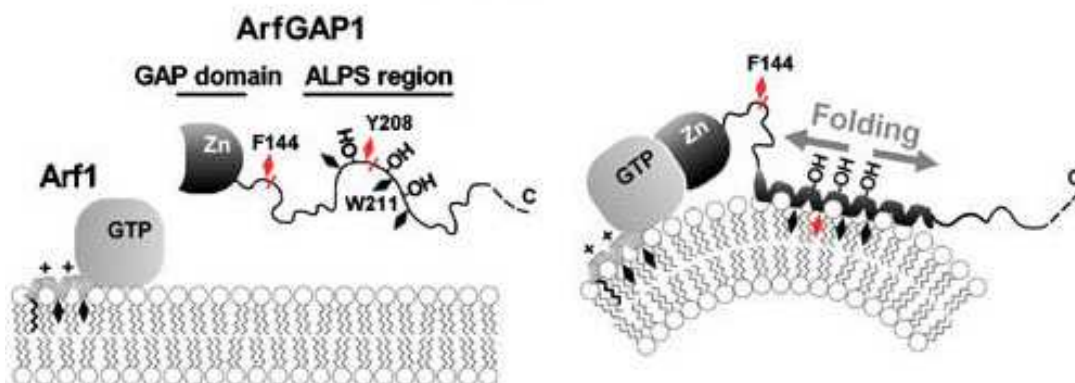


Figure 24 : L'ALPS d'ArfGAP1 se structure en hélice sur des membranes courbées

Si le mécanisme apparaît très simple, il faut noter qu'il provoque des réponses à la courbure extrêmement fines et aiguës. Bruno Mesmin a montré que l'isoforme majoritaire de la protéine ArfGAP1 possède en fait non pas une mais deux hélices de type ALPS (Mesmin

et al., 2007). En revanche, de façon intéressante, dans certains tissus, des variants d'ArfGAP1 ne possèdent qu'un seul motif ALPS fonctionnel. *In vitro*, les deux hélices agissent en synergie et renforcent l'interaction avec les membranes. De plus, la dépendance à la courbure est décalée de 20 nanomètres vers des rayons plus gros. L'hypothèse proposée par Dan Cassel et Bruno Mesmin est que les variants d'ArfGAP par la présence d'un ou deux motifs ALPS sont ainsi adaptés à la composition membranaire des différents types cellulaires (Levi et al., 2008). Par exemple, ArfGAP1 ne possède que le premier ALPS dans un tissu comme le cerveau où les membranes présentent le plus fort taux d'insaturations. Il est intéressant de noter que la réponse à la courbure du seul ALPS 1 sur des liposomes contenant des lipides doublement insaturés ressemble à celle du tandem ALPS 1+2 sur des membranes golgiennes classiques (Mesmin et al., 2007).

D) La bioinformatique, un tournant déterminant dans la validation de l'ALPS

Le laboratoire a recherché si d'autres protéines possédaient des motifs similaires au motif ALPS d'ArfGAP1. La recherche bioinformatique de séquences ALPS par similarité (Blast) n'a donné aucun résultat. Guillaume Drin et Romain Gautier ont alors créé un algorithme recherchant spécifiquement dans les bases de données des hélices (séquences de 18 acides aminés) possédant les caractéristiques de l'ALPS (Gautier et al., 2008). L'hélice doit être amphipathique, la face hydrophobe peut être quelconque, en revanche, la face polaire doit être très majoritairement composée de résidus sérine, thréonine et glycine. Ce programme baptisé « Heliquet » a permis l'identification de plusieurs centaines de protéines dans les banques annotées Swissprot : environ 200 chez l'homme et autant dans la levure. Outre ArfGAP1, trois d'entre elles ont été choisies pour être étudiées expérimentalement : la protéine de levure Kes1p, la protéine Nup133 et la protéine humaine GMAP-210 (Drin et al., 2007) (cf. figure 25). Conformément aux prédictions bioinformatiques, elles sont toutes trois sensibles à la courbure membranaire.

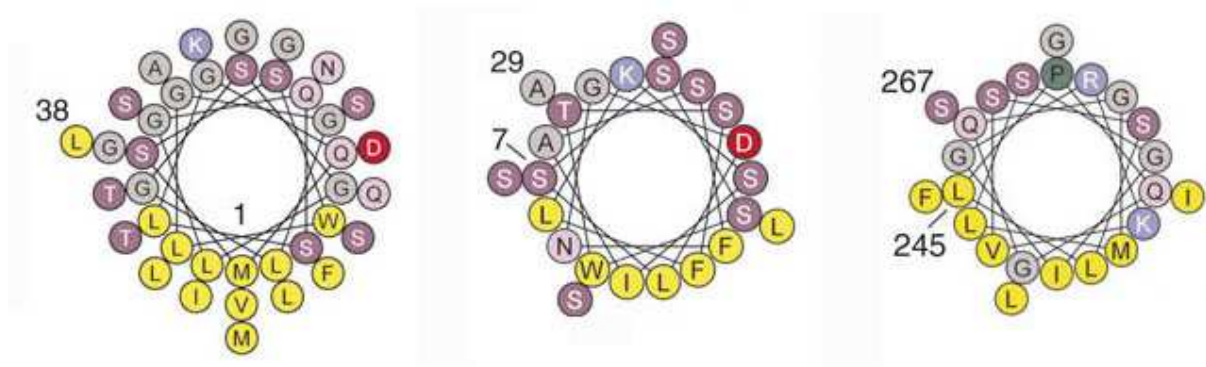


Figure 25 : De gauche à droite, représentation des hélices ALPS de GMAP-210, Kes1p et Nup133

Kes1p est un transporteur de stérol. D'après la structure cristallographique, l'ALPS serait le clapet amovible de la poche contenant le cholestérol. En position fermée, l'ALPS maintient le cholestérol enfoui dans la protéine (cf. figure 26). L'interaction de l'ALPS avec les membranes permettrait l'ouverture du clapet et l'échange du cholestérol entre membrane et protéine. L'hypothèse en cours d'étude au laboratoire est que le motif ALPS de Kes1p contribue au transport vectoriel du cholestérol entre des membranes courbées et planes. Il reste à en définir le sens ainsi que la nature de ces membranes.

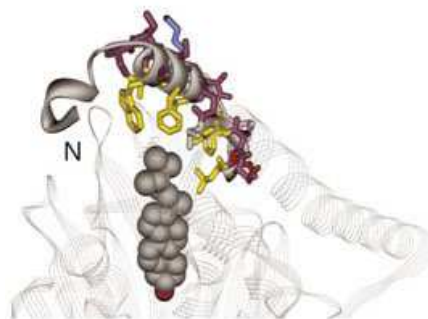


Figure 26 : Mise en évidence de l'hélice ALPS fermant la poche de Kes1 contenant le cholestérol

Nup133 est une nucléoporine, c'est-à-dire un des multiples éléments du pore nucléaire. Associée à un complexe protéique, elle définit les pores nucléaires. Par sa capacité à se lier de façon courbure dépendante, elle serait adaptée à la courbure de la membrane nucléaire au niveau du pore. Une hypothèse alternative est que le motif ALPS de Nup133 intervienne au moment de la mitose lorsque l'enveloppe nucléaire est fragmentée en une multitude de petites vésicules. En effet, Nup133 est impliqué très tôt dans le réassemblage du pore nucléaire et

pourrait participer à la nucléation de l'assemblage du pore sur de telles vésicules (Alber et al., 2007).

En conclusion, la recherche bioinformatique a été une étape déterminante, validant le mécanisme général de sensibilité à la courbure par les hélices ALPS, et révélant des protéines tout à fait intéressantes. La protéine GMAP-210, une corde moléculaire dont une extrémité est un ALPS, a fait l'objet de ma thèse.

V D'autres hélices dans le système COPI : la corde moléculaire GMAP-210

A) Introduction

L'appareil de Golgi est, à la fois, une structure très organisée et une structure extrêmement dynamique. L'une des meilleures illustrations de la plasticité de l'appareil de Golgi est sa capacité à se reformer après mitose ou après traitement à la brefeldine A (un inhibiteur des facteurs d'échange d'Arf1 au niveau de l'appareil de Golgi). Les vésicules de transport transitent continuellement entre les différentes citernes golgiennes de façon bidirectionnelle. Ce trafic hautement dynamique doit être parfaitement orchestré. Ainsi, ont été mises en évidence depuis une dizaine d'années, des cordes moléculaires appelées Golgines connectant les citernes golgiennes entre elles, ainsi que les vésicules aux citernes. Ce lien physique éviterait la dispersion des vésicules dans le cytosol entre les lieux de bourgeonnement et de fusion. Préalablement à l'engagement de la machinerie de fusion (les SNARE), ces cordes moléculaires assureraient la précision du transport en accompagnant la vésicule (cf. figure 27).

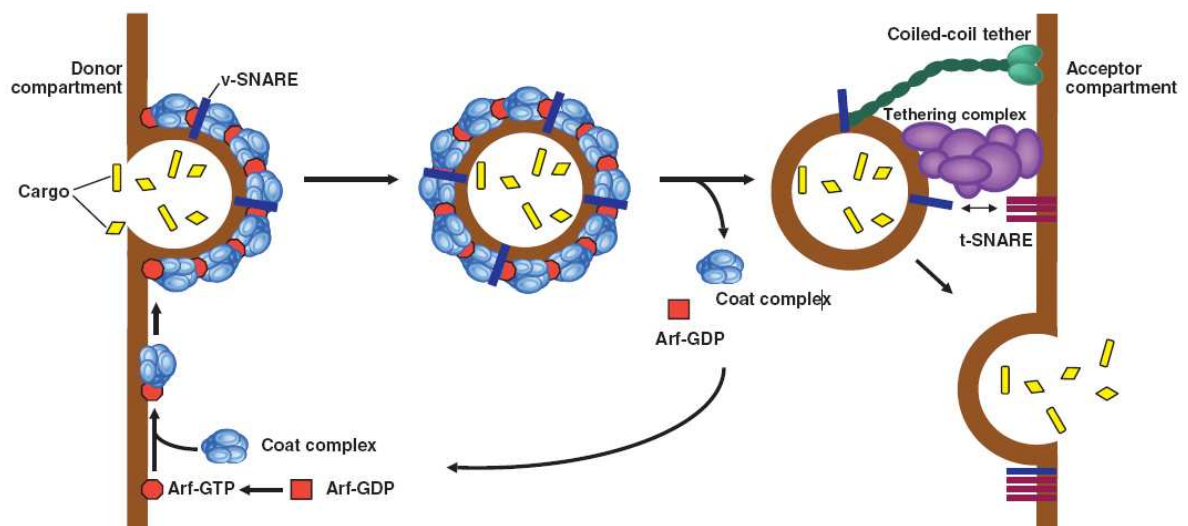


Figure 27 : Schéma du transport d'une vésicule entre deux compartiments (Jackson, 2009)

Les rares observations faites en microscopie électronique montrent des fils (« vesicles on strings ») connectant les vésicules aux saccules golgiens (Orci et al., 1998) (cf. figure 28).

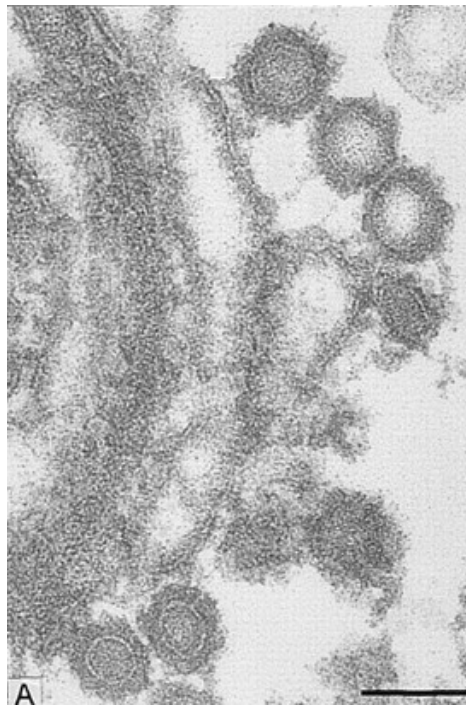


Figure 28 : Microscopie électronique montrant des vésicules connectées à des citernes golgiennes par des fibres (Orci et al., 1998) Barre = 100nm

La biologie moléculaire et la biochimie ont permis de mettre en évidence un certain nombre de protéines qui possèdent toutes les caractéristiques pour assurer cette fonction de corde. Ces protéines filiformes sont structurées en coiled-coil, un super-enroulement de deux hélices alpha dimérisées par un leucine zipper. Ces coiled-coil peuvent être de plusieurs centaines d'acides aminés, et donc avoir une longueur de plusieurs dizaines de nanomètres. Aux deux extrémités du coiled-coil, se trouvent des motifs d'ancrage de différentes natures mais très rarement bien caractérisés.

1) Historique de GMAP-210

GMAP-210 est une protéine humaine de 1979 acides aminés localisée au cis-Golgi. C'est un homodimère dont l'essentiel de la structure est un coiled-coil d'une longueur théorique de 200 nanomètres, soit deux fois le diamètre d'une vésicule de transport. Notons que le coiled-coil présente des interruptions suggérant que cette corde est flexible.

L'intérêt du laboratoire pour GMAP-210 vient de l'identification d'un motif ALPS à son extrémité N-terminale. Un tel motif suggérerait un mécanisme évident de capture de vésicules de transport par cette corde. Une partie de ma thèse a été de caractériser les

propriétés de liaison de GMAP-210, ce qui a permis de proposer un mécanisme minimal d'attachement de deux membranes par GMAP-210. Néanmoins, GMAP-210 avait été auparavant étudiée pour son implication dans l'organisation de l'appareil de Golgi par rapport au centrosome. Je veux donc d'abord présenter ces études antérieures, principalement menées par l'équipe de Michel Bornens.

L'équipe de Michel Bornens a mis en évidence en 1994 qu'une protéine alors appelée p210 (210 kDa étant son poids moléculaire) est une protéine périphérique associée au cis-Golgi (Rios et al., 1994). Cinq années plus tard, la même équipe a démontré que p210, en plus d'être localisée au niveau de l'appareil de Golgi, lie les microtubules (Infante et al., 1999). La protéine est alors renommée GMAP-210, cet acronyme signifiant « Golgi microtubule associated-protein 210 ». Les auteurs montrent ensuite que les deux extrémités de la protéine sont impliquées dans des fonctions différentes : l'extrémité N-terminale [1-375] est associée aux membranes golgiennes alors que l'extrémité C-terminale [1597-1979] est liée au cytosquelette. Ils observent que l'extrémité C-terminale est localisée au niveau du centrosome, et interagit *in vitro* avec les microtubules. En 2004, Bornens et col. détaillent le mécanisme de liaison au cytosquelette en montrant que l'extrémité C-terminale recrute les γ TCC « γ -tubulin containing complexes» aux membranes golgiennes (Rios et al., 2004). De plus, le domaine C-terminal de GMAP-210 couplé à un motif d'adressage aux mitochondries est capable de recruter de la tubuline et de redistribuer les mitochondries autour du centrosome. Ils suggèrent alors que GMAP-210 contribue à l'assemblage et au maintien des saccules golgiens autour du centrosome.

Ce modèle fut ensuite l'objet d'une controverse. Celle-ci vient de l'observation par l'équipe de Munro de la localisation golgienne et non centrosomale de l'extrémité C-terminale de GMAP-210 (Gillingham et al., 2004). Munro propose d'ailleurs que cette localisation soit due à une interaction directe avec la petite protéine G Arf1GTP même si il ne peut démontrer cette interaction ; j'y reviendrai. Dans une courte revue au titre provocateur « Golgi positioning : are we looking at the right MAP ? », Francis Barr met en exergue les données contradictoires et les différences d'observation et d'interprétation de l'ancrage de l'extrémité C-terminal de GMAP-210 par les équipes de Bornens et Munro (Barr and Egerer, 2005). Néanmoins, de la même manière que Munro, il observe une localisation golgienne de l'extrémité C-terminale de GMAP-210.

2) Un motif ALPS à l'extrémité N-terminale de GMAP-210

La situation était très confuse, mais parmi toutes ces observations antérieures, une a intéressé tout particulièrement le laboratoire. Elle constituait en effet un bon indice que la corde GMAP-210 peut par son senseur de courbure lier des vésicules de transport. Il s'agit de l'effet de la surexpression de la corde sur la structure de l'appareil de Golgi (Pernet-Gallay et al., 2002). Cette surexpression dans les cellules HeLa induit une fragmentation de l'appareil de Golgi. Les structures en saccules disparaissent au profit de clusters de vésicules de 50 nanomètres de diamètre remarquablement homogènes (cf. figure 29). Les transports antérograde et rétrograde entre réticulum et cis-Golgi sont bloqués. Ces phénotypes pouvaient s'expliquer par le piège des vésicules par les hélices ALPS de GMAP-210. Incapables de fusionner, les vésicules s'accumulent alors dans le cytosol.

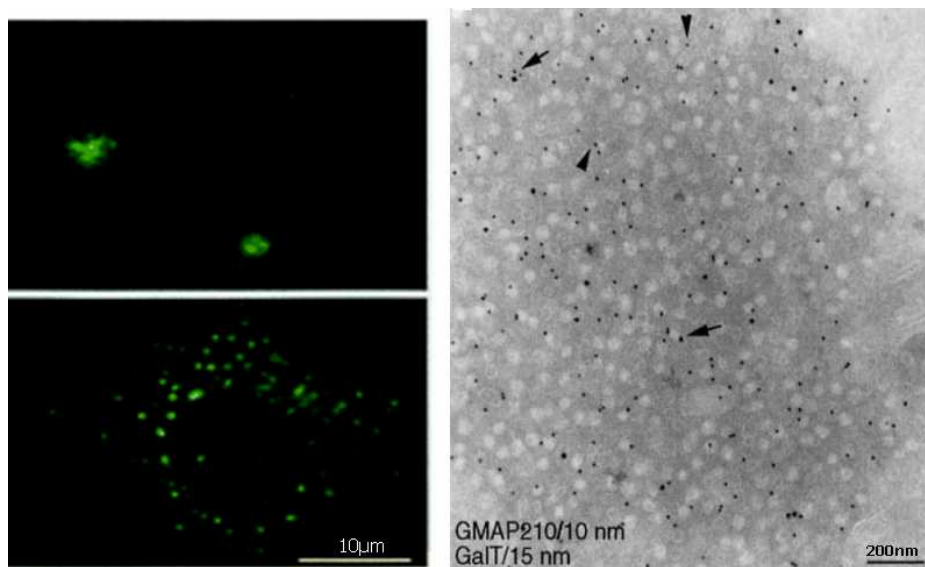


Figure 29 : Microscopie optique de cellules HeLa sauvages (photo du haut) ou surexprimant GMAP-210 (photo du bas). La microscopie électronique montre que l'appareil de Golgi a disparu au profit de clusters de vésicules (Pernet-Gallay et al., 2002).

Guillaume Drin, en utilisant une construction de l'extrémité N-terminale de GMAP-210 a, juste avant mon arrivée au laboratoire, démontré que le motif ALPS prédit à l'extrémité N-terminale est effectivement fonctionnel. Remarquons que si la physicochimie des ALPS de GMAP-210 et d'ArfGAP1 est proche, la séquence de GMAP-210 est plus longue et présente moins de résidus aromatiques. Les expériences de flottaison, dichroïsme circulaire et de fluorescence des tryptophanes démontrent qu'il s'agit bien d'un motif non

structuré en solution qui se replie en hélice alpha à la surface de petits liposomes (cf. figure 30). La sensibilité à la courbure semble très forte puisque dans les expériences de liaison l'extrémité N-terminale de la protéine reste soluble en présence de liposomes de 90 nanomètres de rayon alors qu'elle est très majoritairement associée aux liposomes de 36 nanomètres de rayon. GMAP-210 étant un dimère reposant sur une structure coiled-coil, deux motifs ALPS sont présents à l'extrémité de la corde. Vraisemblablement, ils agissent de concert pour la capture d'une même vésicule.

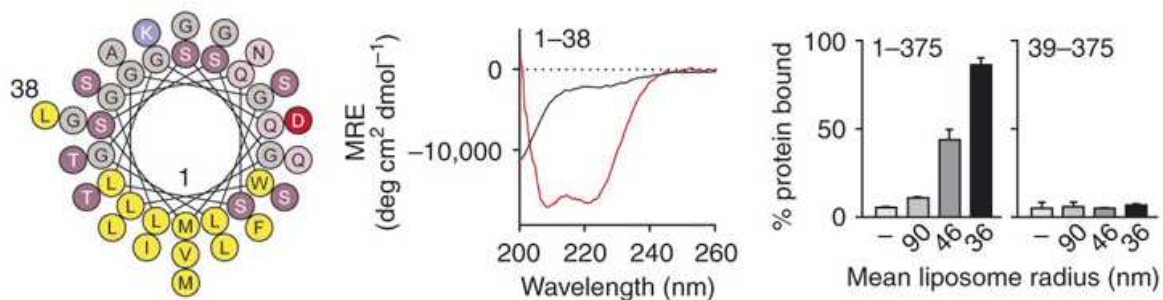


Figure 30: Représentation de l'ALPS de GMAP-210. Spectres de dichroïsme circulaire du peptide ALPS en solution (noir) et en présence de petits liposomes (rouge). Quantification de la liaison de la protéine (extrémité N-terminale 1-375) en fonction du rayon de courbure. (Drin et al., 2007)

Pour ma part, je me suis d'abord intéressé à l'autre extrémité de la corde, celle qui faisait objet de controverse entre plusieurs laboratoires. En m'appuyant sur les indices et prédictions de Munro et col, j'ai cherché à démontrer une interaction directe entre GMAP-210 et Arf1GTP. Ensuite, j'ai montré que cette même interaction pouvait être contrôlée par la courbure membranaire et ceci de façon opposée à l'extrémité N-terminale. Ceci a abouti à un modèle où GMAP-210, de par son motif ALPS à l'extrémité N-terminale et son motif d'interaction avec Arf1 à l'extrémité C-terminale, est capable de connecter des membranes courbes à des membranes planes. Dans un contexte cellulaire, ceci pourrait correspondre à la connexion des vésicules de transport à des citernes golgiennes comme le suggèrent les images de microscopie électronique citées auparavant (cf. figure 28).

Dans un deuxième temps, j'ai établi les premières mesures quantitatives de GMAP-210 avec des membranes, en particulier des mesures de la durée de vie d'attachement de chacune des extrémités à des membranes.

Enfin, je suis revenu à la physicochimie particulière des motifs ALPS en comparant ce motif à un autre type d'hélice amphipathique tout à fait singulier qui est présent dans l' α -synucléine.

B) Matériel et méthodes

Les études présentées dans cette thèse ont été réalisées *in vitro* à l'aide de différentes techniques biochimiques et biophysiques et en utilisant des protéines purifiées et des liposomes de composition et de rayon définis.

Les méthodes décrites ici s'appliquent non seulement à l'étude de GMAP-210 (chapitres V et VI) mais également à l'étude de l' α -synucléine présentée dans un chapitre distinct (chapitre VII).

1) Lipides et liposomes

Les solutions de lipides purs en chloroforme sont stockées sous de l'argon à -20°C . Nous disposons de lipides naturels (comme la phosphatidylcholine purifiée à partir d'œuf, la phosphatidyléthanolamine purifiée à partir de foie) et de lipides synthétiques présentant des chaînes grasses définies. Les liposomes sont préparés à partir d'un mélange de lipides reflétant les caractéristiques de la membrane étudiée. Par exemple, pour une membrane golgienne, les liposomes sont constitués de 50% de phosphatidylcholine, 19% de phosphatidyléthanolamine, 16% de cholestérol, 10% de phosphatidylinositol et 5% de phosphatidylsérine. Ces pourcentages sont déterminés par rapport au nombre de moles de lipides (mol%). Un film lipidique est obtenu après évaporation du chloroforme au rotavapor. Ce film est resuspendu dans une solution HEPES 50mM, acétate de potassium 120mM, pH 7,2 et subit plusieurs cycles de congélation/décongélation entre l'azote liquide et l'eau à 37°C , ce qui conduit à la formation de vésicules multilamellaires de taille variable. L'étape finale est l'extrusion : la suspension de liposomes est forcée à passer à travers un filtre de polycarbonate de rayon défini (0,4 μm , 0,2 μm , 0,1 μm , 0,05 μm ou 0,03 μm) grâce à un système de seringues sous pression. Une fois extrudés, les liposomes sont conservés à température ambiante quelques jours, excepté les plus petits qui sont utilisés dans la journée. Les liposomes contenant un fluorophore (NBD ou rhodamine) sont stockés à l'abri de la lumière. L'extrusion permettant d'obtenir des liposomes avec un rayon minimum de 30 nanomètres, nous utilisons également la technique de sonication qui permet d'atteindre des rayons de l'ordre de 20 nanomètres. La sonication est réalisée avec une sonde en titane. Les débris sont éliminés par ultracentrifugation.

La courbure des liposomes étant le paramètre critique de nos mesures, un soin tout particulier est pris lors des étapes d'extrusion (minimisation des fuites, extrusion séquentielle à travers des pores de plus en plus petits). La taille des liposomes est déterminée par diffusion dynamique de la lumière. C'est une technique qui nécessite très peu de matériel (typiquement 20µl d'une solution à 0,1mM) et qui donne des rayons proches de ceux que l'on peut directement observer en microscopie électronique.

Le principe de la diffusion dynamique de la lumière est la mesure de la diffusion de particules établie d'après les fonctions d'autocorrélation (différence d'un signal à l'instant $t+dt$ par rapport à t) d'un signal de diffusion de lumière. A partir du coefficient de diffusion, on détermine la taille apparente des particules à l'aide de l'équation $D = \frac{kT}{f} = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$ où k est la constante de Boltzmann, T la température, f le coefficient de frottement, η la viscosité du milieu et enfin R_h le rayon hydrodynamique. Cette équation montre que plus la particule est grande (R_h), plus sa diffusion est lente.

2) Purification des protéines et marquage

- GMAP-210

Les différents fragments de GMAP-210 clonés dans un vecteur pGEX-2T sont exprimés sous forme GST dans des bactéries BL21Gold. Une culture bactérienne de DO 1 est induite par 0.1mM d'IPTG à 17°C pendant une nuit. Cette température relativement basse permet d'augmenter la quantité de protéines solubles. Les bactéries resuspendues dans un tampon TRIS 50mM, NaCl 150mM, MgCl₂ 1mM pH 7,4 sont lysées mécaniquement par une presse de French en présence d'un cocktail d'inhibiteurs. Le lysat est ultracentrifugé puis le surnageant est incubé pendant 3 heures à 4°C sur des billes Glutathione-Sépharose. La protéine est éluée par coupure protéolytique de la GST (incubation de thrombine pendant une nuit). La protéine est purifiée sur une colonne de gel filtration Sephacryl S300 (XK 16/70) avec un tampon TRIS 50mM, NaCl 150mM, MgCl₂ 1mM pH 7, puis concentrée sur une cellule Amicon (cutoff 10kDa).

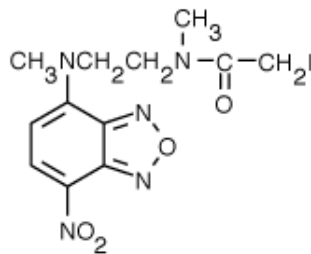
- α-synucléine

L'α-synucléine est exprimée sans aucune étiquette à partir d'un vecteur pET21 dans des bactéries BL21Gold. Une culture de DO 0.6 à 37°C est induite par 1mM d'IPTG pendant

3 heures. Les bactéries sont lysées mécaniquement par une presse de French en présence d'un cocktail d'inhibiteurs. Le lysat est ultracentrifugé et le surnageant est ensuite bouilli pendant 10 minutes. Cette étape tout à fait originale utilise le fait que l' α -synucléine est intrinsèquement non repliée et reste donc soluble à haute température contrairement à toutes les autres protéines du lysat qui sont dénaturées à 100°C et précipitent. Une centrifugation permet de récupérer le surnageant contenant presque exclusivement l' α -synucléine. La dernière étape est une chromatographie sur une colonne échangeuse d'anion Sepharose Q (XK16/20cm) puis la protéine est concentrée sur une cellule Amicon (cutoff 10kDa).

Marquage au NBD

La fluorescence du groupement NBD (cf. structure ci-dessous) est hautement sensible à l'environnement. En particulier, des différences importantes de fluorescence sont observées quand ce groupement passe d'un environnement aqueux à un environnement hydrophobe. Le NBD est donc une sonde de choix pour cartographier les régions d'interaction avec les membranes lipidiques. Le greffage du NBD peut se faire facilement par réaction nucléophile d'un dérivé iodoacétamide avec le groupement thiol des cystéines exposées.



Structure du iodoacétamide-NBD (N,N'-diméthyl-N-(iodoacétyl)-N'-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)éthylènediamine)

Pour un marquage précis, le principe est d'éliminer les cystéines endogènes et d'introduire une seule cystéine à un endroit voulu de la protéine. Toutes ces étapes sont réalisées par mutagenèse dirigée (kit Quickchange). Les protéines mutées sont les suivantes :

GMAP-210 [1-375]	M1C C77L C214S C352L C359L
GMAP-210 [1597-1843]	C1722S T1829C
α -synucléine	V3C

Les protéines sont purifiées selon les mêmes protocoles que la forme sauvage en présence d'un agent réducteur, le dithiothréitol (DTT). Avant marquage, le DTT est éliminé par une petite colonne de gel filtration (NAP10). Le marquage se fait par addition d'un excès de 5 fois de Iodoacétamide-NBD dans un tampon soigneusement dégazé. Après quelques minutes, la réaction est stoppée par l'addition d'un excès de cystéine libre (1mM). Enfin, la protéine marquée est séparée de la sonde libre au cours de la dernière étape de purification (gel filtration dans le cas de GMAP-210 et colonne échangeuse d'ion dans le cas de l' α -synucléine). Nous déterminons la fraction et la concentration de protéine marquée par la sonde en mesurant le spectre d'absorbance dans la zone UV-visible (200 à 600nm) et en utilisant les coefficients d'extinction molaire de la protéine et du NBD.

3) Dichroïsme circulaire

La protéine GMAP-210 étant en partie structurée en coiled-coil, nous avons contrôlé la structure secondaire des différentes constructions à l'issue de leur purification. La mesure est réalisée dans un spectromètre Jasco J-815 en utilisant une fine cellule en quartz (0.05cm). Les protéines sont préalablement dialysées contre un tampon TRIS 10 mM, pH 7.5, KCl 150 mM pour enlever le glycérol, et les agrégats sont éliminés par ultracentrifugation. Les spectres sont mesurés entre 195 et 260 nanomètres.

4) Flottaison

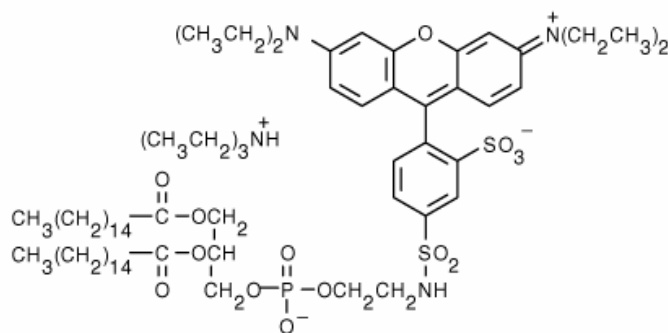
Le principe est de séparer les protéines solubles des protéines liées aux liposomes par des coussins de sucrose de différentes densités. Les liposomes sont incubés avec les protéines dans un volume de 150 μ l, puis la suspension est ajustée à 30% de sucrose (volume final de 250 μ l). Au dessus de ce coussin, sont déposés un coussin de sucrose 25% (200 μ l) et une couche de tampon sans sucrose (50 μ l). L'échantillon est centrifugé à 240 000g dans un rotor « swing » (TLS 55 Beckman) pendant 1h à 20°C. Les liposomes se retrouvent alors dans la fraction supérieure avec leurs protéines associées, les protéines libres restent dans la fraction inférieure. Les liposomes étant marqués avec une sonde fluorescente, nous pouvons les visualiser avant et après ultracentrifugation à l'aide de l'imageur LAS3000 (ceci est illustré

dans la figure 18). Avec une seringue Hamilton, trois fractions sont collectées : une fraction inférieure de 250 μ L, une fraction intermédiaire de 140 μ L et une fraction supérieure de 100 μ L. Un échantillon de 10 μ L de chacune de ces fractions prélevées est analysé avec l'imageur afin de vérifier que les liposomes sont dans la fraction supérieure. Les fractions sont ensuite analysées sur gel d'acrylamide SDS pour déterminer la partition des protéines entre liposomes et tampon.

5) Fluorescence NBD et FRET entre rhodamine et NBD

La fluorescence des différentes constructions marquées au NBD est suivie dans un spectrophotomètre Shimadzu. Pour un spectre d'émission, l'excitation du NBD se fait à 495 nm et l'émission est mesurée entre 510 et 700 nm. Pour les mesures cinétiques, les longueurs d'ondes sont fixées à 495 nm pour l'excitation et à 537 nm pour l'émission. La constante de temps est de 0.5 seconde. Les mesures sont réalisées à 37°C dans une cuve cylindrique en quartz de 600 μ l agitée à l'aide d'un petit barreau magnétique.

Dans certaines expériences, nous utilisons des liposomes contenant 1% de rhodamine greffée sur la tête polaire de la phosphatidyléthanolamine (DHPE) (cf. structure ci-dessous).



