



HAL
open science

Mécanismes Moléculaires impliqués dans les Myopathies: Analyses des interactions Dystrophine-Lipides.

Joe Sarkis

► **To cite this version:**

Joe Sarkis. Mécanismes Moléculaires impliqués dans les Myopathies: Analyses des interactions Dystrophine-Lipides.. Biophysique. Université Rennes 1; Université Européenne de Bretagne, 2011. Français. NNT: . tel-00678400

HAL Id: tel-00678400

<https://theses.hal.science/tel-00678400>

Submitted on 12 Mar 2012

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.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie et Science de la Santé

Ecole doctorale Vie-Agronomie-Santé

présentée par

Joe SARKIS

Préparée à l'unité de recherche UMR CNRS 6026 ICM
Interactions Cellulaires et Moléculaires
UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement (S.V.E)

Intitulé de la thèse :

**Mécanismes moléculaires impliqués dans les
myopathies : Analyse des interactions
dystrophine-lipides.**

Thèse soutenue à Rennes le 4 Novembre 2011

devant le jury composé de :

Patricia BASSEREAU

D.R., CNRS, UMR 168, Institut Curie, Paris / *rapporteur*

Eric LESNIEWSKA

Pr., UMR CNRS 5209, Institut Carnot de Bourgogne, Dijon / *rapporteur*

Steve J. WINDER

Pr., Dept. Of Biomedical Science, Sheffield UK / *examineur*

Arnaud SAINT-JALMES

C.R., CNRS, UMR 6251, Institut de Physique, Rennes1 / *examineur*

Véronique VIÉ

M.C., UMR CNRS 6251, Institut de Physique, Rennes 1 / *examineur*

Jean-François HUBERT

Pr., UMR CNRS 6026, Rennes 1 / *directeur de thèse*

*A mes parents,
A Yannou, à Gilo,*

“Be Happy, Be a Dreamer, Make it REAL”... A toi AROUZ !

REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été réalisés dans l'équipe « Résonance Magnétique Nucléaire et Interactions Lipides-Protéines » (RMN-ILP) de l'UMR CNRS 6026 de l'Université de Rennes1, en collaboration avec Véronique Vié de l'équipe Biophysique de l'Institut de Physique de Rennes et ont été financés par l'Association Française contre les Myopathies-AFM. Je remercie le Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie français qui m'a accordé une bourse d'étude pendant ces trois ans de thèse.

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail. Patricia Bassereau et Eric Lesniewska qui ont accepté de rapporter ce manuscrit, ainsi que Steve Winder et Arnaud Saint-Jalmes pour leur rôle d'examineurs.

J'exprime toute ma gratitude à mon directeur de thèse Jean-François Hubert pour avoir dirigé et encadré cette thèse, et à Véronique Vié pour avoir co-encadré ces travaux. Tous ces résultats n'auraient pu voir le jour sans vous deux. Un grand merci pour la liberté dont j'ai bénéficié et qui m'a permis de jongler sur divers sujets. Nous avons constamment travaillé ensemble et les discussions riches que nous avons eues ont contribué grandement à accroître mes connaissances, tant sur le plan scientifique que méthodologique. J'ai apprécié tout au long de ces trois ans la confiance que vous m'avez accordée ainsi que votre soutien. Comme disait Henri Poincaré, «On fait la science avec des faits, comme on fait une maison avec des pierres: mais une accumulation de faits n'est pas plus une science qu'un tas de pierres n'est une maison». C'est grâce à vos conseils et vos remarques que j'ai appris à construire ces faits pour qu'il ne reste pas qu'un tas de pierres. Je suis également très reconnaissant que vous m'avez permis de préparer mon avenir dans les meilleurs conditions.

Je remercie profondément les membres et anciens membres de l'équipe RMN-ILP, notamment Elisabeth Le Rumeur qui m'a beaucoup encouragé et qui m'a fait profiter de sa connaissance et de son expertise dans le domaine de la dystrophine. Je remercie également Arnaud Bondon, directeur de l'équipe, pour ses conseils, son soutien et pour tous les nombreux sujets de discussion abordés, tant sur le plan scientifique que politique et humain. Merci pour tous ceux qui ont contribué à l'ambiance du laboratoire, Baptiste Legrand et Sandrine Pottier qui ont partagé le même bureau durant ma thèse, Liza Mouret, Olivier Delalande, Céline Raguenés-Nicol, Angélique Chéron, Christophe Tascon, ainsi que tous les doctorants avec qui j'ai eu le plaisir de passer des bons moments, Aurélie Nicolas, Fabien Balezeau, et Matthieu Simon. Une pensée particulière pour Chantal, qui était toujours pleine de

bonne humeur et qui calmait notre gourmandise avec des gâteaux aux chocolats - du jamais vu.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à tous les membres de l'équipe Biophysique de l'IPR, qui ont su rendre ces années très agréables et très enrichissantes autant d'un point de vue scientifique que personnel : Sylvie Beaufile, Franck Artzner, Pascal Panizza, Laurent Courbin et Arnaud Saint-Jalmes. Un grand merci pour les non-permanents de l'institut, avec qui j'ai passé des merveilleux moments, que ce soit au cours du déjeuner au « DIAP », durant les pauses cafés ou bien dans les soirées et les sorties du week-end : dans le désordre, Marie Postic, Sarah Ameziane, David Pluchon, Louis Salkin. Une pensée aux anciens doctorants et post-doctorants : Angela Jimenez, Malika Belloul, Mathieu Pinot, Tomas Guilbert, Christophe Tarabout, Matthieu Roché, Lionel Chièze et David Sessons avec qui je ne partage que des bons souvenirs. Je remercie également Estelle Robert, pour toute son aide et soutien.

Comment pourrais je oublié le soutien de Yannou, de Marie St-Cast et Dom qui ont su écouter mes doutes, mes joies et mes petits problèmes. Merci pour toutes les merveilleuses soirées, les discussions enrichissantes qu'on a eu, et surtout pour votre encouragement et votre contribution dans la mise en page de cet ouvrage.

Je pense aussi très fort au soutien de mes amis, Georges, Fadi, Marcos, Nizar, Rita, et Makram. Merci pour ce que vous êtes !

Enfin, je remercie ma famille, qui malgré la distance, était toujours présente pour m'encourager et me soutenir. Je remercie plus particulièrement mes parents, Jean et Claudette, sans qui rien de ceci n'aurait pu être réalisable, ainsi que mes deux frères Georges et Charbel. « A very very big THANKS to you ARROUZ » pour ton amour, ton encouragement et ta confiance en moi.

En Conclusion, c'est avec une certaine émotion que je quitte le laboratoire et la Bretagne. Une page se tourne mais ces trois années de thèse sont définitivement dans ma mémoire. Je n'ai aucun regret, bien au contraire. Je vous remercie encore, et je vous souhaite à chacun d'entre vous une excellente continuation.

SOMMAIRE

Avant propos

PARTIE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1- Les Membranes	5
I.1.A- Les membranes biologiques	5
<i>I.1.A.1. Composition et structure des membranes biologiques</i>	7
I.1.A.2- Dynamique de la membrane	10
I.1.A.2-1. Phase des lipides dans l'eau	13
I.1.A.2-2. L'effet de la géométrie au sein d'une membrane	14
I.1.B- De la membrane biologique vers les membranes biomimétiques	17
I.1.B.1- Les vésicules lipidiques	19
I.1.B.2- Les bicouches et les monocouches planes	22
I.1.B.2-1. Fusion de vésicules	24
I.1.B.2-2. Cuve de Langmuir	26
<i>I.1.B.2-2.a. Introduction</i>	26
<i>I.1.B.2-2.b. Dispositif</i>	27
<i>I.1.B.2-2.c. Principe et état physique</i>	28
<i>I.1.B.2-2.d. Transfert de Langmuir-Blodgett (LB)</i>	31
<i>I.1.B.2-2.e. Transfert de Langmuir-Schaefer (LS)</i>	32
Chapitre 2- Interactions Lipides-Protéines	35
I.2.A- Mode d'association protéines-membrane	35
I.2.A.1- Les protéines membranaire ou intrinsèques	36
I.2.A.2- Les protéines extrinsèques	36
I.2.B- Effet des lipides sur la structure/fonction des protéines	37
I.2.B.1- Les têtes polaires lipidiques	38
I.2.B.2- Les propriétés physiques de la membrane	40
I.2.B.2-1. L'épaisseur de la bicouche lipidique	40
I.2.B.2-2. La viscosité membranaire	41
I.2.B.2-3. La courbure membranaire	42
I.2.C- Protéine et courbure membranaire : influence mutuelle?	45
Références	49

PARTIE II : LA DYSTROPHINE, SES PARTENAIRES, SA FONCTION BIOLOGIQUE

Chapitre 1- Introduction	57
II.1.A. Dystrophine et Myopathie	57
II.1.A.1. Historique	57
II.1.A.2. Étiologie	58
II.1.A.3. Gène et mutations	59
II.1.A.4. La dystrophine	59
II.1.A.5. Les différentes isoformes et leurs expressions tissulaires	62
II.1.A.6. Pathologies	65
II.1.A.7. Signes cliniques	68
II.1.A.8. Histopathologie du tissu musculaire	69
II.1.B. Partenaires moléculaires de la dystrophine	71
II.1.B-1. Le complexe DGC	72
II.1.B-2. Le domaine central de la dystrophine et ses partenaires	76
II.1.C. Le point sur les traitements de la myopathie	87
II.1.C-1. Les thérapies géniques	90
II.1.C-2. Les thérapies cellulaires	97
II.1.D. Conclusions et Contexte du travail	98
Chapitre 2 – DYS R1-3 et DYS R20-24 et membrane	101
Chapitre 3 – DYS R11-15 et membrane	103
II.3.A. Adsorption de DYS R11-15 à l'interface liquide/air	105
II.3.B. Analyse d'interaction de DYS R11-15/SUVs par résonance plasmonique de surface (SPR)	110
II.3.C. Images AFM de DYS R11-15 et monocouche lipidique	116
II.3.D. Image AFM de DYS R11-15 et bicouche lipidique	121
Chapitre 4- DYS R 11-15 : Un pont de connexion	123
II.4. Cytosquelette et actine	124
II.4.1. L'actine	126
II.4.2. Mécanisme de polymérisation	128
II.4.3. L'actine <i>in vivo</i>	134
II.4.4. Conclusion	142
Résultats	143

Chapitre 5- Discussions et Conclusion	145
Perspectives	154
Références	157

ANNEXE : PEPTIDES ANTIMICROBIENS

Chapitre 1 –Introduction	173
III.1.A- Historique	173
III.1.B- Différentes classes d’AMPs	174
III.1.B-1. Les AMPs naturels	175
III.1.B-2. Les “<i>de novo</i>” peptides synthétiques	177
III.1.C- Mode d’action des AMPs	178
Chapitre 2 - K4 et membrane	183
Références	187

AVANT PROPOS

La biologie moderne montre que les êtres vivants, des plus petits au plus grands, sont d'une incroyable complexité. Aujourd'hui, les scientifiques commencent à comprendre comment les protéines interagissent entre elles. De plus, de nombreuses fonctions essentielles des cellules vivantes sont effectuées grâce à l'association des protéines avec la membrane. Néanmoins, il reste un pas de géant à faire avant de comprendre comment au sein d'un organisme composé de milliard de cellules, les fonctions biologiques émergent. Les mécanismes fondamentaux qui dictent les interactions entre les différents constituants d'un organisme (cellules, macromolécules, tissus) sont pour la plupart encore inconnus.

Avec cette grande complexité, les systèmes biologiques constituent un nouveau défi et commencent à intéresser de plus en plus les physiciens. Ces derniers affirment que quelques soient les mécanismes à l'origine de l'organisation de la vie, ceux-ci ne peuvent être que des mécanismes physiques (mécaniques, électrostatique, etc...) et que seules les lois de la physique sont nécessaires et suffisantes pour expliquer tout le vivant. Depuis, une nouvelle discipline fait son apparition après la Seconde Guerre mondiale, la biophysique. Elle s'appuie sur des concepts (forces, énergies, ...), des approches expérimentales et des instrumentations physiques pour comprendre les interactions élémentaires qui ont lieu au sein des cellules. Durant ces vingt dernières années, les méthodologies et concepts biophysiques ont été utilisés pour résoudre beaucoup de questions biologiques notamment dans le contexte du développement des connaissances dans le domaine des interactions protéines-lipides. L'utilisation de systèmes modèles simplifiés de membrane cellulaire est de plus en plus répandue.

Ma thèse se situe à l'interface entre la physique et la biologie. Nous avons couplé une approche biomimétique à des techniques de microscopie, de biochimie et d'interface afin d'explorer les interactions et le comportement des biomolécules (peptides et protéines) avec la membrane. Nous utilisons des approches interdisciplinaires pour répondre à des questions d'interactions et de comportements entre fragments de la dystrophine / membranes et peptides antimicrobiens / membranes.

Ce manuscrit comportera deux grandes parties et une annexe :

La partie I est une revue de la littérature comportant deux chapitres : le premier concernant les membranes biologiques et l'utilisation *in vitro* des différents modèles biomimétiques, et le deuxième chapitre concerne les interactions protéines-lipides.

La partie II est consacrée à l'étude des fragments de la dystrophine avec les modèles lipidiques d'une part, et/ou avec les filaments d'actines du cytosquelette d'autre part. Elle comporte cinq différents chapitres : le premier est une introduction sur la dystrophine, les trois suivants illustrent les résultats obtenus, et le dernier chapitre est une discussion et conclusion générale de toute la partie.

L'annexe présentera les peptides antimicrobiens, avec une introduction générale constituant le chapitre 1, suivie par les résultats obtenus et constituant le chapitre 2.

PARTIE I :

INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIQUE

Ce travail de thèse s'intéresse aux aspects structuraux des interactions entre protéines/peptides et membranes. Malgré les avancées méthodologiques et cognitives exceptionnelles faites au XX^{ème} siècle dans le domaine de la biologie et de la biochimie, il reste aujourd'hui à élucider et préciser de nombreux phénomènes.

Dans ce contexte de biologie intégrative, de nombreuses recherches s'intéressent notamment à la membrane, barrière contrôlant les échanges et les communications intra et extracellulaires. Biologistes ou physiciens, les chercheurs confirment que d'une manière générale, la fonction biologique d'une membrane repose sur ses propriétés physiques. C'est sur ce concept que repose notre étude. Une meilleure connaissance de la structure des macromolécules (protéines ou autres) et de leurs interactions et associations, ouvre également des voies quant à la compréhension de leur rôle biologique.

La compréhension des interactions intracellulaires entre membrane plasmique et biomolécules nécessite quelques définitions fondamentales. Dans le but de positionner le sujet de ma thèse dans le contexte scientifique actuel, j'introduirai les objets biologiques que sont les membranes biologiques et leurs différents constituants avec une vision générale des différentes études utilisant des systèmes biomimétiques. Cela constituera le chapitre 1 de la première partie. Ensuite, le deuxième chapitre constitue une synthèse bibliographique sur les interactions protéines-lipides, et les différents points influençant et/ou intervenant dans ces interactions.

Chapitre 1 – LA MEMBRANE

I.1.A- Les membranes biologiques

Les cellules sont définies comme étant des entités fonctionnelles vivantes. L'intégralité de la cellule est une unité spatiale, délimitée par une enveloppe externe appelée membrane plasmique. A l'intérieur de la cellule (le cytoplasme) baignent différents organites eux-mêmes compartimentés par un ensemble de membranes (*Fig 1.1.1.*).

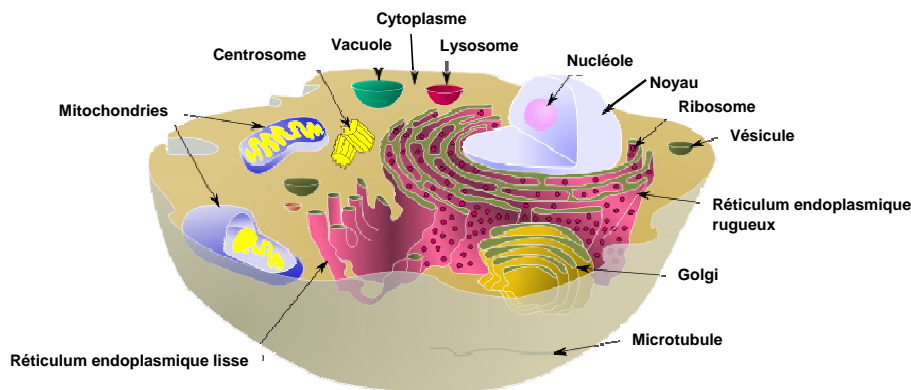


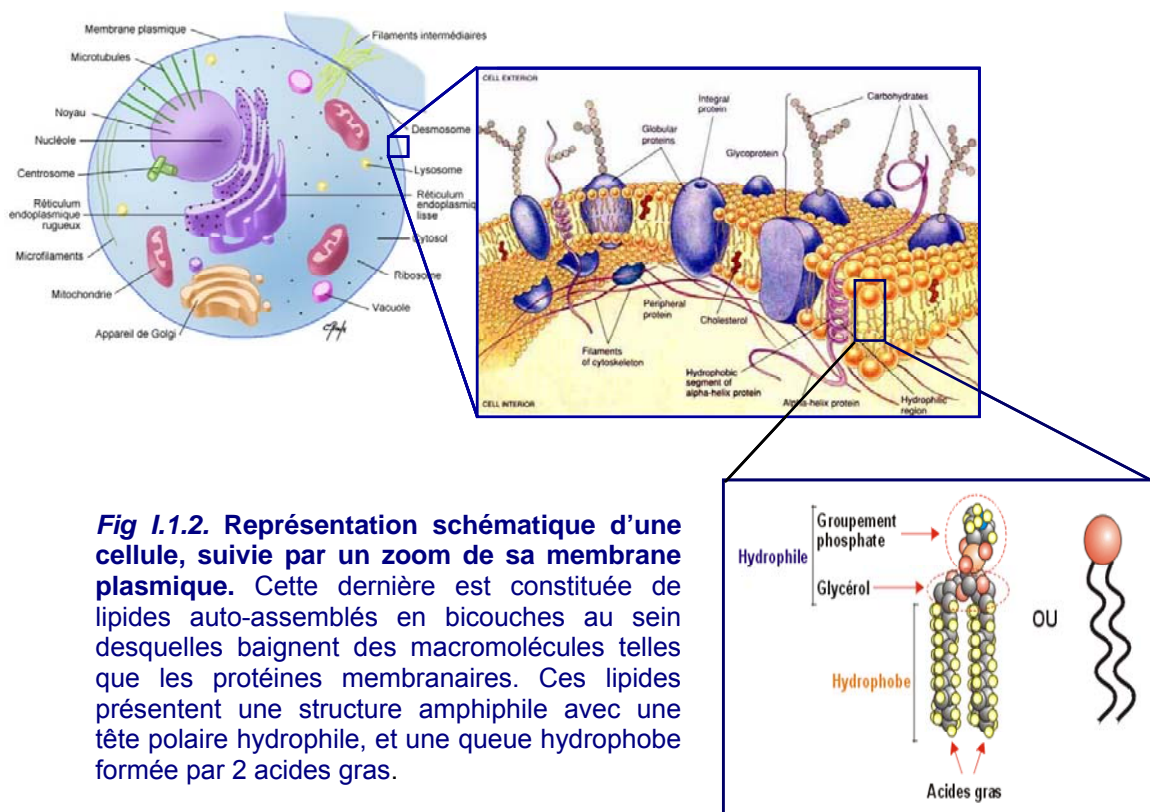
Fig 1.1.1. Représentation schématique d'une cellule. Les différents organites cellulaires et la cellule elle-même sont délimités par une membrane.