Structure de la rhodamine greffée sur une phosphatidyléthanolamine (DHPE)

Au contact des liposomes marqués à la rhodamine, le groupement NBD fluoresce beaucoup moins directement car une partie de l'énergie d'émission est transmise au groupement rhodamine : il y a un signal de FRET. L'utilisation de ce couple de fluorophores permet de réaliser des expériences d'échange entre deux populations de liposomes : l'une contenant le fluorophore accepteur et l'autre dépourvue de fluorophore. Le déplacement de la protéine NBD d'une population de liposomes vers l'autre engendre des variations opposées de

l'émission directe du NBD et du signal de FRET. La mise au point des longueurs d'ondes et des bandes passantes a été faite de façon à minimiser l'excitation directe de la rhodamine-DHPE.

6) Diffusion statique

La polymérisation du manteau à la surface de la membrane, et dans une moindre mesure le recrutement de la protéine G Arf1, entraînent l'augmentation de l'indice de réfraction des liposomes et par conséquent de leur pouvoir diffusant. La diffusion statique est suivie au spectrofluorimètre avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 350nm (bandes passantes 1,5nm). La mesure est effectuée à 37°C dans une cuve de 100µl.

C) Résultats

1) L'extrémité C-terminale de GMAP-210 interagit directement avec Arf1GTP

Rud3p est une protéine de levure partiellement similaire à GMAP-210. Elle ne comprend que 484 acides aminés au lieu des 1979 de GMAP-210 mais elle est néanmoins très semblable à la région C-terminale. En revanche, son extrémité N-terminale ne possède pas de motif ALPS. Nous pourrions qualifier Rud3p de « demi-homologue » de GMAP-210. L'équipe de Sean Munro avait clairement démontré que Rud3p est recruté au niveau de l'appareil de Golgi et que ce recrutement dépendait de l'extrémité C-terminale et non pas de la partie coiled-coil de la protéine (Gillingham et al., 2004). De plus, des expériences de « pull-down » montraient que le domaine C-terminal de Rud3p interagit avec la petite protéine G Arf1 dans sa conformation active (GTP). Mon premier objectif a donc été de tester si l'extrémité C-terminale de GMAP-210 interagissait avec Arf1GTP. Il faut noter que cette interaction n'avait pas pu être observée par l'équipe de Sean Munro, qui suggéra d'ailleurs pour expliquer ce résultat négatif que d'autres partenaires protéiques étaient requis pour le recrutement de cette extrémité aux membranes. Cette interprétation n'était cependant guère satisfaisante compte tenu d'une part de la similarité de séquence des domaines C-terminaux de Rud3p et de GMAP-210 (cf. figure 31) et d'autre part de leur localisation golgienne.

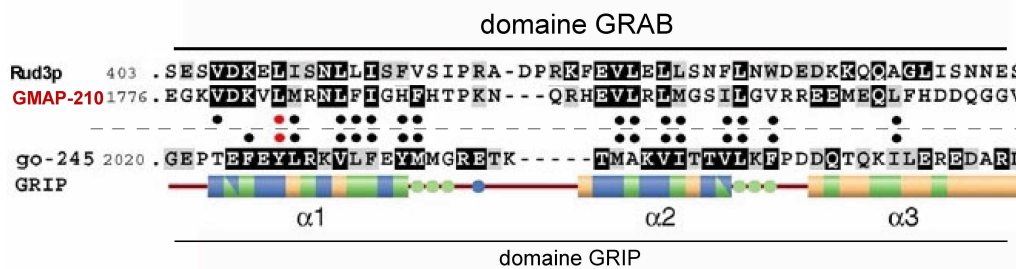


Figure 31 : Alignements du présumé domaine GRAB de Rud3p et GMAP-210 avec le domaine GRIP de la golgine-245 (d'après (Gillingham et al., 2004))

L'idée directrice que j'ai suivie a été qu'il existe bien une interaction directe entre la partie C-terminale de GMAP-210 et Arf1GTP, mais que cette interaction repose également sur l'interaction de chaque protéine avec la membrane. Bref, il fallait définir précisément les constructions et notamment inclure éventuellement des régions flexibles pouvant interagir

avec les membranes. Par ailleurs, le point clé était de réaliser des expériences non pas en solution mais sur liposomes.

J'ai construit deux formes de la partie C-terminale de GMAP-210. La première comprend les acides aminés 1597 à 1830, la seconde, 1597-1843, est très légèrement plus étendue. Ces constructions sont dépourvues des 150 derniers aminés de GMAP-210 qui sont absents dans Rud3p et qui posent des problèmes de solubilité lors de leur purification. Les deux constructions comprennent environ 200 acides aminés en coiled coil en amont de la région commune à Rud3p, appelée domaine GRAB, et correspondant à un domaine présumé d'interaction avec Arf1. Je présenterai ce domaine plus en détail dans le modèle final d'interaction entre Arf1 et GMAP-210. Ce qu'il faut noter ici est que la construction [1597-1830] s'arrête précisément à la fin du domaine GRAB alors que la construction [1597-1843] comprend quelques acides aminés supplémentaires qui m'ont particulièrement intéressé car ils semblaient pouvoir former une hélice amphipathique (cf. figure 32).

L'interaction des deux constructions avec Arf1 a été testée par des expériences de flottaison sur liposomes de composition proche de celle des vésicules golgiennes. Le principe est d'incuber les liposomes avec Arf1, avec une quantité stœchiométrique de la construction GMAP-210 et avec un nucléotide en excès (GDP ou GTP) pour forcer Arf1 à acquérir la conformation voulue. Un excès de sucrose est alors mélangé à la solution qui est ensuite recouverte de deux coussins de plus faible densité. Comme l'intérieur des liposomes ne contient pas de sucrose, ceux-ci flottent au dessus des différentes couches de solution après ultracentrifugation. En récupérant différentes fractions depuis le fond jusqu'au sommet des tubes, on peut alors séparer les protéines libres des protéines associées aux liposomes et observer cette partition sur gel polyacrylamide dénaturant (sodium dodécyl sulfate). La figure 28 montre le résultat très tranché que j'ai observé pour les deux constructions de la partie C-terminale de GMAP-210. La forme [1597-1830] reste soluble quelles que soient les conditions alors que la forme [1597-1843] est recrutée de façon stœchiométrique sur les liposomes par la forme GTP d'Arf1. Autrement dit, les treize acides aminés en aval du domaine GRAB semblent clé pour l'interaction de ce domaine avec Arf1GTP sur membrane.

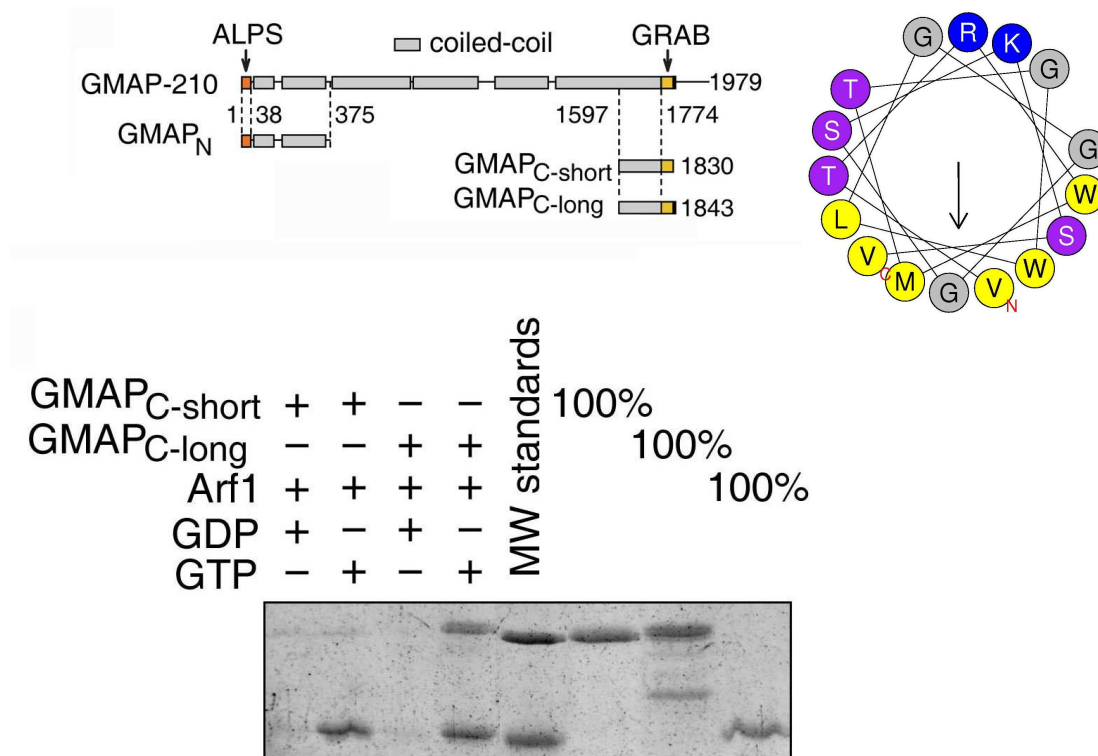


Figure 32 : Schéma des différentes constructions de GMAP-210 utilisées pour la caractérisation biochimique des extrémités et représentation en alpha hélice de la séquence [1830-1843] et représentation en hélice alpha de la séquence [1830-1843]. Flottaisons de l'extrémité C-terminale contenant ou non l'hélice amphipathique (respectivement « GMAP_{C-long} » [1830-1843] et GMAP_{C-short} [1597-1830]) en présence d'Arf1GDP ou Arf1GTP.

Pour expliquer la forte différence entre les constructions [1597-1830] et [1597-1843], deux hypothèses pouvaient être envisagées. La première était que les treize derniers acides aminés de la construction interagissent directement avec Arf1. La seconde qui avait ma préférence était que ces acides aminés forment une hélice amphipathique qui interagit directement avec la membrane. Arf1GTP étant périmembranaire, il semblait en effet avantageux que son partenaire protéique, ici GMAP-210, soit lui-même en interaction avec la membrane.

Pour tester si l'hélice amphipathique en aval du domaine GRAB contacte directement la membrane lipidique, j'ai marqué cette hélice amphipathique avec un fluorophore NBD extrêmement sensible à l'environnement membranaire. Le marquage a été fait sur un mutant de GMAP-210 dans lequel la thréonine en position 1829, c'est-à-dire entre la fin de la troisième hélice du motif GRAB et le début de l'hélice amphipathique, a été remplacée par une cystéine (cf. figure 33 A). La seule cystéine naturelle de la construction [1597-1843] a été mutée en sérine afin d'avoir un marquage spécifique. J'avais construit initialement un mutant

possédant une autre cystéine en aval de l'hélice (T1844C) mais cette mutation engendrait de la protéolyse de la protéine. Les figures 33 B et C montrent le gel de la protéine marquée ainsi que le spectre d'absorption UV-visible qui indique un marquage à 100% de la protéine.

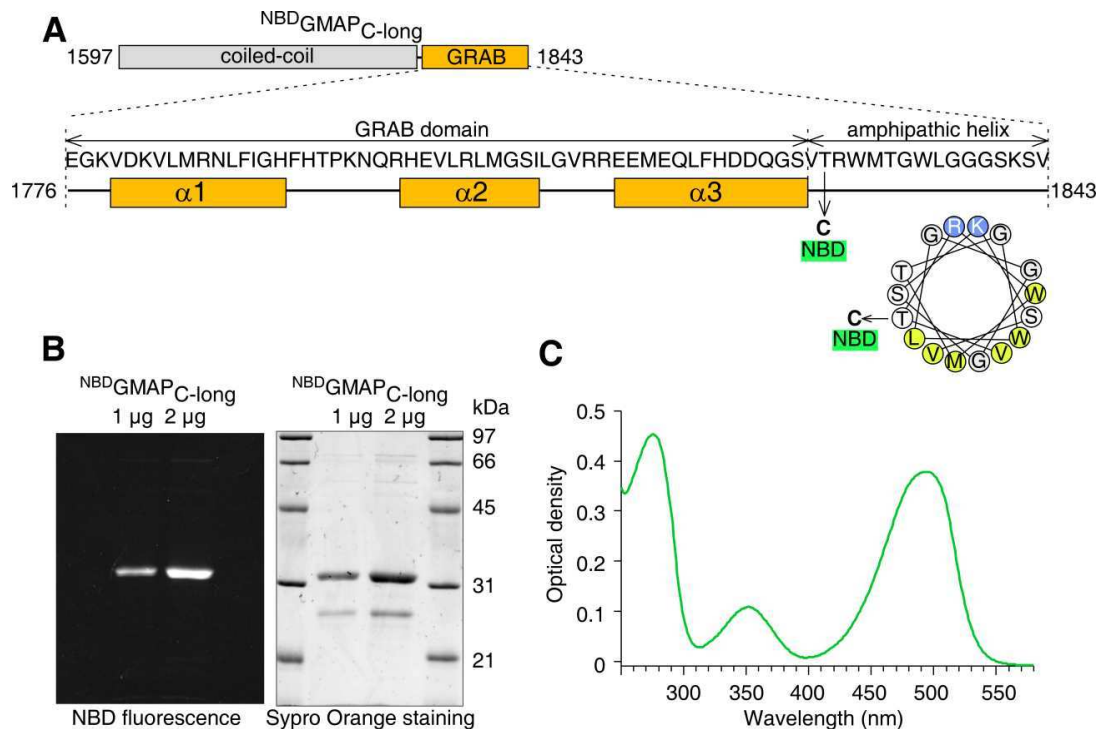


Figure 33 : Marquage de la cystéine 1830 positionnée en aval du motif GRAB. Quantification sur gel et spectroscopie du ratio de protéines marquées.

J'ai ensuite réalisé des expériences de fluorescence. Comme dans les expériences de flottaison, la construction est mélangée avec des liposomes et Arf1. En mesurant la fluorescence du NBD, j'ai observé que celle-ci augmentait lorsqu'Arf1 basculait à l'état GTP (cf. figure 34A). Notons que l'activation d'Arf1 se fait, en l'absence de facteur d'échange, par la chélation du magnésium d'Arf1 par l'EDTA en présence d'un excès de GTP. De plus, les spectres d'émission de GMAP-210 marqué au NBD avant et après activation d'Arf1 montrent un « blueshift » (un décalage du maximum d'émission vers le bleu). Ces deux observations, augmentation de fluorescence et blueshift, indiquent que la région marquée rencontre la membrane (cf. figure 34C). Enfin, l'amplitude de la fluorescence NBD augmente avec la concentration d'Arf1 d'une façon qui suggère une interaction stœchiométrique entre Arf1 et GMAP-210 (cf. figure 34B). Nous avons également montré que la vitesse apparente d'activation d'Arf1 est conservée en présence ou en absence de GMAP-210, GMAP-210 n'a donc pas d'effet sur l'échange GDP/GTP de la petite protéine G.

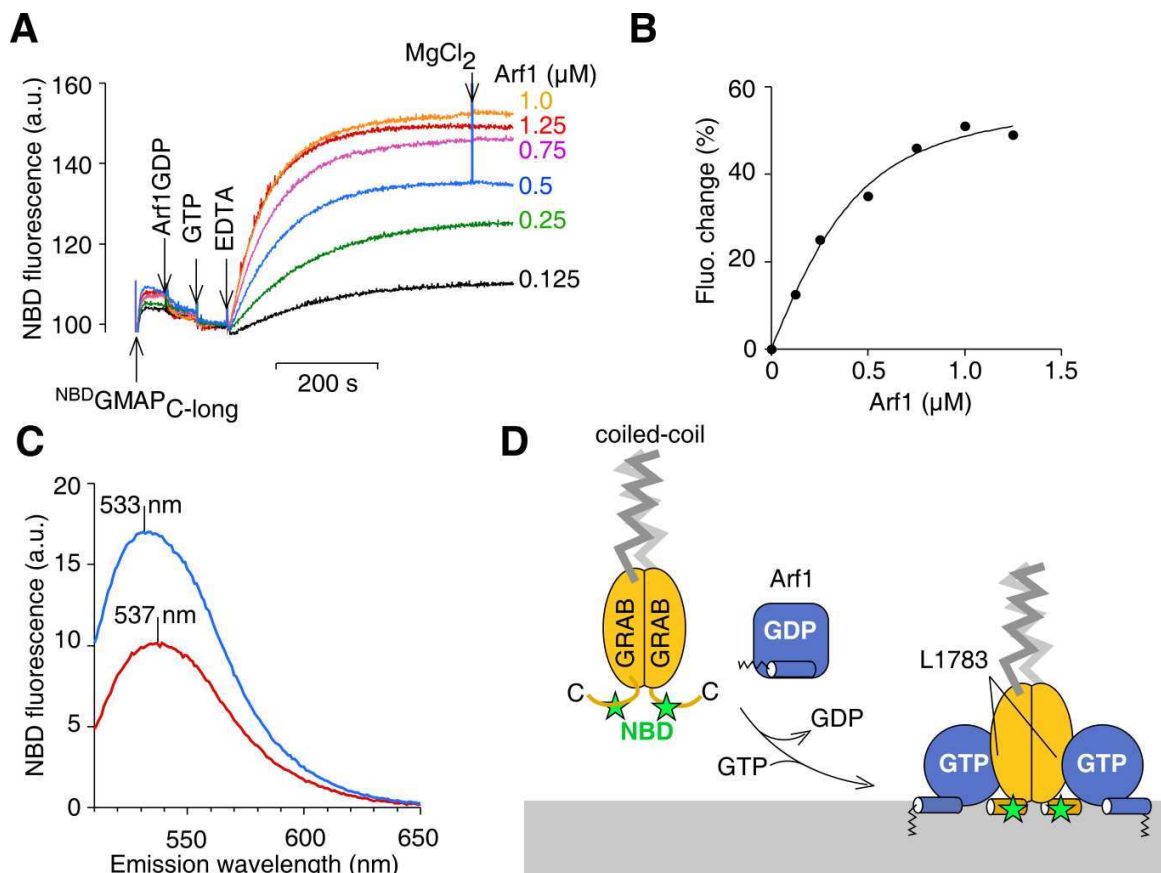


Figure 34 : Suivi par fluorescence NBD des cinétiques de recrutement de GMAP Cter NBD en fonction de la concentration d'Arf1 (A) et représentation du pourcentage d'augmentation de fluorescence en fonction de la concentration d'Arf1 (B). Spectre de GMAP Cter NBD en présence d'Arf1 GDP (spectre rouge) ou d'Arf1 GTP (spectre bleu) (C). Modèle de l'interaction (D).

L'ensemble de mes résultats aboutit à un modèle d'interaction entre la région C-terminale de GMAP-210 et Arf1GTP sur des membranes qui est décrit dans la figure 30D. Dans ce modèle, les deux protéines interagissent chacune avec la membrane via une hélice amphipathique : dans le cas d'Arf il s'agit bien sûr de l'hélice myristylée N-terminale alors que dans le cas du domaine GRAB, il s'agit de la petite hélice en aval du domaine que j'avais identifiée dans la séquence. Ces deux interactions facilitent le positionnement et le contact entre le domaine GRAB et Arf1GTP. En l'absence de données structurales, ce dernier contact n'est pas bien connu. Néanmoins, je vais décrire ici un modèle plausible qui repose sur le fait que le domaine GRAB (GRIP Related Arf binding protein) a été défini par analogie structurale avec un autre motif bien mieux caractérisé, le domaine GRIP.

Le domaine GRIP est présent à l'extrémité C-terminale d'autres golgines et reconnaît spécifiquement Arl1GTP, une petite protéine G assez voisine d'Arf1 et localisée au trans-Golgi. Des études cristallographiques ont montré que le complexe entre Arl1GTP et le domaine GRIP est une dyade (cf. figure 35). Le domaine GRIP homodimérique est constitué de 3 hélices alpha présentant une face hydrophobe assurant l'interface entre les 2 monomères. De part et d'autre de l'homodimère, une protéine G Arl1 accueille dans une poche hydrophobe bien définie une tyrosine du monomère pointant vers l'extérieur. (Panic et al., 2003) (Wu et al., 2004). La mutation de la tyrosine du motif GRIP en alanine inhibe l'interaction avec la petite protéine G Arl1, et par conséquent provoque la redistribution de la protéine dans le cytosol.

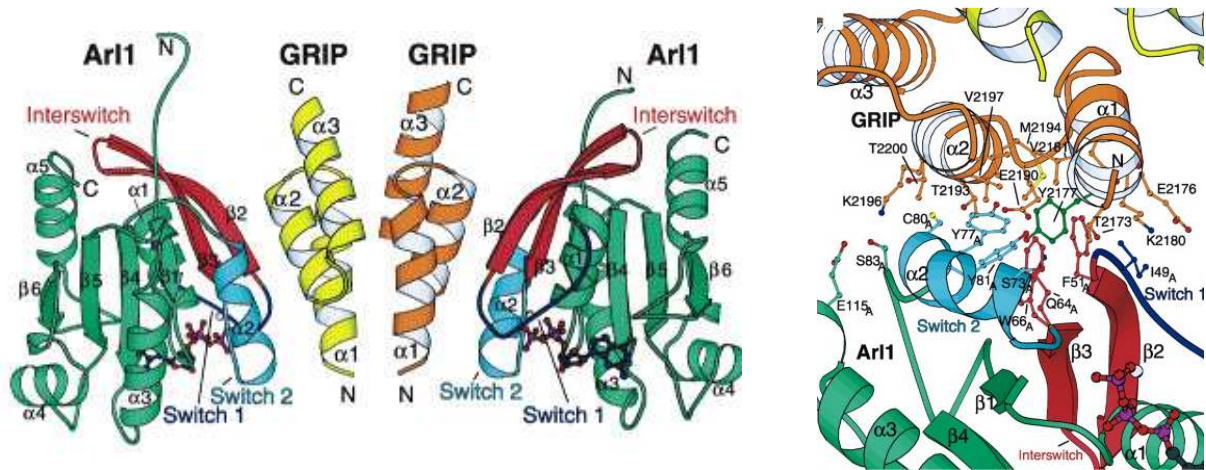


Figure 35: Structure du domaine GRIP (co-cristal GRIP Arl1) et mise en évidence de la reconnaissance de la tyrosine (Y2177 en vert) de GRIP par une poche d'Arl1. (Panic et al., 2003)

Les alignements de séquence révèlent que la tyrosine (Y2177) du motif GRIP correspondrait à une leucine dans le motif GRAB de Rud3p (L410) et de GMAP-210 (L1783) (cf. figure 31). Or, la mutation de la leucine en alanine provoque *in vivo* la perte de la localisation cis-golgienne des protéines. J'ai construit et purifié le même mutant et observé qu'il n'interagit plus avec Arf1GTP sur liposomes (non montré). L'ensemble de ces observations suggère donc que malgré une modeste similarité des séquences, le domaine GRAB interagit avec Arf1 de façon similaire à l'interaction du domaine GRIP avec Arl1.

Notons que dans le cas des domaines GRIP de certains golgines, des acides aminés hydrophobes en aval du domaine sont également important pour ancrer ces protéines aux membranes en présence d'Arl1GTP (Lu et al., 2006). Cependant ces séquences ne semblent pas former des hélices amphipathiques. Enfin, remarquons que l'hélice en aval du domaine

GRAB de GMAP-210 a une nette face hydrophobe et une face polaire peu chargée (seulement 2 résidus basiques). En raison du nombre élevé de résidus hydroxylés dans sa face polaire, l'hélice avait été identifiée comme putatif motif ALPS par le programme Heliquist. C'est un faux positif : le domaine C-terminal ne peut être recruté à des membranes dépourvues d'Arf1 fortement courbées (non montré). Cette hélice ne suffit donc pas à une liaison aux membranes mais elle agit de concert avec l'interaction GRAB/Arf1.

Pour conclure, l'ancrage de l'extrémité C-terminale de GMAP-210 repose donc sur une synergie d'interactions protéine/protéine (GRAB/Arf1) et protéine/lipides (hélice/membrane).

2) Rôle de la courbure membranaire sur la stabilité de l'interaction entre GMAP-210 et Arf1GTP

Les expériences précédentes ont montré que le recrutement de l'extrémité C-terminale de GMAP-210 aux membranes est strictement dépendant de la forme GTP d'Arf1. Par conséquent, l'hydrolyse du GTP d'Arf1 pouvait être un mécanisme de contrôle de cette interaction. J'ai donc cherché à savoir si ArfGAP1 pouvait hydrolyser le GTP d'Arf1 complexé à GMAP-210.

Pour suivre l'attachement puis le détachement du complexe au cours du cycle GDP/GTP d'Arf1, j'ai utilisé le mutant fluorescent NBD de GMAP-210. Dans un premier temps, GMAP-210 C-terminal est recruté par Arf1GTP sur des liposomes puis à l'issue de la cinétique d'activation, ArfGAP1 est ajouté à la réaction (cf. figure 36A). ArfGAP1 provoque une réversion totale du signal NBD montrant une dissociation complète de GMAP-210 et suggérant donc une hydrolyse efficace du GTP d'Arf1 dans ces conditions.

A partir de ce résultat positif, j'ai étudié l'effet de la courbure membranaire sur la réaction. En effet, comme je l'ai expliqué plus haut, ArfGAP1 est la première protéine dans laquelle un motif senseur de courbure de type ALPS avait été décrit. Si ArfGAP1 conservait cette propriété vis-à-vis du complexe Arf1/GMAP-210, alors cela signifierait que la courbure membranaire contrôlerait l'interaction avec la membrane non seulement de la région N-terminale de GMAP-210 mais également de la région C-terminale. De façon très intéressante, l'effet fonctionnel de la courbure membranaire serait opposé : dans le premier cas, la courbure membranaire favorise positivement l'interaction du motif ALPS de GMAP-210 avec la

membrane. Dans le second cas, l'effet serait indirect et négatif : ArfGAP1, par ses motifs ALPS et son activité GAP, détacherait l'extrémité C-terminale de GMAP-210 de membranes courbées.

J'ai mesuré la vitesse de dissociation de l'extrémité C-terminale de GMAP-210 de la membrane en fonction du rayon de courbure des liposomes. La réduction du rayon des liposomes de 85 à 35 nm augmente la vitesse de désorption de GMAP-210 d'un facteur 100 (cf. figure 36B). Ceci signifie donc que la stabilité du complexe Arf1-GMAP-210 est indirectement dépendante de la courbure de la membrane. Compte tenu de la différence de cinétique entre membrane courbe, par exemple une vésicule, et membrane plane, par exemple une citerne golgienne, le complexe perdurera uniquement sur les membranes planes.

Enfin, pour montrer de façon qualitative que l'extrémité C-terminale de GMAP-210 a une régulation par la courbure membranaire opposée à celle de l'extrémité N-terminale, j'ai réalisé une expérience de flottaison comparée des deux extrémités de GMAP-210 sur liposomes de différents rayons. Le gel SDS montre très clairement que l'extrémité N-terminale possédant l'ALPS se lie spécifiquement aux membranes présentant un fort rayon de courbure, alors que l'extrémité C-terminale, en présence d'Arf1GTP et d'ArfGAP1 n'est trouvée stablement associée qu'aux liposomes présentant un faible rayon de courbure (cf. figure 36C).

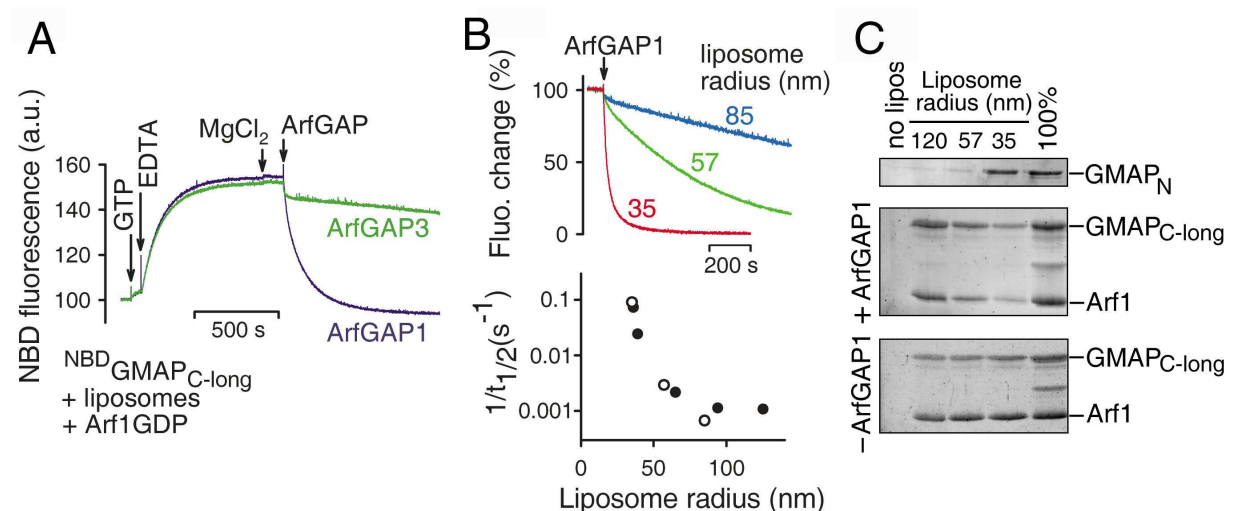


Figure 36 : A) Suivi par fluorescence NBD de la désorption de l'extrémité C-terminale de GMAP-210 de la membrane par ArfGAP1 ou ArfGAP3. B) Quantification de la vitesse de détachement de la membrane en fonction du rayon de courbure des liposomes. C) Gels de flottaison de l'extrémité N-terminale et C-terminale (en présence d'Arf1, avec ou sans ArfGAP1) de GMAP-210 en fonction de la courbure membranaire.

En conclusion, l'étude biochimique des deux extrémités de GMAP-210 permet de proposer un modèle minimal d'attachement de deux membranes par cette corde : celle-ci, en présence d'ArfGAP1, unirait de façon hétérotypique des membranes courbes à des membranes plates couvertes d'Arf1GTP (cf. figure 37). La situation cellulaire correspondante à ce schéma minimal serait assez proche de ce qui a été observé en microscopie électronique : des vésicules de transport liées aux citernes golgiennes par des fibres souples.

Notons que ce système de connexion de membranes par GMAP-210 repose sur un grand nombre d'hélices amphipathiques, à savoir les hélices de type ALPS à l'extrémité N-terminale, l'hélice amphipathique en aval du domaine GRAB de GMAP-210, l'hélice amphipathique d'Arf1GTP et enfin l'hélice ALPS d'ArfGAP1 (cf. figure 37).

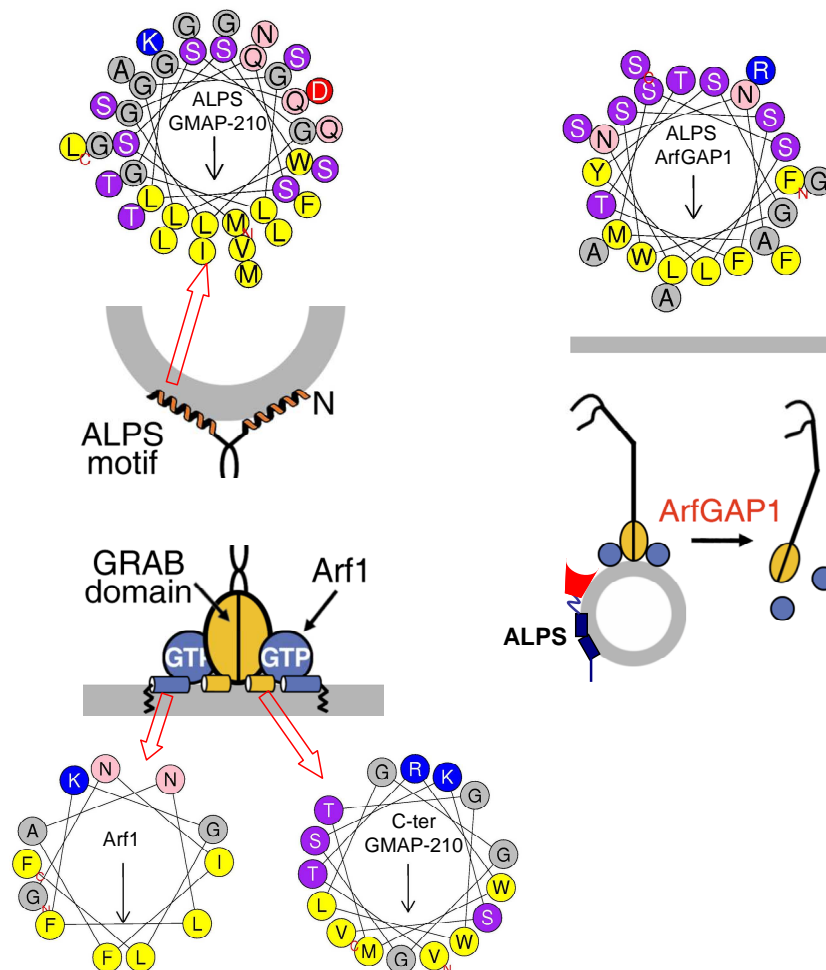


Figure 37: L'attachement asymétrique par GMAP-210 de membranes courbées à des membranes planes recouvertes d'Arf1GTP repose sur 4 types d'hélices amphipathiques : l'hélice ALPS de GMAP-210, l'hélice en aval du domaine GRAB, l'hélice d'Arf et l'hélice ALPS1 d'ArfGAP1.

3) Démonstration des capacités de connexion hétérotypique de GMAP-210

Dans ce paragraphe, je vais présenter les approches originales que Guillaume Drin a utilisées pour démontrer que GMAP-210 lie de façon asymétrique des membranes courbées à des membranes planes. Il s'est appuyé sur trois techniques : la diffusion dynamique de la lumière (DLS), la microscopie optique et la microscopie électronique. Avec mes propres mesures sur l'extrémité C-terminale que j'ai détaillées ci-dessus, l'ensemble forme le cœur de la publication jointe en annexe (Drin et al., 2008).

Pour reconstituer l'attachement de deux membranes par la corde GMAP-210, il fallait évidemment utiliser une protéine possédant des extrémités N- et C- terminales fonctionnelles. Pour des raisons d'expression et de purification, la protéine GMAP-210 utilisée pour cette étude est une forme raccourcie, déléetée d'une grande partie du coiled-coil. Cette « minigolgine » correspond en fait à la mise bout-à-bout des extrémités N-terminale et C-terminale utilisée en biochimie ([1-375] et [1597-1843]). Jean-François Casella a montré que cette forme raccourcie de GMAP-210, transfectée dans les cellules, induit le même le phénotype de dislocation de l'appareil de Golgi que la forme entière.

L'une des démonstrations repose sur l'utilisation en microscopie optique de liposomes géants (quelques microns de rayon) contenant un fluorophore vert et de petits liposomes (30nm de rayon) contenant un fluorophore rouge. En présence d'Arf1, de GTP, du facteur d'échange d'Arf1 (ARNO), de GMAP-210 et d'ArfGAP1, les petits liposomes rouges sont recrutés à la surface du liposome géant vert (cf. figure 38). Tous ces éléments sont indispensables à cette connexion ordonnée. En particulier, omettre ArfGAP1 conduit à la formation de petits agrégats entre les petits liposomes rouges. En effet, dans ces conditions, Arf1GTP est distribué sur toutes les membranes et non pas présent sur les seuls gros liposomes. Dès lors, la corde peut unir les petits liposomes entre eux. Il est à noter que très peu de molécules de GMAP-210 sont nécessaires à la réaction ; il a été estimé que 10 à 15 molécules par liposome suffisent à induire la connexion hétérotypique. La microscopie électronique montre que les petits liposomes forment le ciment entre les gros liposomes (cf. figure 38). Enfin, cette agrégation est réversible et ne conduit pas à la fusion des liposomes car l'addition du mutant d'ArfGAP1 non sensible à la courbure (par conséquent capable d'attaquer aussi Arf1 situé sur les gros liposomes) provoque la dissociation des liposomes.

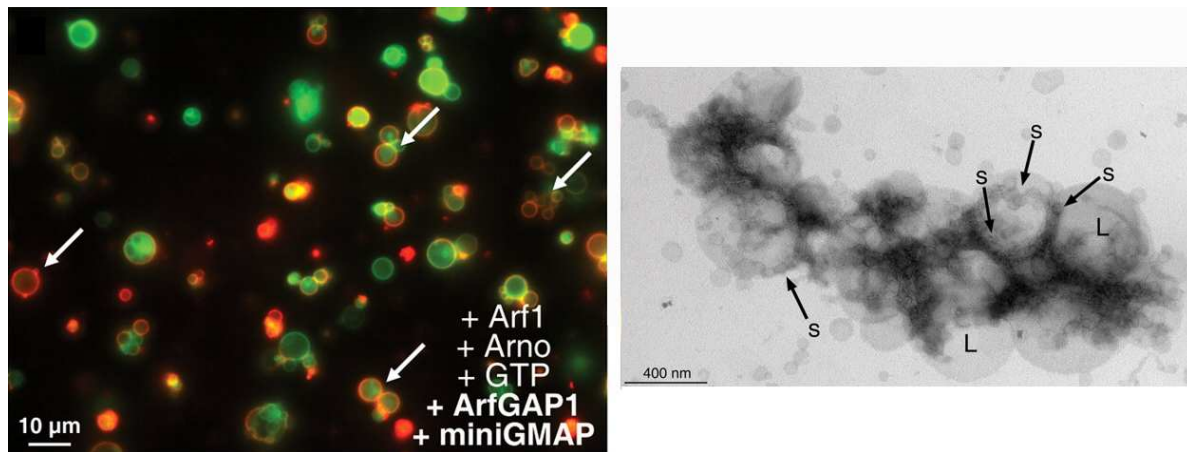


Figure 38: Microscopie optique de liposomes géants verts entourés de très petits liposomes rouges en présence d'Arf1, son facteur d'échange, GMAP-210 et ArfGAP1. Microscopie électronique d'un assemblage de gros (L) et petits (S) liposomes par GMAP-210.

4) Questions sur le modèle

Dans cette partie, je vais aborder différents points sur le fonctionnement de GMAP-210 en cherchant à replacer de façon critique notre modèle dans un contexte plus général. Il faut bien sûr noter que notre modèle repose essentiellement sur des expériences *in vitro*. Néanmoins, confrontées à des résultats de biologie cellulaire déjà publiés, les grandes lignes du modèle semblent pertinentes.

Pertinence des interactions décrites

GMAP-210 possède, en l'état des connaissances, le mécanisme de « tethering » le plus simple. Cette très longue corde d'environ 200 nanomètres relie de façon asymétrique et réversible des membranes planes recouvertes d'Arf1GTP à des membranes courbes. L'extrémité C-terminale est un homodimère, chaque monomère interagit avec Arf1GTP. Le domaine GRAB qui permet cette interaction est prolongé par une petite hélice amphipathique qui, en interagissant avec la membrane, contribue au mécanisme d'ancrage. A l'autre extrémité de la corde, se trouvent deux motifs ALPS d'une quarantaine de résidus. Ces hélices, dont la face polaire est dépourvue de résidus chargés et singulièrement enrichie en résidus hydroxylés et en glycine, permettent la liaison à des membranes très courbées à la surface desquelles elles se structurent. ArfGAP1 joue un rôle déterminant dans la connexion asymétrique des membranes. En effet, ArfGAP1 empêche l'interaction du C-terminal de

GMAP-210 avec Arf1 sur des membranes courbées. GMAP-210 lie ainsi vectoriellement des membranes courbées à des membranes planes recouvertes d'Arf1.

Les études de biologie cellulaire vont de pair avec les fonctions proposées des extrémités. En effet, si les deux extrémités sont localisées au niveau de l'appareil de Golgi, leur comportement est néanmoins différent. La surexpression de l'extrémité N-terminale de GMAP-210 dans des cellules HeLa entraîne l'agrégation de vésicules. Une démonstration particulièrement convaincante est l'expression de cette extrémité de GMAP-210 dans des cellules qui en sont dépourvues, à savoir des levures. Cathy Jackson a montré que la surexpression induit la formation d'un amas de vésicules parfaitement homogènes (données non publiées).

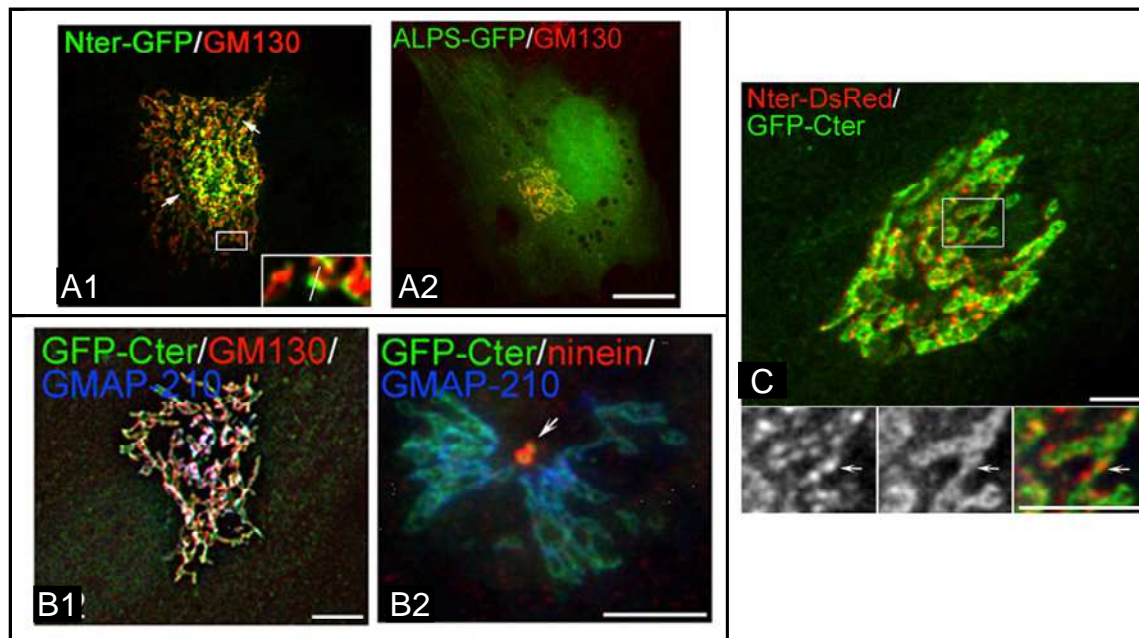


Figure 39 : Colocalisation de l'extrémité N-terminale de GMAP-210 : [1-375] (N-ter GFP) et [1-38] (ALPS GFP) avec GM-130, un marqueur cis-golgien (A1 et A2). Colocalisation de l'extrémité C-terminale [1778-1979] (GFP-Cter) avec GM-130 et la ninéine un marqueur centrosomal (B1 et B2). Localisation comparée des deux extrémités de GMAP-210 (C) (Cardenas et al., 2009)

Lors de la révision du manuscrit, l'équipe de Rosa M. Rios a publié un article sur l'aspect cellulaire du fonctionnement des deux extrémités de GMAP-210 dans BMC Biology (Cardenas et al., 2009) (cf. figure 39). Cette étude montre très clairement que les extrémités N- et C-terminales sont toutes deux associées à l'appareil de Golgi, au niveau des citernes cis. Leur localisation présente néanmoins des différences, le marquage de l'extrémité N-terminale apparaît sous forme de spots alors que celui de l'extrémité C-terminale est plus homogène. En

utilisant différentes constructions du N-terminal, il est démontré que la localisation golgienne dépend de l'ALPS. Par ailleurs, cette publication explicite très clairement que le domaine C-terminal de GMAP-210 est recruté à la surface de l'appareil de Golgi par Arf1 et interagit avec le centrosome. En effet, la brefeldine A redistribue l'extrémité C-terminale de GMAP-210 dans le cytosol mais il persiste un marquage de cette extrémité au niveau du centrosome.

Spécificité d'interaction de l'extrémité C-terminale

Nous avons vu que la spécificité d'interaction du C-terminal de GMAP-210 est limitée *in vitro*. Ce domaine est capable de lier Arf6, une petite protéine G spécifique de la membrane plasmique. Il se peut qu'à l'interaction avec Arf1GTP, s'ajoutent des interactions avec d'autres protéines. Nous savons par exemple que la golgine GCC185, qui interagit avec Arl1 via un domaine GRIP, possède un deuxième site de liaison à une autre protéine G (Burguete et al., 2008). La structure cristallographique montre que cinq tours de coiled-coil en amont du domaine GRIP interagissent spécifiquement avec Rab6GTP (cf. figure 40). Cette interaction est rendue possible par la longue queue hypervariable caractéristique des protéines Rab qui leur permet de « flotter » à quelques nanomètres au dessus de la membrane. Cette découverte a montré que le coiled-coil des golgines n'est pas une structure inerte et que des interactions spécifiques sont possibles.

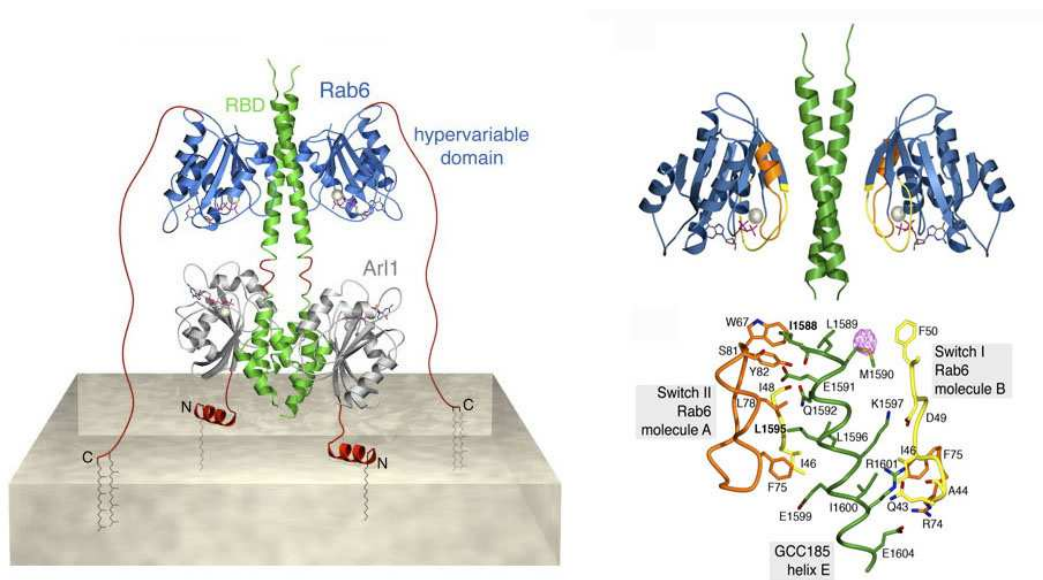


Figure 40 : Double ancrage de la golgine GCC185 à la membrane par Arl1 et Rab6. Mise en évidence de l'interaction entre 5 tours de coiled-coil et les switch de Rab6. (Burguete et al., 2008)

Sean Munro a mis en évidence que l'homologue de GMAP-210 dans la Drosophile possède un site d'interaction avec Rab2 (Sinka et al., 2008). Rab2 est localisée au niveau de

l'appareil de Golgi et, est impliquée dans le transport rétrograde entre le réticulum et l'appareil de Golgi. A la différence de GCC185, le site d'interaction correspond à une section du coiled-coil éloignée du motif GRAB. Dès lors, se pose le problème de la compatibilité d'interaction entre GMAP-210, Arf1 et Rab2 et la membrane. Il se peut que l'extrémité C-terminale de GMAP-210 interagisse avec des protéines G situées sur des membranes différentes. D'une façon générale, il semble que la plupart des golgines possèdent des sites d'interaction à des protéines Rab. La cartographie des différents sites montre que certaines golgines en possèdent tout le long de leur coiled-coil. Munro émet l'hypothèse d'un appareil de Golgi tentaculaire avec ces cordes capturant sélectivement les membranes étiquetées par des protéines G Rab spécifiques de l'appareil de Golgi. Toutes les structures dépourvues de ces protéines Rab seraient exclues de l'environnement golgien. Ceci pourrait expliquer pourquoi par exemple aucun ribosome, pourtant de taille moindre que les vésicules en transit, n'y est localisé.

Régulation par ArfGAP1

En grande partie, notre modèle repose sur l'effet d'ArfGAP1 sur l'attachement de la région C-terminale de GMAP-210. Or, il existe de nombreuses ArfGAP qui pour la plupart ne sont pas sensibles à la courbure mais qui contrôlent l'interaction de petites protéines G de type Arf1 avec différents effecteurs. Il peut donc paraître arbitraire de considérer que seul ArfGAP1 contrôle notre système. Néanmoins, plusieurs observations suggèrent qu'ArfGAP1 détermine la régulation de GMAP-210. D'abord, les protéines ArfGAP au niveau du cis-Golgi (où agit GMAP-210) ne sont pas si nombreuses. On en compte trois : ArfGAP1 avec ses motifs ALPS et deux protéines très similaires appelées ArfGAP2 et ArfGAP3. En parallèle à mon étude, Joëlle Bigay a étudié ArfGAP3 et montré que cette protéine est non pas régulée par la courbure membranaire mais par le manteau COPI. Une concentration catalytique de coatomer suffit à activer la protéine. Pour ma part, j'ai observé qu'ArfGAP3 est inefficace sur le complexe Arf1/GMAP-210 (cf. figure 32A). L'ensemble de ces résultats suggère que contrairement à ArfGAP3, spécifique du système COPI, ArfGAP1 a un spectre d'action assez large sur les différents complexes Arf/effecteur au niveau de l'appareil de Golgi. Il peut être aussi bien à l'origine de la dépolymérisation du manteau COPI que de la dissociation de GMAP-210 sur des membranes courbées. Un autre argument en faveur du rôle clé d'ArfGAP1 dans la régulation des cordes au niveau du Golgi est fourni par une étude de

l'homologue d'ArfGAP1 dans la levure, Gcs1p (Liu et al., 2005). Gcs1p régule l'interaction de la golgine Imh1p en contrôlant l'état nucléotidique de la petite protéine G Arf1 associée à cette corde.

Il semble qu'ArfGAP1 soit aussi bien capable d'agir *in vitro* sur Arf1 seul qu'engagé dans des complexes avec le coatomer ou GMAP-210. Pour autant, n'y a-t-il aucun effet de ces interactions sur la réaction d'hydrolyse ? Par ailleurs, Joëlle Bigay et Dan Cassel ont observé une légère stimulation d'ArfGAP1 par le coatomer, un autre effecteur d'Arf1. Pour répondre à cette question, j'ai effectué des expériences d'hydrolyse du GTP d'Arf1 à différentes concentrations de GMAP-210 C-terminal. Les résultats sont présentés dans la figure suivante (cf. figure 40). A la différence des expériences précédentes, la réaction d'hydrolyse est suivie par fluorescence des tryptophanes. Le signal est plus complexe puisqu'il concerne à la fois Arf1 dont la fluorescence change entre les formes GTP et GDP, et l'hélice amphipathique en aval de GMAP-210 dont la fluorescence dépend de son état soluble ou périmembranaire. Les différentes mesures montrent que l'augmentation de la concentration de l'extrémité C-terminale de GMAP-210 ralentit la vitesse d'hydrolyse du GTP d'Arf1. Néanmoins, à des concentrations saturantes de GMAP-210, la vitesse d'hydrolyse n'est pas nulle suggérant que ArfGAP1 est capable d'attaquer le GTP d'Arf1 complexé à GMAP-210 (cf. figure 41).

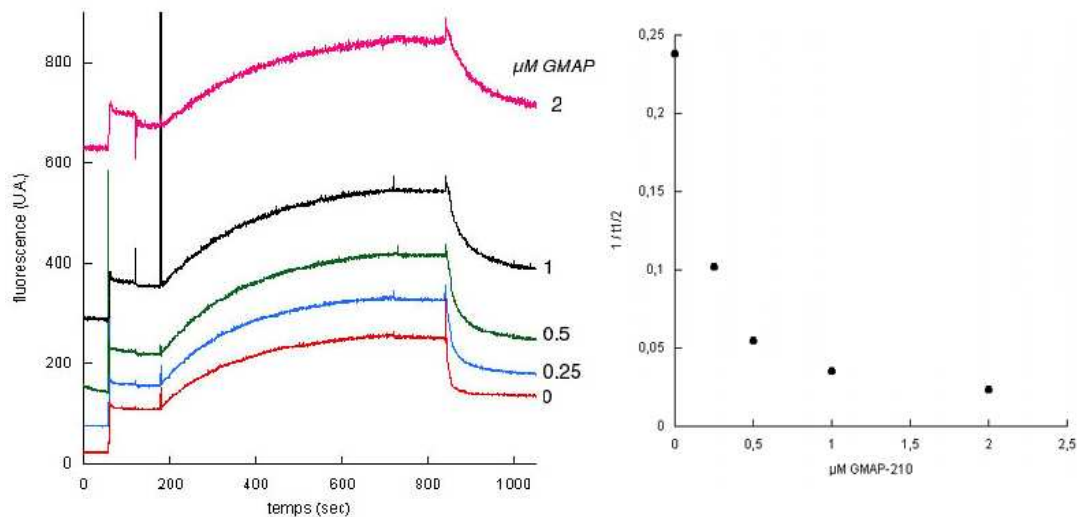


Figure 41 : Effet d'ArfGAP1 sur le complexe Arf1GTP/GMAP-210 suivant la concentration de GMAP-210. Les cinétiques d'assemblage et de désassemblage sont suivies par fluorescence du tryptophane (signal de bascule Arf1 GDP/GTP et de la partition de l'hélice amphipathique en aval du domaine GRAB de GMAP-210). La vitesse d'hydrolyse du GTP est représentée en fonction de la concentration de GMAP-210. C

Compatibilité avec les microtubules

Notre modèle est-il compatible avec le rôle, initialement proposé, de GMAP-210 dans le positionnement de l'appareil de Golgi autour du centrosome ? Clairement, notre modèle est indépendant de toute interaction avec les microtubules et le centrosome. Néanmoins, les deux fonctions ne sont pas incompatibles. En effet, en aval du motif d'interaction avec Arf1GTP, le domaine GRAB, se trouve une séquence de 150 acides aminés qui pourrait lier les microtubules et que nous avons délétée dans notre étude. De plus, des données récentes ont montré que la déplétion de GMAP-210 par ARN interférent provoque la réduction de la longueur des « stacks » golgiens et leurs dispersions (Yadav et al., 2009). Le phénotype est similaire à celui engendré par l'utilisation de nocodazole, un agent bloquant la polymérisation des microtubules. Sans doute, GMAP-210 participe au positionnement péricentrosomal de l'appareil de Golgi. D'autres études seront donc nécessaires à la compréhension du fonctionnement de la longue partie C-terminale de GMAP-210.

GMAP-210, évolution et diversité des golgines

Les golgines, dans leur ensemble, restent mystérieuses par l'absence de fonction définie d'une de leurs extrémités, généralement l'extrémité N-terminale. La golgine-245, par exemple, a un motif C-terminal GRIP d'interaction avec Arl1GTP localisé sur les citernes trans-golgiennes. En revanche aucune donnée, à ce jour, n'indique la fonction de l'extrémité N-terminale. De même, la protéine IMH1 qui possède également un domaine GRIP C-terminal n'a pas de fonction attribuée pour son extrémité N-terminale. Aucune interaction protéique n'a pu être révélée. J'ai testé la capacité du N-terminal de cette corde à lier des membranes lipidiques, de différentes compositions et différents rayons de courbure. Je n'ai observé aucune liaison *in vitro*.

Les alignements de séquence entre les différents homologues de GMAP-210 dans les différentes espèces depuis la levure (Rud3p) jusqu'à l'homme montrent que le motif ALPS à l'extrémité N-terminale n'est présent dans l'évolution qu'à partir de la drosophile. Il est difficile d'interpréter une telle évolution. Dans les espèces les moins évoluées, il se peut qu'un autre mécanisme permette le « tethering ». Globalement, plusieurs mécanismes permettent le recrutement des golgines à la surface des membranes lipidiques : un domaine transmembranaire, une association avec une protéine membranaire, une interaction avec une

petite protéine G ou directement avec les membranes lipidiques. La distribution spatiale des effecteurs au niveau de l'appareil de Golgi gouverne la localisation des golgines.

Historiquement, les golgines GM130 et p115 sont les mieux étudiées. GM130, recruté sur les citernes cis-golgiennes via la protéine GRASP-65 interagit avec la protéine p115 ancrée sur les vésicules de transport via la protéine G Rab1 (Barr et al., 1998) (Beard et al., 2005). La giantine, protéine transmembranaire présente sur les vésicules, interagit également avec le complexe GM130/p115. Ce système multipartite permet de connecter des vésicules venant du réticulum endoplasmique, marquées par la protéine G Rab1, aux citernes cis-golgiennes. Les golgines GM130 et p115 semblent également impliquées dans la fusion homotypique de vésicules et la connexion des différentes citernes golgiennes.

Autre système de « tethering »

Hormis ces cordes moléculaires, il existe un autre système de connexion des vésicules, il s'agit des complexes d'attachement à plusieurs sous unités (« multisubunit tethering complexes »). Ces protéines sont des multimères de haut poids moléculaire formant un fagot d'hélices dont les mécanismes d'assemblage sont mal connus. Il existe différents complexes avec leurs propres localisations subcellulaires (TRAPPI, COG au niveau de l'appareil de Golgi par exemple). A la différence des golgines, ces complexes protéiques ont un rôle dans le « tethering » à courte distance. Du fait de leurs structures très différentes de celles des golgines, je n'aborderai pas ces mécanismes.

Dans une deuxième partie de ma thèse, j'ai essayé par des approches biochimiques d'affiner notre modèle en me focalisant sur deux grandes questions : d'une part, la compatibilité entre le « tethering » de GMAP-210 et les phénomènes de bourgeonnement par les manteaux et d'autre part, la durée de vie des interactions entre GMAP-210 et les membranes.

VI Interactions GMAP-210 / membranes : durées de vie et compatibilité avec le manteau COPI

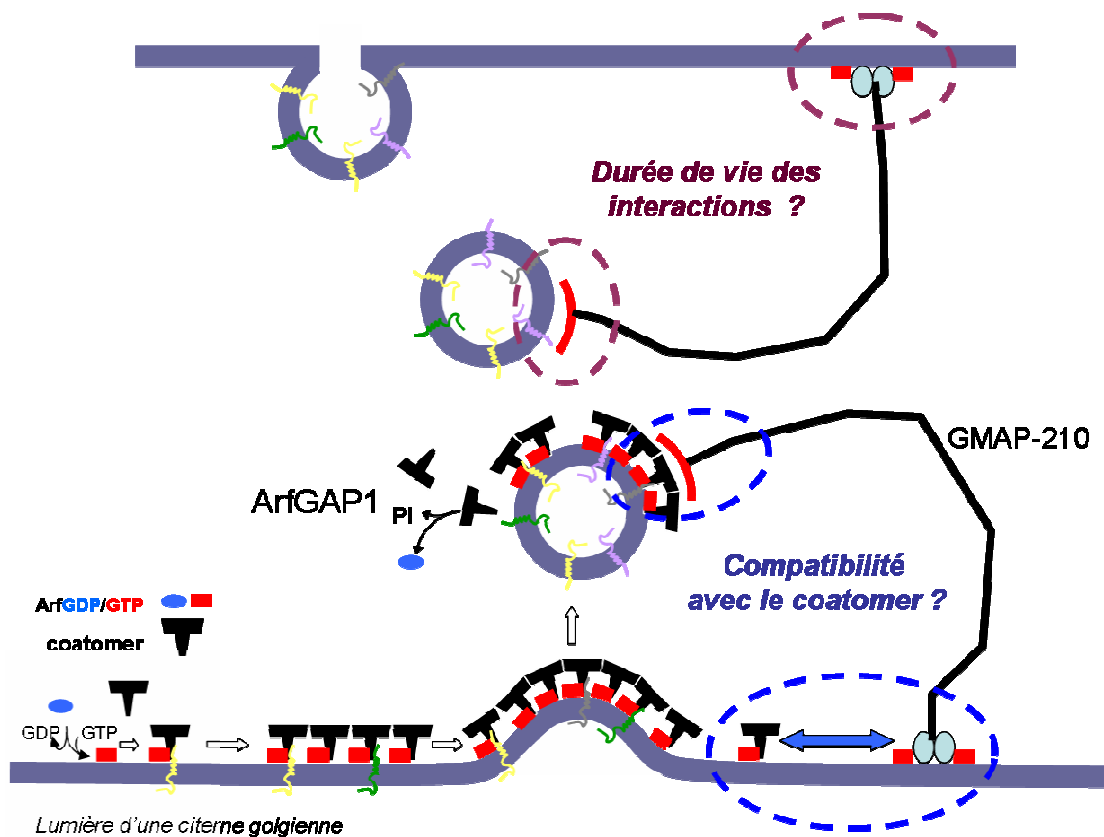


Figure 42: Schéma du bourgeonnement d'une vésicule COPI et de la capture d'une vésicule par GMAP-210. Mise en évidence des questions concernant la compatibilité de GMAP-210 avec le coatomer et de la durée de vie des interactions entre GMAP-210 et les membranes, ceci pour chacune des deux extrémités de la corde.

La figure ci-dessus reprend les grandes lignes de deux mécanismes ayant lieu au niveau de l'appareil de Golgi : premièrement le bourgeonnement de vésicules induit par Arf1 et le manteau COPI, et deuxièmement l'attachement de membranes planes et courbées par la corde GMAP-210. Ces deux mécanismes sont vraisemblablement interdépendants ce qui conduit à plusieurs questions.

Une première question concerne la compatibilité d'interaction d'Arf1 avec deux protéines. Arf1GTP est capable d'interagir avec l'extrémité C-terminale de GMAP-210 mais également de recruter le coatomer pour former des vésicules de transport COPI. Nous avons donc voulu savoir si ces deux interactions étaient exclusives.

Il était également important d'étudier la compatibilité entre le manteau COPI et l'autre extrémité de GMAP-210 : son motif ALPS N-terminal. La question revenait à savoir si GMAP-210 via son motif ALPS est capable de lier une membrane courbée encore recouverte de son coatomer. En d'autres termes, quand GMAP-210 prend-t-elle en charge la vésicule : dès son bourgeonnement de la membrane lorsqu'elle est encore couverte d'un manteau, ou ultérieurement après désassemblage de celui-ci ?

Un autre aspect m'a intéressé : l'aspect cinétique des différentes interactions proposées dans le modèle d'attachement membranaire par GMAP-210. Initialement, nous avons pensé que GMAP-210 était capable d'accompagner une vésicule pendant son trajet depuis sa naissance jusqu'à sa fusion avec un compartiment cible. Autrement dit, nous pensions que les interactions devaient perdurer pour que l'attachement soit efficace. Nous verrons que c'est un problème qui soulève des questions intéressantes sur le fonctionnement d'une corde.

1) Compatibilité entre les extrémités N- et C-terminales de GMAP-210 avec le coatomer

a) Extrémité C-terminale de GMAP-210

Pour étudier la compatibilité entre le manteau COPI, GMAP-210 et Arf1, nous avons utilisé la diffusion statique de la lumière. Cette technique permet de suivre le recrutement du manteau sur les liposomes, la diffusion augmentant lorsque le coatomer polymérise. La petite protéine G Arf1 est activée en présence de différentes concentrations de GMAP-210, puis le coatomer est ajouté. En présence de 0,1mM de liposomes et 0.5 μ M d'Arf1, l'augmentation de la concentration de GMAP-210 de 0 à 1 μ M bloque le recrutement du coatomer (cf. figure 43). Sans GMAP-210, le signal de polymérisation est maximal ; en présence de 1 μ M de GMAP-210, le signal est très faible. Le recrutement de GMAP-210 par Arf1 inhibe donc la liaison du coatomer, et ceci de façon dose dépendante.

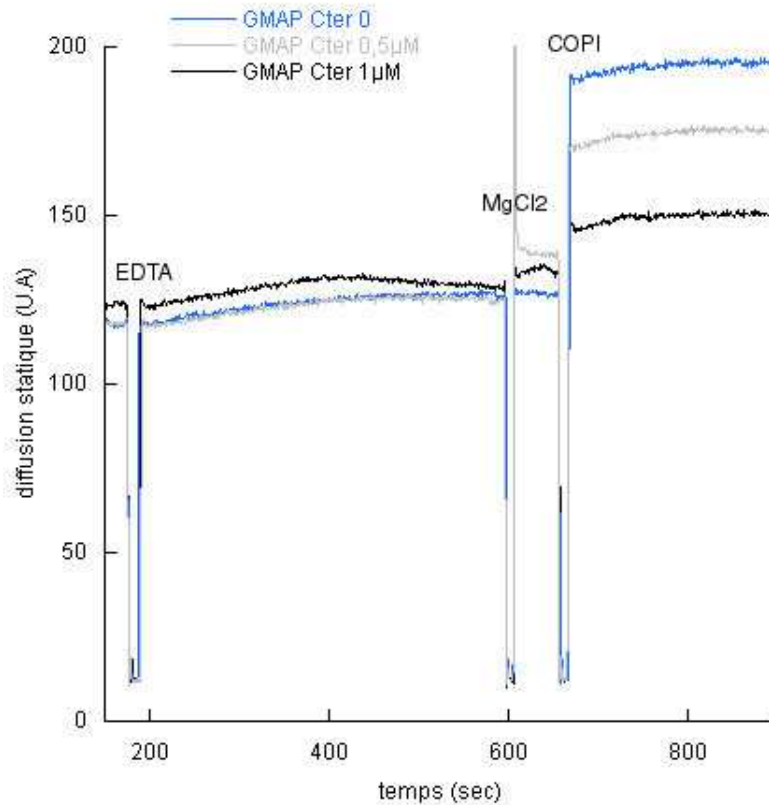


Figure 43 : Cinétique de recrutement du coatomer en présence de différentes concentrations de l'extrémité C-terminale de GMAP-210 (0 ; 0.5 μ M ; 1 μ M) préalablement recrutée à la membrane par Arf1

Le complexe Arf1-GMAP-210 exclue donc toute possibilité d'interaction avec le coatomer. Cette spécificité est très importante afin d'empêcher l'extrémité C-terminale de GMAP-210 de se retrouver sur un bourgeon. Plus surprenant, un liposome recouvert de manteau est dépolymérisé après addition du C-terminal de GMAP-210 (non montré). Ceci est probablement lié à la fixation moins solide du manteau à la membrane que dans une cellule. Néanmoins, ce phénomène confirme la compétition, Arf1GTP interagit avec soit GMAP-210 soit le coatomer.

b) Extrémité N-terminale de GMAP-210

La question de la capacité de l'ALPS de GMAP-210 à lier une vésicule encore recouverte de manteau est importante pour comprendre le fonctionnement spatio-temporel de la corde. Dans un cas, la corde serait à même de reconnaître une vésicule bourgeonnante, dans l'autre cas elle prendrait en charge la vésicule une fois déshabillée de son manteau.