Les membranes biologiques représentent un élément fondamental de l'organisation cellulaire. Elles assurent l'individualité cellulaire et sont responsables de la compartimentation de l'espace cytoplasmique en organites fonctionnellement spécialisés ainsi que des échanges contrôlés entre l'intérieur de la cellule et le milieu extra-cellulaire. Elles constituent aussi une interface de communication avec l'extérieur *via* des messagers chimiques ou électriques (1).

Ces membranes sont loin d'être des enveloppes inertes. Le modèle de « mosaïque fluide » a été introduit dès 1972 par Singer et Nicolson (2). Mosaïque car la composition de la membrane est très hétérogène à la fois dans l'espace et le temps. Fluide car les

phospholipides et les protéines membranaires peuvent se mouvoir dans le plan de la membrane.

Ce modèle décrit les membranes biologiques comme étant constituées d'une double couche de phospholipides, dans laquelle les chaînes hydrophobes se font face, traversées par des protéines membranaires (**Fig 1.1.2.**). Les lipides y sont en permanent mouvement de diffusion latérale, via le mouvement brownien (3), et les protéines membranaires se déplacent également, mais plus lentement que les lipides qui les entourent.



Les membranes sont formées de lipides auto-assemblés en double feuillet et constituent une bicouche d'épaisseur 5 nm environ. Grâce au développement de nouvelles techniques telles que les pièges optiques ou la spectroscopie de corrélation de fluorescence, de récentes études (4) ont montré une grande complexité de l'organisation dynamique des membranes, les lipides (et les protéines) ne diffusent pas aussi librement que le proposait le modèle originel mais s'organisent en domaines lipo-protéiques temporaires. L'existence de micro-domaines de phases diverses et de constitution diverses au sein des membranes a révélé toute leur complexité et la nécessité d'utiliser des modèles moins élaborés pour en comprendre le fonctionnement.

I.1.A.1. Composition et structure des membranes biologiques

Les membranes sont majoritairement composées de lipides et de protéines dont les quantités relatives varient d'une cellule à l'autre. Dans sa définition la plus large, un lipide (du grecque *lipos* : gras) se définit comme un composé de poids moléculaire faible ou intermédiaire (<5000 Da) avec une proportion importante de chaînes hydrocarbonées dans sa structure. Les lipides sont les briques fondamentales de membranes biologiques. Une section membranaire de $1 \mu\text{m}^2$ contient approximativement 5×10^6 molécules de lipides. Ce sont des molécules amphiphiles possédant une tête polaire hydrophile et deux chaînes d'acides gras hydrophobes de 2 à 3 nm, saturées ou insaturées (possédant de 0 à 6 insaturations) (5). La taille de la tête hydrophile varie largement.

En milieu aqueux, l'organisation la plus stable des lipides est celle qui permet de minimiser les interactions entre les parties hydrophobes et les molécules d'eau. Les lipides s'organisent le plus souvent en bicouche, partie apolaire au centre de la bicouche où l'eau n'a pas accès et apparitions de nombreuses interactions de van der Waals de manière à exclure toute molécule polaire ; alors que la partie polaire est en contact avec le milieu aqueux, de part et d'autre de la bicouche (6). La structure se referme sur elle-même formant une vésicule close, qui sépare un compartiment aqueux interne du milieu aqueux externe, ce qui est le propre d'une membrane biologique (*Fig I.1.3.*).

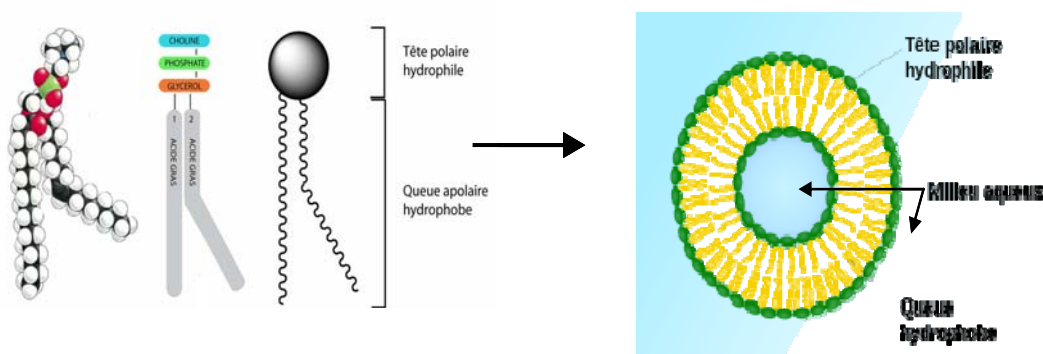


Fig I.1.3. Modèle moléculaire d'un phospholipide (gauche) et organisation des lipides en bicouche formant une vésicule close (liposome) délimitant un intérieur aqueux (droite).

Le caractère hydrophobe de la barrière lipidique la rend sélective et imperméable à certains molécules polaires. Par ailleurs, la perméabilité diminue avec la masse moléculaire des solutés.

Il existe une variété importante de lipides possédant une structure différente, et donc des caractéristiques géométriques et physiques différentes. On répertorie trois familles de lipides dans les membranes : les glycérophospholipides (ou phospholipides), les sphingolipides (tel que la sphingomyéline) et les stérols (tel que le cholestérol). Chaque type de cellule et de membrane a sa propre composition lipidique (7) qui peut également changer au cours du développement cellulaire (8) (*Fig I.1.4-A*). Cela montre la capacité des cellules de réguler et adapter la composition lipidique membranaire aux besoins de l'activité cellulaire. Les phospholipides sont les lipides les mieux représentés et les plus abondants dans les membranes des cellules animales.

Les diacylphosphoglycérides

Les diacylphosphoglycérides ou phospholipides dérivent du glycérol par estérification en position 3 par un dérivé de l'acide phosphorique. En position 1 et 2, on trouve des chaînes hydrocarbonées. Ces chaînes sont associées au glycérol par des liaisons esters. La nature du substituant fixé sur l'acide phosphorique définit la nature du phosphoglycéride. Le phosphoglycéride le plus simple est l'acide phosphorique, estérifié sur le groupement hydroxyl en position 3 du glycérol par l'acide phosphorique. Ce n'est pas un phospholipide membranaire mais un intermédiaire dans la biosynthèse des autres phospholipides. Parmi ceux que l'on rencontre le plus fréquemment, nous citerons la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylsérine (*Fig I.1.4-B*). Suivant le lipide, la tête peut être ionique (charge positive ou négative), zwitterionique (deux charges opposées) ou neutre. Ils sont également classés selon la structure de leur squelette carboné (nombre de carbones, présence d'insaturations...). L'exemple le plus classique de phospholipide, et sur lequel nous avons porté notre attention, est la 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC). Cette molécule est un ester bâti sur le glycérol. Elle comporte deux chaînes aliphatiques, issues des acides gras engagés dans l'estérification de deux groupements alcool du glycérol. Le troisième groupement alcool est estérifié par l'acide phosphorique (sous forme d'un groupement phosphate, ionisé, donc chargé, au pH cellulaire aux alentours de 7,4). Chaque chaîne aliphatique est formée de 18 atomes de carbone et une insaturation en position C9. L'ensemble forme un groupement dioleoyl-glycero-phospho (DOP) ou phosphatidyl. Ce dernier est ici lié à la choline, groupement chargé positivement. C'est donc un phospholipide zwitterionique.

Comme le groupement phosphate est chargé négativement au pH cellulaire, l'ensemble de la molécule est globalement neutre. Le **Tableau I.1.1** montre les variations de compositions lipidiques entre différentes membranes, notamment le sarcolemme de la cellule musculaire, le réticulum endoplasmique et la mitochondrie (9).

	Sarcolemme	Réticulum endoplasmique	Mitochondrie
Phospholipides :			
PC	45	58	49
PE	23	29	39
PS	18	9	9

PC, PE, PS : phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine et phosphatidylsérine.

Tableau I.1.1. Composition lipidique approximative de différentes membranes biologiques, notamment le sarcolemme. Les proportions sont données en pourcentage des lipides totaux (9).

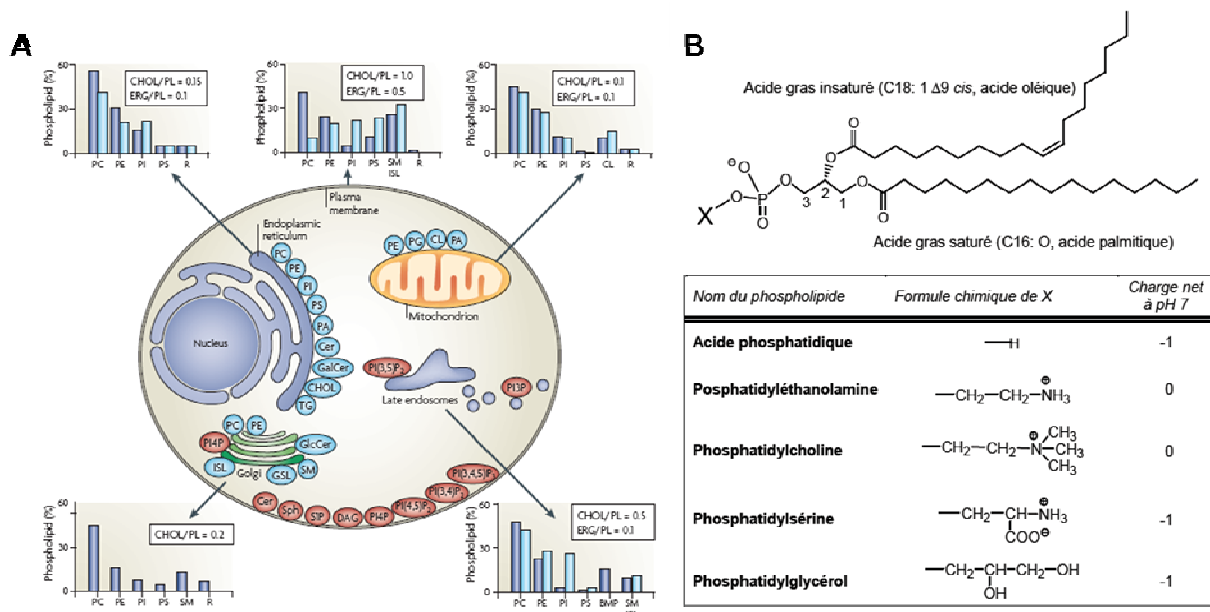


Fig I.1.4. (A) Cartographie des lipides membranaires : quantification et distribution chez les mammifères (bleu foncé) et dans les levures (bleu clair). Adapté de la référence (10) **(B) Structure des principaux phospholipides des membranes biologiques**. Les carbones de la chaîne principale du glycérol sont notés de 1 à 3.

Le sarcolemme constitue la membrane de la cellule musculaire. C'est à cette membrane que nous nous sommes intéressés lors des études qui seront présentées dans la partie II. L'analyse de la composition lipidique du sarcolemme montre une abondance des phospholipides (9). PC représente 45% des phospholipides totaux, PS 18% et PE 23%. De plus, les acides gras de type Dioleoyl-glycérol (DO 18 :2) constituent 12% de la composition globale du sarcolemme (9). Ainsi, pour les études de la partie II, nous utilisons les phospholipides DOPC, DOPS et DOPE, vu leur représentation importante dans le sarcolemme.

I.1.A.2- Dynamique de la membrane

Les différents constituants d'une membrane biologique, s'ils sont confinés dans un espace défini par la membrane, n'en sont pas moins animés de mouvements divers. Le modèle « mosaïque fluide » (2) décrit la membrane comme un fluide bidimensionnel isotrope.

La phase lipidique des membranes biologiques est fluide dans les conditions physiologiques et permet donc le déplacement des constituants. L'amplitude de ces mouvements dépend à la fois de la température et de la concentration lipidique elle-même. La fluidité est facilitée par une augmentation de la température et par la présence d'insaturations dans les queues hydrophobes des phospholipides, et ralentie par la présence de chaînes saturées ainsi qu'une forte proportion de cholestérol. En effet la présence d'insaturations induit un encombrement stérique plus important de la chaîne carbonée. Cette géométrie engendre un désordre plus important dans l'agencement des lipides dans la bicouche, ce qui se traduit finalement par une plus grande fluidité de celle-ci.

Les bicouches lipidiques voient leur structure et leurs propriétés physiques se modifier radicalement à des températures caractéristiques (**Fig I.1.5-I**). Ces changements sont de véritables transitions de phases, liées à des modifications de conformation et d'organisation des chaînes carbonées au cœur de la bicouche. Dans une situation où toutes les configurations autour des liaisons C-C sont de type *trans*, la chaîne est étirée au maximum (**Fig I.1.5-II.A**). Une autre configuration de liaisons C-C existe, c'est la

configuration gauche (**Fig 1.1.5-II.B**). Le passage d'une configuration *trans* à une configuration gauche autour d'une liaison C-C nécessite de l'énergie (11).

En phase lamellaire, on peut distinguer trois phases principales (**Fig 1.1.5**).

- Une phase cristalline L_c , à très basse température, dans laquelle les molécules sont arrangées périodiquement et ont une probabilité de diffusion nulle à grande distance.
- A température intermédiaire, la bicouche se trouve en phase gel L_β ; les chaînes carbonées sont alignées (conformation β des chaînes aliphatiques), dans un état condensé, et les liaisons carbone-carbone ont une probabilité élevée d'avoir une conformation *trans*. Leur longueur (et donc l'épaisseur de la bicouche) est maximale comme dans la phase cristalline.
- A plus haute température, la bicouche devient fluide (phase L_α). Cela entraîne un accroissement de la mobilité moléculaire (12). La probabilité d'une isomérisation *trans* \rightarrow gauche augmente. Dans une bicouche lipidique, les liaisons cis et gauches rendent le parallélisme des chaînes plus difficile (11, 13). Au-delà d'une température donnée, appelée température de transition T_m , une transition coopérative est observée, qui fait passer la conformation ordonnée à une conformation désordonnée (Figure 2 D). La T_m augmente avec la longueur de la chaîne carbonée. Dans la conformation désordonnée, appelée α , les chaînes oscillent autour d'un axe moyen perpendiculaire au plan de la membrane. Les chaînes ne sont plus étirées au maximum et l'épaisseur de la bicouche diminue (13). Le contact entre chaînes est moins étroit et les lipides sont plus séparés les uns des autres. Ainsi, au cours de la transition, une expansion latérale des lipides dans la bicouche est observée, aux dépens de l'épaisseur. La surface occupée à l'interface est plus importante.

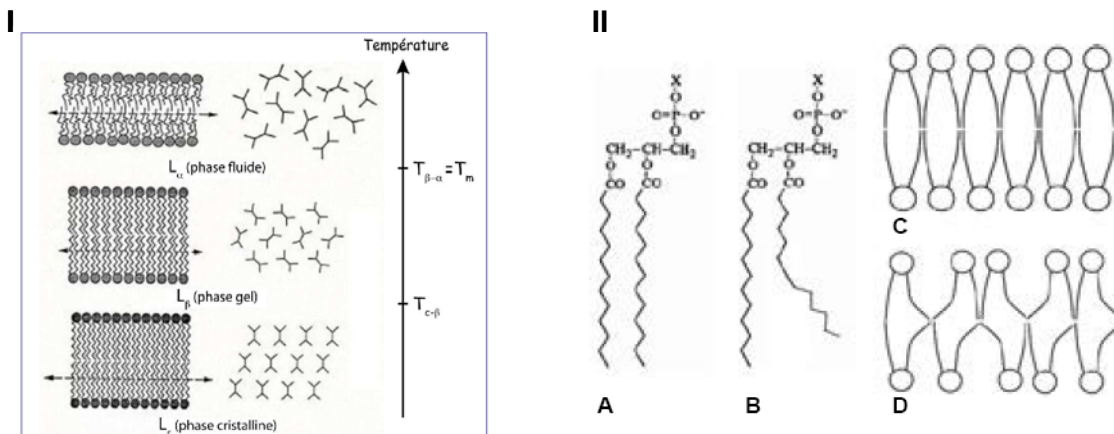


Fig 1.1.5. Représentation des différentes phases d'une bicouche lipidique (I). (II) Représentation de (A) phospholipide Tout-trans (All-trans), (B) phospholipide avec une liaison gauche. (C) membrane en conformation β . (D) membrane en conformation α . Adapté de la référence (14).

De plus, les lipides peuvent se déplacer selon plusieurs types de mouvement (**Fig 1.1.6**) :

- Mouvement rotationnel : une simple rotation sur eux-mêmes. Le coefficient de diffusion rotationnel D_r est de l'ordre de 10^{-8}s^{-1} (15).
- Mouvement translationnel : par diffusion latérale dans le feuillet dont ils font partie. Le coefficient de diffusion D est de l'ordre de $10^{-12} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (15)
- Mouvement de basculement : beaucoup plus rare, le lipide change de feuillet (flip-flop) et passe d'une monocouche à l'autre. Ce phénomène est très lent et défavorable, avec un temps de corrélation de l'ordre de l'heure voire du jour selon la nature du phospholipide (16). Dans la cellule, une enzyme, la flipase, est requise pour permettre le changement de feuillet.

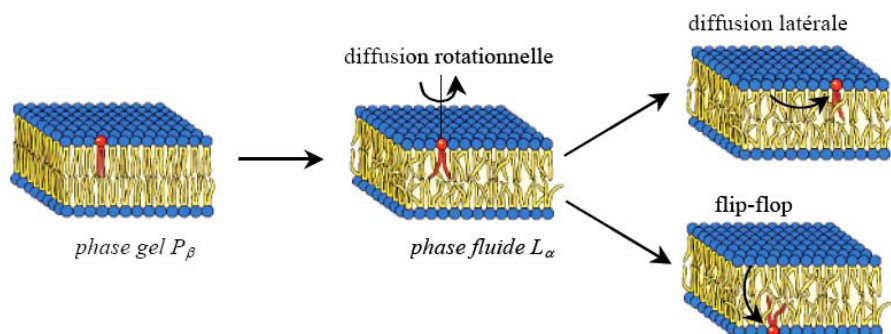


Fig 1.1.6. Représentation schématique de la dynamique des lipides au sein des membranes. Adapté de la référence (3).

Les protéines présentes dans la membrane diffusent également mais beaucoup moins vite que les lipides (environ 100 fois moins vite). Depuis 1972, le modèle mosaïque fluide a considérablement évolué. Les biologistes et les biophysiciens ont été amenés à repenser le modèle original et à entrevoir un aspect fonctionnel dans la dynamique et la composition de la membrane. Plusieurs protéines membranaires ne diffusent pas librement dans la membrane, elles sont confinées à l'intérieur de domaines spécifiques ou bien elles ont un mouvement dirigé. Il existe une forte hétérogénéité latérale membranaire avec l'existence de micro-domaines dans des phases différentes (4).

I.1.A.2-1. Phase des lipides dans l'eau

En 1968, les travaux de *Luzzati et al.* ont permis de mettre en évidence les différentes structures adoptées par les lipides dans l'eau (17). On distingue deux types de structures : (i) celles de types *I* ou "directs" (huile dans eau) où les lipides se trouvent dans un milieu aqueux continu, (ii) et celles de types *II* ou "inverses" (eau dans huile) où les têtes polaires s'organisent dans une matrice non polaire continue formée par les chaînes aliphatiques.

Les interactions hydrophobes des lipides amphiphiles en milieu aqueux conduisent à un auto-assemblage supramoléculaire spontané des lipides en structures diverses. La minimisation du contact avec l'eau positionne les chaînes d'acides gras au centre, et les parties polaires sont en périphérie, en contact avec l'eau. Cette auto-organisation est guidée par deux forces principales : d'une part l'effet hydrophobe, qui tend à associer les chaînes carbonées et d'autre part les répulsions entre les têtes polaires, d'origine stérique et/ou électrostatique. Le rapport entre ces forces en compétition détermine l'aire par tête optimale a_0 des molécules. *J. Israelachvili* (18) a montré que la structure adoptée ne dépend alors que du paramètre suivant (**Fig I.1.7**) :

$$x = \frac{v}{a_0 \times l_c}$$

(v : volume de la partie hydrophobe, l_c : la longueur des chaînes carbonées)

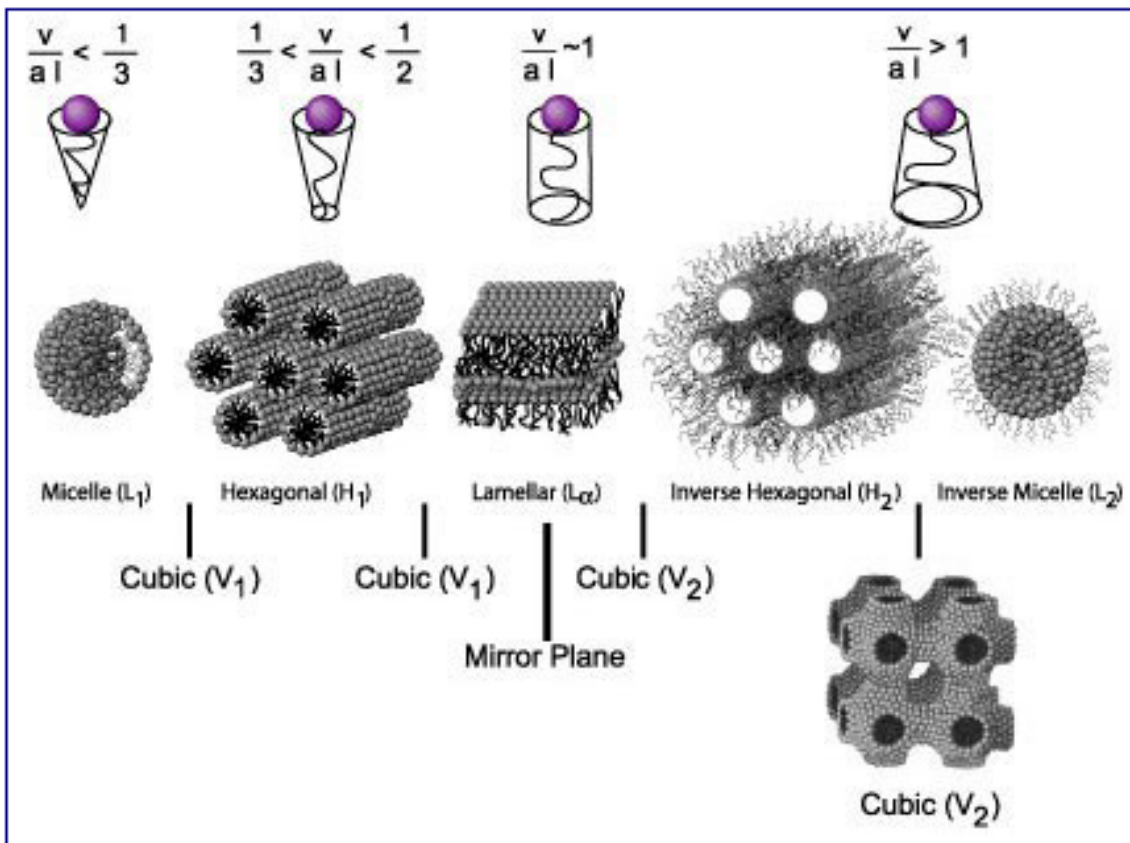


Fig I.1.7. Structure de l'assemblage spontané en fonction de la forme des molécules amphiphiles. Les chiffres 1 et 2 font référence au milieu continu (1 direct et 2 inverse). Adapté de la référence (18).

I.1.A.2-2. L'effet de la géométrie au sein d'une membrane

L'organisation des membranes dépend de la forme moléculaire intrinsèque des lipides le constituant. En 1979, *Cullis & de Kruijff* (19) montrent l'importance de la forme de la molécule lipidique sur son auto-assemblage. En effet, c'est le volume occupé par la partie hydrophobe par rapport à celui occupé par la partie hydrophile qui permet de prévoir le type d'organisation qu'un lipide adoptera dans l'eau. Le volume de la tête hydrophile dépend du volume des molécules la constituant, de son hydratation et de sa dynamique de rotation. Le volume moléculaire des chaînes acyles est fonction du nombre d'insaturations en configuration *Cis* : plus celles-ci sont nombreuses et proches de la tête hydrophile et plus le volume occupé par ces chaînes est important. De plus, une distribution asymétrique existe dans la membrane entre le feuillet interne et le feuillet externe constituant la bicouche (**Fig I.1.8**).

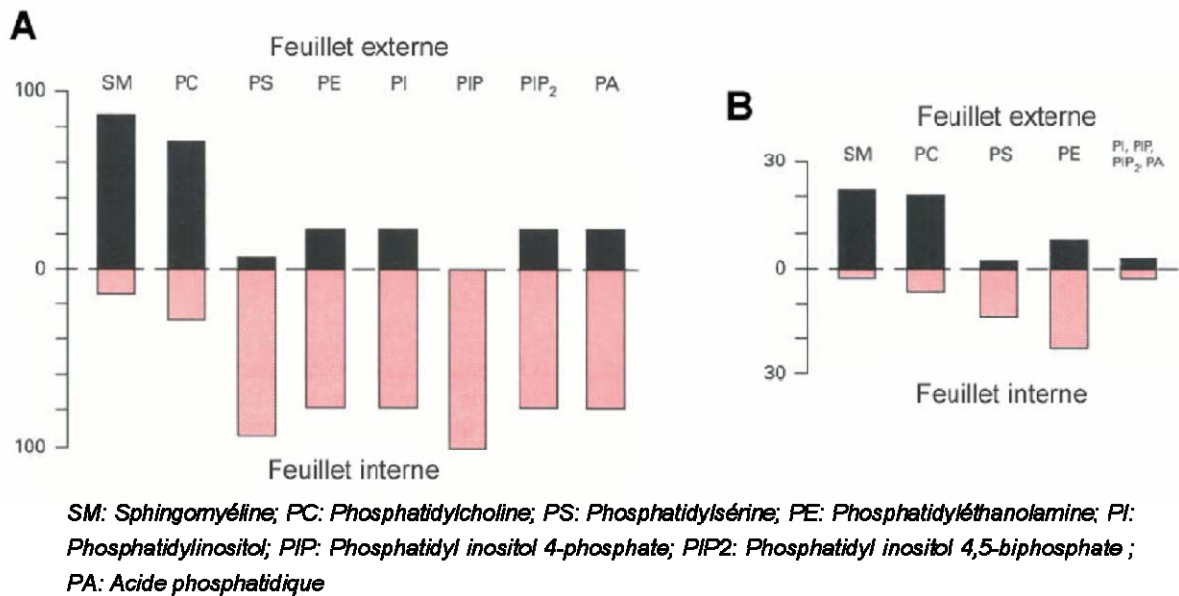


Fig 1.1.8. Distribution asymétrique des phospholipides de la membrane plasmique de l'érythrocyte humain. (A) Distribution des lipides individuels en % dans les feuillettes. (B) indique le pourcentage du total des lipides. Adapté de la référence (20).

Ainsi, des études *in vitro* montrent que la lysophosphatidylcholine (LPC), qui ne possède qu'une chaîne acyle saturée, s'organise en micelle dans un solvant aqueux ; tandis que la phosphatidylcholine (PC) s'organise en bicouche (**Fig 1.1.9-A**). Or, un lipide en forme de cône induit une courbure positive (type micelle), et un lipide en forme de cône inversé tel que la phosphatidyléthanolamine (PE) induit une courbure négative (type micelle inversée) (21).

Cette variabilité d'organisations présente un intérêt physiologique transitoire ou durable. Chaque organe a sa propre courbure de membrane contrôlée en partie par sa propre composition de lipides (22). Sur la **Fig 1.1.9-B**, la présence de phosphatidyléthanolamine sur le feuillet interne de la membrane permet de créer une invagination membranaire.

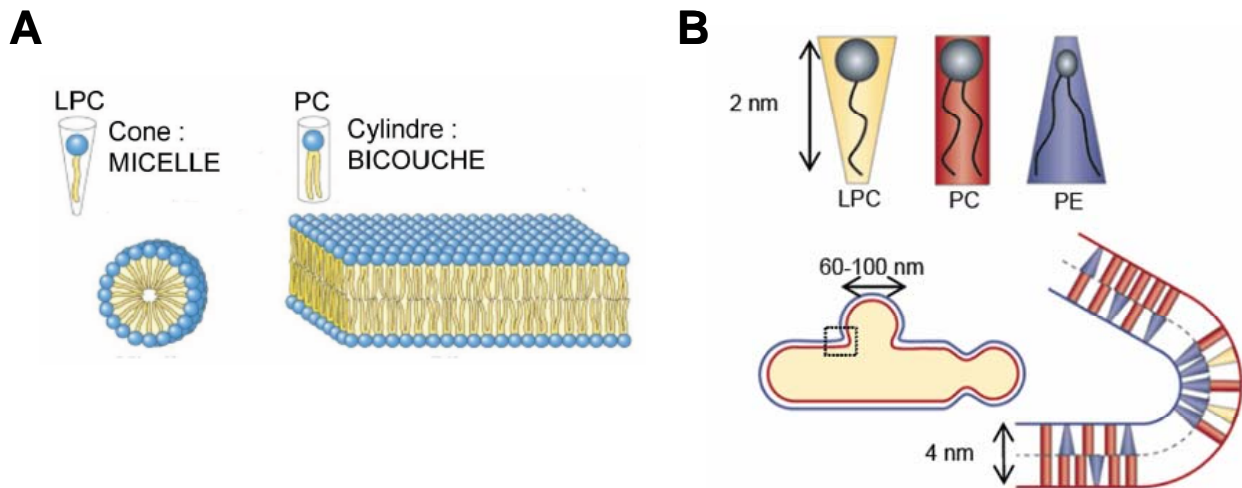


Fig 1.1.9. Lipides et organisation. (A) Auto-organisation dans l'eau de la lysophosphatidylcholine (LPC) et de la phosphatidylcholine (PC). Adapté de la référence (23). (B) Influence de la forme moléculaire des lipides sur les propriétés physiques de membrane. Trois phospholipides de formes différentes contribuent à la formation d'une invagination membranaire. Adapté de la référence (24).

Des organisations non lamellaires sont observées pendant la fusion membranaire, passage de deux à une seule bicouche. Cette fusion membranaire est impliquée dans plusieurs processus physiologiques tels que le trafic intracellulaire, la division cellulaire, endocytose et exocytose ... De plus, certaines protéines et enzymes agissent directement sur la forme membranaire. *In vivo*, la fusion membranaire est étroitement contrôlée par les protéines fusogènes. Un autre exemple, lors de la formation des vésicules synaptiques, l'acide lysophosphatidique (cône inverse) est acétylé en acide phosphatidique (cône) par l'enzyme "endophiline acétyltransférase" (25). De manière similaire, certaines phospholipases hydrolysent spécifiquement les têtes polaires et modifient ainsi leurs tailles (26).

Les formes individuelles des lipides qui composent la membrane jouent un rôle important à l'échelle locale sur la stabilisation des protéines insérées dans la bicouche. La présence d'un lipide dans une membrane induisant une courbure différente de la courbure intrinsèque liée au lipide préexistant déstabilise la membrane et engendre un stress de courbure. Ce dernier influence la stabilité du système et les interactions avec les protéines membranaires et extrinsèques. D'autre part, les peptides et les protéines insérés dans les membranes sont aussi responsables de l'organisation membranaire locale.

En conclusion, les variations de compositions lipidiques et protéiques donnent à chaque membrane des propriétés de structure, de charge et de fluidité légèrement différentes. L'ensemble de ces variations influence l'activité biologique des membranes et notamment, la stabilité et l'activité des protéines membranaires ou périphériques. Cependant, la composition n'est pas figée et la cellule est capable de moduler sa composition lipidique afin de s'adapter à son environnement.

I.1.B- De la membrane biologique vers les membranes biomimétiques

La grande variété de lipides et de protéines au sein d'une même cellule en fait un système complexe fortement inhomogène. Les membranes sont ainsi caractérisées par des hétérogénéités de distribution et d'état de phase. De plus, leurs interactions avec les composants intra et extracellulaires rendent les investigations directes difficiles. D'où l'idée de simplifier le système et de travailler avec des modèles biomimétiques. Ces modèles permettent des études *in vitro* dans des conditions expérimentales pour lesquelles les paramètres peuvent être systématiquement contrôlés et modifiés (*Fig I.1.10*).

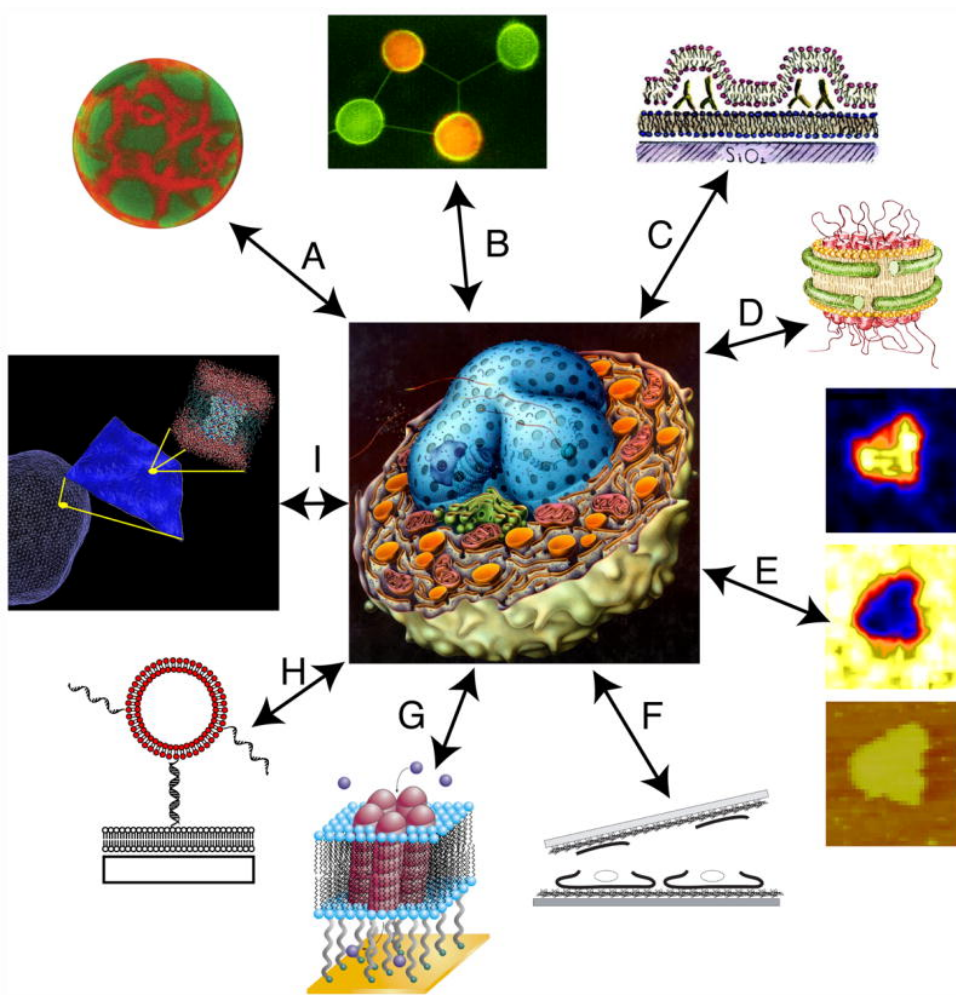


Fig I.1.10. Différentes études utilisent des modèles membranaires. Une collection de systèmes modèles lipidiques entourant un schéma d'une cellule qui souligne le grand nombre de surfaces membranaires différentes. (A) Vésicules géantes unilamellaires (GUV), (B) Un réseau de vésicules lipidiques géantes reliées par des microtubules; (C) Fusion des GUV sur un support solide formant une bicouche lipidique supportée ; (D) Nanodisques de membrane contenant des protéines transmembranaires; (E) Bicouches lipidiques analysées par NanoSIMS; (F) Eclatement des membranes cellulaires sur des supports solides; (G) Bicouche lipidique attachée à un support solide contenant des canaux ioniques, (H) Des vésicules attachées à une bicouche lipidique supportée via l'ADN; (I) Représentation visuelle des simulations de multi-échelle. Adapté de la référence (27).

Nous présentons ici plus en détail les trois systèmes modèles qui ont été utilisés lors de ce travail de thèse : Les liposomes (ou vésicules lipidiques), les bicouches et les monocouches planes. Ces modèles trouvent des applications dans les domaines de la biochimie-biophysique, de la pharmacologie, de la thérapie génique, de la biotechnologie

ou encore la cosmétologie, et sont très utilisées pour aborder des études d'interaction entre lipides et protéines.

I.1.B.1- Les vésicules lipidiques

Les liposomes constituent le modèle le plus simple de structure mimant la cellule (objet constitué d'une membrane lipidique sans autre constituant). Ce sont des vésicules sphériques de quelques dizaines à quelques milliers de nanomètres de diamètre. Ces vésicules sont composées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques qui permettent de séparer un milieu intravésiculaire d'un milieu extérieur. Les phospholipides naturels forment spontanément des liposomes en milieu aqueux car c'est l'organisation la plus stable qui permet de minimiser les interactions entre les parties hydrophobes et les molécules d'eau. Les liposomes ne se forment qu'à une température supérieure à celle de leur transition de phase (14).

La méthode la plus simple de préparation des liposomes consiste à évaporer le solvant organique dans lequel sont dissous les lipides, puis à les remettre en suspension dans un milieu aqueux par simple agitation (28). Les lipides s'organisent alors en vésicules multilamellaires (MLV, Multi Lamellar Vesicles). Ce sont des structures en bicouches lipidiques, closes, concentriques, séparées les unes des autres par des couches d'eau (*Fig I.1.11*). Ces liposomes ont des tailles très hétérogènes et possèdent un volume aqueux interne relativement faible par rapport à la quantité de lipides. Leur taille moyenne élevée (d'environ 200 nm de diamètre et plus) et l'hétérogénéité des suspensions obtenue en font des mauvais candidats pour les études biophysiques-biochimiques. En effet, les MLVs diffusent fortement la lumière et rendent difficiles les études en spectroscopie optique. De plus, leur caractère multilamellaires et leur taille inhomogène compliquent les études de perméabilité, de liaisons...

Un traitement physique des MLVs (ultrasons, pressions élevées) conduit à des vésicules de taille homogène et constituées d'une seule bicouche lipidique (Unilamellar vesicles) (*Fig I.1.11*).