J'ai utilisé différentes approches pour essayer de répondre à la question : par exemple des expériences de fluorescence NBD avec l'ALPS marqué au NBD incubé en présence de liposomes coâtés mais aussi de la microscopie électronique où des gros liposomes et des petits liposomes coâtés étaient incubés avec la « minigolgine ». Je présenterai un seul résultat figuré ci-dessous, qui provient d'une expérience de sédimentation.

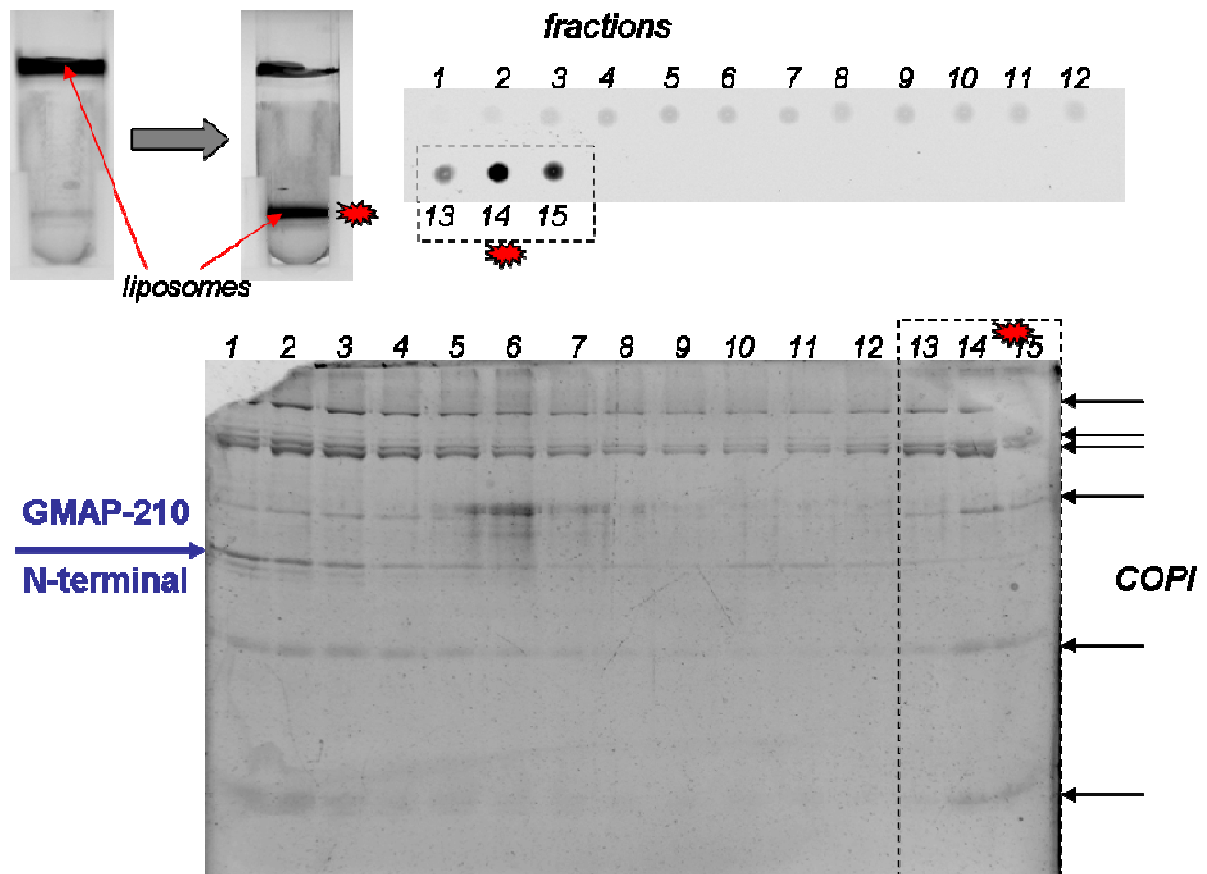


Figure 44 : Des liposomes coâtés sont incubés au sommet d'un coussin de sucrose et ultracentrifugés (notons qu'au sommet du coussin de sucrose, après centrifugation, c'est le ménisque que l'on aperçoit et non pas des liposomes). La fluorescence des liposomes est analysée et les protéines associées sont révélées par un gel SDS.

Des liposomes (fluorescents) sont recouverts de coatomer, cette réaction est suivie par diffusion statique. La forme N-terminale de GMAP-210 [1-375] est alors incubée avec ces liposomes coâtés, puis ce mélange est déposé à la surface d'un coussin de sucrose. A l'issue de la centrifugation, les liposomes coâtés se retrouvent en bas du tube (au dessus d'une fine couche de sucrose de forte densité). Des prélèvements successifs sont réalisés à partir du haut du tube, puis chaque fraction est analysée par fluorescence afin de déceler la présence des liposomes et déposée sur un gel SDS afin de caractériser les protéines associées (cf. figure

44). Le gel montre la séparation du coatomer en excès et du coatomer lié aux liposomes (fractions 13,14 et 15). Nous pouvons observer que GMAP-210 est retrouvée au sommet du tube, et n'est absolument pas enrichie dans les fractions contenant les liposomes coatés. Le résultat suggère donc qu'il n'y a pas d'interaction. L'ensemble des mesures va dans le sens d'une absence de liaison mais je resterai prudent sur la conclusion compte tenu des biais possibles dû à la stœchiométrie entre liposomes et protéines. En effet, il n'est pas impossible que quelques cordes soient liées aux liposomes coatés mais que ceci reste difficilement détectable. Fonctionnellement, une seule corde pourrait suffire à prendre en charge une vésicule COPI. Faute de résultats concluants avec ce manteau, nous n'avons pas étudié la compatibilité de l'ALPS avec des vésicules de type COPII. L'approche *in vivo* permettra sans doute de déterminer la spécificité d'interaction de GMAP-210 avec le manteau des vésicules de transport.

2) Durée de vie des interactions des deux extrémités de la corde avec leurs membranes

Une question très importante, par ailleurs posée par Rothman dans l'une des premières publications décrivant les cordes, est la durée de vie de l'interaction entre d'une part la corde et la vésicule, d'autre part la corde et la membrane la supportant (Orci et al., 1998). Cette discussion écrite bien avant la description des mécanismes moléculaires est particulièrement intéressante, en voici un extrait :

“A fine balance between binding and dissociation would be needed for transport by tethered vesicles to occur at a useful rate. As the simplest possibility, the strings would function best when they are poised individually on the cusp of dissociation because of a rapid, dynamic thermodynamic equilibrium between bound and unbound states: If the attachment of vesicles to the proposed strings were too strong or too long-lived, vesicles would effectively be stuck in place as a fly is stuck to fly paper; if attachment were too weak, the vesicles would fly away and processivity would be lost. But when a vesicle is bound by multiple strings each of which dissociates and can be replaced by a new string in the time frame of inter-cisternal transport (approximately 1 min), then can vesicles effectively diffuse while remaining attached to the surface of the stack, just as a fly walks.”

L'une des idées les plus intéressantes dans ce paragraphe imagé est qu'une association trop forte entre corde et vésicule soit désavantageuse pour le mouvement de la vésicule. Après avoir caractérisé de façon plutôt qualitative les interactions entre GMAP-210 et les membranes (chapitre V), nous nous sommes donc intéressés à la stabilité de chaque interaction.

Pour mesurer la durée de vie des interactions entre GMAP-210 et les membranes, nous avons choisi la technique de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), à savoir un transfert d'énergie entre molécules fluorescentes : le NBD greffé aux protéines d'intérêt et la rhodamine greffée sur la phosphatidyléthanolamine des liposomes. Nous disposons de deux constructions de GMAP-210 marquées au NBD : la forme N-terminale [1-375] (marquée à l'extrémité de la protéine grâce à la mutation M1C) et la forme C-terminale [1597-1843] avec le même marquage que celui utilisé précédemment (mutant T1829C). Par ailleurs, disposant au laboratoire des motifs ALPS d'ArfGAP1, je les ai comparés aux motifs ALPS de GMAP-210 (extrémité N-terminale). Le principe des mesures est de suivre la vitesse de désorption spontanée des protéines d'une population de liposomes vers une seconde population. Ces populations diffèrent en effet par la présence ou non de 1% de rhodamine-DHPE, ce qui conduit à des signaux de fluorescence différents selon que la protéine est liée à une population ou à une autre.

Notons que toutes les mesures présentées ci-dessous (k_{off} de l'extrémité N-terminale de GMAP-210, des motifs ALPS1+2 et ALPS1 d'ArfGAP1) ont été effectuées le même jour dans les mêmes conditions (liposomes et protéines).

a) Extrémité N-terminale de GMAP-210

Afin de déterminer la concentration de liposomes nécessaire à la liaison totale de la construction N-terminale de GMAP-210 marquée au NBD, les spectres d'émission de la protéine en solution puis après chaque incrément de liposomes sont mesurés. Avec des liposomes non marqués, les signaux mesurés proviennent directement de la fluorescence du NBD rencontrant une bicouche lipidique (pic à 520nm). Par contre, avec des liposomes marqués à la rhodamine, la fluorescence directe du NBD est faible, une grande partie du signal provient d'un FRET entre le NBD de l'ALPS et la rhodamine de la membrane (pic vers

600nm) (les spectres sont corrigés de la fluorescence directe des liposomes marqués à la rhodamine) (cf. figure 45).

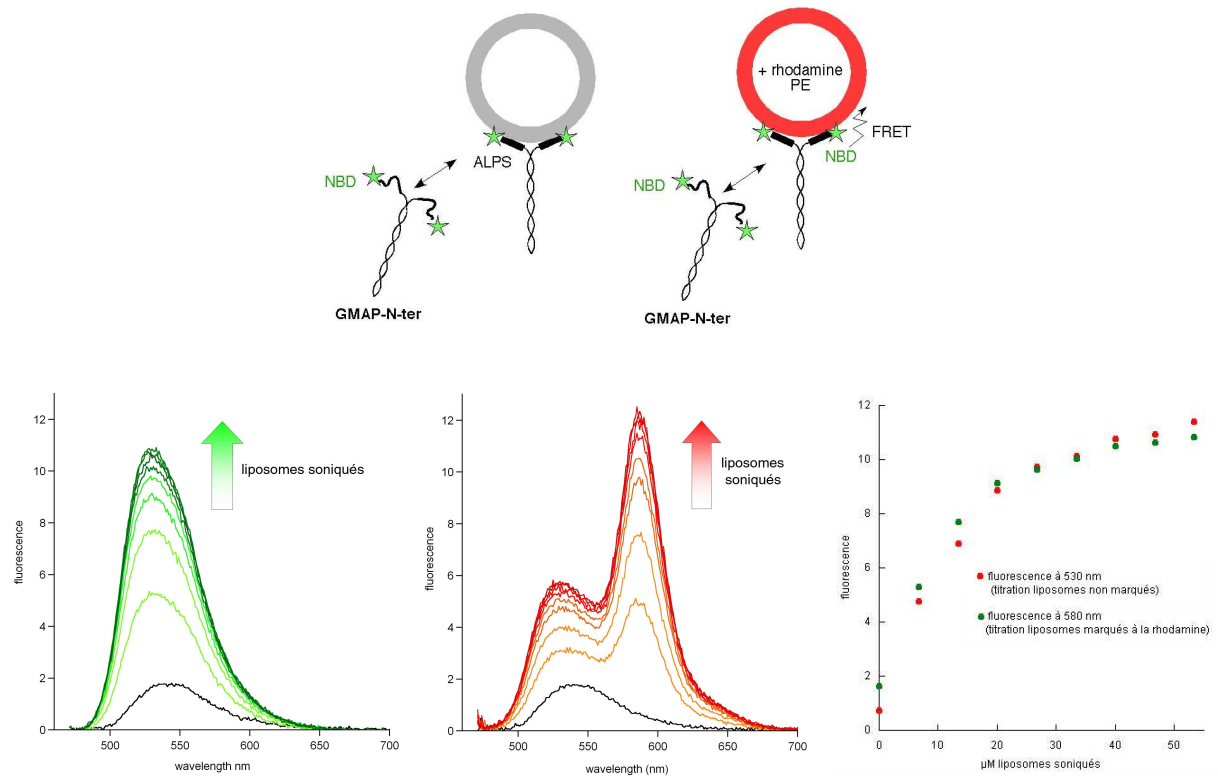


Figure 45 : Titration de 250nM du N-terminal de GMAP-210 marqué au NBD avec des liposomes soniqués contenant ou non de la rhodamine. Courbes de titration

Les titrations de l'extrémité N-terminale de GMAP-210 avec chacune des populations liposomales indiquent que $40\mu\text{M}$ de liposomes soniqués sont suffisants pour lier 250nM de protéines (cf. figure 45). Pour les mesures de k_{off} , nous nous sommes placés au dessus de la concentration saturante, soit $130\mu\text{M}$ de liposomes pour 250nM de protéines, ceci afin d'éviter que des protéines soient libres.

Le spectre initial d'émission (cf. spectre rouge de la figure 46a) correspond à l'interaction de la construction N-terminale GMAP-210 (marquée au NBD) avec des liposomes soniqués marqués à la rhodamine. Ensuite, nous nous plaçons à longueur d'onde fixe (520nm) pour suivre le déplacement du signal lorsqu'à l'instant $t=60\text{s}$, un excès de liposomes soniqués non fluorescents est ajouté (d'un facteur 4 par rapport à la concentration des premiers liposomes). L'ajout des liposomes provoque une forte augmentation du signal

direct NBD (à 520nm). La réaction est rapide, le $t_{1/2}$ de la réaction est de moins d'une seconde. Enfin, lorsque le signal est stabilisé, un second spectre d'émission est mesuré (cf. spectre vert de la figure 46a). Ce spectre avec un pic très majoritaire à 520nm couplé à la forte diminution du signal de FRET montre que l'essentiel de la protéine est maintenant en interaction avec les liposomes non marqués.

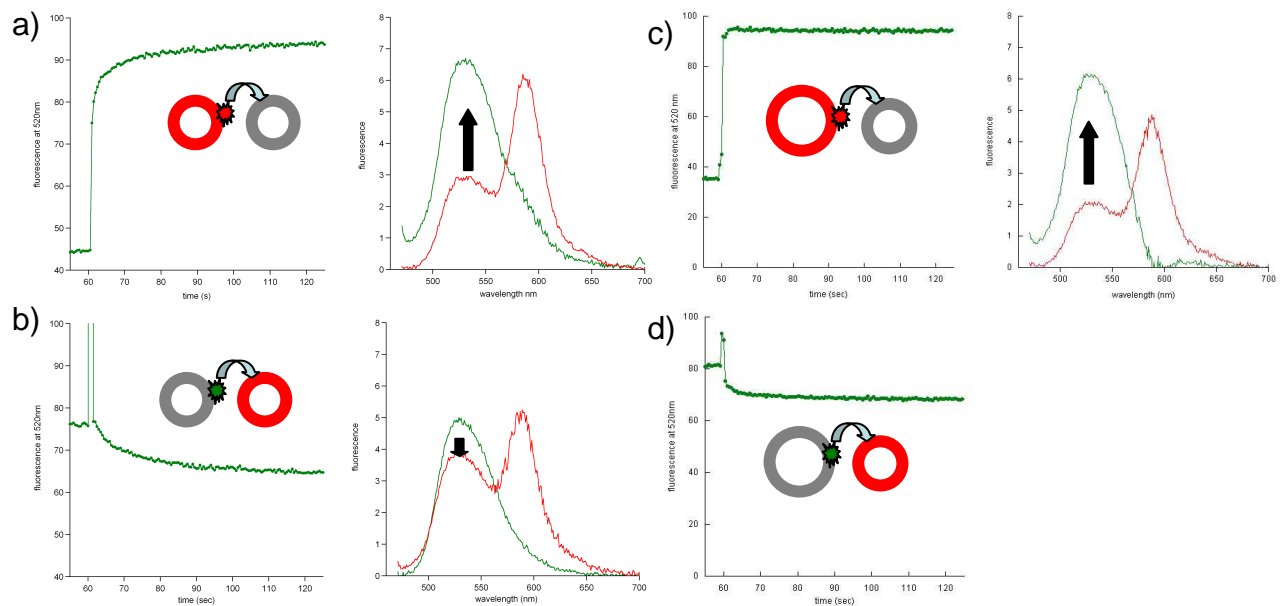


Figure 46 : Cinétiques et spectres du déplacement de l'extrémité N-terminale de GMAP-210: a) déplacement de la protéine de liposomes soniqués marqués à la rhodamine (spectre rouge) vers des liposomes soniqués non marqués (spectre vert) b) déplacement de la protéine de liposomes soniqués non marqués (spectre vert) vers liposomes soniqués marqués à la rhodamine (spectre rouge) c) déplacement de la protéine de liposomes extrudés et marqués à la rhodamine (spectre rouge) vers des liposomes soniqués non marqués (spectre vert). d) déplacement de la protéine de liposomes extrudés et non marqués vers liposomes des soniqués marqués à la rhodamine (les spectres ne sont pas présentés car n'ont pas pu être corrigés de la fluorescence des liposomes fluorescents en excès). Spectres : Exc 465 (bp 1,5) nm ; Em 470-700 (bp 5) nm / Cinétiques : Exc 465 (bp 1,5) nm ; Em 520 (20) nm

La vitesse de désorption est également mesurée lorsque le N-terminal de GMAP-210 est initialement lié à des liposomes soniqués non marqués (cf. figure 46b). Ici, le spectre initial du mélange figuré en vert correspond au signal simple de liaison du NBD dans un environnement lipidique. La cinétique de désorption spontanée est suivie à 520nm par l'ajout de liposomes compétiteurs marqués à la rhodamine. La réaction est également rapide, le $t_{1/2}$ de

la réaction est d'environ 5 secondes. Notons que le $t_{1/2}$ est différent ce qui suggère que, la rhodamine, sonde assez volumineuse, pourrait affecter la stabilité de l'interaction de la protéine avec la membrane. Le spectre final est mesuré et corrigé de la fluorescence des liposomes rhodamine ajoutés en excès. On observe que la fluorescence directe du NBD a diminué au profit du signal de FRET. Ces mesures montrent donc que la dissociation des ALPS de GMAP-210 de membranes extrêmement courbées est assez rapide, de l'ordre de la seconde.

Compte tenu de la sensibilité à la courbure de l'extrémité N-terminale de GMAP-210, il était intéressant de mesurer la vitesse de désorption spontanée de liposomes obtenus par extrusion dont le rayon est plus proche de celui des vésicules golgiennes que des liposomes soniqués (35nm contre 20nm). Etant donné que la liaison de l'ALPS de GMAP-210 dépend de la courbure membranaire, une titration de la protéine avec les liposomes extrudés a d'abord été faite. Une concentration plus élevée de liposomes extrudés par rapport aux très petits liposomes utilisés précédemment est nécessaire pour lier la protéine. 250 μ M de liposomes sont alors utilisés pour une concentration de 250nM de protéines.

L'approche expérimentale est proche de celle décrite avec les liposomes soniqués. Notons que GMAP-210 est initialement incubée avec des liposomes extrudés. Les liposomes compétiteurs sont soniqués et utilisés en excès d'un facteur 2 (il était difficile d'obtenir une concentration élevée de liposomes extrudés en raison des limites de la technique). La figure 46c montre la translocation de GMAP-210 de liposomes extrudés marqués à la rhodamine (signal de FRET en rouge) vers des liposomes soniqués non marqués. La cinétique de désorption spontanée est plus rapide que sur des liposomes soniqués. Elle est inférieure à la seconde et ne peut être donnée précisément. La cinétique mesurée correspond simplement au temps de mélange dans l'appareil. Cette vitesse est confirmée dans la figure 46d avec la translocation de GMAP-210 de liposomes extrudés non marqués vers des liposomes soniqués marqués à la rhodamine. La gêne engendrée par la rhodamine semble moins important sur ces liposomes que sur les liposomes soniqués.

En conclusion, l'extrémité N-terminale de GMAP-210 interagit très transitoirement avec les vésicules de transport.

b) Motifs ALPS d'ArfGAP1

GMAP-210 via son coiled-coil présente deux motifs ALPS à son extrémité. ArfGAP1 possède également une paire de motifs ALPS. La disposition relative des hélices ALPS dans les deux protéines est différente. De plus, les motifs ALPS ont des petites différences physicochimiques. La comparaison des k_{off} de ces deux protéines golgiennes s'imposait donc.

La figure ci-dessous (47a et b) montre que la vitesse de désorption d'ArfGAP1 de membranes présentant un fort rayon de courbure est très rapide et similaire à celle de l'extrémité N-terminale de GMAP-210 dans les mêmes conditions. En revanche, à la différence de l'extrémité N-terminale de GMAP-210 dont le temps de demi-réaction est inférieur à la seconde, le k_{off} d'ArfGAP1 est plus lent.

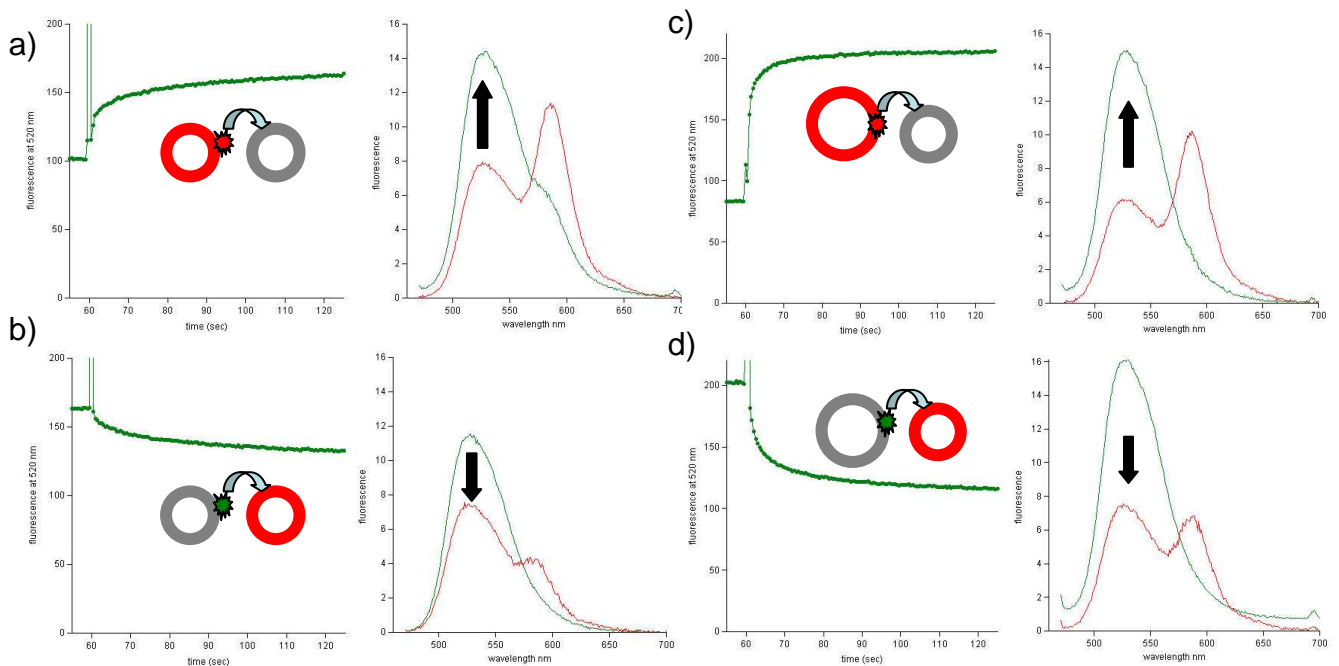


Figure 47 : Cinétiques et spectres du déplacement de l'ALPS 1+2 d'ArfGAP1:

a) déplacement de la protéine de liposomes soniqués marqués à la rhodamine (spectre rouge) vers des liposomes soniqués froids (spectre vert).

b) déplacement de la protéine de liposomes soniqués non marqués (spectre vert) vers des liposomes soniqués marqués à la rhodamine (spectre rouge).

c) déplacement de la protéine de liposomes extrudés et marqués à la rhodamine (spectre rouge) vers des liposomes soniqués non marqués (spectre vert).

d) déplacement de la protéine de liposomes extrudés non marqués (spectre vert) vers des liposomes soniqués marqués à la rhodamine (spectre rouge).

Spectres : Exc 465 (bp 1,5) nm ; Em 470-700 (bp 5) nm / Cinétiques : Exc 465 (bp 1,5) nm ; Em 520 (20) nm

La figure 48 montre que le motif ALPS 1 seul d'ArfGAP1 (décrit dans le paragraphe IV C) a une vitesse de dissociation beaucoup plus rapide (avec un $t_{1/2}$ inférieur au temps de mélange) que le peptide constitué des deux motifs ALPS sur des membranes soniqués.

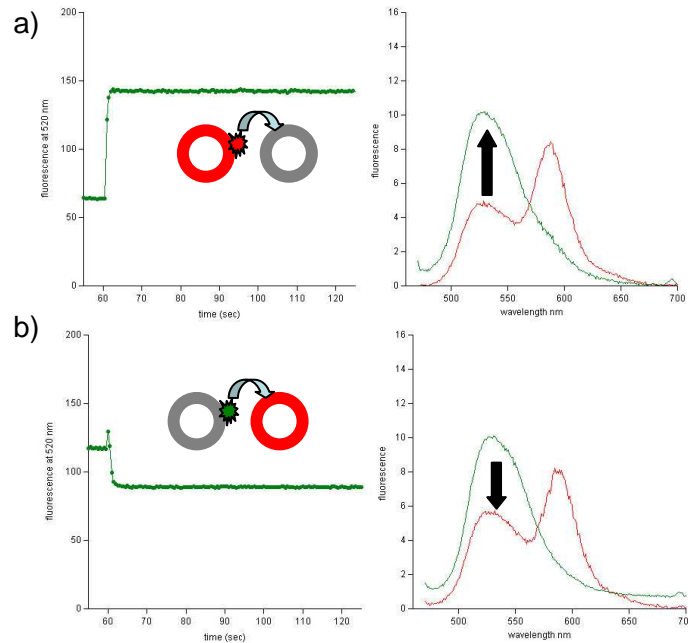


Figure 48: Cinétiques et spectres du déplacement de l'ALPS 1 d'ArfGAP1 :

a) déplacement de la protéine de liposomes soniqués marqués à la rhodamine vers des liposomes soniqués non marqués. En rouge : signal initial de FRET correspondant à la liaison de la protéine à des liposomes marqués. En vert, signal mesuré après l'ajout des liposomes non marqués en excès.

b) déplacement de la protéine de liposomes soniqués non marqués vers des liposomes soniqués marqués à la rhodamine. En vert : signal initial de la liaison de la protéine à des liposomes non marqués. En rouge, signal de FRET mesuré après l'ajout des liposomes marqués en excès

Spectres : Exc 465 (bp 1,5) nm ; Em 470-700 (bp 5) nm / Cinétiques : Exc 465 (bp 1,5) nm ; Em 520 (20) nm

En conclusion, ces différentes mesures ont montré que la vitesse de désorption de l'extrémité N-terminale de GMAP-210, des deux ALPS d'ArfGAP1 et à fortiori du seul motif ALPS1 est très rapide sur des membranes présentant un très fort rayon de courbure. Il est intéressant de noter que la vitesse de désorption de GMAP-210 est plus rapide que celle d'ArfGAP1 sur des liposomes de 35 nanomètres. Ceci suggère qu'ArfGAP1 réside plus longtemps à la surface des vésicules pour pouvoir hydrolyser le GTP des différents Arf alors que l'attachement de la vésicule par GMAP-210 est très labile. De plus, les différences observées selon le rayon de courbure suggèrent que le mécanisme d'interaction avec la

membrane diffère suivant son niveau de courbure. Enfin, nous avons vu que le motif ALPS1 se dissocie extrêmement rapidement de la membrane alors que le tandem ALPS 1+2 a une durée de vie plus longue, ce qui confirme la synergie entre les deux motifs.

c) Extrémité C-terminale de GMAP-210

Après avoir caractérisé les vitesses de désorption de l'extrémité N-terminale de GMAP-210, j'ai étudié le comportement du domaine C-terminal. Je rappelle que la liaison avec la membrane est indirecte et repose sur l'interaction avec Arf1GTP. J'ai mesuré le k_{off} de l'extrémité C-terminale de GMAP-210 en utilisant des liposomes accepteurs et compétiteurs recouverts d'Arf1GTP ainsi que le k_{off} du complexe entre GMAP-210 et Arf1 en utilisant des liposomes compétiteurs dépourvus d'Arf1. La stratégie expérimentale est la même que celle utilisée avec l'autre extrémité de GMAP-210. J'utilise la construction C-terminale de GMAP-210 marquée au NBD avec des populations de liposomes marquées ou non à la rhodamine. Toutes les mesures présentées ci-dessous ont été effectuées le même jour dans les mêmes conditions (liposomes et protéines).

- Mesure du k_{off} de GMAP-210 entre 2 populations de liposomes recouverts d'Arf1 :

Dans un premier temps, l'extrémité C-terminale de GMAP-210 est recrutée par Arf1GTP sur des liposomes marqués à la rhodamine de taille moyenne (0,2 μm). La cinétique du recrutement est suivie à 590nm, c'est-à-dire à la longueur d'onde correspondant à un signal de FRET (cf. les 800 premières secondes de la cinétique de la figure 49a). Lorsque le signal est stabilisé, le spectre est mesuré (spectre rouge) puis la cinétique est de nouveau suivie (à 590nm) avant l'ajout de liposomes compétiteurs non marqués et préalablement recouverts d'Arf1 (cf. cinétique). On observe une diminution du signal et le spectre final montre que GMAP-210 s'est déplacé des liposomes (rhodamine) de départ vers les liposomes non marqués en excès (augmentation de la fluorescence directe du NBD et la diminution du signal de FRET). La vitesse de dissociation est beaucoup plus lente que celle de l'extrémité N-terminale. En effet, le temps demi-réaction est de l'ordre de la minute alors que nous avons vu qu'il est de l'ordre de la seconde dans le cas de l'extrémité N-terminale.

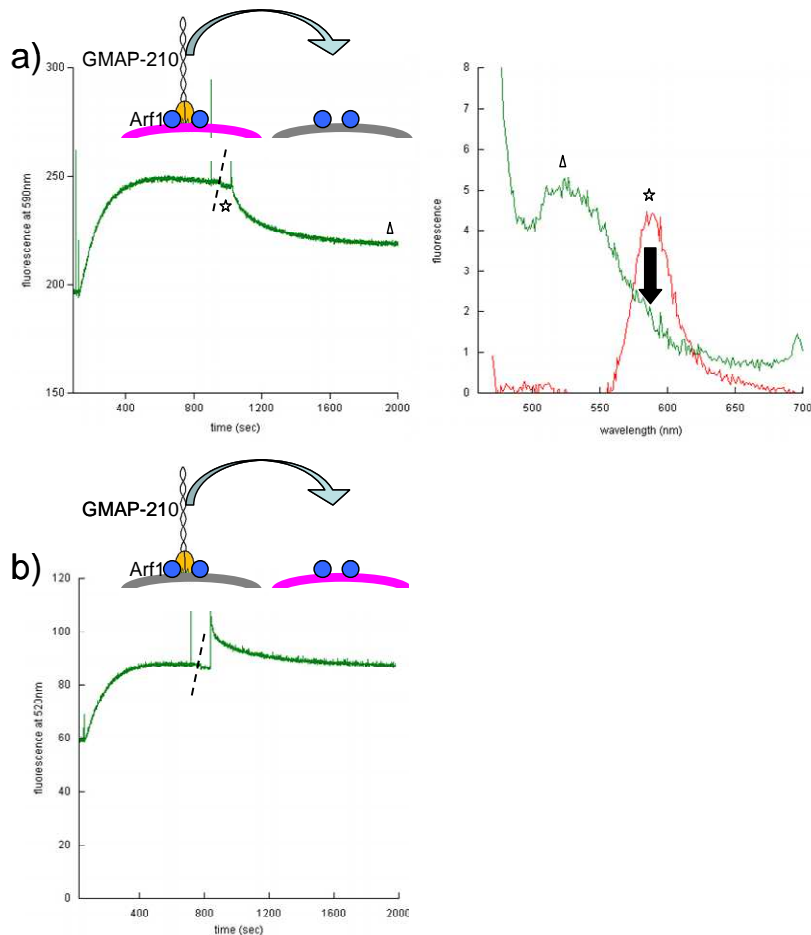


Figure 49 : Cinétiques et spectres du déplacement de l'extrémité C-terminale de GMAP-210 :
a) déplacement de la protéine de liposomes marqués à la rhodamine recouverts d'Arf1GTP (spectre rouge) vers des liposomes non marqués recouverts d'Arf1 (spectre vert).
Cinétique : Exc 465 (bp 1,5) nm ; Em 590 (20) nm Spectres : Exc 465 (bp 1,5) nm ; Em 470-700 (bp 5) nm
b) déplacement de la protéine de liposomes non marqués recouverts d'Arf1GTP vers des liposomes marqués à la rhodamine recouverts d'Arf1 (les spectres ne sont pas présentés car n'ont pas pu être corrigés de la fluorescence des liposomes fluorescents en excès).
Cinétique : Exc 465 (bp 1,5) nm ; Em 520 (20) nm

L'expérience a également été faite dans le sens inverse, l'extrémité C-terminale de GMAP-210 est initialement recrutée sur des liposomes non marqués et ensuite déplacée par un excès de liposomes marqués (cf. figure 49b). Les cinétiques sont suivies à 520nm (fluorescence directe du NBD) ce qui permet à la fois de suivre la translocation de GMAP-210 sur la première population de liposomes puis son déplacement vers la deuxième population. La vitesse est un peu plus rapide que celle mesurée en a), le $t_{1/2}$ est de 30 secondes. Ceci confirme que la durée d'interaction sur les membranes est plus longue pour l'extrémité C-terminale que l'extrémité N-terminale de GMAP-210.

- Mesure du k_{off} du complexe Arf1GTP/GMAP-210 :

J'ai également mesuré la dissociation du complexe GMAP-210/Arf1 en utilisant des liposomes compétiteurs dépourvus d'Arf1. Le processus opératoire est le même que celui utilisé pour mesurer le k_{off} de l'extrémité C-terminale seule. Dans ces conditions, le déplacement de l'extrémité C-terminale de GMAP-210 nécessite en parallèle le déplacement des molécules d'Arf1GTP. Par conséquent, cette réaction est nécessairement plus lente que la réaction de déplacement de la seule corde.

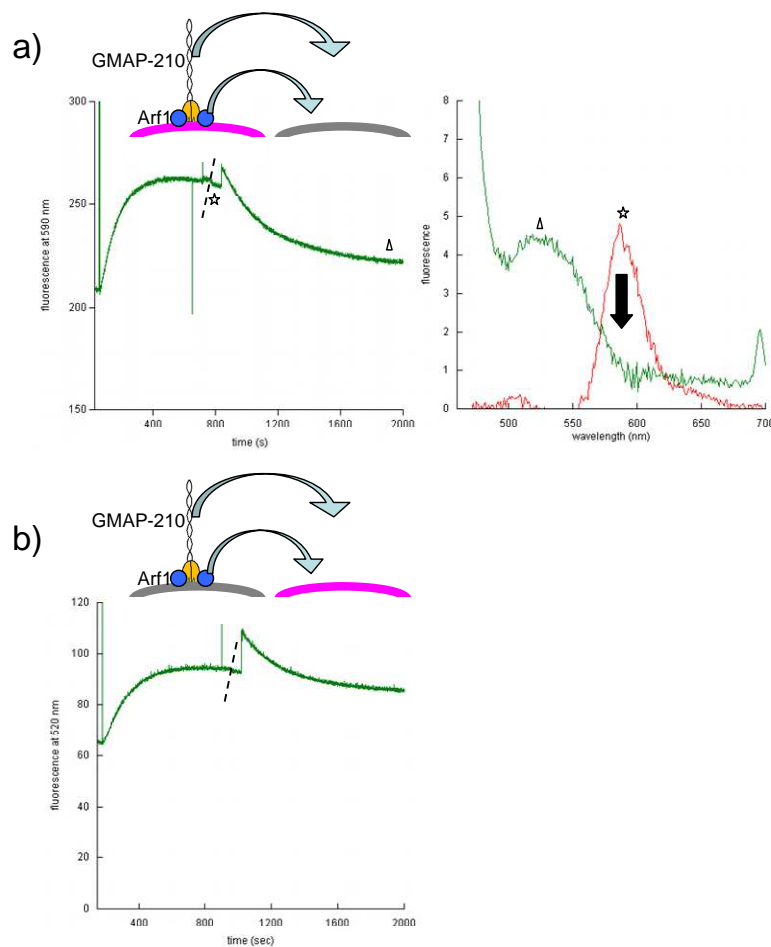


Figure 50 : Cinétiques et spectres du déplacement du complexe GMAP-210/Arf1 :

a) déplacement du complexe de liposomes marqués à la rhodamine recouverts d'Arf1GTP (spectre rouge) vers des liposomes non marqués (sans Arf1) (spectre vert).

Cinétique : Exc 465 (bp 1,5) nm ; Em 590 (20) nm ; spectre : Exc 465 (bp 1,5) nm ; Em 470-700 (bp 5) nm

b) déplacement du complexe de liposomes non marqués recouverts d'Arf1GTP vers des liposomes marqués à la rhodamine (sans Arf1) (les spectres ne sont pas présentés car n'ont pas pu être corrigés de la fluorescence des liposomes fluorescents en excès).

Cinétique : Exc 465 (bp 1,5) nm ; Em 520 (20) nm

La figure 50 montre que le k_{off} du complexe Arf1/GMAP-210 est d'environ 3 minutes. Notons que ce déplacement nécessite que les molécules d'Arf1GTP elles-mêmes soient capables de se détacher des liposomes. C'est un processus qui avait déjà été caractérisé (cf. chapitre IV B). Mes mesures du k_{off} d'Arf1GTP (avec Arf1 marqué à l'Oregon Green pour permettre un signal de FRET) sont homogènes avec les mesures précédemment publiées (Antonny et al., 1997a). Le temps de dissociation est de l'ordre d'une demi-minute.

En conclusion, les interactions des extrémités de GMAP-210 avec les membranes ont donc des durées de vie différentes. Ces mesures de k_{off} montrent que l'extrémité C-terminale est solidement ancrée à la membrane par la petite protéine G Arf1. En revanche, l'interaction entre l'extrémité N-terminale et les membranes est labile. Nous ne pouvons exclure qu'*in vivo* un autre élément puisse renforcer l'interaction. Néanmoins, cette interaction transitoire est avantageuse dans le cadre du transport dynamique des vésicules entre les différents compartiments. Il aurait été intéressant de mesurer l'interaction du motif ALPS avec les membranes dans des conditions où l'autre extrémité de la corde est immobilisée. Malheureusement, ce n'est pas possible par FRET, le mélange de petits liposomes, de gros liposomes et de cordes entraîne inexorablement une agrégation.

3) Nouvelles questions sur GMAP-210

La dynamique du trafic vésiculaire est extrêmement complexe avec de nombreuses protéines impliquées depuis le bourgeonnement jusqu'à la fusion : les manteaux et leurs régulateurs, les protéines du cytosquelette, les moteurs moléculaires, les SNARE et bien entendu les golgines. L'arrimage des vésicules par les golgines, ces longs coiled-coil, éviterait la dispersion des vésicules, contribuerait à la spécificité membranaire (avec le système des protéines Rab par exemple) et rapprocherait les membranes permettant ainsi aux protéines SNARE d'induire leur fusion.

Les mesures de k_{off} des extrémités de GMAP-210 ont montré qu'ils étaient de différents ordres de grandeur. L'interaction de l'ALPS sur les vésicules est de l'ordre de la seconde alors qu'une minute est nécessaire à la translocation de l'extrémité C-terminale. Plusieurs minutes sont nécessaires à la translocation du complexe Arf1/GMAP-210. En ce qui concerne l'extrémité N-terminale, notre hypothèse était qu'une corde était capable

d'accompagner la vésicule pendant tout son cheminement (cf. figure 51a). Le k_{off} extrêmement rapide de l'extrémité N-terminale suggère que plusieurs cordes vont être nécessaires, tour à tour, pour accompagner les vésicules (cf. figure 51b). Les interactions étant transitoires, plusieurs cordes pourraient participer à l'accompagnement des vésicules, ce qui n'était pas le cas avec notre hypothèse initiale, le système étant moins dynamique, une vésicule aurait pu être immobilisée. Enfin, nous avons vu précédemment que les coiled-coil des golgines présentent des sites de liaison à des protéines Rab. Nous pouvons imaginer que les vésicules garnies de Rab puissent glisser le long du coiled-coil avant de fusionner avec les membranes cibles.

Pour avoir une vision plus précise de la dynamique de l'attachement de vésicules par GMAP-210, il serait intéressant de mesurer le k_{off} de l'extrémité N-terminale de la corde lorsque celle-ci est attachée par son autre extrémité sur un support. Cette mesure pourrait être faite en microscopie à onde évanescente (TIRF) avec une bicouche lipidique sur laquelle serait fixée l'extrémité C-terminale de GMAP-210 et un flux de petits liposomes fluorescents.

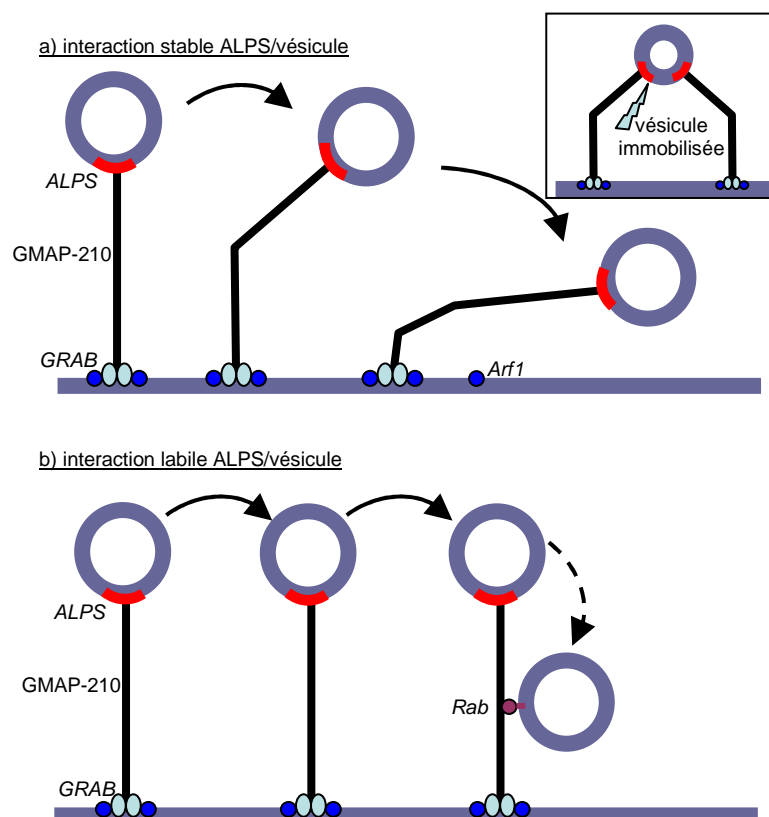


Figure 51 : a) Vésicule accompagnée par une seule corde b) Vésicule échangée entre plusieurs cordes

A propos de la dynamique des golgines, il est intéressant de noter que la protéine GRASP-65 (Golgi Reassembly Stacking Protein 65kDa) qui recrute la golgine GM130 à la surface de l'appareil de Golgi est une des protéines phosphorylées au cours de la mitose. GRASP-65 phosphorylée se détache de la membrane entraînant également la dissociation de la membrane. En effet, le système de « tethering » doit cesser au cours de la mitose afin de permettre la fragmentation de l'appareil de Golgi (Barinaga-Rementeria Ramirez and Lowe, 2009). Les golgines sont également des cibles directes des kinases. Ainsi la protéine GM130 phosphorylée a une affinité moins grande pour les vésicules couvertes de p115 qui s'accumulent alors dans le cytosol. Dans le cas de GMAP-210, aucune phosphorylation n'a été détectée mais ceci reste à explorer. D'ailleurs, les motifs ALPS par l'abondance de résidus sérines (et thréonines) sont des candidats intéressants. Enfin, je signalerai que, pendant le processus apoptotique, l'un des mécanismes responsables de la fragmentation de l'appareil de Golgi repose sur la dégradation des golgines et de certaines de leurs protéines associées par les caspases.

En conclusion, GMAP-210 est une golgine fascinante dont nous ne connaissons à ce jour qu'une partie du fonctionnement. Notre étude a pu montrer un mécanisme original de connexion de vésicules à des membranes planes par la reconnaissance de la courbure membranaire. Cette connexion asymétrique est rendue possible par un motif ALPS sensible à la courbure et un motif d'interaction avec Arf1 régulé négativement par la courbure membranaire grâce à ArfGAP1. Des questions subsistent notamment par rapport à l'éventuelle compatibilité de l'ALPS avec une vésicule encore recouverte de son manteau, le rôle de Rab2, la stœchiométrie cordes/vésicules ou encore par rapport au mécanisme précis d'interaction avec les microtubules. Récemment, une étude a montré que cette immense protéine de 2000 acides aminés semble également impliquée dans le transport intraflagellaire de cellules ciliées (Follit et al., 2008). Bref, bien des mystères restent à découvrir...

VII Motif ALPS et α -synucléine : comparaison entre deux hélices amphipathiques senseurs de courbure membranaire

A- Introduction

Dans un précédent chapitre (IV) décrivant les motifs ALPS, j'ai souligné leurs deux grandes originalités. D'abord une originalité fonctionnelle, avec la capacité de reconnaître de façon très fine la courbure des membranes. Ensuite, une originalité structurale et physicochimique : les motifs ALPS forment des hélices amphipathiques dont la face polaire présente presque exclusivement des résidus polaires non chargés (sérine, thréonine et glycine). J'ai enfin mentionné que cette physicochimie particulière et cette fonction spécifique sont étroitement liées. L'introduction de résidus basiques à l'interface de l'hélice ALPS réduit, voire abolit, la sensibilité à la courbure membranaire. La surprise, pour nous, a été de réaliser qu'il existait une autre hélice amphipathique dont la physicochimie est à l'opposé de celle du motif ALPS et qui pourtant, semble reconnaître également la courbure membranaire. Cette hélice appartient à une protéine, l' α -synucléine, célèbre pour son implication dans la maladie de Parkinson.

Dans cette dernière partie de ma thèse, j'ai cherché à comparer les propriétés senseurs de courbure des motifs ALPS et α -synucléine. L'idée directrice était que leur physicochimie très différente pourrait leur permettre d'être adaptées à des membranes cellulaires n'ayant pas les mêmes compositions lipidiques et ainsi d'agir sur des compartiments différents.

1) α -synucléine et pathologie

L' α -synucléine est une protéine présente chez les vertébrés. C'est une protéine neuronale, identifiée historiquement dans la torpille (Maroteaux et al., 1988). Il existe deux autres formes de la synucléine, les β - et γ -synucléines issues d'épissage alternatif. L' α -synucléine est particulièrement étudiée en raison de son association à une pathologie importante chez l'homme : la maladie de Parkinson. L' α -synucléine est en effet un composant majeur des corps et neurites de Lewy présents dans les neurones de parkinsoniens (Goedert, 2001). Ces accumulations de protéines et de lipides induisent la mort des neurones

dopaminergiques de la substance noire. La diminution de la dopamine dans le striatum est à l'origine des nombreux troubles parkinsoniens.

La maladie de Parkinson a plusieurs origines, génétique ou sporadique. Un point commun est l'agrégation de l' α -synucléine causée par des mutations ponctuelles, des duplications et triplications géniques, des stress environnementaux (stress oxydatifs, toxicité ionique) ou encore des désordres du protéasome.

Malgré l'abondance de publications scientifiques portant sur l' α -synucléine, sa fonction reste mal connue. Les conclusions des études sont rendues difficiles par l'adaptation des souris aussi bien à sa surexpression qu'à sa délétion. Il semblerait néanmoins qu'elle soit impliquée dans la plasticité synaptique en régulant le groupe de vésicules prêtes à fusionner. En effet, on observe en microscopie électronique que la surexpression de l' α -synucléine conduit à l'augmentation du nombre de vésicules proches de la membrane plasmique. Par différentes techniques, il a été montré que c'est l'étape entre l'arrimage des vésicules et leur fusion qui est inhibée par l' α -synucléine (Larsen et al., 2006). Les vésicules sont arrimées mais ne sont pas aptes à fusionner ; l' α -synucléine contrôlerait ainsi le nombre de vésicules immédiatement disponibles pour la neurotransmission.

2) Interaction α -synucléine – membrane lipidique

Comment l' α -synucléine s'associe-t-elle aux vésicules synaptiques ? Aucun récepteur protéique n'a été identifié. Par contre, les propriétés remarquables d'association avec les membranes lipidiques semblent clés pour la liaison de l' α -synucléine aux vésicules synaptiques. Notons tout d'abord que cette protéine a une séquence très particulière. Les cent premiers acides aminés forment des répétitions de onze résidus, répétitions qui individuellement pourraient former des hélices amphipathiques (cf. figure 52). Cette séquence est suivie d'une région acide et très riche en proline. Le dichroïsme circulaire montre que l' α -synucléine n'a aucune structure en solution, ce qui explique sans doute sa tendance à s'agréger observée dans la maladie de Parkinson.

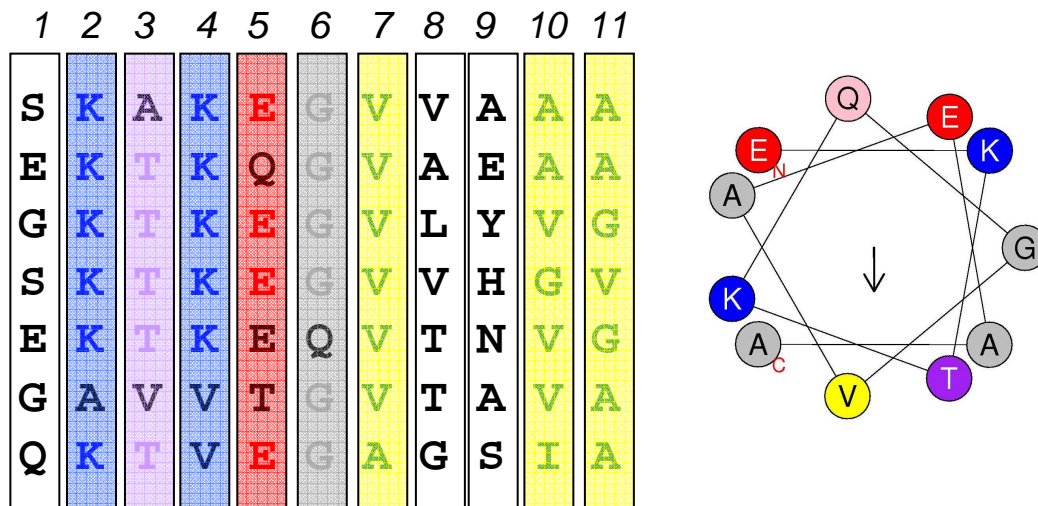


Figure 52 : Alignements de l' α -synucléine par séquences de 11 résidus. L'une de ces répétitions est représentée en alpha-hélice.

En 1998, il a été montré que l' α -synucléine a la capacité de se lier à des liposomes artificiels. Cette liaison dépend de la charge négative des liposomes ainsi que de leur taille (Davidson et al., 1998). L'expérience consistait à incuber l' α -synucléine avec un mélange de liposomes multilamellaires et de petits liposomes soniqués et d'éluer cet ensemble sur une colonne de gel filtration. De façon très nette, on observe que l' α -synucléine co-élue avec les liposomes soniqués chargés négativement (cf. figure 53). Par contre, aucune interaction n'est décelée ni avec les gros liposomes de même composition ni avec des liposomes soniqués neutres (PC ou PC/PE).

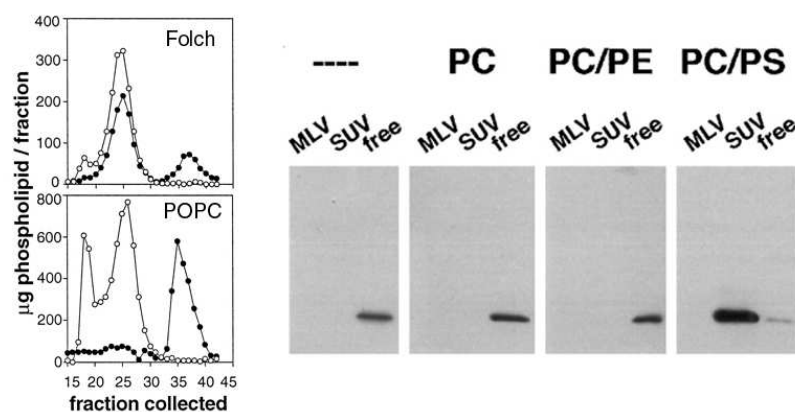


Figure 53: Chromatographie d'exclusion de l' α -synucléine incubée avec un mélange de liposomes soniqués (fractions 20-30) et de vésicules multilamellaires (fractions 15-20) de différentes compositions lipidiques. A gauche, exemple de profil de gel filtration avec des liposomes de type Folch (phospholipides de cerveau) ou des liposomes neutres (POPC), (en point noir l' α -synucléine, en point blanc les lipides). (Davidson et al., 1998)

Depuis, cette capacité de l' α -synucléine à reconnaître des membranes a été abondamment étudiée. L'intérêt est en effet que cette liaison semble bien expliquer le rôle de l' α -synucléine dans le contrôle de vésicules synaptiques car celles-ci ont une très forte courbure (rayon estimé de 20nm). Par ailleurs, l'idée d'équilibre entre différents états de l' α -synucléine est une explication plausible des relations entre fonction et pathologie. En effet, le fonctionnement physiologique de la protéine reposerait sur l'équilibre entre la forme déstructurée en solution et la forme structurée en hélice sur des vésicules synaptiques. A ce premier équilibre, qui ressemble à celui d'un motif ALPS avec une membrane courbée, s'ajouterait dans les conditions pathologiques un déplacement de la forme déstructurée et monomérique en solution vers une forme agrégée (cf. figure 54). Ce phénomène est dépendant des mutations ponctuelles, des duplications géniques ou des petits dysfonctionnements accumulés sur une longue période de temps (les neurones étant des cellules restant en interphase des décennies). L' α -synucléine forme alors des oligomères, y compris sous forme de feuilletts beta. Notons qu'*in vitro*, en solution, l' α -synucléine est capable de s'agréger en quelques jours et de former des fibrilles visibles en microscopie électronique.

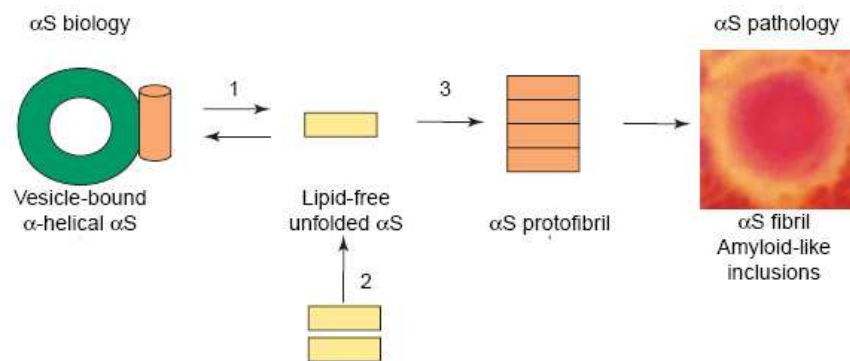


Figure 54 : Equilibre physiologique de l' α -synucléine entre la forme non structurée en solution et la forme en hélice liée à des vésicules (1). La surexpression de la protéine (2) ou des dysfonctionnements (mutations par exemple) (3) peuvent déplacer cet équilibre vers des agrégats d' α -synucléine. (Scherzer and Feany, 2004)

Le dichroïsme circulaire montre sans ambiguïté que l' α -synucléine en présence de petits liposomes ou de détergents se replie en hélice alpha. Par contre, la longueur et le nombre de ces hélices ont été pendant longtemps discutés. Les mesures de résonance magnétique nucléaire (RMN) sur des micelles de sodium dodécylsulfate (SDS) réalisées depuis de nombreuses années montraient la présence de deux hélices. Deux études récentes,

du groupe de Jao, par « spin labelling » combiné à de la spectroscopie RPE (résonance paramagnétique électronique) sur liposomes soniqués POPC/POPS indiquent au contraire une seule hélice continue (Jao et al., 2004) (Jao et al., 2008). Il semble en fait que le rayon extrême des micelles SDS (quelques nanomètres) utilisées dans les expériences de RMN conduise à la « cassure » de la protéine sur cette surface bien trop réduite.

Le principe de la méthode de spin-labelling combinée à l'EPR est de remplacer individuellement chacun des résidus d'une protéine par une cystéine et d'ajouter sur cette cystéine un groupement nitroxyde. Celui-ci sert de sonde et permet de faire une spectroscopie RPE donnant des informations très précises sur la position de la sonde par rapport à la membrane et à l'eau. Les résultats sur l' α -synucléine révèlent une périodicité assez unique des cent premiers résidus de la protéine (cf. figure 55). Cette périodicité indique qu'il s'agit d'une hélice alpha atypique dite de type 3/11, c'est-à-dire que 11 résidus sont nécessaires pour faire 3 tours d'hélice.

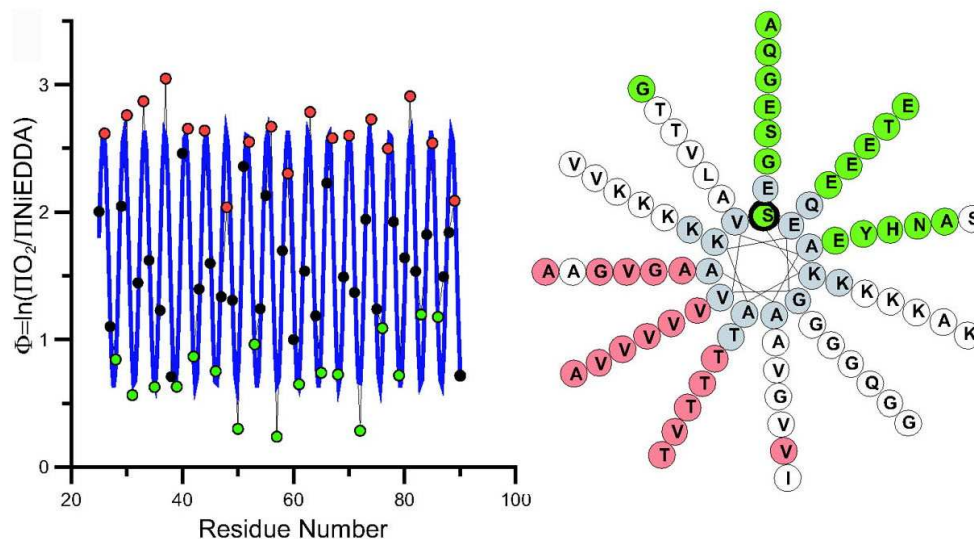


Figure 55: Accessibilité des différents résidus de l' α -synucléine à l'eau (point vert) ou à la membrane (point rouge) (La ligne bleue indique le meilleur fit dont la périodicité est de 3,67 soit 11 résidus pour 3 tours d'hélices.) Représentation de l' α -synucléine en hélice 3/11. Remarquons la conservation spectaculaire de certains acides aminés (glycines, lysines, thréonines, valines) sur la longueur de l'hélice (Jao et al., 2008).

L'analyse de la séquence primaire va de pair avec les données structurales puisque se succèdent ainsi 7 unités de 11 acides aminés (soit 3 tours) avec un fort taux d'identité (cf. figure 52). Le pas d'une hélice 3/11 est de 3.67 acides aminés alors qu'une hélice alpha conventionnelle a un pas de 3.6 acides aminés par tour (18 acides aminés donnant 5 tours d'hélice). La différence peut sembler faible : dans l'hélice alpha classique, la rotation est de

100 degrés par résidu contre 98 degrés dans le cas de l'hélice 3/11. Cependant, accumulée sur une longue séquence, cette subtile différence change l'alignement des acides aminés. La structure 3/11 de l' α -synucléine montre un alignement de résidus identiques ou très proches sur toute la longueur de l'hélice. Cet alignement ne pourrait pas exister dans une alpha hélice où deux mêmes résidus peuvent se situer au minimum à cinq tours l'un de l'autre. Dans la figure 55, on note des alignements remarquables d'acides aminés spécifiques comme par exemple les glycines, les valines ou encore les lysines en position interfaciale. Plus surprenant encore, on remarque l'excellente conservation d'une thréonine au centre de la face hydrophobe. Or, la thréonine a un caractère ambivalent avec d'une part un groupement hydroxyle polaire mais également un groupement méthyle hydrophobe. Notons également que les résidus acides sont essentiellement des glutamates situés en crête de l'hélice. La face hydrophobe est constituée majoritairement de petits résidus hydrophobes, les valines, et un seul résidu aromatique est présent dans la séquence de l'hélice.

En conclusion, l' α -synucléine est une hélice amphipathique remarquable du fait de plusieurs alignements de résidus identiques tout au long de l'hélice.

3) *α -synucléine exprimée dans un microorganisme*

L'équipe de Susan Lindquist a eu l'ingénieuse idée d'exprimer l' α -synucléine dans des cellules eucaryotes dépourvues du gène : des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) (Outeiro and Lindquist, 2003). En effet, si l'essentiel de la fonction de l' α -synucléine repose directement sur son interaction avec les lipides, on peut s'attendre à ce que l'expression de cette protéine dans une cellule qui en est dépourvue conduise à des phénotypes pertinents notamment pour la localisation membranaire. Par contre, si l' α -synucléine est essentiellement impliquée dans des interactions protéine/protéine, il est peu vraisemblable qu'elle puisse rencontrer des partenaires dans une cellule comme la levure. D'une façon générale, les observations de Lindquist sont bien en faveur d'un rôle de l' α -synucléine dans le transport vésiculaire. La protéine se localise partiellement à la membrane plasmique des levures mais conduit également à l'accumulation de petites vésicules visibles en microscopie électronique. La surexpression engendre d'importantes perturbations du trafic vésiculaire.

4) Pourquoi comparer GMAP-210 et α -synucléine ?

Les protéines GMAP-210 et α -synucléine sont impliquées dans le trafic vésiculaire, respectivement golgien et synaptique. Qui dit vésicule de transport, dit forte courbure membranaire. L'ALPS de GMAP-210 et l' α -synucléine interagissent avec des membranes courbées. Cependant, les membranes lipidiques des vésicules sont très différentes, les unes proviennent de l'appareil de Golgi, les autres dérivent de la membrane plasmique. Par ailleurs, la physicochimie des hélices ALPS et α -synucléine sont très éloignées, pour ne pas dire opposées : elles sont toutes deux amphipathiques mais leurs faces hydrophobes et polaires sont très différentes. Les figures 56a et b le montrent sans ambiguïté.

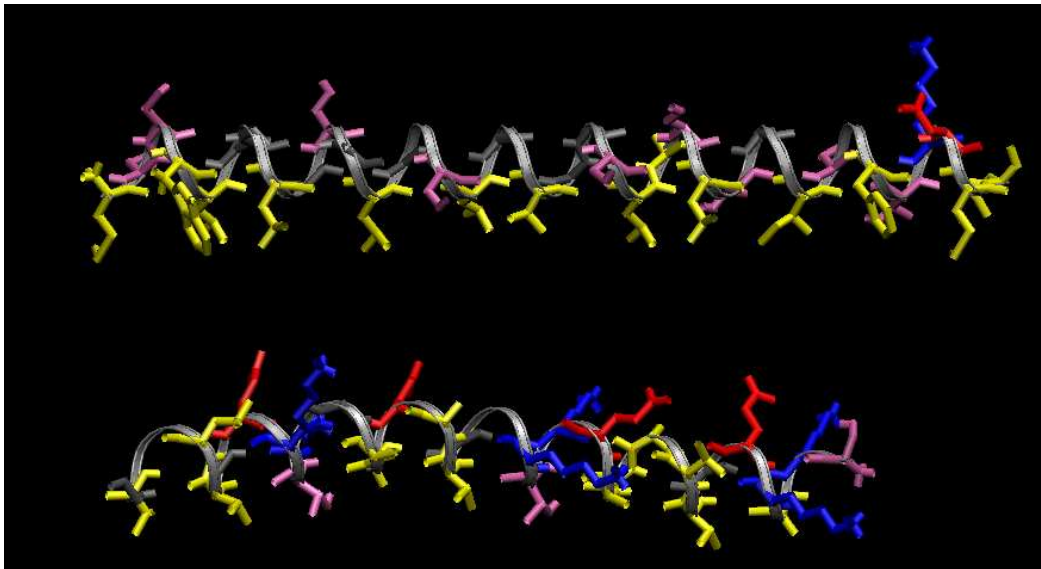


Figure 56a : Représentation en hélice alpha de l'ALPS de GMAP-210 (haut) et de 33 résidus de l' α -synucléine (bas) sur leurs longueurs (en jaune, les résidus hydrophobes, en rose les sérines/thréonines, en bleu les résidus basiques et en rouge les résidus acides).

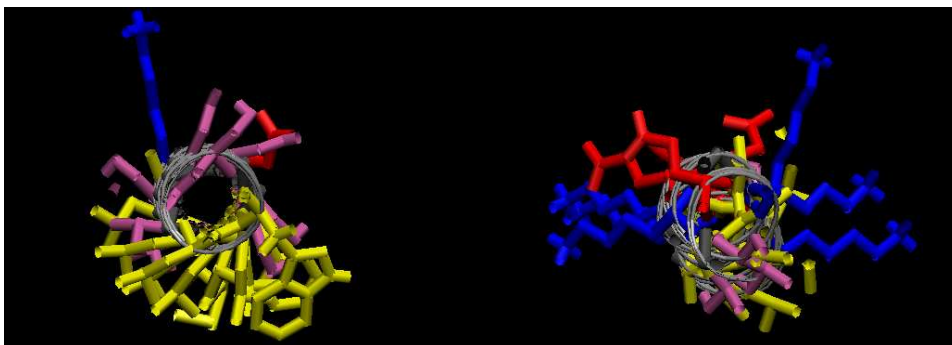


Figure 56b : Même représentation des hélices ALPS (à gauche) α -synucléine (à droite) projetées sur un plan

Notre objectif a été de comparer les propriétés de liaison de l' α -synucléine et de l'ALPS de GMAP-210 à des liposomes. Bien que beaucoup d'études aient été faites sur l' α -synucléine, aucune n'examinait de façon très précise la dépendance à la courbure et à la composition lipidique. En particulier, aucune réponse fine en fonction de la courbure n'avait été faite. L'idée générale qui a motivé notre étude était qu'ayant des physicochimies si opposées, le motif ALPS et l' α -synucléine étaient adaptées à des systèmes vésiculaires complètement différents. En parallèle à notre étude biochimique, l'équipe de Cathy Jackson mène l'étude comparative de GMAP-210 et de l' α -synucléine dans la levure afin de mieux comprendre les spécificités membranaires de ces deux protéines.