Ces derniers sont classés en trois domaines de tailles :

- Les SUVs (Small Unilamellar Vesicles) de 20 à 50 nm de diamètre. Les SUVs sont obtenues par sonication d'une suspension de MLV ou par

filtration à travers un filtre de très petite taille. La forte courbure imposée à la membrane implique une surface externe significativement supérieure à celle de la surface de la monocouche interne et donc un nombre de lipides supérieur dans cette monocouche. La petite taille des SUVs favorise leur utilisation en spectroscopie optique.

- Les LUVs (Large Unilamellar Vesicles) de 100 à 500 nm de diamètre. Les LUVs s'obtiennent par extrusion d'une solution de MLV à travers des filtres ayant des pores de tailles calibrées. Les LUVs, comme les SUVs, peuvent être produites dans un milieu salin et notamment physiologique. L'évaporation par inversion de phase est une autre technique de préparation des LUVs (29). Cette méthode consiste à forcer l'émulsion par sonication entre une phase éther (solvant des lipides) et une phase aqueuse. L'éther est ensuite éliminé lentement par évaporation sous vide partiel. La courbure d'une vésicule de grande taille est plus proche de celle observée physiologiquement. Ce sont des objets beaucoup plus diffusants que les SUVs.
- Les GUVs (Giant Unilamellar Vesicles) ont une taille variant de 1 μm à plus de 100 μm de diamètre. Ils sont formés dans un milieu non ionique par électroformation (30) ou par hydratation douce en milieu ionique (réhydratation des lipides en présence ou absence d'un champ électrique). Un très bon rendement de vésicules unilamellaires est obtenu par l'électroformation (80%), alors qu'un pauvre rendement en vésicules unilamellaires est obtenu par hydratation douce. Seule la formation des GUVs par hydratation douce peut être réalisée en milieu physiologique (31). D'autres techniques de préparation de GUV existent, notamment par double émulsion : une goutte de solution aqueuse passe successivement par deux interfaces entre une huile contenant le lipide et une solution aqueuse (32). Les GUVs sont surtout utilisées pour décrypter certains mécanismes membranaires (diffusion de protéines membranaires, déformations membranaires, formation de radeaux lipidiques, électrophysiologie, perméabilité membranaire...) à une échelle cellulaire.

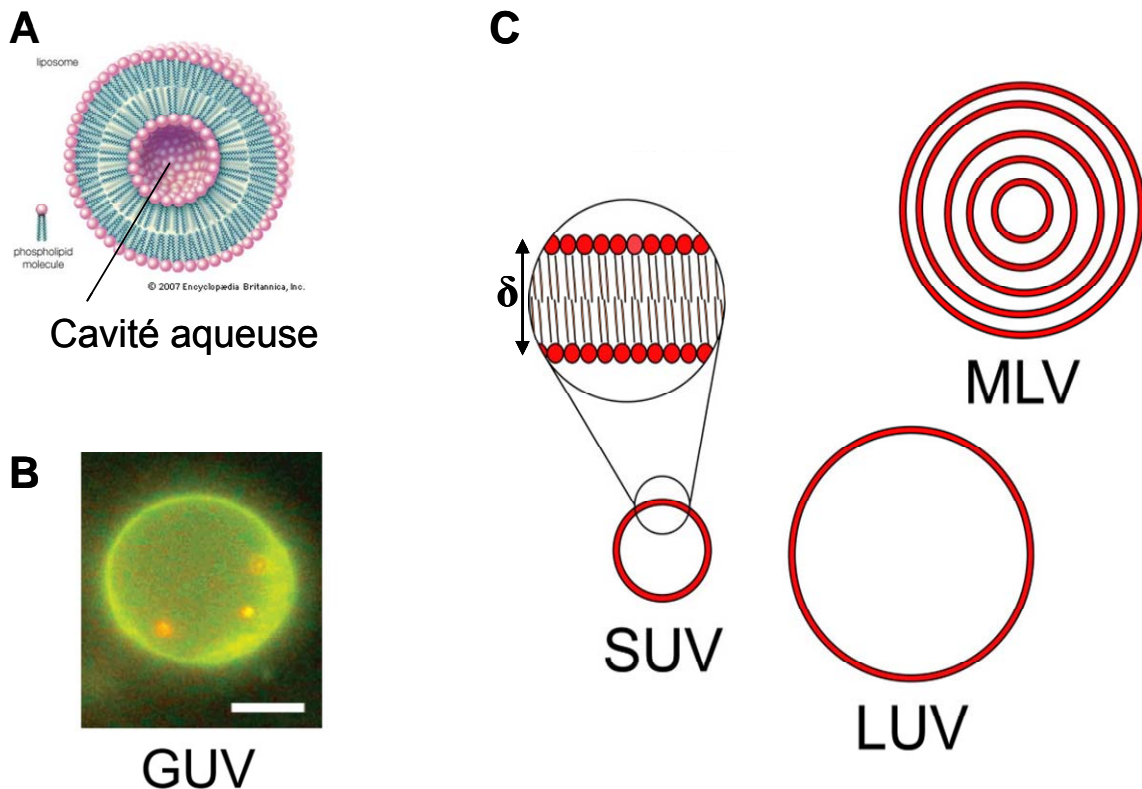


Fig 1.1.11. Les liposomes. (A) Structure schématique de la double couche lipidique au sein d'une vésicule. (B) La GUV constituée d'un mélange de phospholipides et d'un fluorochrome (vert), et contient trois sphères de polystyrène (rouge) qui peuvent se déplacer librement au sein de la vésicule. La barre d'échelle est de 5 μm . (C) Les liposomes sont présentés en respectant la taille et le nombre de bicouches. SUV = petite vésicule unilamellaires, LUV = grande vésicule unilamellaire, MLV = vésicules multilamellaires, GUV = vésicules unilamellaires géantes ($\delta \sim 5 \text{ nm}$). Adapté de la référence (33).

La taille et la monodispersité des vésicules sont usuellement vérifiées par microscopie électronique ou diffusion de lumière. D'un point de vue général, les vésicules (MLV, SUV et LUVs) peuvent être produites à des concentrations élevées de l'ordre de quelques dizaines de mg/mL et sont résistantes, ne nécessitent pas de précautions particulières de manipulation, et sont stables au cours du temps....

Lorsqu'elles forment des vésicules, les bicouches lipidiques limitent les échanges entre les compartiments internes et l'extérieur. Les bicouches pures sont imperméables aux ions et aux grosses molécules polaires, et seulement partiellement perméables à l'eau

qui peut s'immiscer entre les lipides sous l'effet de la pression osmotique. Cela signifie que les fonctions physiologiques des membranes biologiques ne peuvent reposer simplement sur la bicouche, mais nécessitent la présence d'autres composants tels que les protéines membranaires pour permettre des échanges contrôlés entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule.

Le choix du système modèle, et principalement la taille des vésicules, joue un rôle déterminant pour l'étude des interactions protéines-membranes. En variant la taille des vésicules, le rayon de courbure est modifié, et nous détaillerons l'importance du rayon de courbure sur ces interactions dans le chapitre 2 de la partie I.

I.1.B.2- Les bicouches et les monocouches planes

Les bicouches lipidiques, libres ou supportées, sont des systèmes biomimétiques à deux dimensions facilement accessibles à des techniques de caractérisations de surface du fait de leur localisation dans l'espace (34-36). L'épaisseur de la bicouche dépend de la nature des lipides qui la constitue et varie de 4 à 7 nm.

Les bicouches libres sont surtout utilisées pour étudier les mécanismes de régulations des canaux ioniques et autres protéines membranaires intrinsèques. Alors que les modèles de monocouches sont utilisés pour étudier l'interaction et l'organisation protéines-lipides, notamment pour les protéines extrinsèques monotopiques, c'est-à-dire les protéines qui se retrouvent à l'extérieur de la membrane cellulaire, et qui sont en contact avec un seul feuillet de la membrane.

Différents types de bicouches libres existent (*Fig I.1.12*).

Ces systèmes, avec deux compartiments aqueux relativement faciles d'accès et dans lesquels on peut plonger des électrodes, se prêtent admirablement bien à l'étude de la perméabilité ionique de la bicouche : on peut mesurer des courants et / ou des différences de potentiel de part et d'autre de la bicouche (37)

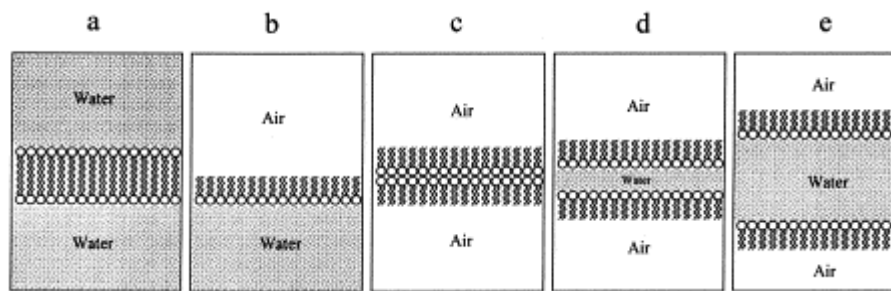


Fig 1.1.12. Représentation schématique des différents modèles membranaires planes : (a) film noir (BLM: black lipid membrane), (b) monocouche lipidique, (c) film noir de Newton (NBF : Newton black film), (d) film noir commun, (e) film de savon. Adapté de la référence (38).

Les travaux de *McConnel et al.* (39) ont favorisé l'utilisation des membranes déposées sur des supports solides, notamment pour l'étude de processus membranaires d'adhésion et d'interactions cellulaires (40) et pour le développement de nouvelles surfaces biofonctionnalisées. Aujourd'hui, l'utilisation de bicouches lipidiques supportées est de loin le système modèle le plus utilisé pour regarder l'organisation des protéines membranaires dans la membrane et notamment avec les techniques de microscopie de champs proches tel que la Microscopie à Force Atomique (AFM) (41, 42). En biotechnologie, beaucoup des développements de "nouveaux" supports sont réalisés, tels que les coussins de polymère qui permettent d'éloigner la membrane du substrat (43, 44).

Pour former des bicouches lipidiques supportées, deux différentes techniques de fabrication sont couramment utilisées (*Fig 1.1.13*), la fusion de vésicules ou bien dépôt par la méthode Langmuir-Blodgett en utilisant la cuve de Langmuir (ou balance à film de Langmuir). Cette dernière permet la fabrication soit d'une monocouche, d'une bicouche ou même dans certaines conditions, de double bicouches supportées.

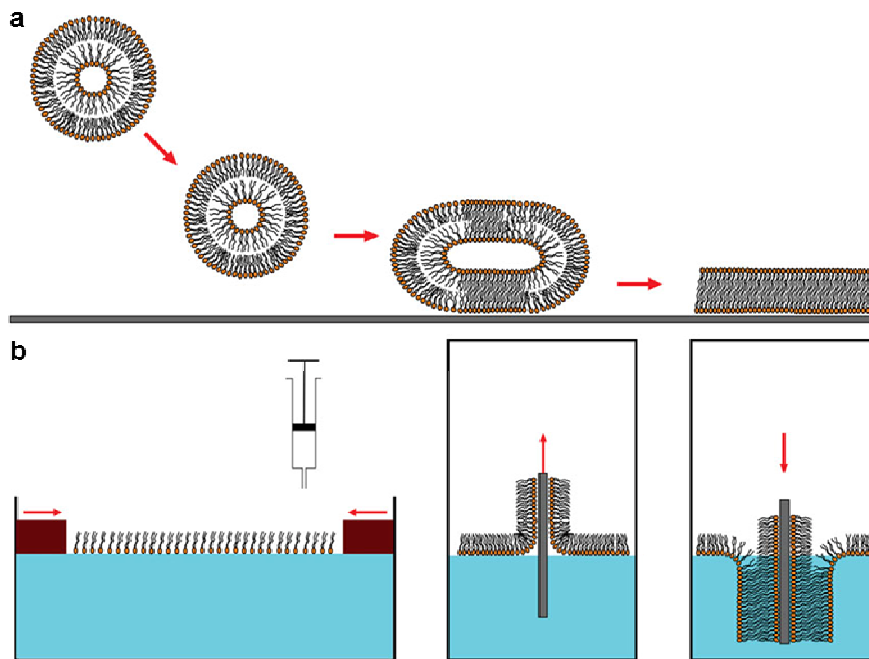


Fig 1.1.13 Représentation schématique des deux méthodes couramment utilisées pour la fabrication de bicouches lipidiques supportées : (a) fusion de vésicules lipidiques et (b) la technique de Langmuir-Blodgett. Adapté de la référence (42).

I.1.B.2-1. Fusion de vésicules

Brian et McConnell (45) ont montré par des mesures de retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) que des vésicules phospholipidiques (SUVs) forment spontanément une bicouche sur un support de verre. Les coefficients de diffusion des phospholipides dans la bicouche supportée sont équivalents à ceux attendus pour une bicouche fluide ou monocouche (de l'ordre de 10^{-8} cm²/s).

Cette technique est l'une des manières les plus simples et rapides pour former des membranes supportées. Il s'agit d'adsorber des vésicules de phospholipides sur une surface solide, et consécutivement s'opère leur réorganisation en bicouche plane. Pour que la fusion des vésicules se produise, il est impératif que les phospholipides se trouvent à l'état fluide, dans le but de limiter l'interaction entre les lipides. Cela se traduit expérimentalement par le fait que la température à laquelle se fait la fusion doit être supérieure à la température de transition gel/fluide du lipide considéré.

Le processus de fusion des vésicules se déroule en plusieurs étapes, qui sont résumées dans la **Fig 1.1.14**.

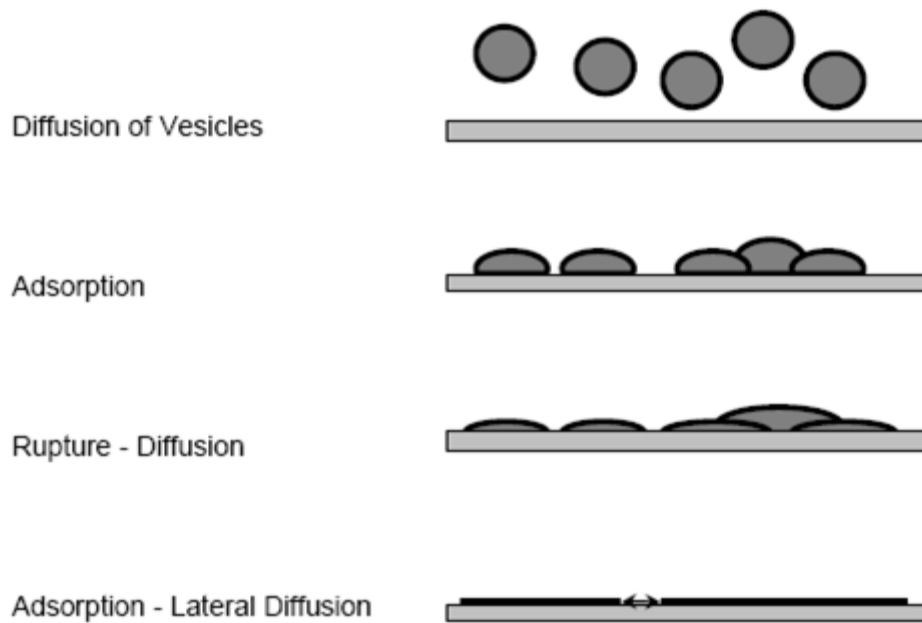


Fig I.1.14. Représentation du processus de fusion de vésicules sur un support solide.

Adapté de la référence (46).

Initialement, les vésicules diffusent à la surface. L'adsorption des vésicules à la surface continue progressivement jusqu'à une concentration critique. Ensuite, des interactions stériques entre les vésicules augmentent leurs déformations ainsi que la tension latérale dans la membrane (47). Lorsque cette tension est suffisamment élevée, un pore se forme, par diminution de l'énergie de la vésicule, et le rayon de ce pore augmente jusqu'à ce que la tension diminue suffisamment pour que l'équilibre de la vésicule soit atteint. Les domaines de vésicules éclatées diffusent par la suite sur la surface et forment une bicouche. C'est la surface interne de la vésicule qui devient la monocouche proximale du support solide dans la bicouche lipidique supportée.

Cependant, les différentes interactions entre les vésicules elles-mêmes d'une part, et entre les vésicules et le support solide d'autre part dépendent de plusieurs facteurs tels que la nature des vésicules lipidiques (composition, charge, taille et état physique), du substrat (charge, structure, rugosité) et de l'environnement aqueux dans lequel ils se trouvent (pH et force ionique). Les deux supports solides les plus utilisés sont le verre avec une surface rugueuse et le mica avec une surface atomiquement plane.

I.1.B.2-2. Cuve de Langmuir

I.1.B.2-2.a. Introduction

Depuis les Grecs, on sait qu'un film d'huile, répandu sur la mer, tend à calmer les vagues. Benjamin Franklin fait l'expérience suivante : Franklin va au bord d'un étang (à Clapham près de Londres) et verse, doucement, une cuillerée d'huile d'olive sur l'étang. L'huile s'étale, mais l'aspect optique de la surface ne change pas. Franklin arrive tout de même à reconnaître les régions qui sont recouvertes car en l'absence d'huile, la brise crée des vaguelettes sur l'étang ; en présence d'huile, on ne voit plus de rides, la surface est lisse. La peau de l'eau est devenue rigide ! Grâce à ce test, Franklin peut estimer assez bien la surface du film d'huile. Elle est énorme: de l'ordre de 100 m².

*Une des extrémités de la molécule est fortement hydrophile. Le reste de la molécule est résolument hydrophobe. En se serrant l'une contre l'autre comme les pingouins d'une rookerie, les molécules d'huile peuvent alors réaliser une situation presque parfaite: tête dans l'eau, chaîne à l'air presque perpendiculaire à la surface. Les molécules forment une couche bien régulière dont l'épaisseur est égale à une longueur moléculaire. C'est une **monocouche**.*

*Cette expérience porte en elle-même un résultat considérable qui ne sera pas exploité par Franklin, mais seulement cent ans plus tard par Lord Rayleigh. Si l'on divise le volume d'huile par la surface d'étalement, on trouve la hauteur du film qui s'avère être de l'ordre du nanomètre. Cette hauteur, c'est, en gros, **la taille des molécules d'huile** !*

Texte adapté du livre de Pierre-Gilles de GENNES : Les objets fragiles.

Depuis cette époque, de nombreuses études furent menées dans le but de comprendre l'origine de ce phénomène. Dès la fin du 19^e siècle, la notion de monocouche apparut, mais c'est Irving Langmuir, prix Nobel 1932, qui commença véritablement à s'intéresser aux propriétés thermodynamiques des films ainsi formés, et introduit la notion de molécules amphiphiles (48). Les molécules amphiphiles s'organisent spontanément à l'interface eau/air et donnent naissance à un film monomoléculaire, qui a pour effet d'abaisser la tension de surface et de stabiliser l'interface. Un film de Langmuir est donc une monocouche de molécules tensioactives à la surface de l'eau. C'est un système bidimensionnel. Les propriétés physicochimiques de ces films monomoléculaires sont déterminées entre autres par la mesure de la pression de surface en fonction de l'aire de la cuve. De plus, il est possible de déterminer l'indice de réfraction et l'épaisseur du film en utilisant l'ellipsométrie et la réflectométrie optique.

Quelques années plus tard, Katherine Blodgett et Irving Langmuir réussissent le transfert de monocouches successives sur des substrats de verre et montrent les propriétés optiques de tels films (49, 50). La méthode de transfert est appelée alors “méthode de Langmuir-Blodgett”.