B) Résultats

La caractérisation de la liaison de l'ALPS de GMAP-210 et de l' α -synucléine à des liposomes a été faite à partir de mutants marqués au NBD (respectivement M1C et V3C). Comme nous l'avons vu précédemment, cette technique spectroscopique nous permet de quantifier précisément la liaison des protéines avec les membranes et a donc été préférée aux expériences de flottaison moins précises et plus longues. L'intensité de fluorescence de la protéine en solution (F_0) et en présence de liposomes (F) est mesurée puis normalisée (F/F_0). Ainsi, pour chaque composition, le rapport F/F_0 est représenté en fonction du rayon des liposomes : un signal de 1 correspondant à une absence d'interaction. La fluorescence augmente au maximum d'un facteur 7 pour l' α -synucléine et d'un facteur 5 pour GMAP-210, ceci est dû sans doute au degré différent de pénétration de la sonde des deux protéines dans la membrane. Les mesures comparatives entre GMAP-210 et l' α -synucléine sont systématiquement faites le même jour avec les mêmes liposomes.

1) Titration de l' α -synucléine et de GMAP-210

Les concentrations de protéines et de liposomes utilisées lors des mesures ont été choisies après des expériences de titration qui permettent de définir un rapport protéine/lipides optimal, c'est-à-dire une surface membranaire suffisante pour lier totalement la protéine d'intérêt lorsque le liposome présente les bonnes caractéristiques (courbure, composition).

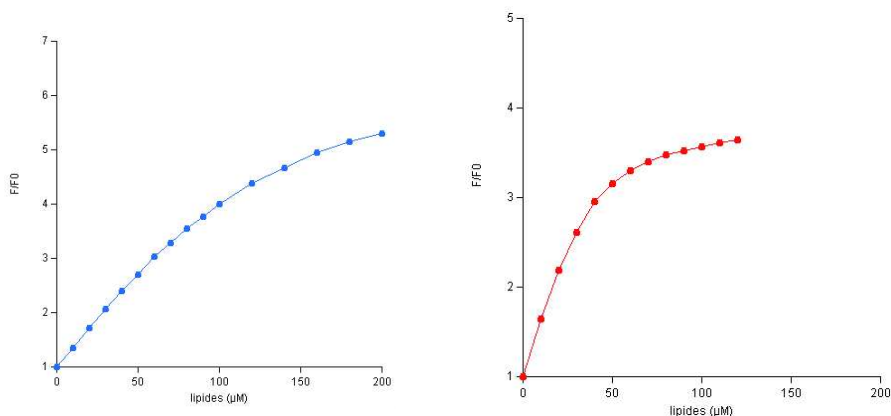


Figure 57: Mesures de liaison de l' α -synucléine (en bleu) et de GMAP-210 (en rouge) (250nM) en fonction de la concentration de liposomes soniqués (eggPC 40%, POPE 30% POPS, 30% ; cholestérol/phospholipides 1/5)

La figure 57 montre deux titrations sur GMAP-210 et α -synucléine réalisées avec 250nM de protéines et des liposomes soniqués composés de PC 40% (phosphatidylcholine naturelle origine d'œuf) de palmitoyl-oléyl-PE 30%, palmitoyl-oléyl-PS, 30% et de cholestérol selon un ratio cholestérol/phospholipides 1/5. Dans les deux cas, une très bonne liaison est observée. Nous utiliserons par la suite une concentration saturante en liposomes de 150 μ M pour 250nM de protéines et les seuls paramètres qui changeront seront la nature et/ou le rayon des liposomes étudiés.

2) Le motif ALPS de GMAP-210 et l' α -synucléine sont sensibles à la courbure membranaire

Des liposomes constitués de PC 40%, POPE 30%, POPS 30% et de cholestérol (présent selon le ratio 1/5 mol cholestérol / mol phospholipides) sont soit extrudés séquentiellement à travers des filtres de polycarbonate dont les pores sont de 200, 100, 50 et 30nm, soit soniqués. Ceci permet d'obtenir une large gamme de rayons (typiquement de 20 à 100nm). La figure 58 montre que la liaison des deux protéines est fortement dépendante du rayon de courbure. Dans les deux cas, on note un signal de liaison très faible sur des liposomes de rayon supérieur à 60nm. Par contre, pour des rayons plus petits, on observe une augmentation très franche du signal de liaison. Notons cependant que la réponse à la courbure de l' α -synucléine semble légèrement décalée vers des rayons plus petits. Ce comportement est intéressant, l' α -synucléine travaillant sur des vésicules synaptiques avec un rayon de l'ordre de 20 nanomètre alors que le rayon des vésicules COPI est de l'ordre de 40nm.

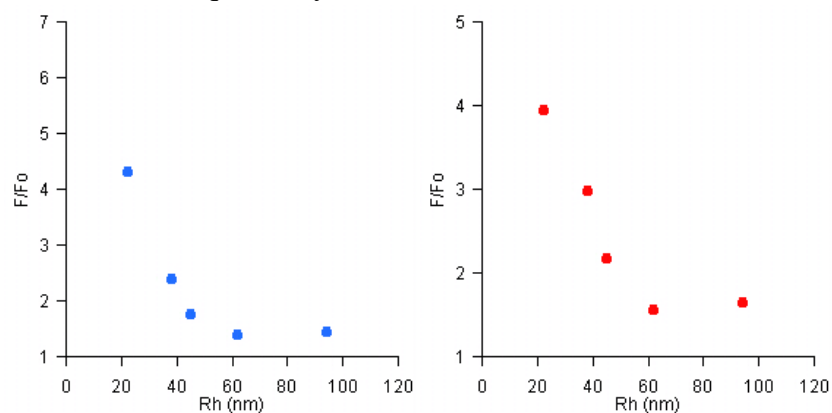


Figure 58 : Mesures de liaison de l' α -synucléine (en bleu) et de l'ALPS de GMAP-210 (en rouge) en fonction du rayon des liposomes sur une membrane « classique » (eggPC 40%, POPE 30% POPS, 30% ; cholestérol/phospholipides 1/5)

3) Effet de la charge

Dans l'expérience suivante, nous avons remplacé la phosphatidylsérine (POPS) par de la phosphatidylcholine synthétique présentant les mêmes chaînes d'acide gras (POPC). Cette substitution conduit donc à totalement éliminer les lipides chargés négativement. Dans ces conditions, l' α -synucléine, et la partie N-terminale de GMAP-210 se comportent de façon opposée (cf. figure 59). Aucune liaison n'est observée dans le cas de l' α -synucléine alors que l'extrémité N-terminale de GMAP-210 continue à présenter une liaison à la fois significative et très dépendante de la courbure. Notons que du fait du changement de composition lipidique, nous ne balayons pas exactement la même gamme de rayon (la composition lipidique a une influence sur la courbure membranaire).

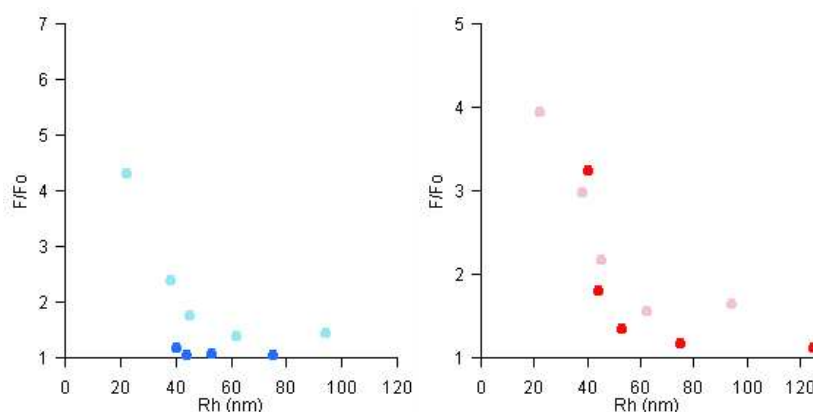


Figure 59 : Mesures de liaison de l' α -synucléine (en bleu) et de l'ALPS de GMAP-210 (en rouge) en fonction du rayon des liposomes selon deux compositions membranaires données, une globalement chargée négativement (eggPC 40%, POPE 30% POPS, 30% ; cholestérol/phospholipides 1/5) (en clair, référence de la figure 58) et une neutre (eggPC 40%, POPC 30% POPE 30% ; cholestérol/phospholipides 1/5) (foncé).

Dans un deuxième temps, nous avons effectué des expériences avec des liposomes contenant différents pourcentages de phosphatidylsérine (cf. figure 60). On remarque que la liaison de l' α -synucléine n'est significative qu'au-delà de 20% PS. A un pourcentage de PS peu physiologique (40%), la liaison devient extrêmement forte même pour des liposomes relativement gros.

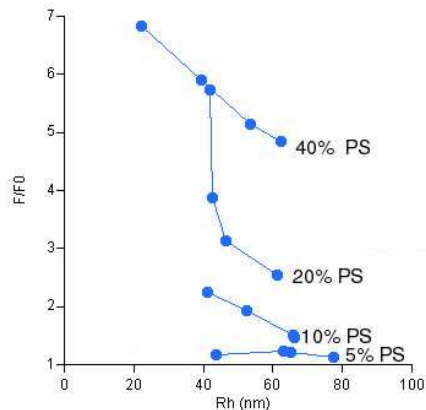


Figure 60: Mesures de liaison de l'α-synucléine en fonction du rayon des liposomes et selon le pourcentage de phospholipides anioniques (PS) (eggPC 25%, liverPE 35%, DOPS x%, DOPE 40-x% ; cholestérol/phospholipides 1/2)

En conclusion, l'α-synucléine, contrairement à GMAP-210, n'interagit qu'avec des membranes fortement chargées. Pour des pourcentages de phosphatidylsérine proches de ceux rencontrés dans la membrane plasmique ou les vésicules synaptiques (30%), la liaison est très sensible à la courbure membranaire. La charge est donc un paramètre extrêmement discriminant entre les deux senseurs de courbure membranaire.

4) Effet de la géométrie des lipides

Dans un fond lipidique constitué de 40% eggPC, 30% PE, 30% PS et de cholestérol (rapport cholestérol/phospholipides 1/5 mol), outre le changement de rayon, nous avons fait varier les chaînes latérales de la phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine. Les phospholipides possédant un palmitate et un oléate ont été comparés à ceux possédant soit les deux acides gras saturés (myristate), soit les deux acides gras insaturés (oléate). Nous n'avons pu utiliser de phospholipides dipalmitoyl en raison de leur température de fusion bien au dessus de la température de nos mesures. Le myristate est l'acide gras saturé possédant la plus longue chaîne carbonée à l'état fluide à température ambiante. Les phospholipides dimyristoyl et dioléyl ont un effet opposé sur le « packing » de la membrane, les premiers conduisent à un « packing » très serré, les deuxièmes par leur forme conique engendrent des défauts importants.

Le remplacement des phospholipides palmitate-oléate en dimyristate a un effet très négatif sur la liaison à la fois de l'α-synucléine et de GMAP-210, y compris sur les

membranes très courbées (soniquées) (cf. figure 61). A l'inverse, le passage de lipides palmitate-oléate en dioléate favorise fortement la liaison des deux protéines, ce qui a pour effet de réduire fortement la sensibilité à la courbure. Notons quand même de légères différences entre l' α -synucléine et l'extrémité N-terminale de GMAP-210 : la réponse à la courbure de l' α -synucléine apparait toujours légèrement décalée vers de plus petits rayons que dans le cas de GMAP-210. Malgré la forte différence de physicochimie, notamment dans la face hydrophobe, les deux protéines apparaissent toutes deux très sensibles à la nature des chaînes d'acides gras, et donc vraisemblablement au « packing » des lipides.

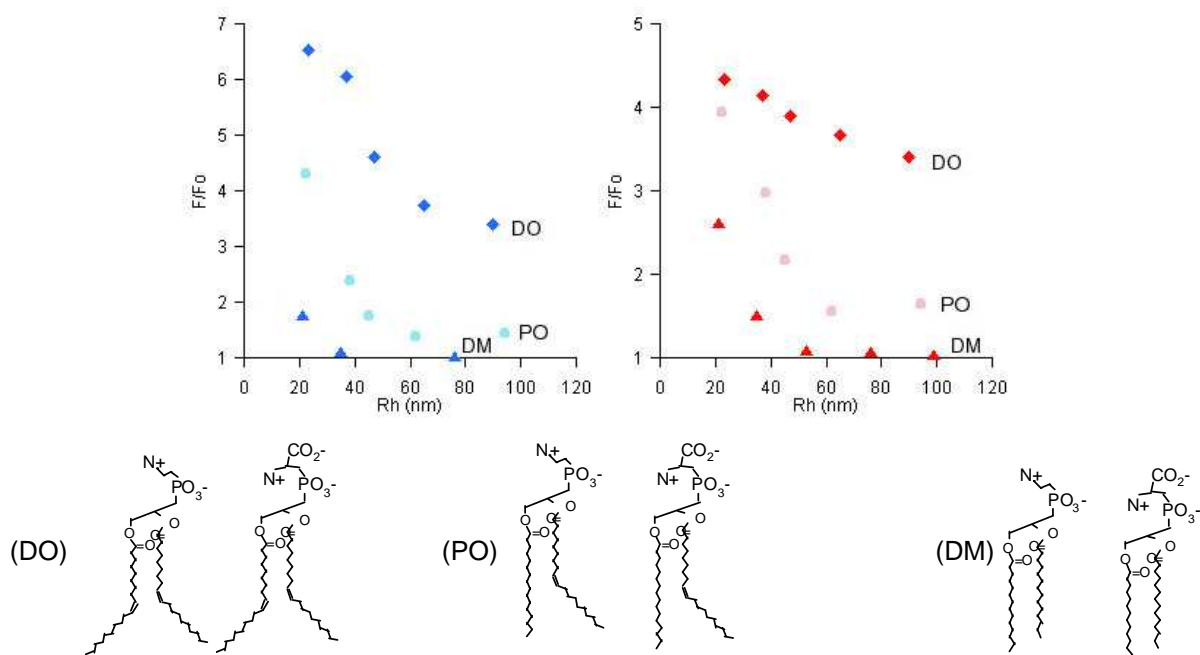


Figure 61 : Mesures de liaison de l' α -synucléine et de l'ALPS de GMAP-210 en fonction du rayon des liposomes (eggPC 40%, PE 30% PS, 30% ; cholestérol/phospholipides 1/5) selon l'insaturation des phospholipides PE et PS : dioléyl (DO) (losanges), palmitoyl-oléyl (PO) (ronds, référence de la figure 58), dimyristate (DM) (triangles)

Certaines publications suggéraient que l' α -synucléine reconnaissait spécifiquement la charge négative de la phosphatidylsérine et la géométrie des chaînes grasses de ce lipide. Cette hypothèse était intéressante, compte tenu de la physicochimie atypique de la protéine. Pour tester cette hypothèse, nous avons comparé deux membranes présentant le même « packing » global et la même charge globale où nous avons interverti les têtes polaires et les acides gras. L'une des préparations de liposomes contenait du DOPE et du DMPS alors que la seconde contenait du DMPE et du DOPS.

La réponse de l' α -synucléine est la même sur les deux types de liposomes, ce qui démontre l'indépendance entre la charge négative et la nature des chaînes grasses portées par la phosphatidylsérine (cf. figure 62). L' α -synucléine est sensible au « packing » global de la membrane.

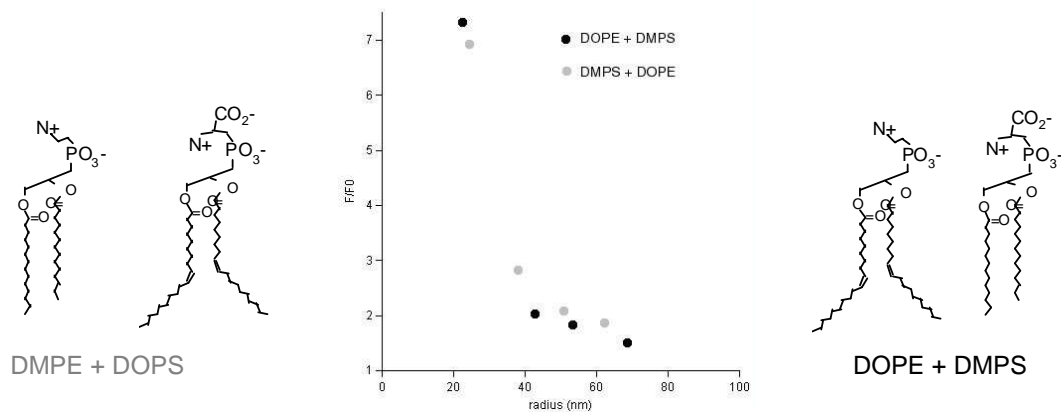


Figure 62 : Mesures de liaison de l' α -synucléine en fonction du rayon des liposomes sur une membrane eggPC 40%, PE 30% PS, 30% ; cholestérol/phospholipides 1/5. Le « packing » global de la membrane est conservé: DOPE et DMPS (en noir) versus DMPE et DOPS (en gris)

5) Phospholipides polyinsaturés et cholestérol

Les membranes synaptiques présentent 50 % de phospholipides polyinsaturés. Cette polyinsaturation concerne quasiment exclusivement la phosphatidylsérine et la phosphatidyléthanolamine. Par ailleurs, ces membranes contiennent un taux élevé de cholestérol avec un rapport molaire phospholipides/cholestérol de 1/1 (Takamori et al., 2006). La structure des acides gras polyinsaturés (omega-3) dans la membrane est mal connue. Du fait de leur longueur (22 carbones) et de leurs multiples insaturations (6), ils semblent repliés sur eux-mêmes (Glomset, 2006). Cette conformation singulière pourrait favoriser la liaison de l' α -synucléine possédant de petits acides aminés hydrophobes et gêner la liaison de l'ALPS de GMAP-210. Cette hypothèse était renforcée par une étude montrant la dépendance de l' α -synucléine à la phosphatidylsérine constituée de chaînes grasses stéarique et docosahexanoïque (ω -3). Notons que le fond lipidique est curieux avec un tiers de sphingomyéline, un tiers de phosphatidylsérine et un tiers de cholestérol. (Kubo et al., 2005).

Le remplacement des chaînes palmitoyl-oléyl en stéaroyl- ω 3 de la phosphatidyléthanolamine et de la phosphatidylsérine a un effet modeste sur la liaison de GMAP-210 et de l' α -synucléine (cf. figure 63). Contrairement à notre hypothèse, GMAP-210 reste capable de se lier à de telles membranes. La liaison de GMAP-210 est faiblement diminuée dans ce contexte polyinsaturé alors que celle de l' α -synucléine est très légèrement améliorée. Remarquons que pour un rayon proche de 40nm correspondant à celui des vésicules COPI, la liaison de GMAP-210 est très faible et inchangée pour l' α -synucléine. De la même façon, pour un rayon de 20nm correspondant à celui des vésicules synaptiques, la liaison de l' α -synucléine est meilleure alors que celle de GMAP-210 est réduite. Pour affiner ce résultat, j'ai comparé les courbes de titration sur des liposomes soniqués polyinsaturés ou non de chacune des deux protéines. Ces expériences (non montrées) semblent confirmer la meilleure adaptation de l' α -synucléine aux membranes polyinsaturées que GMAP-210.

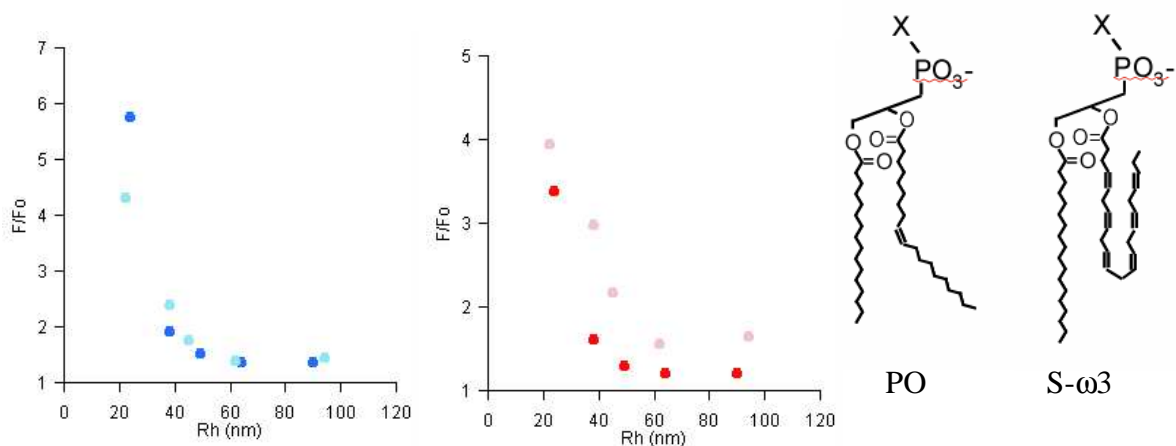


Figure 63 : Mesures de liaison de l' α -synucléine (en bleu) et de l'ALPS de GMAP-210 (en rouge) en fonction du rayon des liposomes de type eggPC 40%, PE 30% PS, 30% ; cholestérol/phospholipides 1/5. La phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylsérine ont des chaînes grasses palmitoyl-oléyl (clair, référence de la figure 58) ou stéaroyl- ω 3 (foncé).

L'effet des polyinsaturés semble donc modeste. Se pose alors la question des résultats obtenus par Kubo et al. montrant que dans des membranes constituées de phosphatidylsérine (33%), sphingomyéline (33%), et de cholestérol (33%) l' α -synucléine ne se lie que lorsque la phosphatidylsérine est polyinsaturée. Bien que la composition lipidique de ces membranes nous apparaissait surprenante, j'ai refait l'expérience tant en fluorescence NBD qu'en flottaison et n'ai pu reproduire leurs résultats (non montré). La liaison de l' α -synucléine à des liposomes courbés ne dépend pas de la polyinsaturation des chaînes grasses de la phosphatidylsérine. La liaison est, par ailleurs, meilleure en présence de dioléylphosphatidylsérine. Ce résultat est en adéquation avec la sensibilité au « packing » que

nous avons montrée. Néanmoins, il est difficile d'expliquer la différence entre les résultats publiés et les nôtres.

En conclusion, cette étude comparative entre l'interaction de GMAP-210 et de l' α -synucléine avec des membranes de rayon défini a permis de montrer que ces protéines sont toutes deux de très bons senseurs de la courbure membranaire. En dépit de leur physicochimie très différente, leur liaison aux membranes requiert un fort rayon de courbure. Le maximum de liaison de l' α -synucléine est sur des liposomes soniqués de 20nm de rayon alors que l'ALPS se lie totalement sur des liposomes extrudés de 30nm de rayon. Nous pouvons noter qu'elles semblent donc adaptées à la courbure des vésicules sur lesquelles elles fonctionnent, les vésicules synaptiques et golgiennes ont respectivement des rayons de 20 et 35nm.

L' α -synucléine est strictement dépendante de la présence d'un taux élevé de phospholipides anioniques dans les membranes. Par ailleurs, il semble que tous les phospholipides anioniques ne contribuent pas de la même façon à la liaison de la protéine. Ainsi, j'ai pu mesurer que la présence de deux phospholipides anioniques très différents en terme de volume de tête polaire, l'acide phosphatidique (petite tête) et le phosphatidylglycérol (tête volumineuse), n'a pas le même effet sur la liaison de la protéine (non montré). L'acide phosphatidique est bien plus favorable que le phosphatidylglycérol. Les phosphoinositides de l'appareil de Golgi avec le volumineux inositol ne sont donc probablement pas adaptés à l' α -synucléine. A la différence de l' α -synucléine, GMAP-210 ne nécessite pas de phospholipides chargés négativement. Par contre, en dépit d'une courte séquence acide en aval du motif ALPS de GMAP-210, un taux important de charges négatives ne semble pas interférer avec la liaison de l'extrémité N-terminale GMAP-210 aux liposomes.

La modification du « packing » de la membrane par l'utilisation de lipides coniques (phospholipides dioléyl) diminue la dépendance à la courbure des deux protéines. Ces lipides coniques créent des espaces dans la membrane facilitant l'interaction des deux hélices. A l'inverse, des lipides très compacts comme des phospholipides dimyristoyl gênent la liaison de l' α -synucléine et de GMAP-210. L'une des hypothèses était que la physicochimie de l' α -synucléine (face hydrophobe composée de petits acides aminés hydrophobes et de thréonines, face polaire zwitterionique) pourrait être adaptée à la lipidomique singulière de la vésicule synaptique (fortement polyinsaturée et riche en cholestérol). De plus, plusieurs études *in vivo* ont montré un lien entre l' α -synucléine, le transport vésiculaire et le métabolisme lipidique

des acides gras oméga-3 (Kitajka et al., 2004) (Ben Gedalya et al., 2009). Les résultats ont été assez décevants, l'effet des polyinsaturés sur la liaison de l' α -synucléine semble subtil, l'étude devra être poursuivie.

C) Questions sur les hélices amphipathiques

Motifs ALPS de GMAP-210 et spécificité membranaire

Une question importante non résolue à ce jour est de comprendre la spécificité de l'interaction des motifs ALPS de GMAP-210 vis-à-vis des membranes courbées de différente nature. Autrement dit, pourquoi GMAP-210 se lie *in vivo* sur des vésicules golgiennes et non pas sur des vésicules dérivées de la membrane plasmique ? Autant, l' α -synucléine par sa très nette dépendance à la charge négative des membranes, ne peut interagir avec les membranes peu chargées des compartiments de la voie sécrétoire ; autant, nous n'avons pas trouvé les paramètres lipidiques contrôlant négativement la liaison de GMAP-210 avec les membranes synaptiques. Une piste intéressante pourrait nous être donnée par les études de Cathy Jackson. En effet, elle montre très nettement que la surexpression dans la levure de l'extrémité N-terminale de GMAP-210 et de l' α -synucléine conduit à l'accumulation de vésicules d'origine très différente. Une étude lipidomique des amas de vésicules piégées par ces protéines pourraient nous donner la composition des membranes. Nous ne pouvons exclure que, par une synergie d'interactions, des protéines associées aux vésicules golgiennes puissent restreindre l'interaction avec GMAP-210 ou encore que l'ancrage de la corde via son domaine C-terminal sur les citernes golgiennes limite son exposition aux seules vésicules golgiennes.

Physicochimie de l' α -synucléine et sensibilité à la courbure

Nous savons que les motifs ALPS sont senseurs de courbure en raison de la physicochimie atypique de la face polaire de l'hélice amphipathique. En revanche, nous n'avons pas démontré pourquoi l' α -synucléine, hélice amphipathique possédant une face polaire zwitterionique, est un si bon senseur de courbure membranaire. D'une façon plus générale, pourquoi des hélices amphipathiques sont très sensibles à la courbure membranaire ? Une hypothèse réaliste est de dire que la liaison à des membranes courbées est la conséquence de défauts dans l'hélice. Ainsi, l'ALPS sans résidus basiques ne peut interagir électrostatiquement avec les membranes. L'observation en détail de l'étude de l' α -synucléine

nous conduit à soupçonner non pas la face polaire mais la face hydrophobe caractérisée par des valines et des thréonines. Les valines sont les acides aminés présentant la chaîne latérale la plus courte avec les alanines. Or, nous savons que la mutation de résidus hydrophobes en alanines a des effets négatifs sur la liaison des hélices amphipathiques. Il serait intéressant de remplacer certaines valines en leucines qui sont des résidus plus fréquemment rencontrés dans les hélices amphipathiques voire même en résidus aromatiques comme la phénylalanine. Sans conteste, le plus intrigant est la rangée de résidus hydroxylés, les thréonines, au centre de la face hydrophobe. J'ai construit un mutant de l' α -synucléine dans lequel j'ai substitué toutes les thréonines par des résidus hydrophobes. Faute de temps, je n'ai pu le caractériser. Enfin, la périodicité originale (3/11) de l' α -synucléine pourrait être impliquée dans la sensibilité à la courbure de la protéine. Il est intéressant de constater que cette périodicité est également retrouvée dans les apolipoprotéines. Les apolipoprotéines sont de longues hélices englobant des particules lipidiques d'une dizaine de nanomètres de diamètre dont la surface est une monocouche de phospholipides. De la même manière que l' α -synucléine, des motifs de 11 acides aminés (et également de 22) sont répétés dans la séquence des apolipoprotéines. L'étude de Jao suggère que l'hélice de l' α -synucléine, en raison des décalages des liaisons hydrogènes dus à sa périodicité, n'est pas linéaire mais courbe et donc présente une adaptation géométrique adaptée à des vésicules.

Physicochimie de différentes hélices amphipathiques

Le répertoire des hélices amphipathiques est très vaste. Nous avons vu essentiellement des hélices amphipathiques de protéines humaines. Je conclurai cette partie avec trois hélices amphipathiques originale présentes dans la bactérie et la levure (cf. figure 64).

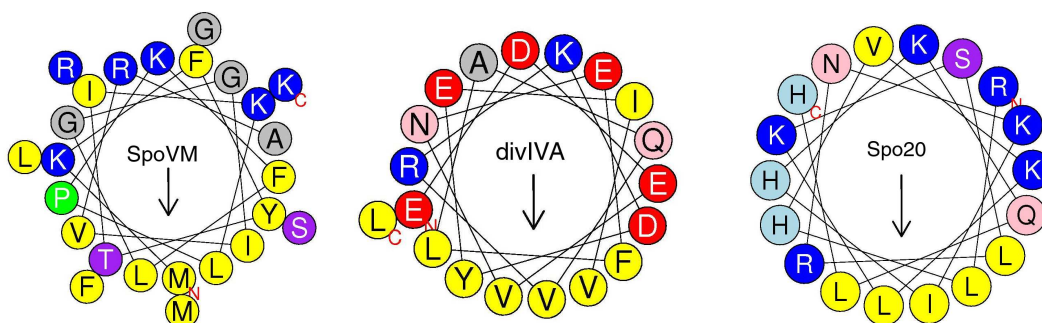


Figure 64: Représentation des hélices amphipathiques des protéines SpoVM et divIVA présentes dans *Bacillus subtilis* et de la protéine Spo20 présente dans la levure.

Des hélices amphipathiques gouvernent la distribution de protéines périmembranaires dans la bactérie. C'est ainsi que la protéine SpoVM est spécifiquement recrutée sur les spores, larges structures endomembranaires d'environ 1 μ m de diamètre dérivées de la membrane plasmique, de *Bacillus subtilis*. L'interaction repose sur une hélice amphipathique de 26 résidus qui reconnaît la courbure de la spore (Ramamurthi et al., 2009). L'hélice amphipathique contient une proline, résidu très défavorable à la structure en hélice. Pourtant, cette proline s'avère très importante. Sa mutation en alanine abolit le recrutement spécifique de cette protéine à la surface de la membrane de la spore. La protéine devient également localisée au niveau de la membrane plasmique. Des études de liaison *in vitro* sur liposomes montrent que la distribution de la protéine en fonction du diamètre des liposomes est déplacée de 2 à 8 μ m lorsque la proline est mutée. Le mécanisme de reconnaissance de la (faible) courbure membranaire de la spore est à élucider, en particulier le rôle de cette proline.

Une autre protéine, présente dans *Bacillus subtilis*, appelée DivIVA est impliquée dans la division cellulaire. La protéine est localisée au niveau de la membrane en cours de cytokinèse et au niveau des pôles, c'est-à-dire des membranes courbées et présentant une courbure négative. La liaison aux membranes dépend d'une hélice amphipathique conservée dans les différentes souches bactériennes dont la face polaire zwitterionique est inversée, les résidus acides sont à l'interface, les résidus basiques sont en crête. Le mécanisme est également à découvrir. (Lenarcic et al., 2009) (Ramamurthi and Losick, 2009)

Dans la levure, Spo20 est une protéine SNARE sensible à l'acide phosphatidique (Liu et al., 2007). La reconnaissance de ce phospholipide repose sur une courte hélice amphipathique (5 tours d'hélice) avec une face hydrophobe réduite et une grande face polaire riche en résidus basiques et possédant trois histidines. Le mécanisme est inconnu à ce jour. Assurément, de nombreuses investigations devront être menées afin de mieux comprendre la physicochimie des hélices amphipathiques et leurs adaptations aux membranes lipidiques.

VIII) Conclusion

Au cours de cette thèse, je me suis intéressé à deux protéines humaines impliquées dans le trafic vésiculaire. GMAP-210 est une corde moléculaire localisée au niveau de l'appareil de Golgi. L' α -synucléine est une protéine localisée au niveau des vésicules synaptiques. Ces deux protéines contiennent toutes deux une hélice amphipathique senseur de la courbure membranaire. Ces hélices présentent néanmoins des physicochimies très différentes. La longue hélice de l' α -synucléine a la particularité d'avoir une face polaire hydrophobe composée de petits résidus et de thréonines et une face polaire zwitterionique avec des lysines interfaciales. GMAP-210 contient à son extrémité N-terminale une hélice de type ALPS caractérisée par l'abondance de résidus hydroxylés et l'absence de résidus basiques dans la face polaire. En dépit des différences importantes de physicochimie et hormis la stricte dépendance de l' α -synucléine à la charge négative des membranes, les mesures *in vitro* ont montré des propriétés de liaison assez similaires des deux protéines. Les résultats devront être affinés, en particulier ceux portant sur la liaison de GMAP-210 et de l' α -synucléine à des membranes fortement polyinsaturées.

L'autre extrémité de GMAP-210 interagit avec Arf1GTP. Cette interaction est contrôlée négativement et indirectement par la courbure membranaire. En effet, ArfGAP1 rend stable l'interaction du complexe uniquement sur des membranes planes. Par ses deux extrémités aux propriétés bien distinctes, GMAP-210 relie des membranes courbées (vésicules) à des membranes planes (cisternes). Cette connexion hétérotypique de membranes dépend de quatre types d'hélices amphipathiques : le motif ALPS à l'extrémité N-terminale, l'hélice en aval du domaine C-terminal de liaison avec Arf1GTP, l'hélice amphipathique myristylée d'Arf1 et enfin les motifs ALPS d'ArfGAP1. L'accompagnement de vésicules par GMAP-210 semble être un processus très dynamique. Autant l'extrémité C-terminale est ancrée durablement sur les membranes recouvertes d'Arf1, autant l'extrémité N-terminale semble se lier très transitoirement aux vésicules de transport.

Les hélices amphipathiques sont des structures protéiques très simples mais la diversité de leur physicochimie suggère une adaptation remarquable aux différentes membranes. L'interface lipides/hélices est très complexe et de nombreuses subtilités nous échappent encore, tant au niveau de la biochimie des hélices que de la cartographie lipidique

des membranes. L'utilisation conjointe de plusieurs approches expérimentales comme la biochimie, la bioinformatique (recherche ciblée d'hélices, analyse à haute résolution des interactions atomiques entre protéines et lipides) et la biologie cellulaire permettra sans doute de mieux comprendre ce dialogue subtil entre lipides et protéines.

Liste des abréviations

ALPS : amphipathic lipid packing sensor

ArfGAP : Arf GTPase activating protein

ARNO : Arf1 nucleotide site opener

ATP : adenosine triphosphate

CCT : CTP-phosphocholine cytidyltransferase

COPI : coat protein I

COPII : coat protein II

FRET : fluorescence resonance energy transfer

GDP : guanosine diphosphate

GRAB : GRIP-related Arf-binding

GTP : guanosine triphosphate

GST : Glutathione S-transferase

PC : phosphatidylcholine

PH : pleckstrin homology

PE : phosphatidyléthanolamine

PI : phosphatidylinositol

PI3P : phosphatidylinositol-3-phosphate

PI4,5P₂ : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PS : phosphatidylsérine

SDS : sodium dodécylsulfate

Liste des figures

Figure 1 : Photographie de microscopie électronique montrant des vésicules de 70 nm formées à partir de fractions golgiennes incubées en présence d'ATP.

Figure 2 : Illustration du trafic vésiculaire de type COPI, COPII et clathrine

Figure 3: Illustration du recrutement du manteau COPII à la surface membranaire

Figure 4: Cage COPII et cage de clathrine dont un triskèle

Figure 5 : Structure du domaine ENTH. Mise en évidence de l'hélice H0

Figure 6 : Microscopie électronique de liposomes seuls ou incubés avec l'epsine

Figure 7 : Hélices de l'epsine, de l'endophiline et de l'amphiphysine

Figure 8 : Position d'une hélice modèle (segment d'une apolipoprotéine) dans une bicouche lipidique (dioléylphosphatidylcholine) par des méthodes de diffraction aux rayons X

Figure 9: Représentation de différents phospholipides

Figure 10: Cartographie des lipides membranaires : quantification et distribution chez les mammifères et dans la levure

Figure 11 : Structure du domaine FYVE. Vue de la poche de stéréospécificité du PI3P

Figure 12 : Macrophages transfectés par des sondes basiques présentant 2, 4, ou 8 résidus basiques

Figure 13: Représentation de deux hélices amphipathiques de deux peptides antimicrobiens (magainine, cécropine)

Figure 14 : Agencement de phospholipides coniques dans le feuillet d'une bicouche lipidique

Figure 15 : Schéma publié dans Cell en 1991 suggérant une bascule du myristate dans Arf entre la forme GDP et la forme GTP

Figure 16 : Représentation de l'alpha hélice N-terminale de la petite protéine G Arf1

Figure 17 : Cinétique (suivie par FRET) de recrutement et de dissociation d'Arf1 de liposomes

Figure 18 : Changements conformationnels induits lors de l'échange GDP/GTP induisant la libération de l'hélice amphipathique N-terminale

Figure 19a : Mesure par fluorescence des tryptophanes de la vitesse de l'hydrolyse du GTP d'Arf1 en fonction du rayon de courbure des liposomes

Figure 19b : Mesure par diffusion statique de la cinétique du désassemblage du manteau en fonction du rayon de courbure des liposomes

Figure 20 : Expérience de flottaison d'ArfGAP1 : des liposomes de différents rayons de courbure sont incubés avec ArfGAP1

Figure 21: Représentation en hélice alpha de l'ALPS1 d'ArfGAP1 et dichroïsme circulaire du peptide en solution ou en présence de liposomes très courbés

Figure 22 : Conséquences de la physicochimie d'une hélice amphipathique sur la liaison aux membranes

Figure 23 : Représentation de l'ALPS1 d'ArfGAP1 et du mutant portant deux lysines à l'interface

Figure 24 : L'ALPS d'ArfGAP1 se structure en hélice sur des membranes courbées

Figure 25 : Représentation des hélices ALPS de GMAP-210, Kes1p et Nup133

Figure 26 : Mise en évidence de l'hélice ALPS fermant la poche de Kes1 contenant le cholestérol

Figure 27 : Schéma du transport d'une vésicule entre deux compartiments

Figure 28 : Microscopie électronique montrant des vésicules connectées à des citernes golgiennes par des fibres

Figure 29 : Microscopie optique de cellules Hela sauvages ou surexprimant GMAP-210

Figure 30: Représentation de l'ALPS de GMAP-210 et spectres de dichroïsme circulaire du peptide ALPS en solution et en présence de petits liposomes

Figure 31 : Alignements du présumé domaine GRAB de Rud3p et GMAP-210 avec le domaine GRIP de la golgine-245

Figure 32 : Schéma des différentes constructions de l'extrémité C-terminale de GMAP-210 et représentation en hélice alpha de la séquence [1830-1843]. Flottaisons de l'extrémité C-terminale contenant ou non l'hélice amphipathique en présence d'Arf1GDP ou Arf1GTP.

Figure 33 : Marquage de la cystéine 1830 positionnée en aval du motif GRAB. Quantification sur gel et spectroscopique du ratio de protéines marquées

Figure 34 : Suivi par fluorescence NBD des cinétiques de recrutement de GMAP Cter NBD en fonction de la concentration d'Arf1. Spectre de GMAP Cter NBD en présence d'Arf1 GDP ou d'Arf1 GTP. Modèle de l'interaction

Figure 35: Structure du domaine GRIP (co-cristal GRIP Arl1) et mise en évidence de la reconnaissance de la tyrosine (Y2177 en vert) de GRIP par une poche d'Arl1

Figure 36 : Suivi par fluorescence NBD de la désorption de l'extrémité C-terminale de GMAP-210 de la membrane par ArfGAP1 ou ArfGAP3 et quantification de la vitesse de

détachement de la membrane en fonction du rayon de courbure des liposomes. Gels de flottaison de l'extrémité N-terminale et C-terminale (en présence d'Arf1, avec ou sans ArfGAP1) de GMAP-210 en fonction de la courbure membranaire.

Figure 37: L'attachement asymétrique par GMAP-210 de membranes courbées à des membranes planes recouvertes d'Arf1GTP repose sur 4 types d'hélices amphipathiques : l'hélice ALPS de GMAP-210, l'hélice en aval du domaine GRAB, l'hélice d'Arf et l'hélice ALPS1 d'ArfGAP

Figure 38: Microscopie optique de liposomes géants verts entourés de très petits liposomes rouges en présence d'Arf1, son facteur d'échange, GMAP-210 et ArfGAP1. Microscopie électronique d'un assemblage de gros et petits liposomes par GMAP-210

Figure 39 : Localisation subcellulaire des extrémités de GMAP-210

Figure 40 : Double ancrage de la golgine GCC185 à la membrane par Arl1 et Rab6. Mise en évidence de l'interaction entre 5 tours de coiled-coil et les switch de Rab6

Figure 41 : Effet d'ArfGAP1 sur le complexe Arf1GTP/GMAP-210 suivant la concentration de GMAP-210

Figure 42: Schéma du bourgeonnement d'une vésicule COPI et de la capture d'une vésicule par GMAP-210

Figure 43 : Cinétique de recrutement du coatomer en présence de différentes concentrations de l'extrémité C-terminale de GMAP-210

Figure 44 : Sédimentation du N-terminal de GMAP-210 sur un coussin de sucrose

Figure 45 : Titration de 250nM du N-terminal de GMAP-210 marqué au NBD avec des liposomes soniqués contenant ou non de la rhodamine.

Figure 46 : Cinétiques et spectres du déplacement de l'extrémité N-terminale de GMAP-210

Figure 47 : Cinétiques et spectres du déplacement de l'ALPS 1+2 d'ArfGAP1

Figure 48: Cinétiques et spectres du déplacement de l'ALPS 1 d'ArfGAP1

Figure 49 : Cinétiques et spectres du déplacement de l'extrémité C-terminale de GMAP-210

Figure 50 : Cinétiques et spectres du déplacement du complexe GMAP-210/Arf1

Figure 51 : Schéma d'une vésicule accompagnée par une seule corde ou d'une vésicule échangée entre plusieurs cordes

Figure 52 : Alignements de l' α -synucléine par séquences de 11 résidus

Figure 53: Chromatographie d'exclusion de l' α -synucléine incubée avec un mélange de liposomes soniqués et de vésicules multilamellaires de différentes compositions lipidiques

Figure 54 : Equilibre physiologique de l' α -synucléine entre la forme non structurée en solution et la forme en hélice liée à des vésicules

Figure 55: Accessibilité des différents résidus de l' α -synucléine à l'eau ou à la membrane

Figure 56 : Représentation en hélice alpha de l'ALPS de GMAP-210 et de 33 résidus de l' α -synucléine

Figure 57 : Mesures de liaison de l' α -synucléine et de GMAP-210 (250nM) en fonction de la concentration de liposomes soniqués (eggPC 40%, POPE 30% POPS, 30% ; cholestérol/phospholipides 1/5)

Figure 58 : Mesures de liaison de l' α -synucléine et de l'ALPS de GMAP-210 en fonction du rayon des liposomes sur une membrane « classique » (eggPC 40%, POPE 30% POPS, 30% ; cholestérol/phospholipides 1/5)

Figure 59 : Mesures de liaison de l' α -synucléine et de l'ALPS de GMAP-210 en fonction du rayon des liposomes selon deux compositions membranaires données, une globalement chargée négativement (eggPC 40%, POPE 30% POPS, 30% ; cholestérol/phospholipides 1/5)

Figure 60: Mesures de liaison de l' α -synucléine en fonction du rayon des liposomes et selon le pourcentage de phospholipides anioniques (PS) (eggPC 25%, liverPE 35%, DOPS x%, DOPE 40-x% ; cholestérol/phospholipides 1/2)

Figure 61 : Mesures de liaison de l' α -synucléine et de l'ALPS de GMAP-210 en fonction du rayon des liposomes (eggPC 40%, PE 30% PS, 30% ; cholestérol/phospholipides 1/5) selon l'insaturation des phospholipides PE et PS : dioléyl, palmitoyl-oléyl (référence de la figure 60) et dimyristate

Figure 62 : Mesures de liaison de l' α -synucléine en fonction du rayon des liposomes sur une membrane eggPC 40%, PE 30% PS, 30% ; cholestérol/phospholipides 1/5. Le « packing » global de la membrane est conservé: DOPE et DMPS versus DMPE et DOPS

Figure 63 : Mesures de liaison de l' α -synucléine et de l'ALPS de GMAP-210 en fonction du rayon des liposomes de type eggPC 40%, PE 30% PS, 30% ; cholestérol/phospholipides 1/5. La phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylsérine ont des chaînes grasses palmitoyl-oléyl (clair, référence de la figure 55) ou stéaroyl- ω 3.

Figure 64: Représentation des hélices amphipathiques des protéines SpoVM et divIVA présentes dans Bacillus subtilis et de la protéine Spo20 présente dans la levure

Références bibliographiques

Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L. M., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., Suprpto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B. T., *et al.* (2007). The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature* 450, 695-701.

Antonny, B. (2006). Membrane deformation by protein coats. *Curr Opin Cell Biol* 18, 386-394.

Antonny, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P., and Chabre, M. (1997a). N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry* 36, 4675-4684.

Antonny, B., Huber, I., Paris, S., Chabre, M., and Cassel, D. (1997b). Activation of ADP-ribosylation factor 1 GTPase-activating protein by phosphatidylcholine-derived diacylglycerols. *J Biol Chem* 272, 30848-30851.

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, 9917-9924.

Attard, G. S., Templer, R. H., Smith, W. S., Hunt, A. N., and Jackowski, S. (2000). Modulation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase by membrane curvature elastic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9032-9036.

Barinaga-Rementeria Ramirez, I., and Lowe, M. (2009). Golgins and GRASPs: Holding the Golgi together. *Semin Cell Dev Biol*.

Barr, F. A., and Egerer, J. (2005). Golgi positioning: are we looking at the right MAP? *J Cell Biol* 168, 993-998.

Barr, F. A., Nakamura, N., and Warren, G. (1998). Mapping the interaction between GRASP65 and GM130, components of a protein complex involved in the stacking of Golgi cisternae. *Embo J* 17, 3258-3268.

Beard, M., Satoh, A., Shorter, J., and Warren, G. (2005). A cryptic Rab1-binding site in the p115 tethering protein. *J Biol Chem* 280, 25840-25848.

Ben Gedalya, T., Loeb, V., Israeli, E., Altschuler, Y., Selkoe, D. J., and Sharon, R. (2009). Alpha-synuclein and polyunsaturated fatty acids promote clathrin-mediated endocytosis and synaptic vesicle recycling. *Traffic* 10, 218-234.

Beraud-Dufour, S., Robineau, S., Chardin, P., Paris, S., Chabre, M., Cherfils, J., and Antonny, B. (1998). A glutamic finger in the guanine nucleotide exchange factor ARNO displaces Mg²⁺ and the beta-phosphate to destabilize GDP on ARF1. *Embo J* 17, 3651-3659.

Bigay, J., Casella, J. F., Drin, G., Mesmin, B., and Antonny, B. (2005). ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *Embo J* 24, 2244-2253.

- 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.
- Bonifacino, J. S., and Glick, B. S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116, 153-166.
- Boumann, H. A., Gubbens, J., Koorengel, M. C., Oh, C. S., Martin, C. E., Heck, A. J., Patton-Vogt, J., Henry, S. A., de Kruijff, B., and de Kroon, A. I. (2006). Depletion of phosphatidylcholine in yeast induces shortening and increased saturation of the lipid acyl chains: evidence for regulation of intrinsic membrane curvature in a eukaryote. *Mol Biol Cell* 17, 1006-1017.
- Burguete, A. S., Fenn, T. D., Brunger, A. T., and Pfeffer, S. R. (2008). Rab and Arl GTPase family members cooperate in the localization of the golgin GCC185. *Cell* 132, 286-298.
- Cardenas, J., Rivero, S., Goud, B., Bornens, M., and Rios, R. M. (2009). Golgi localisation of GMAP210 requires two distinct cis-membrane binding mechanisms. *BMC Biol* 7, 56.
- Caro, L. G., and Palade, G. E. (1964). Protein Synthesis, Storage, And Discharge In The Pancreatic Exocrine Cell. An Autoradiographic Study. *J Cell Biol* 20, 473-495.
- Casanova, J. E. (2007). Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors. *Traffic* 8, 1476-1485.
- Cohen, L. A., Honda, A., Varnai, P., Brown, F. D., Balla, T., and Donaldson, J. G. (2007). Active Arf6 recruits ARNO/cytohesin GEFs to the PM by binding their PH domains. *Mol Biol Cell* 18, 2244-2253.
- Cosson, P., and Letourneur, F. (1994). Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* 263, 1629-1631.
- Davidson, W. S., Jonas, A., Clayton, D. F., and George, J. M. (1998). Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem* 273, 9443-9449.
- Di Paolo, G., and De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443, 651-657.
- Donaldson, J. G., Cassel, D., Kahn, R. A., and Klausner, R. D. (1992). ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatamer protein beta-COP to Golgi membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6408-6412.
- Drin, G., Casella, J. F., Gautier, R., Boehmer, T., Schwartz, T. U., and Antonny, B. (2007). A general amphipathic alpha-helical motif for sensing membrane curvature. *Nat Struct Mol Biol* 14, 138-146.
- Drin, G., Morello, V., Casella, J. F., Gounon, P., and Antonny, B. (2008). Asymmetric tethering of flat and curved lipid membranes by a golgin. *Science* 320, 670-673.

- Dumas, J. J., Merithew, E., Sudharshan, E., Rajamani, D., Hayes, S., Lawe, D., Corvera, S., and Lambright, D. G. (2001). Multivalent endosome targeting by homodimeric EEA1. *Mol Cell* 8, 947-958.
- Farsad, K., Ringstad, N., Takei, K., Floyd, S. R., Rose, K., and De Camilli, P. (2001). Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J Cell Biol* 155, 193-200.
- Fath, S., Mancias, J. D., Bi, X., and Goldberg, J. (2007). Structure and organization of coat proteins in the COPII cage. *Cell* 129, 1325-1336.
- Follit, J. A., San Agustin, J. T., Xu, F., Jonassen, J. A., Samtani, R., Lo, C. W., and Pazour, G. J. (2008). The Golgin GMAP210/TRIP11 anchors IFT20 to the Golgi complex. *PLoS Genet* 4, e1000315.
- Ford, M. G., Mills, I. G., Peter, B. J., Vallis, Y., Praefcke, G. J., Evans, P. R., and McMahon, H. T. (2002). Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* 419, 361-366.
- Fotin, A., Cheng, Y., Sliz, P., Grigorieff, N., Harrison, S. C., Kirchhausen, T., and Walz, T. (2004). Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature* 432, 573-579.
- Franco, M., Chardin, P., Chabre, M., and Paris, S. (1993). Myristoylation is not required for GTP-dependent binding of ADP-ribosylation factor ARF1 to phospholipids. *J Biol Chem* 268, 24531-24534.
- Franco, M., Chardin, P., Chabre, M., and Paris, S. (1995). Myristoylation of ADP-ribosylation factor 1 facilitates nucleotide exchange at physiological Mg²⁺ levels. *J Biol Chem* 270, 1337-1341.
- Gautier, R., Douguet, D., Antonny, B., and Drin, G. (2008). HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties. *Bioinformatics* 24, 2101-2102.
- Gillingham, A. K., and Munro, S. (2007). The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 579-611.
- Gillingham, A. K., Tong, A. H., Boone, C., and Munro, S. (2004). The GTPase Arf1p and the ER to Golgi cargo receptor Erv14p cooperate to recruit the golgin Rud3p to the cis-Golgi. *J Cell Biol* 167, 281-292.
- Glomset, J. A. (2006). Role of docosahexaenoic acid in neuronal plasma membranes. *Sci STKE* 2006, pe6.
- Goedert, M. (2001). Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2, 492-501.
- Goldberg, J. (1998). Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell* 95, 237-248.
- Hosobuchi, M., Kreis, T., and Schekman, R. (1992). SEC21 is a gene required for ER to Golgi protein transport that encodes a subunit of a yeast coatomer. *Nature* 360, 603-605.

Hristova, K., Wimley, W. C., Mishra, V. K., Anantharamiah, G. M., Segrest, J. P., and White, S. H. (1999). An amphipathic alpha-helix at a membrane interface: a structural study using a novel X-ray diffraction method. *J Mol Biol* 290, 99-117.

Infante, C., Ramos-Morales, F., Fedriani, C., Bornens, M., and Rios, R. M. (1999). GMAP-210, A cis-Golgi network-associated protein, is a minus end microtubule-binding protein. *J Cell Biol* 145, 83-98.

Jackson, C. L. (2009). Mechanisms of transport through the Golgi complex. *J Cell Sci* 122, 443-452.

Jao, C. C., Der-Sarkissian, A., Chen, J., and Langen, R. (2004). Structure of membrane-bound alpha-synuclein studied by site-directed spin labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8331-8336.

Jao, C. C., Hegde, B. G., Chen, J., Haworth, I. S., and Langen, R. (2008). Structure of membrane-bound alpha-synuclein from site-directed spin labeling and computational refinement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19666-19671.

Kalmar, G. B., Kay, R. J., Lachance, A., Aebersold, R., and Cornell, R. B. (1990). Cloning and expression of rat liver CTP: phosphocholine cytidylyltransferase: an amphipathic protein that controls phosphatidylcholine synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6029-6033.

Kitajka, K., Sinclair, A. J., Weisinger, R. S., Weisinger, H. S., Mathai, M., Jayasooriya, A. P., Halver, J. E., and Puskas, L. G. (2004). Effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on brain gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10931-10936.

Kubo, S., Nemani, V. M., Chalkley, R. J., Anthony, M. D., Hattori, N., Mizuno, Y., Edwards, R. H., and Fortin, D. L. (2005). A combinatorial code for the interaction of alpha-synuclein with membranes. *J Biol Chem* 280, 31664-31672.

Larsen, K. E., Schmitz, Y., Troyer, M. D., Mosharov, E., Dietrich, P., Quazi, A. Z., Savalle, M., Nemani, V., Chaudhry, F. A., Edwards, R. H., *et al.* (2006). Alpha-synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis. *J Neurosci* 26, 11915-11922.

Lenarcic, R., Halbedel, S., Visser, L., Shaw, M., Wu, L. J., Errington, J., Marenduzzo, D., and Hamoen, L. W. (2009). Localisation of DivIVA by targeting to negatively curved membranes. *Embo J* 28, 2272-2282.

Levi, S., Rawet, M., Kliouchnikov, L., Parnis, A., and Cassel, D. (2008). Topology of amphipathic motifs mediating Golgi localization in ArfGAP1 and its splice isoforms. *J Biol Chem* 283, 8564-8572.

Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L. C., Bonifacino, J. S., and Klausner, R. D. (1989). Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* 56, 801-813.

Liu, S., Wilson, K. A., Rice-Stitt, T., Neiman, A. M., and McNew, J. A. (2007). In vitro fusion catalyzed by the sporulation-specific t-SNARE light-chain Spo20p is stimulated by phosphatidic acid. *Traffic* 8, 1630-1643.

- Liu, Y. W., Huang, C. F., Huang, K. B., and Lee, F. J. (2005). Role for Gcs1p in regulation of Arl1p at trans-Golgi compartments. *Mol Biol Cell* 16, 4024-4033.
- Lu, L., Tai, G., Wu, M., Song, H., and Hong, W. (2006). Multilayer interactions determine the Golgi localization of GRIP golgins. *Traffic* 7, 1399-1407.
- Maroteaux, L., Campanelli, J. T., and Scheller, R. H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* 8, 2804-2815.
- Mesmin, B., Drin, G., Levi, S., Rawet, M., Cassel, D., Bigay, J., and Antonny, B. (2007). Two lipid-packing sensor motifs contribute to the sensitivity of ArfGAP1 to membrane curvature. *Biochemistry* 46, 1779-1790.
- Orci, L., Glick, B. S., and Rothman, J. E. (1986). A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: its possible role in protein transport within the Golgi stack. *Cell* 46, 171-184.
- Orci, L., Perrelet, A., and Rothman, J. E. (1998). Vesicles on strings: morphological evidence for processive transport within the Golgi stack. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2279-2283.
- Outeiro, T. F., and Lindquist, S. (2003). Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science* 302, 1772-1775.
- Panic, B., Perisic, O., Veprintsev, D. B., Williams, R. L., and Munro, S. (2003). Structural basis for Arl1-dependent targeting of homodimeric GRIP domains to the Golgi apparatus. *Mol Cell* 12, 863-874.
- Pernet-Gallay, K., Antony, C., Johannes, L., Bornens, M., Goud, B., and Rios, R. M. (2002). The overexpression of GMAP-210 blocks anterograde and retrograde transport between the ER and the Golgi apparatus. *Traffic* 3, 822-832.
- Ramamurthi, K. S., Lecuyer, S., Stone, H. A., and Losick, R. (2009). Geometric cue for protein localization in a bacterium. *Science* 323, 1354-1357.
- Ramamurthi, K. S., and Losick, R. (2009). Negative membrane curvature as a cue for subcellular localization of a bacterial protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Resh, M. D. (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1451, 1-16.
- Rios, R. M., Sanchis, A., Tassin, A. M., Fedriani, C., and Bornens, M. (2004). GMAP-210 recruits gamma-tubulin complexes to cis-Golgi membranes and is required for Golgi ribbon formation. *Cell* 118, 323-335.
- Rios, R. M., Tassin, A. M., Celati, C., Antony, C., Boissier, M. C., Homberg, J. C., and Bornens, M. (1994). A peripheral protein associated with the cis-Golgi network redistributes in the intermediate compartment upon brefeldin A treatment. *J Cell Biol* 125, 997-1013.
- Roth, T. F., and Porter, K. R. (1964). Yolk Protein Uptake In The Oocyte Of The Mosquito *Aedes Aegypti*. *J Cell Biol* 20, 313-332.
- Schekman, R., and Novick, P. (2004). 23 genes, 23 years later. *Cell* 116, S13-15, 11 p following S19.

Scherzer, C. R., and Feany, M. B. (2004). Yeast genetics targets lipids in Parkinson's disease. *Trends Genet* 20, 273-277.

Serafini, T., Orci, L., Amherdt, M., Brunner, M., Kahn, R. A., and Rothman, J. E. (1991a). ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell* 67, 239-253.

Serafini, T., Stenbeck, G., Brecht, A., Lottspeich, F., Orci, L., Rothman, J. E., and Wieland, F. T. (1991b). A coat subunit of Golgi-derived non-clathrin-coated vesicles with homology to the clathrin-coated vesicle coat protein beta-adaptin. *Nature* 349, 215-220.

Sinka, R., Gillingham, A. K., Kondylis, V., and Munro, S. (2008). Golgi coiled-coil proteins contain multiple binding sites for Rab family G proteins. *J Cell Biol* 183, 607-615.

Stagg, S. M., Gurkan, C., Fowler, D. M., LaPointe, P., Foss, T. R., Potter, C. S., Carragher, B., and Balch, W. E. (2006). Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. *Nature* 439, 234-238.

Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Gronborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brugger, B., Ringler, P., *et al.* (2006). Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127, 831-846.

van Meer, G., Voelker, D. R., and Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 112-124.

Vigers, G. P., Crowther, R. A., and Pearse, B. M. (1986). Three-dimensional structure of clathrin cages in ice. *Embo J* 5, 529-534.

Wu, M., Lu, L., Hong, W., and Song, H. (2004). Structural basis for recruitment of GRIP domain golgin-245 by small GTPase Arl1. *Nat Struct Mol Biol* 11, 86-94.

Yadav, S., Puri, S., and Linstedt, A. D. (2009). A primary role for Golgi positioning in directed secretion, cell polarity, and wound healing. *Mol Biol Cell* 20, 1728-1736.

Yeung, T., Gilbert, G. E., Shi, J., Silvius, J., Kapus, A., and Grinstein, S. (2008). Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science* 319, 210-213.

Yeung, T., Terebiznik, M., Yu, L., Silvius, J., Abidi, W. M., Philips, M., Levine, T., Kapus, A., and Grinstein, S. (2006). Receptor activation alters inner surface potential during phagocytosis. *Science* 313, 347-351.

Annexe

La publication ci-jointe a été décrite dans le chapitre IV de cette thèse.



Asymmetric Tethering of Flat and Curved Lipid Membranes by a Golgin

Guillaume Drin, *et al.*
Science **320**, 670 (2008);
DOI: 10.1126/science.1155821

The following resources related to this article are available online at www.sciencemag.org (this information is current as of May 4, 2008):

Updated information and services, including high-resolution figures, can be found in the online version of this article at:

<http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/320/5876/670>

Supporting Online Material can be found at:

<http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/320/5876/670/DC1>

This article **cites 23 articles**, 7 of which can be accessed for free:

<http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/320/5876/670#otherarticles>

This article appears in the following **subject collections**:

Cell Biology

http://www.sciencemag.org/cgi/collection/cell_biol

Information about obtaining **reprints** of this article or about obtaining **permission to reproduce this article** in whole or in part can be found at:

<http://www.sciencemag.org/about/permissions.dtl>

To demonstrate the phosphorylation of this residue in intact cells and in vivo, we generated a specific antibody (Ab) to a mouse phospho-Ser³⁸⁹ GSK3 β peptide. A band corresponding to GSK3 β was detected with this Ab in WT and GSK3 $\alpha^{-/-}$ embryonic stem (ES) cells, but not in the GSK3 $\beta^{-/-}$ ES cells by Western blot analysis (Fig. 4A). This specific band was also present in GSK3 $\beta^{-/-}$ ES cells transfected with a WT GSK3 β , but not with a GSK3 β -S³⁸⁹A mutant (Fig. 4B). Phospho-Ser³⁸⁹ GSK3 β was detected in mouse GSK3 β -transfected 293T cells, but only if active MKK6 was present (Fig. 4C). The presence of the phospho-Ser³⁸⁹ GSK3 β in these cells correlated with an increased amount of β -catenin (Fig. 4C), which is indicative of an inhibition of GSK3 β activity. Ser³⁸⁹-phosphorylation was also detected in WT GSK3 β , but not the GSK3 β -S³⁸⁹A mutant after in vitro incubation with activated p38 MAPK (fig. S9). Phosphatase treatment of GSK3 β previously incubated with activated p38 MAPK abrogated its recognition by the phospho-Ser³⁸⁹ Ab (fig. S9). Together, these results show the specificity of this Ab for phospho-S³⁸⁹ GSK3 β and the phosphorylation of GSK3 β at S³⁸⁹ by p38 MAPK in vitro.

To determine whether activation of p38 MAPK was required for phosphorylation of GSK3 β at Ser³⁸⁹ in intact cells, we treated mouse GSK3 β -transfected 293T cells with SB203580. The inhibition of p38 MAPK abrogated the phosphorylation of Ser³⁸⁹ (Fig. 4D). Similarly, treatment with SB203580 inhibited phosphorylation of endogenous GSK3 β at Ser³⁸⁹ in WT mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and ES cells (Fig. 4E). We also examined phospho-Ser³⁸⁹ abundance in MEFs deficient for the major upstream activators of p38 MAPK, MKK3, and MKK6 (23). Phospho-Ser³⁸⁹ was barely detectable in MKK3^{-/-}MKK6^{-/-} MEFs (Fig. 4F). In contrast, the amounts of phospho-Ser³⁸⁹ were comparable in WT and MKK3^{-/-}MKK6^{-/-} MEFs (Fig. 4F). Thus, activation of p38 MAPK appears to be required for the phosphorylation of GSK3 β at Ser³⁸⁹. Inhibition of p38 MAPK by either SB203580 (Fig. 4D) or the absence of MKK3 and MKK6 (Fig. 4F) also decreased the amount of β -catenin, consistent with the possibility that p38 MAPK activation is required for repressing GSK3 β activity.

We also examined phospho-Ser³⁸⁹ in different mouse tissues. A high amount of phospho-S³⁸⁹ was detected in the brain, and lesser amounts were detected in thymocytes and spleen cells (Fig. 4G). Phospho-Ser³⁸⁹ was not detected in the kidney (Fig. 4G), liver, or heart (fig. S10). Phosphorylation of GSK3 β at Ser³⁸⁹ was detected in practically all of the examined tissues (Fig. 4G). Analysis of the relative abundance of phospho-S³⁸⁹ and phospho-S⁹ showed a predominance of the former in the brain and thymocytes (Fig. 4G), which correlated with the selective high activation of p38 MAPK in these tissues (fig. S11). Inhibition of p38 MAPK by treating animals with SB203580 reduced the levels of phospho-Ser³⁸⁹

GSK3 β in both thymocytes and the brain (Fig. 4H). Analysis of phospho-Ser³⁸⁹ in MKK6 and Rag^{-/-} thymocytes showed that phospho-S³⁸⁹ GSK3 β was present selectively in MKK6 thymocytes (Fig. 4I). Together, these results support our proposal that GSK3 β is phosphorylated at S³⁸⁹ in vivo by p38 MAPK and that this alternative regulatory mechanism of GSK3 β is tissue-specific.