L’avantage de cette méthode de transfert est que les échantillons permettent l’utilisation de nombreuses techniques d’analyse telle que la microscopie électronique à transmission, la microscopie de champ proche tel que l’AFM, la spectroscopie infrarouge... et l’accessibilité à des informations complémentaires.

1.1.B.2-2.b. Dispositif

La cuve où est placée la phase aqueuse (sous phase) est munie de 2 barrières qui permettent la compression des phospholipides, grâce à un moteur dont la vitesse est modulable (**Fig 1.1.15**). La cuve et les barrières sont en Téflon ®. En effet, les propriétés hydrophobes du Téflon d’une part et le caractère hydrophile de l’eau d’autre part induisent la formation d’un ménisque positif convexe (mouillant), ce qui facilite la compression des molécules et permet d’atteindre des pressions de surfaces élevées sans que le film ait tendance à plonger sous les barrières.

Une lame de platine ou une feuille de papier filtre adsorbant (de dimensions bien déterminé) est reliée à un tensiomètre. La tension superficielle est déterminée par la méthode de Wilhelmy qui sera détaillée plus tard. Les isothermes montrant la variation de la pression de surface en fonction de l’aire moléculaire sont enregistrées au cours de la compression.

Le dispositif de prélèvement (dipper automatique) est constitué d’une pince mobile qui bloque le support. Ses mouvements verticaux (ascendants ou descendants) permettent de réaliser des prélèvements à vitesse contrôlée. Un système d’avertissement maintient la pression de surface constante lors du transfert.

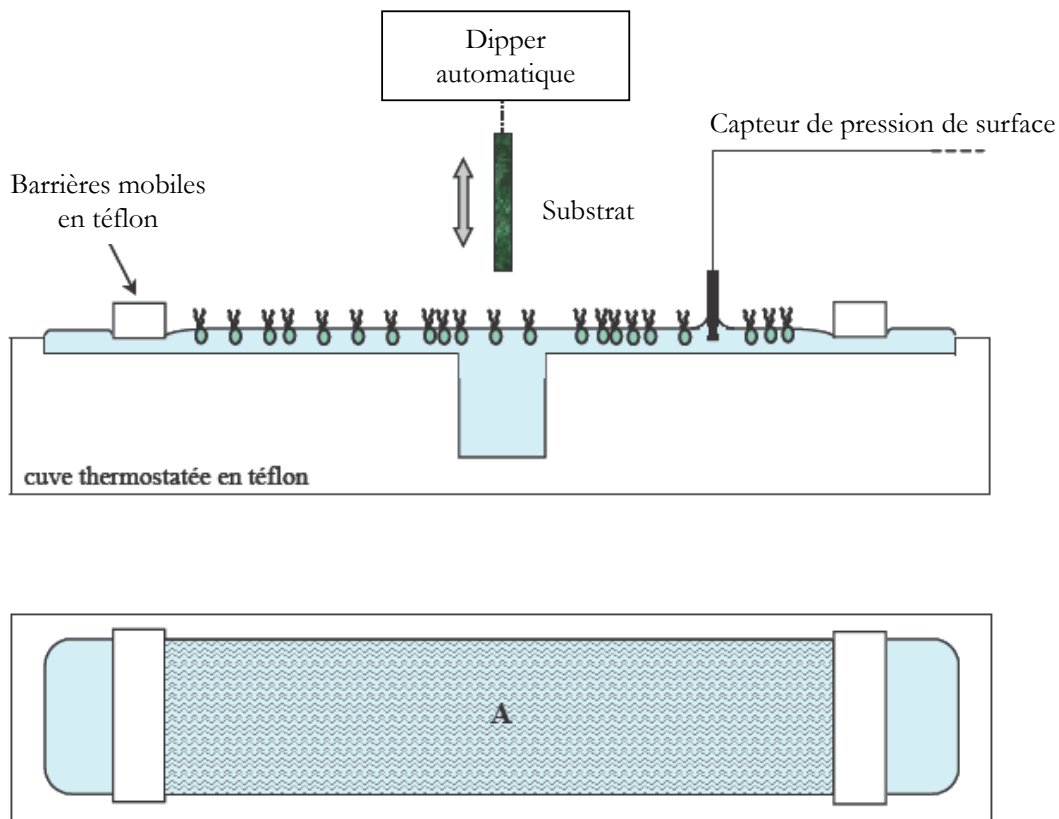


Fig I.1.15. Représentation de la cuve de Langmuir vue en coupe (en haut), et vue de dessus (en bas). Les molécules amphiphiles occupent une aire **A** délimitée par les barrières mobiles.

1.1.B.2-2.c. Principe et état physique

Les molécules amphiphiles à la surface de l'eau forment un film monomoléculaire. Cette auto organisation spontanée diminue la tension de surface et stabilise l'interface. On définit la pression de surface (π) par la différence entre la tension de surface de la sous-phase pure (γ_0) et celle du film monomoléculaire (γ).

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (\text{mN/m})$$

La pression de surface π est mesurée en fonction du temps. Une des extrémités de la lame est plongée dans le liquide, l'autre est reliée à un capteur de force. Une force verticale dirigée vers le bas s'exerce sur la lame. Cette force est la résultante du poids de la lame, de la poussée d'Archimède et de la force due à la tension superficielle.

Les indicateurs les plus importants des propriétés du film lipidique sont donnés par la mesure de la pression de surface et de l'aire (A) que le film occupe à l'interface eau-air. Lorsqu'on réalise une compression (déplacement des barrières à une vitesse constante), la pression latérale est enregistrée en fonction de l'aire moléculaire. L'aire moléculaire est la surface moyenne disponible pour chaque molécule amphiphile constituant le film. Elle dépend de la taille de la tête polaire mais aussi de l'encombrement des chaînes. Les isothermes $\pi = f(A)$ sont obtenues à températures ambiantes, mais certains dispositifs permettent de régler la température de la sous phase et d'en estimer les effets sur les pressions de transition de phases lipidiques (51).

Les différents états physiques sont influencés essentiellement par les conformations adoptées par des chaînes aliphatiques. Les têtes polaires sont organisées dans un plan (surface de la sous phase) et leur compactage (packing) dépend de la capacité des chaînes aliphatiques à s'ordonner. La notion de changement d'état physique à l'interface est un peu différente de la notion de changement de phase des membranes biologiques expliquée dans le chapitre 1 de la première partie. Cette dernière dépend essentiellement de la température, alors qu'en utilisant la balance à film de Langmuir, on introduit un changement de phase en comprimant et donc, le changement d'organisation des chaînes et des têtes lipidiques est causé par effet stérique.

L'allure générale de l'isotherme révèle l'existence de plusieurs phases, avec des transitions entre celles-ci, qui apparaissent à travers des paliers et des pentes (**Fig 1.1.16**). A l'interface, on considère pour les molécules les plus étudiées en biologie, que les états physiques définis en deux dimensions sont au nombre de quatre.

- L'état gazeux noté G et correspond à l'absence d'interactions entre les molécules. Elles sont extrêmement diluées à la surface et les chaînes aliphatiques sont totalement désorganisées.
- L'état liquide expansé noté LE (ou L1 sur la **Fig 1.1.16**) : les têtes hydrophiles sont organisées en réseau 2D parallèlement à la surface et les queues hydrophobes restent mobiles. Cette mobilité est due à de rapides isomérisations trans-gauches des liaisons carbone-carbone. En phase lamellaire, cet état correspond à l'état fluide.

- L'état liquide condensé noté LC (ou L₂ sur la **Fig 1.1.16**) : Les chaînes aliphatiques sont en conformation *trans*, elles occupent une aire minimale et les têtes polaires se rapprochent. Une légère inclinaison des chaînes est observée. La phase liquide condensée équivaut à la phase lamellaire gel.
- L'état solide S se différencie du liquide condensé par l'alignement de chaînes carbonées, obtenu à des grandes pressions et des petites surfaces (grande compression du film). Cet état n'est pas accessible pour les phospholipides, mais il est observé pour d'autres acides gras.

Si l'on poursuit la compression après un certain seuil, le film collapse et forme des structures tridimensionnelles, car les interactions entre les molécules sont si importantes que dans le but de minimiser leur énergie, elles forment des multicouches et/ou des agrégats.

L'augmentation de longueur des chaînes aliphatiques des phospholipides diminue la pression de transition LE/LC et la présence de doubles liaisons empêche la formation de la phase liquide condensé.

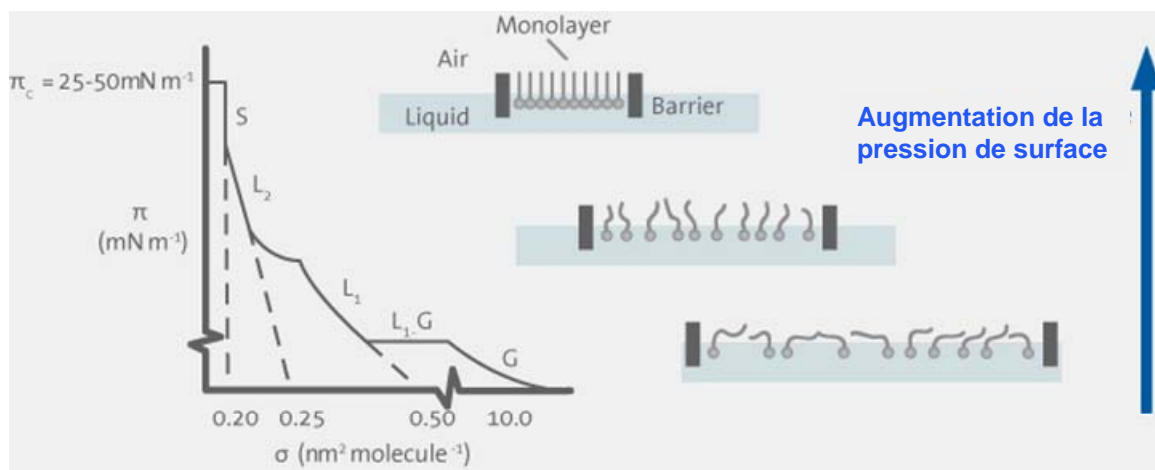


Fig 1.1.16. Isotherme de compression typique d'un acide gras. En comprimant la monocouche, les molécules passent successivement d'un état gazeux (G) à l'état liquide expansé (L_1) puis liquide condensé (L_2). A plus haute densité, on atteint l'état solide (S) et si on continue la compression, la monocouche collapse et forme des structures 3D. Adapté du site de « KSV Nima technology ».

I.1.B.2-2.d. Transfert de Langmuir-Blodgett (LB)

Le transfert des monocouches est réalisé en général à des pressions significativement inférieures au seuil du collapse, dans le but d'éviter cette zone d'instabilité et prélever un film uniforme et homogène. De manière générale, la vitesse de compression est faible (de l'ordre de 5 à 8 cm²/min) pour permettre aux molécules de s'organiser d'elles-mêmes (52, 53). A la pression choisie, la compression est arrêtée. En général, un temps de relaxation permet aux molécules de se réorganiser et une légère diminution de la pression est enregistrée. Il existe deux types de transfert selon la nature du support. Pour un support hydrophile, le transfert est ascendant de façon que les têtes hydrophiles adhèrent au support. Inversement, un prélèvement descendant est réalisé avec un support hydrophobe, de manière à favoriser les interactions hydrophobes. La vitesse très faible de prélèvement est également un facteur important pour l'obtention d'un dépôt régulier (54).

Cette méthode permet de déposer une monocouche et / ou une bicouche (**Fig I.1.17**). La monocouche est obtenue par un passage du support à travers le film monomoléculaire, tandis qu'une bicouche nécessite un deuxième passage dans le sens opposé. Dans certains cas, il est possible de déposer même une troisième couche de lipides. C'est un maximum. Si l'on tente de transférer une quatrième couche verticalement, la troisième couche est pelée et repart à l'interface. Les interactions lipides-substrat déjà recouvert deviennent trop faibles pour permettre le dépôt.

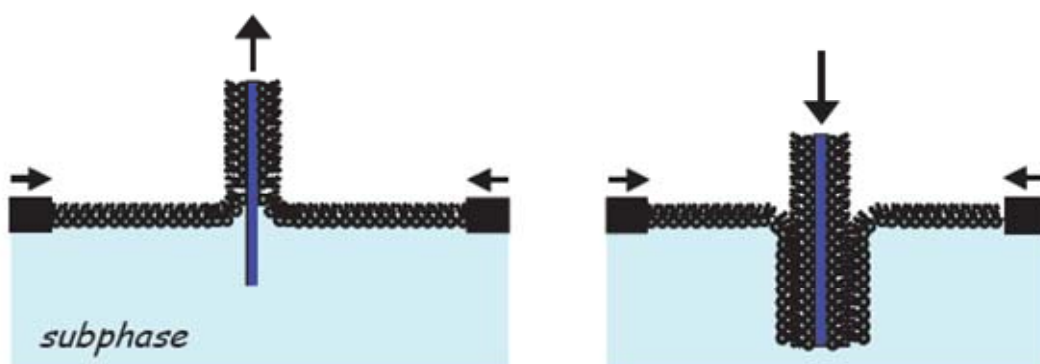


Fig I.1.17. Principe de formation d'une monocouche (à gauche) et d'une bicouche supportée (à droite) par la méthode de Langmuir-Blodgett.

Le principal intérêt de la méthode de transfert LB est de pouvoir contrôler les conditions opératoires avant et pendant le transfert, notamment la température, la

composition de la sous phase (pH, force ionique..), la nature des molécules amphiphiles étalées (pures ou mélangées), la vitesse de compression et le contrôle de pression. Au niveau du prélèvement, les paramètres essentiels sont la pression de transfert, la vitesse, la nature de l'état de surface du substrat.

1.1.B.2-2.e. Transfert de Langmuir-Schaefer (LS)

Contrairement à l'opération de transfert de type Langmuir-Blodgett, le substrat est amené horizontalement, parallèlement à la surface, au contact de la monocouche (55) (**Fig I.1.18**). A l'inverse de la méthode de LB, cette méthode est hors-équilibre donc irréversible et la qualité du dépôt est complètement indépendante de la pression du film lors du dépôt.

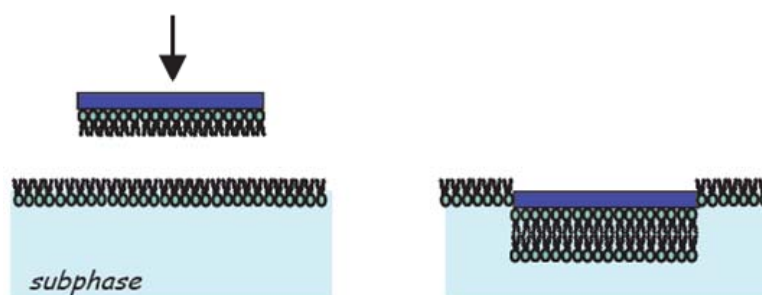


Fig I.1.18. Principe de formation d'une bicouche par Langmuir-Schaefer.

Ce type de transfert est utilisé pour la formation d'une quadricouche de molécules amphiphiles. Il est vrai que la formation d'une bicouche est possible par le transfert vertical de Langmuir-Blodgett, mais pour les phospholipides, de nombreux expérimentateurs forment la bicouche lipidique par un premier dépôt de monocouche type LB, et la deuxième monocouche est réalisée par le transfert Langmuir-Schaefer.

Le changement de phase dans un LB film est minutieusement observable par la microscopie à force atomique. La **Fig I.1.19** montre les différentes phases en fonction de la nature lipidique, qui existent sur des LB films déposés sur mica. Lorsque la monocouche est formée d'une seule phase, une surface lisse et homogène est obtenue (**Fig I.1.19-A et B**). Les lignes présentes dans la **Fig I.1.19- B** (indiquées par les flèches), peuvent correspondre à la frontière entre plusieurs domaines de phospholipides en phase LC. En plus, la coexistence des 2 phases (LE+LC) est observable sur la **Fig I.1.19- C** et la variation de hauteur est mesurée et est de l'ordre de 1 nm (**Fig I.1.19- C**).

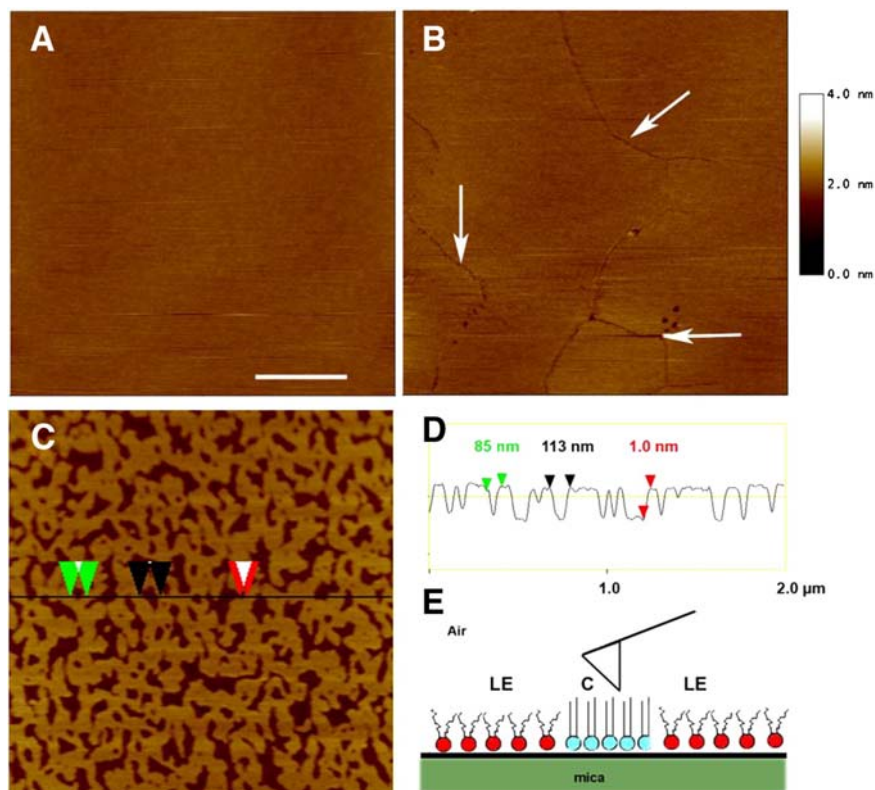


Fig 1.1.19. Images d’AFM de différentes monocouches lipidiques transférées par LB à une pression de surface de 32 mN/m. (A) POPC en phase LE, (B) DPPC en phase LC et (C) SM en phase LE+LC. (D) présente la variation de hauteur de la zone correspondant au trait sur la figure (C). (E) est une illustration de l’échantillon en dessous du levier de l’AFM, où 2 phases LE+LC coexistent sur monocouche supportée sur du mica. Barre d’échelle 500 nm. Adapté de la référence (56).

En conclusion, ces modèles membranaires permettent de simplifier les approches en s’affranchissant le plus possible de la complexité de la membrane naturelle ; notamment ils permettent de contrôler certains facteurs physico-chimiques telles que la composition lipidique et leur organisation (taille de vésicule ou pression de surface d’une monocouche...).

Chacun de ces modèles membranaires biomimétiques sera préférentiellement utilisé en fonction des objectifs recherchés pour la caractérisation d’interactions membrane-biomolécules. Le modèle liposome par exemple, convient parfaitement aux études visant à caractériser l’effet de la courbure membranaire sur les interactions protéine-lipides. Les modèles de membrane plane en cuve de Langmuir est adapté à l’étude de l’effet du *packing* lipidique sur les interactions ou l’organisation d’une protéine avec la membrane.

Chapitre 2 – LES INTERACTIONS LIPIDES-PROTÉINES

Durant ces dernières années, il est devenu évident que de nombreuses fonctions essentielles des cellules vivantes sont assurées grâce à des interactions entre les membranes et les protéines. Comme conséquence, la recherche en divers domaines de la biochimie et de la biophysique a convergé sur l'étude de tous les processus associés à la membrane dans le but d'améliorer la compréhension de la dynamique et la structure des complexes protéines-lipides. Les travaux publiés sur les interactions protéines-lipides constituent une collection de différentes études, chacune utilisant une protéine bien précise avec des méthodes d'investigation variées. Dans ce chapitre, nous essayerons de présenter les exemples les plus représentatifs, en décrivant la structure et le repliement des protéines liées aux membranes, ainsi que les facteurs qui stabilisent leurs interactions.

Les interactions entre les protéines et la membrane stabilisent l'ensemble (par des liaisons hydrogènes, des interactions hydrophobes ou électrostatiques...) tout en conservant une dynamique interne, nécessaire à l'activité protéique. Or, les gradients de pH et de constante diélectrique influencent la stabilité conformationnelle des protéines. La force des liaisons hydrogène et les pK des résidus acides et basiques sont fonction de l'hydrophobicité du milieu. Rompre une liaison d'hydrogène ou changer l'état de protonation d'un résidu nécessite beaucoup plus d'énergie dans un milieu hydrophobe que dans un milieu hydrophile.

I.2.A- Mode d'association protéines-membrane

Il existe différentes classes de protéines membranaires selon leur localisation par rapport à la membrane. Les différents modes d'association de protéines dans une membrane biologique sont présentés dans la *Fig 1.2.1*. Nous distinguons les protéines membranaires intrinsèques (*Fig 1.2.1- a, b, c et d*) qui pénètrent la bicouche lipidique, et les protéines périphériques ou extrinsèques (*Fig 1.2.1- e, f, g et h*) qui sont associées à la membrane et localisées à la surface.

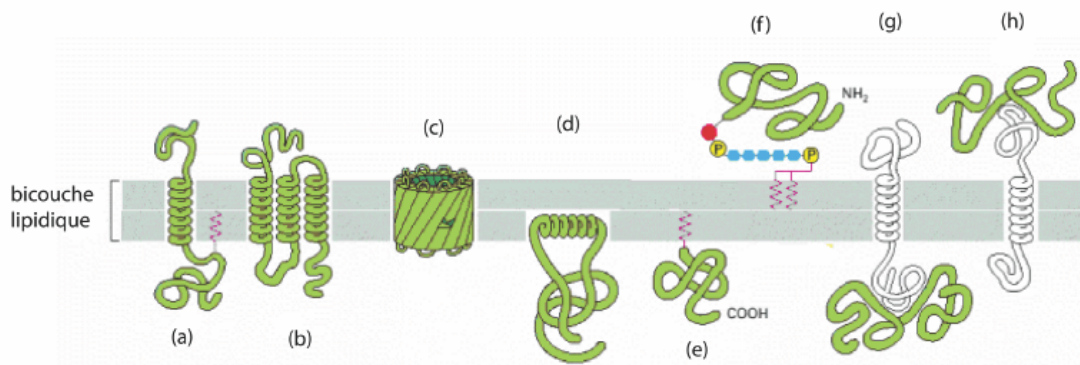


Fig 1.2.1. Représentation schématique des différents modes d'association de protéines avec la membrane biologique. (a-d) représentent les protéines intrinsèques, et (e-h) les protéines extrinsèques. Adapté de la référence (1).

I.2.A.1- Les protéines membranaire ou intrinsèques

Elles sont insérées dans la membrane tout au long de leur vie biologique et ne sont pas solubles en milieu aqueux. Elles sont ainsi en interaction à la fois avec le cœur hydrophobe et les têtes polaires des lipides. Elles peuvent traverser la membrane de part et d'autre ou y être partiellement insérées. Comme la bicouche lipidique impose des contraintes environnementales, deux motifs structuraux peuvent traverser la membrane : les hélices α transmembranaires (**Fig 1.2.1- a et b**) et les structures en tonneau β (**Fig 1.2.1- c**). Les structures en hélices α constituent une large majorité des structures connues (57). Mais toute structure hélicoïdale n'est pas forcément transmembranaire car une hélice amphiphile (ayant des faces hydrophiles et d'autres hydrophobes en projection hélicoïdale) peut ancrer l'ensemble dans le plan de la membrane (**Fig 1.2.1- d**), et établir des interactions électrostatiques avec l'interface et hydrophobes avec les chaînes acyles. Par contre, les protéines en tonneau β sont plus rares.

Les protéines intrinsèques ont pour fonction d'assurer le transport des nutriments ou des signaux de part et d'autre de la membrane cellulaire ; et présentent un rôle structural important. Il peut s'agir de canaux transmembranaires qui assurent l'entrée et la sortie d'électrolytes, de molécules d'eau, glucose, etc...ou bien de protéines qui assurent la transmission d'un signal chimique.

I.2.A.2- Les protéines extrinsèques

Contrairement aux protéines membranaires, les protéines extrinsèques se retrouvent à l'extérieur de la membrane cellulaire. Les protéines extrinsèques sont

constituées de domaines essentiellement en contact avec un milieu polaire : milieu aqueux extra ou intracellulaire. Elles seront donc plus ou moins repliées sur elles-mêmes autour d'un cœur hydrophobe.

Ces protéines sont associées à la surface de la membrane grâce à des interactions faibles de type électrostatique avec (i) les têtes polaires des lipides ou (ii) avec une portion hydrophile de protéine intégrale dépassant la bicouche (*Fig 1.2.1- g et h*). D'autres protéines sont associées à un segment hydrophobe permettant leur insertion dans la partie hydrophobe des bicouches (*Fig 1.2.1- e et f*). Il s'agit le plus souvent d'associations covalentes avec un acide gras (myristique ou palmitique), un lipide (glycosylphosphatidyl-éthanolamine : GPI) ou un résidu isoprényl (farsényl ou géranylgeranyl). Ces dernières sont appelées protéines à ancrage. Les protéines myristoylées, palmitoylées ou isoprénylées sont toujours en contact avec le milieu intracellulaire. Les liaisons à la membrane par myristoylation ou palmitoylation sont relativement faibles et les protéines peuvent dès lors participer facilement à des séquences dans lesquelles elles s'attachent et se détachent de la membrane suite à phosphorylation (58). Elles sont dès lors souvent impliquées dans des processus de signalisation cellulaire, d'adhésion et de reconnaissance cellulaire.

Certaines protéines transmembranaires possèdent aussi un ancrage lipidique sur un domaine cytosolique, ce qui augmente la stabilité de l'ensemble (*Fig 1.2.1- a*). Ces protéines ont une fonction de soutien cellulaire et de transmission de message chimique.

Entre ces 2 types se trouvent les protéines amphitropiques, qui sont solubles dans le cytosol et peuvent pénétrer de manière transitoire la bicouche lipidique lorsque les conditions physico-chimiques du milieu sont favorables. C'est le cas de plusieurs toxines bactériennes et d'autres protéines eucaryotes lors de leurs activités biologiques.

I.2.B- Effet des lipides sur la structure/fonction des protéines

La bicouche lipidique induit des contraintes physiques sur les protéines membranaires ou en interaction avec elles. Elle limite le champ d'exploration conformationnel et les protéines se trouvent ainsi confinées dans un espace bidimensionnel (cas des protéines intrinsèques), et/ ou orientées d'une manière spécifique (cas des protéines extrinsèques). Cela engendre une structuration de la chaîne

polypeptidique en fonction de diverses interactions établies avec les lipides membranaires.

En effet les lipides peuvent s'assimiler à un solvant en deux dimensions entourant les protéines membranaires intrinsèques. Ces lipides sont appelées lipides annulaires. Dans le cas où les lipides se trouvent entre des hélices α intra- ou inter-protéiques grâce à des interactions spécifiques, ils sont nommés lipides non-annulaires. Les interactions des phospholipides avec les protéines se font à différents niveaux. Les données de modélisation moléculaire montrent que les chaînes acyles peuvent avoir des interactions de type van der Waals avec certains acides aminés et que l'oxygène non estérifié du phosphate peut engager une liaison hydrogène avec le groupement amino-terminal de la protéine (59). D'autre part, la nature de la tête polaire des phospholipides a une influence sur son taux d'hydratation et donc son interaction avec la protéine. Par exemple les PC sont davantage hydratées que les PE, et ces derniers procurent de ce fait un environnement beaucoup plus favorable à l'activation de la rhodopsine (60). Cette protéine serait également en interaction directe avec le cholestérol (61). Beaucoup d'autres études de même nature ont permis alors de classer les facteurs lipidiques qui influent l'interaction protéines-lipides, et indirectement, la fonction protéique. Ces facteurs sont :

I.2.B.1- Les têtes polaires lipidiques

L'interface membranaire est une région importante de la bicouche dont le rôle est de moduler un grand nombre de réactions. La membrane contient divers lipides de natures différentes. Cette diversité chimique de l'interface membranaire offre des nombreuses possibilités d'interactions avec les polypeptides. Ces interactions dépendent de la taille et de la charge des groupements chimiques présents.

Cependant, la variation systématique des espèces lipidiques révèle que la fonction de certaines protéines est reliée à la présence (ou pas) de certains lipides bien précis. Le **Tableau 1.2.1.** présente quelques exemples où l'activité de certaines protéines est régulée par la présence de lipides spécifiques.

Alors que la fonction de la plupart des protéines est régulée par la présence de lipides acides, d'autres protéines dépendent de la présence de certains lipides: la protéine kinase C nécessite de la phosphatidylsérine (PS) (62), et le β -hydroxybutyrate déshydrogénase nécessite de la phosphatidylcholine (PC) pour son activité (63).

Protéines	Lipides ^a	Référence
Transporteurs :		
Glucose	PS>PA>PG>PC	(64)
Ca ²⁺ -ATPase	Acides	(65)
(Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase	Acides	(66)
Récepteurs :		
Rhodopsine	PE>PC	(67)
Récepteur d'insuline	PA (inhibition)	(68)
Enzymes intrinsèques:		
Cytochrome c oxydase	CL	(69)
Adénylate cyclase	Acides (inhibition)	(70)
Enzymes périphériques :		
Caséine Kinase I	PIP ₂ >PIP>PA (inhibition)	(71)
Protéine Kinase C	PS	(62)
SecA	Acides	(72)
Protéines du cytosquelette :		
Profiline	PIP ₂ >PIP (inhibition)	(73)
Myosine	Acides	(74)

^a les lipides stimulent une activité catalytique.

Abréviations : PS, phosphatidylsérine ; PA, acide phosphatidique ; PG, phosphatidylglycérol ; PC, phosphatidylcholine ; PE, phosphatidyléthanolamine, CL, cardioline; PIP₂, phosphatidylinositol biphosphate ; PIP, phosphatidylinositol monophosphate.

Tableau I.2.1. Exemples de protéines dont les fonctions sont régulées par les têtes polaires des lipides. Adapté de la référence (75).

Un autre exemple concerne le récepteur de l'insuline. C'est une protéine transmembranaire avec une activité tyrosine kinase. Cette activité est augmentée en ajoutant du diacylglycérol, alors que la présence d'acide phosphatidique inhibe son activité (68).

L'interaction avec des lipides spécifiques constitue un mécanisme d'amélioration et de contrôle de la fonction protéique d'une part (par exemple en modulant l'activité des enzymes) et de la structure membranaire d'autre part (en régulant par exemple les interactions avec les protéines du cytosquelette). Si les concentrations des lipides fluctuent à cause de stimulations externes, une régulation à court terme est possible. Par exemple, plusieurs espèces lipidiques sont métabolisées en réponse aux changements

environnementaux de la cellule, et présentent un impact crucial sur la modulation des fonctions protéiques impliquées dans le transfert et le traitement d'informations.

I.2.B.2- Les propriétés physiques de la membrane

Les propriétés physiques de la membrane résultent de sa composition lipidique. Les principales propriétés qui influencent l'interaction protéines-lipides sont l'épaisseur, la fluidité et la courbure de la bicouche.

I.2.B.2-1. L'épaisseur de la bicouche lipidique

L'épaisseur du cœur hydrophobe de la bicouche lipidique constitue une propriété importante pour les protéines en interaction avec la membrane, et plus précisément, pour les protéines transmembranaires. L'épaisseur de la partie hydrophobe de la membrane est généralement compatible avec l'épaisseur de la protéine intégrée dans la bicouche, dans le but d'éviter l'exposition à l'eau des chaînes acyles ou les acides aminés hydrophobes à l'eau. Si ce n'est pas le cas et que l'épaisseur de la partie hydrophobe n'est pas respectée entre bicouche et protéine, une déformation (distorsion) de la bicouche et/ou de la protéine aura lieu dans le but de minimiser ce décalage d'épaisseur. Un décalage important d'épaisseur de la partie hydrophobe peut engendrer une exclusion de la protéine de la membrane (76). Dans la plupart des cas, c'est la bicouche qui s'adapte et ajuste son épaisseur hydrophobe et un recrutement de lipides spécifique (lipides annulaires) s'effectue autour de la partie hydrophobe de la protéine (77-79). Ce sont les chaînes lipidiques qui s'étirent pour offrir une bicouche plus épaisse, ou bien qui se compriment et forment une bicouche plus fine, permettant ainsi une adaptation à l'épaisseur de la partie hydrophobe de la protéine (**Fig I.2.2**). Par exemple, des mesures d'activités de la Ca^{2+} -ATPase et de la diacylglycérol kinase ont montré une dépendance de leurs activités enzymatiques en fonction de la longueur des chaînes carbonées (80, 81).

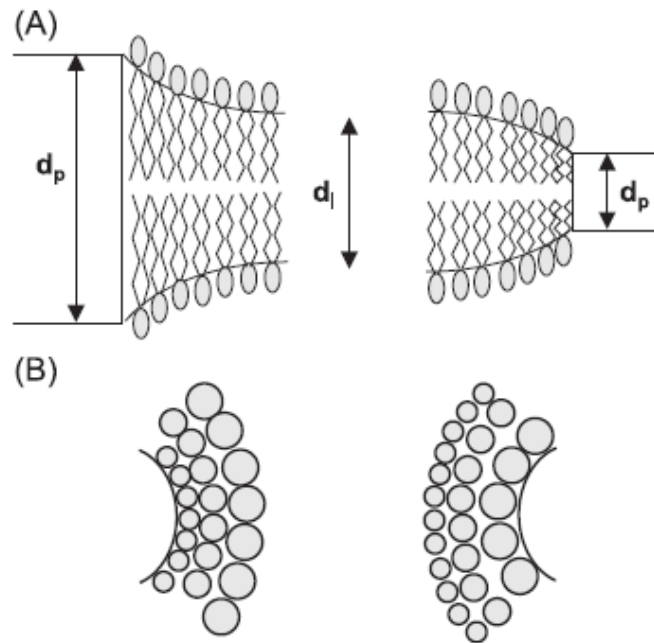


Fig 1.2.2. Illustration de l'ajustement de l'épaisseur hydrophobe de la bicouche. (A) d_p et d_l correspondent respectivement aux longueurs intrinsèques des segments hydrophobes de la protéine membranaire et de la bicouche. (B) est une représentation schématique des volumes occupés par les lipides dans chacun des cas. Un étirement de la bicouche est observé lorsque $d_p > d_l$ et l'aire moléculaire diminue à proximité de la protéine (respectivement A et B à gauche). Inversement, lorsque $d_p < d_l$ la bicouche se comprime et les lipides occupent une plus grande surface (respectivement A et B à droite). Adapté de la référence (60).

Toutefois, si la distorsion lipidique n'est pas suffisante, la protéine peut être capable de flexibilité, via des changements d'orientation et de compaction structurale.

1.2.B.2-2. La viscosité membranaire

La plupart des protéines subissent des changements conformationnels importants avec pour conséquence une adaptation de leur fonction. Le changement conformationnel, et donc fonctionnel, d'une protéine est dépendant de la viscosité de la bicouche lipidique. Dans un milieu visqueux, les forces de friction s'opposent aux mouvements et l'activité de nombreuses protéines membranaires est modulée par l'état de fluidité de la membrane. L'activité enzymatique de Ca^{2+} -ATPase par exemple est perdue dans une phase visqueuse de type gel. C'est souvent le cas chez les enzymes intrinsèques (82).

Cependant, cela n'est pas forcément le cas avec les protéines périphériques. L'interaction de la protéine avec la membrane peut être plus favorable avec des domaines membranaires en phase gel qu'en phase liquide. La (**Fig I.2.3**) montre l'interaction de la protéine périphérique BIAP (la phosphatase alcaline intestinale) avec une bicouche supportée de DOPC/DPPC obtenue par AFM. Cette bicouche présente deux différentes phases lipidiques : une phase gel et une phase fluide (**Fig I.2.3-a**). Lorsqu'on ajoute la protéine dans le milieu et après 45 minutes d'incubation, elle est plutôt présente sur la frontière des deux phases (**Fig I.2.3-b**) (indiqué par les flèches). Après 90 minutes d'incubation, BIAP se trouve préférentiellement dans la phase lipidique ordonnée (gel) de la membrane (**Fig I.2.3-b**) (83, 84).

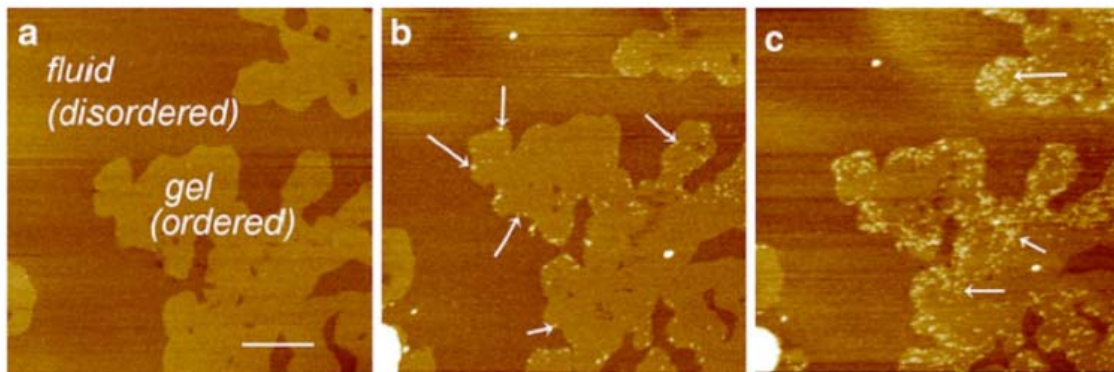


Fig I.2.3. Images AFM montrant l'interaction de BIAP avec une bicouche lipidique supportée de DOPC/DPPC. (a) La bicouche lipidique supportée contenant deux phases différentes : une phase fluide (désordonnée) et une phase gel (ordonnée). (b) Insertion de BIAP (après 45 minutes d'incubation) sur la frontière des deux phases (indiqué par les flèches). (c) Après 90 minutes d'incubation, toutes les protéines sont présentes dans la phase gel. Barre d'échelle 1 μm . Adapté de (83).

En conclusion, des compositions lipidiques et des températures différentes ont donc un effet non négligeable sur l'activité et les changements conformationnels d'une protéine membranaire.