To date, phosphorylation at Ser⁹ by Akt is the best-characterized mechanism for the inhibition of GSK3 β activity. However, knockin mice in which Ser⁹ was replaced by Ala have only a subtle defect related to insulin regulation of glycogen synthase in their skeletal muscle tissue (24), indicating that alternative mechanisms may be involved in the negative regulation of GSK3 β for certain functions. We propose that the phosphorylation of GSK3 β at S³⁸⁹ by p38 MAPK may be one such mechanism. Conditions that promote the activation of p38 MAPK promote the accumulation of β -catenin in certain scenarios; thus, the activation of the p38 MAPK pathway could be an alternative mechanism to regulate β -catenin/T cell factor signaling (and, potentially, cell survival) through the inactivation of GSK3 β .

References and Notes

1. T. Zarubin, J. Han, *Cell Res.* **15**, 11 (2005).
2. A. Mikhailov, M. Shinohara, C. L. Rieder, *Cell Cycle* **4**, 57 (2005).
3. Q. B. She, N. Chen, Z. Dong, *J. Biol. Chem.* **275**, 20444 (2000).
4. T. Kurosu et al., *Apoptosis* **10**, 1111 (2005).
5. H. C. Reinhardt, A. S. Aslanian, J. A. Lees, M. B. Yaffe, *Cancer Cell* **11**, 175 (2007).
6. N. I. Dmitrieva, D. V. Bulavin, A. J. Fornace Jr, M. B. Burg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 184 (2002).
7. N. L. Diehl et al., *J. Exp. Med.* **191**, 321 (2000).
8. G. Pedraza-Alva et al., *EMBO J.* **25**, 763 (2006).
9. V. Ioannidis, F. Beermann, H. Clevers, W. Held, *Nat. Immunol.* **2**, 691 (2001).
10. F. Gounari et al., *Nat. Immunol.* **2**, 863 (2001).
11. B. Hoffman, A. Amanullah, M. Shafarenko, D. A. Liebermann, *Oncogene* **21**, 3414 (2002).
12. Materials and methods are available as supporting material on Science Online.
13. T. C. He et al., *Science* **281**, 1509 (1998).
14. M. Filali, N. Cheng, D. Abbott, V. Leontiev, J. F. Engelhardt, *J. Biol. Chem.* **277**, 33398 (2002).
15. C. Liu et al., *Cell* **108**, 837 (2002).
16. S. Salahshor, J. R. Woodgett, *J. Clin. Pathol.* **58**, 225 (2005).
17. D. A. Cross, D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, B. A. Hemmings, *Nature* **378**, 785 (1995).
18. B. W. Doble, S. Patel, G. A. Wood, L. K. Kockeritz, J. R. Woodgett, *Dev. Cell* **12**, 957 (2007).
19. B. W. Doble, J. R. Woodgett, *J. Cell Sci.* **116**, 1175 (2003).
20. Q. Ding et al., *Mol. Cell* **19**, 159 (2005).
21. R. Dajani et al., *Cell* **105**, 721 (2001).
22. S. Frame, P. Cohen, *Biochem. J.* **359**, 1 (2001).
23. D. Brancho et al., *Genes Dev.* **17**, 1969 (2003).
24. E. J. McManus et al., *EMBO J.* **24**, 1571 (2005).
25. We thank C. Charland for flow cytometry analysis and cell sorting, T. Hunter and the DNA Sequencing Facility for sequencing, and the Univ. of Vermont Protein Core Facility for peptide synthesis. This work was supported by NIH grants R01 AI051454 and National Center for Research Resources (NCRR) grant P20 RR15557 (M.R.), NCRR grants P20 RR021905 and P20 RR16462 (D.E.M.), and Canada Research Chairs and Canadian Institutes of Health Research grant MOP-85057 (B.D.).

Supporting Online Material

www.sciencemag.org/cgi/content/full/320/5876/667/DC1
Materials and Methods
Figs. S1 to S11
References

4 February 2008; accepted 24 March 2008
10.1126/science.1156037

Asymmetric Tethering of Flat and Curved Lipid Membranes by a Golgin

Guillaume Drin,¹ Vincent Morello,¹ Jean-François Casella,¹ Pierre Gounon,² Bruno Antony^{1*}

Golgins, long stringlike proteins, tether cisternae and transport vesicles at the Golgi apparatus. We examined the attachment of golgin GMAP-210 to lipid membranes. GMAP-210 connected highly curved liposomes to flatter ones. This asymmetric tethering relied on motifs that sensed membrane curvature both in the N terminus of GMAP-210 and in ArfGAP1, which controlled the interaction of the C terminus of GMAP-210 with the small guanine nucleotide-binding protein Arf1. Because membrane curvature constantly changes during vesicular trafficking, this mode of tethering suggests a way to maintain the Golgi architecture without compromising membrane flow.

The Golgi apparatus has a stable architecture despite the intense flux of membrane that passes through it (1, 2). Golgins, which probably correspond to molecular strings observed by electron microscopy (3), contribute to this architecture by tethering membranes thanks to their coiled-coil structure, up to 200 nm in length (4). Some golgins link specific transport vesicles to cisternae and may restrict their diffusion (5). But because vesicles bud and fuse

within minutes there must be regulatory mechanisms to promote and disrupt these links within the same time scale. We studied human golgin GMAP-210. This protein is located at the cis

¹Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Nice Sophia Antipolis and CNRS, 660 route des Lucioles, 06560 Valbonne, France. ²Centre Commun de Microscopie Appliquée, Parc Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: antony@ipmc.cnrs.fr

Golgi, and its overexpression induces the formation of clusters of small vesicles (radius, $R \approx 30$ nm) at the expense of the Golgi (6, 7).

The first 38 residues of GMAP-210 form an ALPS (amphipathic lipid-packing sensor) motif, a lipid-binding module that is remarkably sensitive to membrane curvature (8). Soluble and unfolded in the presence of weakly curved liposomes ($R > 100$ nm), ALPS motifs form an amphipathic α helix at the surface of small liposomes ($R < 50$ nm) (8, 9). Through this motif, GMAP-210 could trap small transport vesicles. On its C terminus, GMAP-210 is predicted to contain a GRAB (GRIP-related Arf binding) domain that may interact with the small guanine nucleotide-

binding protein Arf1 in the guanosine 5'-triphosphate (GTP) state (10). We reasoned that this putative interaction may be stable only on flat membranes because ArfGAP1, a guanosine triphosphatase (GTPase) activating protein for Arf1 at the Golgi, contains two ALPS motifs, making its activity exquisitely dependent on membrane curvature (9, 11, 12). Thus, the presence of ALPS motifs both in GMAP-210 and in ArfGAP1 suggests an asymmetric mode of tethering between flat and curved membranes (Fig. 1A). In vivo, this tethering would be ideally suited to confine vesicles in the vicinity of flat cisternae. Moreover tethering should be disrupted as soon as one of the two membranes lost its

identity: that is, when the vesicle becomes flat by membrane fusion or when the cisternae becomes curved by budding. Thus, GMAP-210 could readily recycle such as to be always properly orientated.

Interaction between the GRAB domain of GMAP-210 and a soluble form of Arf1GTP has not been observed (10). Because Arf1 interacts with its partners at the surface of lipid membranes, we reassessed its interaction with GMAP-210 in the presence of liposomes. Two truncated forms of GMAP-210 (GMAP_{C-short} contained amino acids 1597 to 1830 and GMAP_{C-long} included amino acids 1597 to 1843) were used (Fig. 1B and table S1). Both included part of the coiled-coil region and the GRAB domain, but the longer construct contained a short predicted amphipathic helix downstream from the GRAB domain. These constructs were incubated with liposomes in the presence of Arf1, and liposome-bound proteins were recovered by flotation. Arf1GTP but not Arf1GDP efficiently recruited GMAP_{C-long} to the liposomes (Fig. 1C). No recruitment by Arf1GTP was observed for GMAP_{C-short} or when GMAP_{C-long} carried the Leu¹⁷⁸³ → Ala¹⁷⁸³ (L1783A) mutation (Fig. 1C and fig. S1). This mutation eliminates the Golgi localization of the C-terminal region of GMAP-210, and the cognate residue in the GRIP domain is critical for the interaction with Arf1GTP (10). Thus, in the same way as the GRIP domain (13, 14), the GRAB domain may interact simultaneously with the lipid membrane through its amphipathic helix and with Arf1GTP (Fig. 1A). To test this, we attached a membrane-sensitive fluorescent probe (NBD) to this helix via a cysteine mutation (fig. S2, A to C). Guanosine diphosphate (GDP)-to-GTP exchange on Arf1 promoted an increase and a blue shift in the fluorescence of ^{NBD}GMAP_{C-long}, suggesting that the amphipathic helix of the GRAB domain contacted the liposome surface (Fig. 1D and fig. S3, A to D). The kinetics of the NBD fluorescence change matched the time course of Arf1 activation, and its amplitude varied with Arf1 concentration in a manner suggesting a stoichiometric interaction between the two proteins (fig. S3B).

Two GTPase activating proteins for Arf1, ArfGAP1, and ArfGAP3 (Gcs1p and Glo3p in yeast) are localized at the cis Golgi (15) and are candidates for promoting GTP hydrolysis in the Arf1GTP-GRAB domain complex. To test this, we took advantage of the fluorescence signal associated with the translocation of ^{NBD}GMAP_{C-long}. ArfGAP1 reversed the NBD signal within minutes, whereas ArfGAP3 had almost no effect (Fig. 1D). This observation fits with the idea that ArfGAP1/Gcs1p can act on several Arf/Arf-effector complexes at the Golgi, including complexes with golgins, whereas ArfGAP3/Glo3p is more specific to the Arf1-coatome complex (16–18). Because the activity of ArfGAP1 is strongly dependent on membrane curvature owing to its ALPS motifs (9, 12), we asked whether ArfGAP1

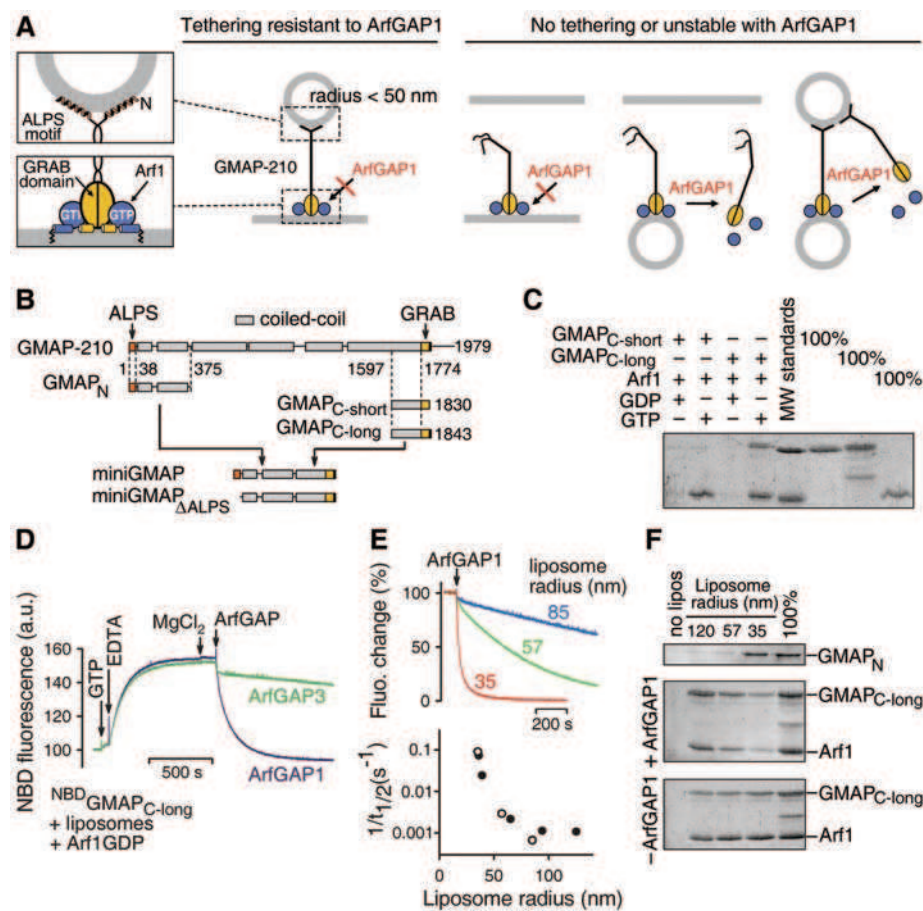


Fig. 1. Membrane attachment of the two ends of GMAP-210. (A) With its N-terminal ALPS motif and its C-terminal GRAB domain, GMAP-210 could connect small vesicles to membranes containing Arf1GTP. The former interaction is stable only on curved membranes (8), whereas the latter should be stable only on flat membranes because ArfGAP1 contains ALPS motifs and is very active on curved membranes. (B) Domain organization of GMAP-210 and scheme of the constructs (24). (C) GMAP_{C-short} or GMAP_{C-long} (0.5 μ M) was incubated with liposomes (0.5 mM lipids, $R = 115 \pm 51$ nm), with Arf1 (1 μ M), and with GDP or GTP (66 μ M) at 1 μ M free Mg^{2+} . The liposomes were recovered by flotation and bound proteins were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. (D) NBD fluorescence assay. The cuvette contained liposomes (0.2 mM lipids, $R = 42 \pm 8$ nm), ^{NBD}GMAP_{C-long} (0.125 μ M), and Arf1GDP (0.75 μ M). When indicated, GTP (10 μ M) was added, and nucleotide exchange was promoted by lowering temporarily the concentration of free Mg^{2+} . Thereafter ArfGAP1 or ArfGAP3 (0.1 μ M) was added. (E) Effect of membrane curvature. (Top) Same as in (D) with liposomes of different radius. (Bottom) Rate of ^{NBD}GMAP_{C-long} dissociation versus liposome radius as determined from two independent experiments. (F) Opposite effect of membrane curvature on the N and C termini of GMAP-210. GMAP_{C-long} was incubated with the liposomes and with Arf1 and GTP as in (C) followed by 3-min incubation with 0.1 μ M ArfGAP1. GMAP_N was simply mixed with the liposomes.

retained this feature when it promoted GTP hydrolysis in the Arf1GTP-GMAP_{C-long} complex. Reducing liposome size from 100 to 35 nm accelerated 100-fold the dissociation of the complex triggered by ArfGAP1 (Fig. 1E). This response resembles that observed on liposomes covered solely by Arf1GTP or by Arf1GTP in complex with coatamer (11). Thus, if the Arf1GTP-GRAB domain complex is not sensitive to membrane curvature per se, the control of its attachment by ArfGAP1 creates sensitivity to membrane curvature opposite to that of the N terminus. In liposome binding experiments, the N-terminal region of GMAP-210 (GMAP_N included amino acids 1 to 375) bound preferentially to small liposomes, whereas the complex between the C-terminal region (GMAP_{C-long}) and Arf1GTP was stable, in the presence of ArfGAP1, only on large liposomes (Fig. 1F).

Having defined simple rules for the membrane attachment of the two ends of GMAP-210, we wished to reconstitute its tethering activity on liposomes. Because full-length GMAP-210 was difficult to express in *E. coli* and poorly soluble, we used a shorter construct, miniGMAP, made by fusing GMAP_N and GMAP_{C-long} (Fig.

1B). MiniGMAP contained the ALPS motif, one-third of the coiled-coil region, and the GRAB domain with its amphipathic helix. When overexpressed in HeLa cells, this construct affected the Golgi morphology in a manner similar to that of the full-length form (figs. S4 and S5). We assessed the effect of miniGMAP on a homogeneous population of liposomes. Dynamic light scattering (DLS) and electron microscopy (EM) were used to detect liposome aggregation. MiniGMAP caused small liposomes ($R = 32 \pm 9$ nm) covered with Arf1GTP to assemble in large aggregates (0.5 to 1 μ m) within minutes (Fig. 2, A and B, and fig. S6). In contrast, almost no aggregation was observed for liposomes devoid of Arf1GTP or when miniGMAP lacked the ALPS motif (Fig. 2A and fig. S7). Liposome aggregation also diminished when vesicle size increased (see below). Thus, the tethering activity of GMAP-210 relies both on its ALPS motif and on the interaction of its GRAB domain with Arf1GTP. Tethering was very efficient: Liposomes aggregated with only 25 nM miniGMAP (fig. S6), a concentration 10- to 100-fold lower than those in other tethering reactions reconstituted with proteins and liposomes (19, 20). This corresponds to 10 to 15

copies of miniGMAP per liposome (table S2), a density similar to what is used to artificially dock liposomes through complementary DNA molecules (21).

Next, we conducted experiments in which two populations of liposomes of defined size were mixed: one covered with Arf1GTP and one devoid of Arf1 (Fig. 2C). Both were used at the same concentration of accessible lipids. Shortly after liposome mixing, miniGMAP was added, and aggregation was followed. Lastly, ArfGAP1 was added to test the resistance of the liposome aggregates. Strong aggregation was observed for two mixtures: those containing small naked liposomes and small liposomes covered with Arf1GTP and those containing small naked liposomes and large liposomes covered with Arf1GTP (Fig. 2C). In contrast, the aggregation signal was much weaker when both liposome populations were of large size (fig. S8). Thus for membrane aggregation to occur, the presence of highly curved membranes and of membrane-bound Arf1GTP is required (Fig. 2A), but these two determinants do not need to be on the same liposome.

The asymmetric and the symmetric tethering geometries differed in their sensitivity to ArfGAP1.

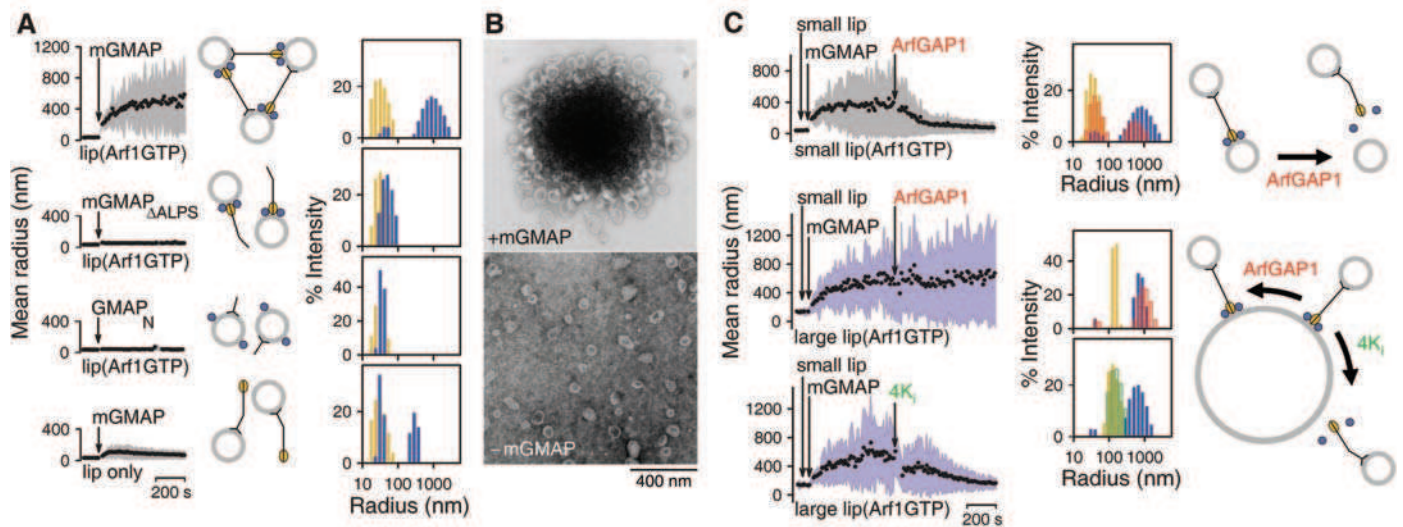


Fig. 2. Liposome tethering induced by miniGMAP. **(A)** Small liposomes ($R = 32 \pm 9$ nm, 50 μ M accessible lipids) covered or not with Arf1GTP (0.25 μ M) were mixed with miniGMAP, miniGMAP Δ ALPS, or GMAP_N (0.125 μ M). Liposome aggregation was followed by DLS. (Left) Mean radius and polydispersity (shaded area) over time. (Right) Size distribution before (yellow bars) and after (blue bars) the reaction. **(B)** Electron micrographs of negatively stained small liposomes ($R = 38 \pm 9$ nm) covered with Arf1GTP and incubated or not with miniGMAP as in (A). **(C)** Two populations of liposomes (small, $R = 36 \pm 7$ nm; large, $R = 143 \pm 45$ nm; 25 μ M accessible lipids each) and either covered or not with Arf1GTP (0.25 μ M) were mixed. Then 0.125 μ M miniGMAP was quickly added, and liposome aggregation was followed by DLS. Thereafter, ArfGAP1 or the 4K_i mutant was added at 0.25 μ M. Yellow bars indicate initial size distribution; blue bars, size distribution after aggregation; and red or green bars, final size distribution after ArfGAP1 or 4K_i, respectively, addition. **(D)** Typical assembly of large (L) liposomes ($R = 144 \pm 55$ nm; 25 μ M accessible lipids) covered with 0.125 μ M Arf1GTP after incubation with 62.5 nM miniGMAP and with small (s) naked liposomes ($R = 41 \pm 16$ nm; 50 μ M accessible lipids). See figs. S6 to S9 for supplementary data and gallery of electron micrographs.

The majority of the aggregates formed in mixture containing only small liposomes disassembled within minutes upon ArfGAP1 addition, whereas those formed by large liposomes covered with Arf1GTP and small naked liposomes were resistant (Fig. 2C). In the latter case, we observed disassembly when we used a mutant of ArfGAP1 (4K_i) that displays more avidity to flat membranes than the wild-type form owing to specific mutations in its ALPS motif (8). Thus, ArfGAP1 through its ALPS motif is capable of selectively disrupting miniGMAP-induced tethering according to the curvature of the membrane on which Arf1GTP anchors the GRAB domain. The fact that ArfGAP1 or the 4K_i mutant can reverse liposome aggregation suggests that no substantial membrane fusion occurred during tethering. EM analysis of incubations conducted with small naked liposomes and large liposomes supplemented with Arf1GTP revealed the formation of clusters containing a few large liposomes and many small liposomes, the latter forming a kind of cement around the larger ones, suggesting that large liposomes contact preferentially small liposomes and vice versa (Fig. 2D and fig. S9). If membrane tethering was random, we should have observed direct contacts between large liposomes as well as clusters of small liposomes such as those visualized previously (Fig. 2B). Thus, in the presence of ArfGAP1, GMAP-210 forms an asymmetric tether that can stably connect a curved membrane to a flat one displaying

Arf1GTP but not other geometrical combinations (Fig. 1A).

Next we established a system suitable for light microscopy. We mixed giant liposomes (tens of micrometers in size) labeled with a green fluorophore with small liposomes labeled with a red fluorophore. The former were visible under the microscope, whereas the latter gave a red fluorescence background. Upon attachment of small liposomes, the contour of the giant liposomes became red (fig. S10). Arf1 was allowed to undergo cycles of GTP binding and hydrolysis on the two populations of liposomes, caused by the addition of ArfGAP1 and of the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-dependent guanine nucleotide exchange factor Arno (22). Because both large and small liposomes contained PIP₂, Arno-catalyzed GDP/GTP exchange on Arf1 occurred on the two populations of liposomes, whereas ArfGAP1-catalyzed GTP hydrolysis in Arf1 occurred preferentially on the small liposomes owing to their strong curvature. Thus, with both Arno and ArfGAP1 present, Arf1GTP should be found at steady state preferentially on the giant liposomes. Under these conditions, miniGMAP caused the large liposomes to be surrounded by red fluorescence (Fig. 3, A to C, and fig. S11). In contrast, when ArfGAP1 was absent, we observed numerous red spots of various size and rarely connected to the giant liposomes (Fig. 3D). Thus, ArfGAP1 helps to organize GMAP-210 tethering by pre-

venting the formation of symmetric assemblies between small liposomes, thereby favoring asymmetric assemblies between large and small liposomes.

Multiple tethering events involving different membranes and several long coiled-coil proteins (e.g., p115) occur at the interface between the endoplasmic reticulum and the cis Golgi (4). The minimal model presented here seems adapted to the capture of small transport vesicles at this region, but additional interactions with protein coats, Rabs, and the cytoskeleton may impose a more specific role to GMAP-210 (4, 23). Nevertheless, a reversible tethering mechanism based on the detection of membrane curvature is straightforward because curvature is a good index for the completion of budding and fusion events. By permitting transient interactions between membranes that are continuously remodeled, GMAP-210 may contribute to the self-organizing properties of the Golgi.

References and Notes

1. T. Misteli, *J. Cell Biol.* **155**, 181 (2001).
2. N. Altan-Bonnet, R. Sougrat, J. Lippincott-Schwartz, *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 364 (2004).
3. L. Orci, A. Perrelet, J. E. Rothman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 2279 (1998).
4. B. Short, A. Haas, F. A. Barr, *Biochim. Biophys. Acta* **1744**, 383 (2005).
5. J. Malsam, A. Satoh, L. Pelletier, G. Warren, *Science* **307**, 1095 (2005).
6. R. M. Rios *et al.*, *J. Cell Biol.* **125**, 997 (1994).
7. K. Pernet-Gallay *et al.*, *Traffic* **3**, 822 (2002).
8. G. Drin *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 138 (2007).
9. J. Bigay, J. F. Casella, G. Drin, B. Mesmin, B. Antonny, *EMBO J.* **24**, 2244 (2005).
10. A. K. Gillingham, A. H. Tong, C. Boone, S. Munro, *J. Cell Biol.* **167**, 281 (2004).
11. J. Bigay, P. Gounon, S. Robineau, B. Antonny, *Nature* **426**, 563 (2003).
12. B. Mesmin *et al.*, *Biochemistry* **46**, 1779 (2007).
13. B. Panic, O. Perisic, D. B. Veprincev, R. L. Williams, S. Munro, *Mol. Cell* **12**, 863 (2003).
14. L. Lu, G. Tai, M. Wu, H. Song, W. Hong, *Traffic* **7**, 1399 (2006).
15. H. Inoue, P. A. Randazzo, *Traffic* **8**, 1465 (2007).
16. P. P. Poon *et al.*, *EMBO J.* **18**, 555 (1999).
17. Y. W. Liu, C. F. Huang, K. B. Huang, F. J. Lee, *Mol. Biol. Cell* **16**, 4024 (2005).
18. A. Eugster, G. Frigerio, M. Dale, R. Duden, *EMBO J.* **19**, 3905 (2000).
19. H. Nakatogawa, Y. Ichimura, Y. Ohsumi, *Cell* **130**, 165 (2007).
20. D. Arac *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 209 (2006).
21. Y. H. Chan, P. Lenz, S. G. Boxer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 18913 (2007).
22. P. Chardin *et al.*, *Nature* **384**, 481 (1996).
23. R. M. Rios, A. Sanchis, A. M. Tassin, C. Fedriani, M. Bornens, *Cell* **118**, 323 (2004).
24. Materials and methods are available on *Science Online*.
25. We thank R. Rios, J. Bigay, and D. Stalder for reagents; N. Leroudier, S. Scarzello, and F. Braud for technical assistance; and C. Jackson and B. Goud for comments on the manuscript. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (programme blanc) and by the CNRS (programme interface).

Supporting Online Material

www.sciencemag.org/cgi/content/full/320/5876/670/DC1

Materials and Methods

Figs. S1 to S10

Tables S1 and S2

29 January 2008; accepted 4 April 2008

10.1126/science.1155821

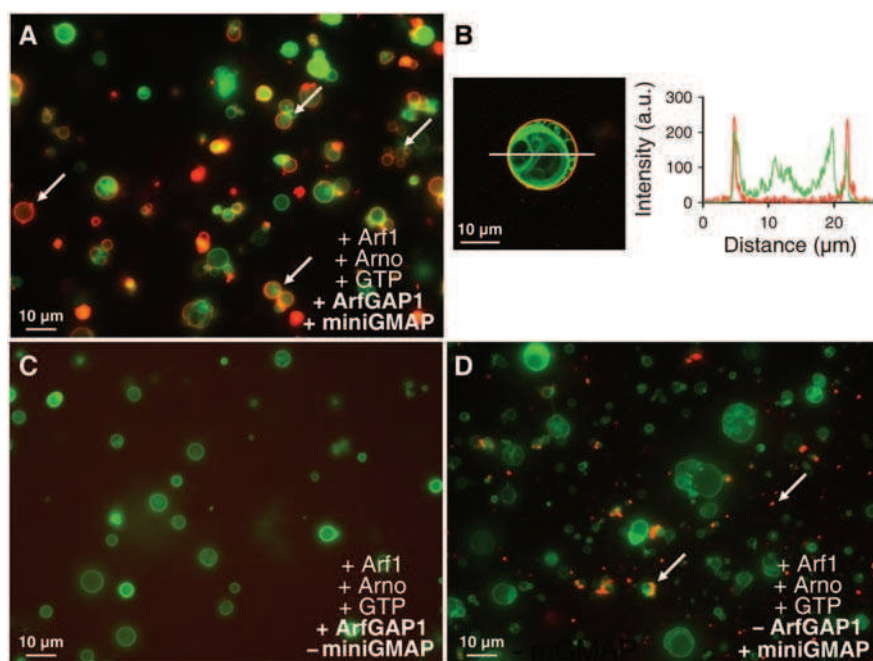


Fig. 3. Self-organization of membrane tethering by miniGMAP when the GTPase cycle of Arf1 is controlled by Arno and ArfGAP1. The sample contains giant liposomes (green) and small liposomes (red; $R = 42 \pm 10$ nm), all with the same composition (Golgi mix plus 4% PIP₂). Arrows indicate typical liposome assemblies. (A and B) The liposome mixture was supplemented with Arf1 (380 nM), GTP (150 μM), Arno (20 nM), ArfGAP1 (185 nM), and miniGMAP (62.5 nM). a.u., arbitrary units. (C and D) MiniGMAP or ArfGAP1 was omitted. The liposomes were visualized by epifluorescence microscopy [(A), (C), and (D)] or by confocal microscopy (B). Other confocal images are shown in fig. S11.

Résumé

Les membranes cellulaires sont constamment remodelées par le bourgeonnement et la fusion de vésicules assurant le transport entre les différentes organelles. De nombreuses protéines périmembranaires orchestrent ce trafic vésiculaire. Les hélices amphipathiques jouent un rôle important dans le mécanisme d'interaction de certaines de ces protéines avec les membranes. A la différence de domaines protéiques reconnaissant spécifiquement un lipide, les hélices amphipathiques reconnaissent plus globalement la physicochimie d'une membrane (forme, charge...).

GMAP-210 est une très longue protéine golgienne qui agit comme corde moléculaire grâce à sa structure en coiled-coil. Le laboratoire avait montré que l'extrémité N-terminale de GMAP-210 possède un motif ALPS, une hélice amphipathique singulière sensible à la courbure membranaire. Les motifs ALPS sont caractérisés par l'absence de résidus basiques, l'interaction avec les membranes ne repose donc que sur l'hydrophobicité. Pour compenser ce déficit, la liaison des motifs ALPS n'a lieu qu'au contact de membranes fortement courbées. Dans le cas de GMAP-210, le motif ALPS permettrait de capturer des vésicules de transport. J'ai démontré que l'autre extrémité de la corde interagit avec Arf1GTP sur des membranes. Cette interaction est conditionnée par le contact avec la surface membranaire d'une petite hélice amphipathique située en aval du domaine d'interaction avec Arf1. De façon remarquable, l'interaction entre Arf1GTP et le domaine C-terminal de GMAP-210 est régulée indirectement par la courbure membranaire. En effet, ArfGAP1, identifiée comme la première protéine possédant un motif ALPS, est capable de dissocier rapidement le complexe de membranes courbées. Par conséquent, GMAP-210 connecte des membranes courbées, par exemple des vésicules, à des membranes planes recouvertes d'Arf1, par exemple des citernes golgiennes. Le mécanisme vectoriel d'attachement de membranes par GMAP-210 repose donc sur de nombreuses hélices amphipathiques (deux dans GMAP-210, une dans Arf1 et une dans ArfGAP1) et permettrait d'expliquer le confinement des vésicules de transport autour de l'appareil de Golgi. Des mesures de vitesse spontanée de désorption membranaire des extrémités de GMAP-210 suggèrent que l'attachement des membranes est très dynamique et a lieu sur des échelles de temps de la seconde à la minute.

Le motif ALPS n'est pas le seul motif amphipathique sensible à la courbure. L' α -synucléine, une protéine synaptique célèbre pour son implication dans la maladie de Parkinson, contient également une hélice amphipathique senseur de courbure. Curieusement, la physicochimie du motif ALPS et de l' α -synucléine est opposée tant pour la face polaire que pour la face hydrophobe. L' α -synucléine a une périodicité atypique (3/11), une face polaire zwitterionique et une face hydrophobe présentant de petits résidus et des thréonines. En utilisant des liposomes de composition et de rayon définis, j'ai montré que la charge négative des membranes est un paramètre discriminant dans la liaison aux membranes des deux protéines. En effet, à la différence de GMAP-210, l' α -synucléine est strictement dépendante d'un taux élevé de phospholipides anioniques. Par contre, ces protéines sont toutes les deux très sensibles à la nature des chaînes insaturées des phospholipides. Les premiers résultats montrent néanmoins des subtilités intéressantes : l' α -synucléine semble mieux adaptée que GMAP-210 à une membrane polyinsaturée comme l'est celle des vésicules synaptiques.

En conclusion, de nombreuses hélices amphipathiques sont impliquées dans le trafic vésiculaire. Elles présentent de nettes différences dans leur physicochimie suggérant une adaptation à des membranes cellulaires (de composition lipidique et de rayon définis) par des mécanismes qui restent largement à explorer.