1.2.B.2-3. La courbure membranaire

Selon la composition de la bicouche, certaines membranes privilégient un assemblage non lamellaire (85). La présence de ces lipides dans la membrane engendre la formation de courbures. La structure finale d'une bicouche n'est que la résultante des forces attractives et répulsives (**Fig I.2.4**). Pour qu'une monocouche lipidique reste plane

(courbure nulle), l'ensemble de ces forces doit être en équilibre sur toute l'étendue de la monocouche.

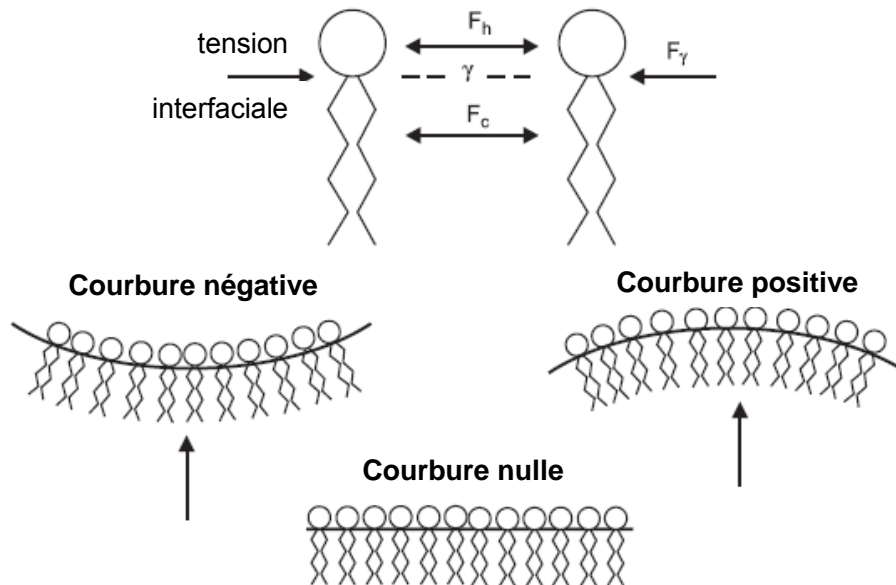


Fig 1.2.4. Différentes courbures adoptées par les couches lipidiques. La nature des lipides et les forces attractives et/ou répulsives entre les molécules induisent une courbure négative, positive ou nulle. Le schéma du haut montre les pressions latérales et tensions s'exerçant dans une monocouche. F_c : force agissant au niveau des chaînes acyles. Ces forces sont dues à l'agitation thermique et sont répulsives. Les interactions de Van der Waals sont par contre attractives entre les chaînes hydrocarbonées. F_γ : tension interfaciale qui tend à minimiser l'aire moléculaire. F_h : pression latérale s'exerçant dans la région des têtes polaires, due essentiellement à des interactions électrostatiques attractives ou répulsives. Les flèches indiquent la direction conventionnelle de l'observation pour définir une courbure positive ou négative. Adapté de la référence (60).

Dans le cas des cellules musculaires, les mouvements consécutifs à la contraction et relaxation des sarcomères engendrent des modifications morphologiques et des forces latérales sur le sarcolemme. Les membranes biologiques présentent des degrés d'extensibilité ou de compressibilité faibles, et non compatibles avec l'ampleur des changements de longueur des fibres musculaires. Des invaginations ou « réservoirs membranaires » se forment au cours de ces cycles mécaniques (**Fig 1.2.5**). Certaines parties du sarcolemme présentent une courbure nulle ou faible lorsque le muscle est au repos (état relaxé); mais lorsqu'une contraction a lieu, des zones d'invaginations

membranaires (= réservoirs membranaires ou *blebs*) se forment et les membranes présentent alors localement un degré de courbure important.

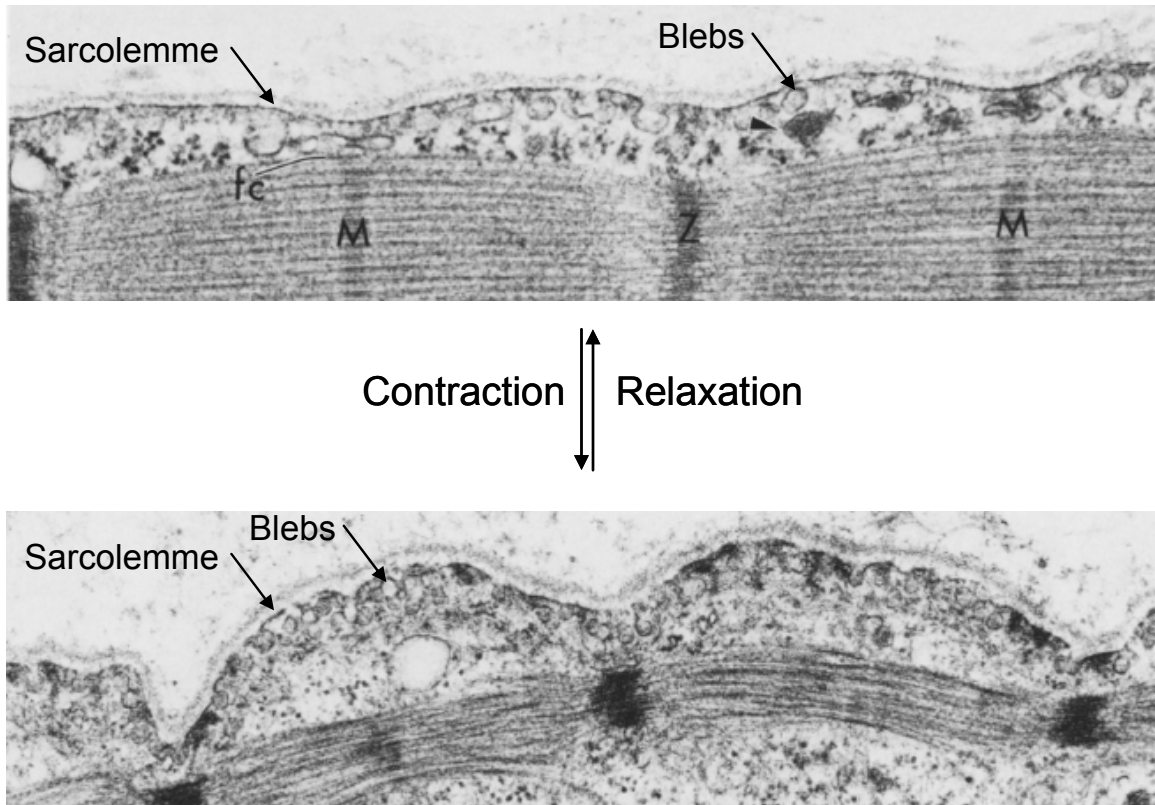


Fig 1.2.5. Coupe longitudinale de fibres musculaires en deux états différents, observées par microscopie électronique: état relaxé (en haut, image × 67000) et contracté (en bas, image × 49000). Le sarcolemme présente ainsi une courbure différente en fonction de son état et localement des *blebs* jouent le rôle de réservoirs membranaires. Z et M représentent les stries Z et M du sarcomère (seront décrites ultérieurement). Adapté de la référence (86).

L'étude de l'influence de la courbure membranaire est réalisée principalement *in vitro* sur le modèle liposome, avec des vésicules de différentes tailles (SUVs et LUVs). Ces modèles sont particulièrement favorables à l'analyse d'interactions avec des protéines solubles (87-89). Le rayon de courbure varie avec la taille des vésicules. Un faible rayon de courbure (cas de SUV) affecte la distribution des lipides entre les deux feuillet de la bicouche. La forte contrainte mécanique existant sur le feuillet externe, écarte les têtes polaires et entraîne une plus grande exposition au solvant des chaînes acyles. Les lipides exercent alors une faible pression latérale sur les protéines liées à la membrane (90). Ces

deux effets favorisent les interactions hydrophobes entre protéines solubles et le feuillet externe de SUV (91).

I.2.C- Protéine et courbure membranaire : influence mutuelle ?

La membrane qui délimite l'appareil de Golgi ou d'autres organelles de transport est sans cesse remodelée par des protéines venant du cytosol. Ainsi, les manteaux protéiques agissent comme moules mécaniques pour déformer les membranes et donner naissance à des vésicules de transport. Ainsi, certaines protéines sont capables de «sentir» l'état des membranes et ainsi d'ajuster leur activité. C'est ainsi qu'un motif ALPS (*ArfGAP1 Lipid Packing Sensor* : une courte région formé par les résidus 192 - 257 de la protéine «*ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 1*» -ArfGAP1- (92)) permet à une corde moléculaire de capturer à son extrémité une petite vésicule ; ou qu'un autre motif du même type permet de programmer le désassemblage du manteau protéique COPI (ou *coat protein* qui intervient dans les mécanismes du trafic membranaire) en fonction de la courbure membranaire induite (93).

Différentes stratégies de détection de la courbure membranaire existent dans la cellule et sont présentées dans la **Fig 1.2.5**. Certaines détections sont basées sur la géométrie : la protéine présente une surface concave riche en résiduels cationiques, et donc interagit préférentiellement avec des couches de lipides membranaires convexes et anioniques (94).

La **Fig 1.2.5-a** montre les différentes formes de la protéine BAR (Bin–Amphiphysin–Rvs domain). Les domaines BAR se trouvent chez des protéines capables de lier et de remodeler la membrane, participant ainsi à des processus de dynamique du cytosquelette (95). Les protéines BAR présentent une structure coiled-coil dimérique en arc de 20nm de longueur (94, 96). Différents types protéiques existent, en fonction de la forme géométrique. On distingue le domaine BAR de référence qui est adapté pour les membranes à forte courbure positive, alors que les deux autres domaines F-BAR et I-BAR sont plus adaptés aux membranes à faible courbure ou même ayant une courbure négative (97).

Cependant, des études concernant la dimérisation de BAR montrent qu'un domaine en dimère est présent sur les membranes à forte courbure. D'autre part, le taux basal de dimérisation de BAR est faible et beaucoup de domaines se trouvent dans un état monomérique dans le cytosol (98). La présence des membranes à forte courbure semble diminuer la concentration critique à partir de laquelle l'oligomère se forme (99), ceci ayant pour conséquence une augmentation de l'oligomérisation (**Fig 1.2.5-b**) (cas de BAR, c'est la dimérisation). La dimérisation est ainsi plus efficace sur les membranes à forte courbure qu'en solution, et par conséquent, cette dimérisation est capable de renforcer l'interaction de BAR avec la membrane.

Dans ce même contexte, la dynamine est une GTPase qui interagit avec les inositols des lipides et forme des oligomères hélicoïdaux à des concentrations élevées. *Roux et al.*(99) ont montré que la présence des fortes courbures membranaires permet la polymérisation de la dynamine même à des faibles concentrations (440 nM). Si la dynamine déforme les membranes à des grandes concentrations sa propre polymérisation peut être contrôlée par la courbure membranaire à des faibles concentrations.

Les motifs ALPS constituent un autre exemple illustrant la détection protéique de la courbure membranaire. Ce sont des petites séquences souples de 20 à 40 acides aminés qui présentent une structure intrinsèquement désordonnée. Ces motifs, pauvres en résidus chargés (100, 101), restent solubles en solution lorsqu'ils sont mis en contact avec des LUVs formés de lipides en formes cylindriques. Par contre, et en présence de SUVs, ces motifs s'adsorbent fortement à la membrane, et se structurent en hélice α (**Fig 1.2.5-c**). Cependant, certains motifs sont capables d'interagir avec des LUVs si ces vésicules sont constituées par des lipides de forme coniques. D'autre part, l'interaction de ArfGAP1 (l'archétype de la famille ALPS) avec les vésicules augmente fortement lorsque la taille des têtes polaires lipidiques diminue, et / ou lorsque le nombre des chaînes acyles monoinsaturés augmente (102, 103).

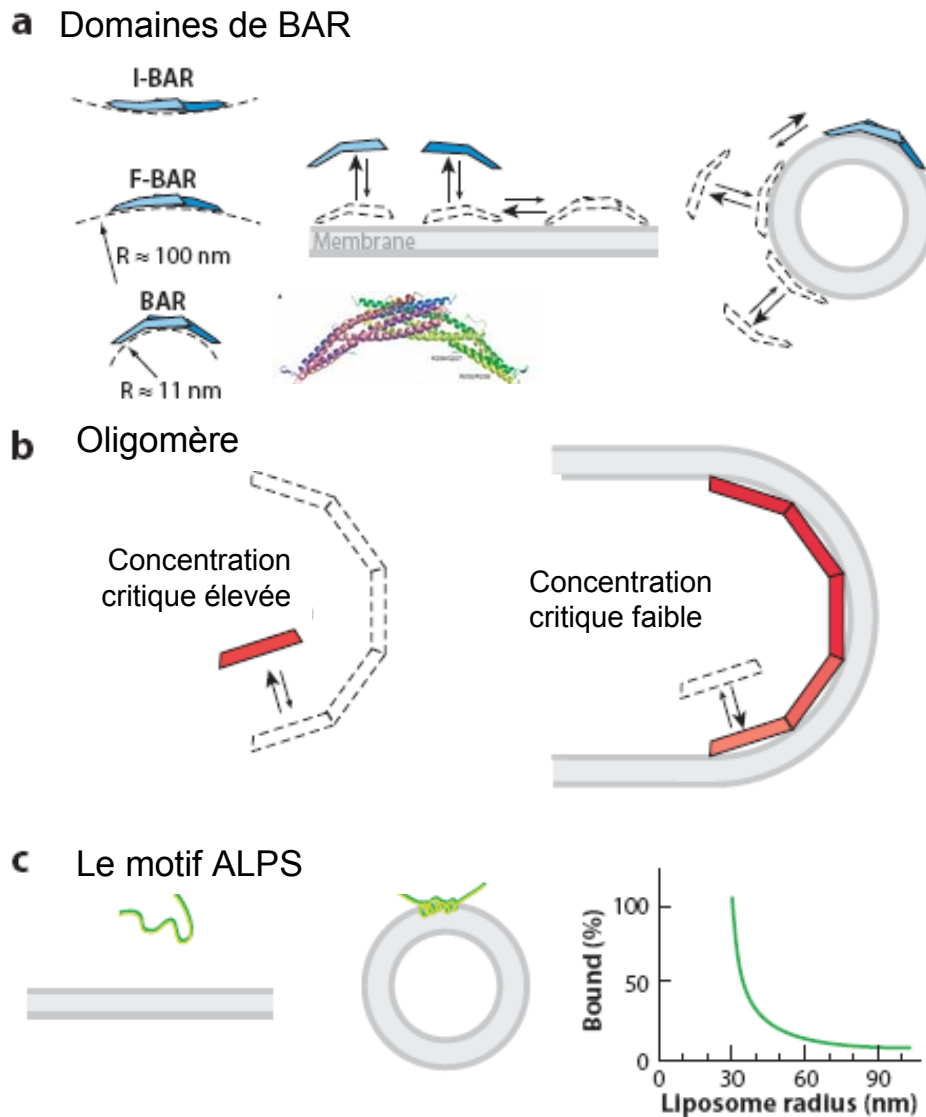


Fig 1.2.5. Mécanismes de détection de la courbure membranaire. (a) Les différents domaines de BAR en dimère. Chacune est sensible à une courbure membranaire différente. (b) Illustration d'un exemple où la présence de la courbure membranaire diminue la concentration critique de l'oligomère, et favorise l'oligomérisation. (c) Le motif ALPS présente une structure intrinsèquement désordonnée, et n'adapte une structure hélicoïdale qu'en présence des fortes courbures membranaires. Adapté de la référence (104).

En conclusion, lors de l'interaction d'une protéine avec la membrane, un grand nombre de facteurs entrent en jeu. Si pour certaines protéines, le pH et la charge globale de la membrane sont des facteurs prépondérants dans l'interaction avec la bicouche lipidique, cette interaction peut être également modulée par la courbure membranaire.

RÉFÉRENCES

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, and W. P. 2002. *Molecular biology of the cell*, New York. US.
2. Singer, S. J., and G. L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-731.
3. Lipowsky, R., and E. Sackmann. 1995. *Structure and Dynamics of Membranes*. Elsevier Science Ltd Vol 1, Parts A & B.
4. Vereb, G., J. Szollosi, J. Matko, P. Nagy, T. Farkas, L. Vigh, L. Matyus, T. A. Waldmann, and S. Damjanovich. 2003. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8053-8058.
5. Letterrier. 1997. *Biologie membranaire : structure et dynamique des membranes biologiques*. Hermann.
6. Israelachvili, J., J. Mitchell, and B. Ninham. 1977. Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 470:185-201.
7. van Meer, G. 1998. Lipids of the Golgi membrane. *Trends in Cell Biology* 8:29-33.
8. Simons, K., and E. Ikonen. 2000. How Cells Handle Cholesterol. *Science* 290:1721-1726.
9. Fiehn, W., J. B. Peter, J. F. Mead, and M. Gan-Elepano. 1971. Lipids and fatty acids of sarcolemma, sarcoplasmic reticulum, and mitochondria from rat skeletal muscle. *J Biol Chem* . 246:5617-5620.
10. Van Meer, G., D. R. Voelker, and G. W. Feigenson. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:112-124.
11. Berde, C. B., H. C. Andersen, and B. S. Hudson. 1980. A theory of the effects of head-group structure and chain unsaturation on the chain melting transition of phospholipid dispersions. *Biochemistry* 19:4279-4293.
12. Schechter. 2002. *Biochimie et biophysique des membranes. Aspects structuraux et fonctionnels*. 2e éd. Paris: Masson, 466p.
13. Cevc, G. 1991. How membrane chain-melting phase-transition temperature is affected by the lipid chain asymmetry and degree of unsaturation: an effective chain-length model. *Biochemistry* 30:7186-7193.
14. Lorin A, Flore C, Thomas A, and Bresseur R. 2004. Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 8:163-176
15. Lipowsky, R., et E. Sackmann. 1995. *Structure and Dynamics of Membranes*. Elsevier Science Ltd Vol 1, Parts A & B.
16. Devaux, P. F., and A. Zachowski. 1994. Maintenance and consequences of membrane phospholipid asymmetry. *Chemistry and Physics of Lipids* 73:107-120.
17. Luzzati, V., T. Gulik-Krzywicki, and A. Tardieu. 1968. Polymorphism of Lecithins. *Nature* 218:1031-1034.
18. Israelchvili JN. 1992. *Intermolecular and Surface Forces*. Academic Press, London.
19. Cullis, P. R., and B. De Kruijff. 1979. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 559:399-420.
20. Zachowski, A. 1993. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J* 294:1-14.
21. Kruijff, B. d. 1997. Lipid polymorphism and biomembrane function. *Current Opinion in Chemical Biology* 1:564-569.
22. Zimmerberg, J. 2000. Are The Curves in all the Right Places? *Traffic* 1:366-369.
23. Cooper G.M, and 2000. *The Cell: A Molecular Approach*. Sunderland (MA): Sinauer Associates;.
24. Sprong, H., P. van der Sluijs, and G. van Meer. 2001. How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:504-513.
25. Schmidt, A., M. Wolde, C. Thiele, W. Fest, H. Kratzin, A. V. Podtelejnikov, W. Witke, W. B. Huttner, and H.-D. Soling. 1999. Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* 401:133-141.
26. Roth, M. G., K. Bi, N. T. Ktistakis, and S. Yu. 1999. Phospholipase D as an effector for ADP-ribosylation factor in the regulation of vesicular traffic. *Chemistry and Physics of Lipids* 98:141-152.
27. Chan, Y.-H. M., and S. G. Boxer. 2007. Model membrane systems and their applications. *Current Opinion in Chemical Biology* 11:581-587.
28. Bangham, A. D., M. M. Standish, and J. C. Watkins. 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13:238-252, IN226-IN227.
29. Rigaud, J. L., A. Bluzat, and S. Buschlen. 1983. Incorporation of bacteriorhodopsin into large unilamellar liposomes by reverse phase evaporation. *Biochem Biophys Res Commun* 111:373-382.

PARTIE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

30. Angelova MI, and Dimitrov DS. 1986. Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem Soc.* 81:303-311.
31. Rodriguez, N., F. Pincet, and S. Cribier. 2005. Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: A comparison by fluorescence microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 42:125-130.
32. Stachowiak, J. C., D. L. Richmond, T. H. Li, A. P. Liu, S. H. Parekh, and D. A. Fletcher. 2008. Unilamellar vesicle formation and encapsulation by microfluidic jetting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4697-4702.
33. Tresset, G., and S. Takeuchi. 2005. Utilization of Cell-Sized Lipid Containers for Nanostructure and Macromolecule Handling in Microfabricated Devices. *Analytical Chemistry* 77:2795-2801.
34. Feng, Z. V., S. Granick, and A. A. Gewirth. 2004. Modification of a Supported Lipid Bilayer by Polyelectrolyte Adsorption. *Langmuir* 20:8796-8804.
35. Kim, J., G. Kim, and P. S. Cremer. 2001. Investigations of Water Structure at the Solid/Liquid Interface in the Presence of Supported Lipid Bilayers by Vibrational Sum Frequency Spectroscopy. *Langmuir* 17:7255-7260.
36. Muresan, A. S., and K. Y. C. Lee. 2001. Shape Evolution of Lipid Bilayer Patches Adsorbed on Mica: An Atomic Force Microscopy Study. *Journal of Physical Chemistry B* 105:852-855.
37. Egan, M., T. Flotte, S. Afione, R. Solow, P. L. Zeitlin, B. J. Carter, and W. B. Guggino. 1992. Defective regulation of outwardly rectifying Cl⁻ channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR. *Nature* 358:581-584.
38. Lalchev, Z. I., and A. R. Mackie. 1999. Molecular lateral diffusion in model membrane systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 15:147-160.
39. McConnell, H. M., T. H. Watts, R. M. Weis, and A. A. Brian. 1986. Supported planar membranes in studies of cell-cell recognition in the immune system. *Biochim Biophys Acta - Reviews on Biomembranes* 864:95-106.
40. Sackmann, E. 1996. Supported membranes: scientific and practical applications. *Science* 271:43-48.
41. Schneider, J., Y. F. Dufrêne, W. R. Barger, and G. U. Lee. 2000. Atomic Force Microscope Image Contrast Mechanisms on Supported Lipid Bilayers. *Biophysical journal* 79:1107-1118.
42. Mingeot-Leclercq, M.-P., M. Deleu, R. Brasseur, and Y. F. Dufrene. 2008. Atomic force microscopy of supported lipid bilayers. *Nat. Protocols* 3:1654-1659.
43. Xie, A. F., and S. Granick. 2002. Phospholipid membranes as substrates for polymer adsorption. *Nat Mater* 1:129-133.
44. Tanaka, M., and E. Sackmann. 2005. Polymer-supported membranes as models of the cell surface. *Nature* 437:656-663.
45. Brian, A. A., and H. M. McConnell. 1984. Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6159-6163.
46. Stroumpoulis, D., A. Parra, and M. Tirrell. 2006. A kinetic study of vesicle fusion on silicon dioxide surfaces by ellipsometry. *AIChE Journal* 52:2931-2937.
47. Seifert, U., and R. Lipowsky. 1990. Adhesion of vesicles. *Physical Review A* 42:4768.
48. Langmuir, I. 1917. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. *Journal of the American Chemical Society* 39:1848-1906.
49. Blodgett, K. B. 1935. Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface. *Journal of the American Chemical Society* 57:1007-1022.
50. Blodgett, K. B., and I. Langmuir. 1937. Built-Up Films of Barium Stearate and Their Optical Properties. *Physical Review* 51:964.
51. Demel, R. A., L. L. M. Van Deenen, and B. A. Pethica. 1967. Monolayer interactions of phospholipids and cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 135:11-19.
52. Chi, L. F., M. Anders, H. Fuchs, R. R. Johnston, and H. Ringsdorf. 1993. Domain Structures in Langmuir-Blodgett Films Investigated by Atomic Force Microscopy. *Science* 259:213-216.
53. von Nahmen, A., A. Post, H.-J. Galla, and M. Sieber. 1997. The phase behavior of lipid monolayers containing pulmonary surfactant protein C studied by fluorescence light microscopy. *European Biophysics Journal* 26:359-369.
54. Amrein, M., A. von Nahmen, and M. Sieber. 1997. A scanning force and fluorescence light microscopy study of the structure and function of a model pulmonary surfactant. *European Biophysics Journal* 26:349-357.
55. Charitat, T., E. Bellet-Amalric, G. Fragneto, and F. Graner. 1999. Adsorbed and free lipid bilayers at the solid-liquid interface. *The European Physical Journal B - Condensed Matter and Complex Systems* 8:583-593.

PARTIE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

56. Giocondi, M.-C., D. Yamamoto, E. Lesniewska, P.-E. Milhiet, T. Ando, and C. Le Grimellec. 2010. Surface topography of membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1798:703-718.
57. Wallin, E., and G. von Heijne. 1998. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein science : a publication of the Protein Society* 7:1029-1038.
58. McLaughlin, S., and A. Aderem. 1995. The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends in Biochemical Sciences* 20:272-276.
59. Damodaran, K. V., K. M. Merz, and B. P. Gaber. 1995. Interaction of small peptides with lipid bilayers. *Biophysical journal* 69:1299-1308.
60. Lee, A. G. 2004. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1666:62-87.
61. Albert, A. D., J. E. Young, and P. L. Yeagle. 1996. Rhodopsin-cholesterol interactions in bovine rod outer segment disk membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1285:47-55.
62. Lee, M. H., and R. M. Bell. 1989. Phospholipid functional groups involved in protein kinase C activation, phorbol ester binding, and binding to mixed micelles. *Journal of Biological Chemistry* 264:14797-14805.
63. Sandermann, H., J. O. McIntyre, and S. Fleischer. 1986. Site-site interaction in the phospholipid activation of D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* 261:6201-6208.
64. Tefft, R. E., A. Carruthers, and D. L. Melchior. 1986. Reconstituted human erythrocyte sugar transporter activity is determined by bilayer lipid groups. *Biochemistry* 25:3709-3718.
65. Carafoli, E. 1991. Calcium pump of the plasma membrane. *Physiological Reviews* 71:129-153.
66. Kimelberg, H. K., and D. Papahadjopoulos. 1972. Phospholipid requirements for (Na⁺ + K⁺)-ATPase activity: Head-group specificity and fatty acid fluidity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 282:277-292.
67. Wiedmann, T. S., R. D. Pates, J. M. Beach, A. Salmon, and M. F. Brown. 1988. Lipid-protein interactions mediate the photochemical function of rhodopsin. *Biochemistry* 27:6469-6474.
68. Arnold, R. S., and A. C. Newton. 1996. Diacylglycerol directly stimulates the insulin receptor tyrosine kinase. *FEBS Letters* 380:58-62.
69. Vik, S. B., G. Georgevich, and R. A. Capaldi. 1981. Diphosphatidylglycerol is required for optimal activity of beef heart cytochrome c oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78:1456-1460.
70. Houslay MD, Needham L, Dodd NJ, and G. AM. 1986. Acidic phospholipid species inhibit adenylate cyclase activity in rat liver plasma membranes. *Biochem J.* 235 (1):237-243.
71. Brockman, J. L., and R. A. Anderson. 1991. Casein kinase I is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in native membranes. *Journal of Biological Chemistry* 266:2508-2512.
72. Lill, R., W. Dowhan, and W. Wickner. 1990. The ATPase activity of secA is regulated by acidic phospholipids, secY, and the leader and mature domains of precursor proteins. *Cell* 60:271-280.
73. Lassing, I., and U. Lindberg. 1985. Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature* 314:472-474.
74. Doberstein, S. K., and T. D. Pollard. 1992. Localization and specificity of the phospholipid and actin binding sites on the tail of *Acanthamoeba* myosin IC. *The Journal of Cell Biology* 117:1241-1249.
75. Newton, A. C. 1993. Interaction of Proteins With Lipid Headgroups: Lessons from Protein Kinase C. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 22:1-25.
76. Webb, R. J., J. M. East, R. P. Sharma, and A. G. Lee. 1998. Hydrophobic Mismatch and the Incorporation of Peptides into Lipid Bilayers: A Possible Mechanism for Retention in the Golgi. *Biochemistry* 37:673-679.
77. Fattal, D. R., and A. Ben-Shaul. 1993. A molecular model for lipid-protein interaction in membranes: the role of hydrophobic mismatch. *Biophysical journal* 65:1795-1809.
78. Nielsen, C., M. Goulian, and O. S. Andersen. 1998. Energetics of Inclusion-Induced Bilayer Deformations. *Biophysical journal* 74:1966-1983.
79. Mouritsen, O. G., and M. Bloom. 1984. Mattress model of lipid-protein interactions in membranes. *Biophysical journal* 46:141-153.
80. Lee, A. G. 2003. Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1612:1-40.
81. Pilot, J. D., J. M. East, and A. G. Lee. 2001. Effects of Bilayer Thickness on the Activity of Diacylglycerol Kinase of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 40:8188-8195.
82. Starling, A. P., J. M. East, and A. G. Lee. 1995. Effects of Gel Phase Phospholipid on the Ca²⁺-ATPase. *Biochemistry* 34:3084-3091.

PARTIE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

83. Giocondi, M.-C., B. Seantier, P. Dosset, P.-E. Milhiet, and C. Le Grimellec. 2008. Characterizing the interactions between GPI-anchored alkaline phosphatases and membrane domains by AFM. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 456:179-188.
84. Milhiet, P.-E., M.-C. Giocondi, O. Baghdadi, F. Ronzon, B. Roux, and C. Le Grimellec. 2002. Spontaneous insertion and partitioning of alkaline phosphatase into model lipid rafts *EMBO reports* 3 (5):485-490.
85. Rietveld, A. G., J. A. Killian, W. Dowhan, and B. de Kruijff. 1993. Polymorphic regulation of membrane phospholipid composition in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 268:12427-12433.
86. Shear, C. R., and R. J. Bloch. 1985. Vinculin in subsarcolemmal densities in chicken skeletal muscle: localization and relationship to intracellular and extracellular structures. *The Journal of Cell Biology* 101:240-256.
87. Epanand, R. M., and R. F. Epanand. 2001. Factors Contributing to the Fusogenic Potency of Foamy Virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 284:870-874.
88. Le Rumeur, E., S. Pottier, G. Da Costa, L. Metzinger, L. Mouret, C. Rocher, M. Fourage, C. Rondeau-Mouro, and A. Bondon. 2007. Binding of the dystrophin second repeat to membrane di-oleyl phospholipids is dependent upon lipid packing. *Biochim Biophys Acta*. 1768:648-654.
89. Epanand, R. M. 1998. Lipid polymorphism and protein-lipid interactions. *Biochim Biophys Acta* 1376:353-368.
90. Booth, P. J., M. L. Riley, S. L. Flitsch, R. H. Templer, A. Farooq, A. R. Curran, N. Chadborn, and P. Wright. 1997. Evidence That Bilayer Bending Rigidity Affects Membrane Protein Folding *Biochemistry* 36:197-203.
91. Huang H, Ball JM, Billheimer JT, and S. F. 1999. Interaction of the N-terminus of sterol carrier protein 2 with membranes: role of membrane curvature. *Biochem J* 344 (Pt 2):593-603.
92. Bigay, J., J.-F. Casella, G. Drin, B. Mesmin, and B. Antonny. 2005. ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *EMBO J* 24:2244-2253.
93. Drin, G., J.-F. Casella, R. Gautier, T. Boehmer, T. U. Schwartz, and B. Antonny. 2007. A general amphipathic [alpha]-helical motif for sensing membrane curvature. *Nat Struct Mol Biol* 14:138-146.
94. Peter, B. J., H. M. Kent, I. G. Mills, Y. Vallis, P. J. G. Butler, P. R. Evans, and H. T. McMahon. 2004. BAR Domains as Sensors of Membrane Curvature: The Amphiphysin BAR Structure. *Science* 303:495-499.
95. Casal, E., L. Federici, W. Zhang, J. Fernandez-Recio, E.-M. Priego, R. N. e. Miguel, J. B. DuHadaway, G. C. Prendergast, B. F. Luisi, and E. D. Laue. 2006. The Crystal Structure of the BAR Domain from Human Bin1/Amphiphysin II and Its Implications for Molecular Recognition *Biochemistry* 45:12917-12928.
96. Frost, A., V. M. Unger, and P. De Camilli. 2009. The BAR Domain Superfamily: Membrane-Molding Macromolecules. *Cell* 137:191-196.
97. Saarikangas, J., H. Zhao, A. Pykäläinen, P. Laurinmäki, P. K. Mattila, P. K. J. Kinnunen, S. J. Butcher, and P. Lappalainen. 2009. Molecular Mechanisms of Membrane Deformation by I-BAR Domain Proteins. *Current biology : CB* 19:95-107.
98. Gallop, J. L., C. C. Jao, H. M. Kent, P. J. G. Butler, P. R. Evans, R. Langen, and H. T. McMahon. 2006. Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature. *EMBO J* 25:2898-2910.
99. Roux, A., G. Koster, M. Lenz, B. Sorre, J.-B. Manneville, P. Nassoy, and P. Bassereau. 2010. Membrane curvature controls dynamin polymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:4141-4146.
100. Doucet, C. M., J. A. Talamas, and M. W. Hetzer. Cell Cycle-Dependent Differences in Nuclear Pore Complex Assembly in Metazoa. *Cell* 141:1030-1041.
101. Mesmin, B., G. Drin, S. Levi, M. Rawet, D. Cassel, J. Bigay, and B. Antonny. 2007. Two Lipid-Packing Sensor Motifs Contribute to the Sensitivity of ArfGAP1 to Membrane Curvature *Biochemistry* 46:1779-1790.
102. Bigay, J., P. Gounon, S. Robineau, and B. Antonny. 2003. Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature* 426:563-566.
103. Antonny, B., I. Huber, S. Paris, M. Chabre, and D. Cassel. 1997. Activation of ADP-ribosylation Factor 1 GTPase-Activating Protein by Phosphatidylcholine-derived Diacylglycerols. *Journal of Biological Chemistry* 272:30848-30851.
104. Antonny, B. 2011. Mechanisms of Membrane Curvature Sensing. *Annual Review of Biochemistry* 80:101-123.

PARTIE II:
LA DYSTROPHINE
SES PARTENAIRES
SA FONCTION
BIOLOGIQUE

Dans cette deuxième partie, nous présenterons les différentes études réalisées sur des fragments de la dystrophine humaine. Cette partie sera divisée en cinq différents chapitres :

Le Chapitre 1 est une introduction générale sur la dystrophine et son implication dans les pathologies musculaires. Ensuite, nous présenterons l'état de l'art sur les différentes études biophysiques et biochimiques réalisées dans le but de déterminer les interactions entre la dystrophine et ses partenaires, et nous terminerons par les différentes thérapies envisagées.

Le Chapitre 2 présentera les résultats obtenus sur deux fragments distincts de la dystrophine : DYS R1-3 et DYS R20-24 et leurs comportements en présence de monocouches lipidiques comme modèles membranaires.

Le Chapitre 3 et le Chapitre 4 seront consacrés à notre travail sur un fragment original de la dystrophine : DYS R11-15.

Dans un premier temps (Chapitre 3), nous montrerons l'interaction de ce fragment avec différents modèles de lipides membranaires : liposomes, monocouches et bicouches. Nous discuterons ainsi de l'effet de la courbure membranaire et du "packing" lipidique sur le comportement de la protéine DYS R11-15.

Dans un second temps (Chapitre 4), nous nous intéresserons au comportement de DYS R11-15, en présence de deux de ses partenaires identifiés : la membrane lipidique d'une part, et les filaments d'actine du cytosquelette d'autre part. Une introduction sur les filaments d'actine du cytosquelette sera présentée, suivie par une description du dispositif expérimental utilisé et les différents résultats obtenus.

Le dernier chapitre (Chapitre 5) sera consacré à une discussion générale des résultats présentés dans cette partie, suivie d'une conclusion et de la présentation des perspectives ouvertes par notre travail.

Chapitre 1 – Introduction : dystrophine et maladies associées

Depuis l'aube de l'humanité, le muscle symbolise la force. La statue du héros grec Hercule Farnèse, sculptée par Glycon d'Athènes au III^e siècle après. J.-C., témoigne de cette pensée. Après la mythologie, la myologie a ouvert ce concept en attribuant également aux muscles des fonctions de motricité et de thermogénèse. L'ensemble de ces fonctions est attribué aux cycles de contraction-relaxation musculaire.

La contraction des muscles permet d'accomplir les mouvements permettant, par exemple, de s'asseoir, de marcher ou de saisir un objet. Même les modifications infimes de l'expression du visage font appel à un ajustement délicat des muscles faciaux. Au cours de ces mouvements, il est possible qu'un traumatisme mécanique ait lieu, à cause des troubles de contraction ou d'un mouvement brusque générateur par exemple de claquages ou de déchirures musculaires

Des troubles musculaires d'origine génétique sont également observés. Parmi ceux-ci figurent les myopathies. Elles se caractérisent par une atrophie des tissus musculaires, produite par une dégénération progressive de ces mêmes tissus. Les dystrophies sont des myopathies génétiques dont l'origine symptomatique est le plus souvent liée à une mutation du gène codant pour une protéine sarcoplasmique appelée dystrophine (1). Une des plus graves manifestations en rapport avec un déficit de la dystrophine est la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD).

II.1.A. Dystrophine et Myopathie

II.1.A.1. Historique

Au début du XIX^e siècle, les premières descriptions de cas pouvant s'apparenter à la DMD ont été répertoriées (2). Plusieurs chercheurs notamment Charles Bell (1774-1842), Gaetano Conte (1798-1858), Richard Partridge (1805-1873) et William John Little contribuèrent à dresser le tableau pathologique de ce qui allait devenir la DMD. Cette dystrophie doit son nom à Guillaume Benjamin Amand Duchenne. Ce physiologiste français (1806-1875), fit en 1861 la description détaillée d'un patient (2) atteint de dystrophie dans un feuillet intitulé « De l'électrisation localisée et de son

application à la pathologie et à la thérapeutique ». Cependant la paternité de la DMD reste controversée, puisque quelques années auparavant (1851-1852) l'anglais Edward Meryon (1807-1880) fit la description de plusieurs cas identiques à celui décrit par Guillaume Duchenne (3). Edward Meryon attribua les causes de la maladie à une carence en éléments nutritionnels (2). Quant à G. Duchenne, il pensa tout d'abord que la maladie avait une origine cérébrale «Paraplégie hypertrophique de l'enfance d'origine cérébrale». En 1868, des études histologiques permirent à G. Duchenne de conclure à une origine musculaire de la maladie : «paralyse musculaire pseudo-hypertrophique ou paralysie myo-sclérosique» (4). Il associa la pseudo-hypertrophie musculaire à l'invasion du tissu musculaire par du tissu conjonctif et adipeux. Il remarqua plus tard, que des séances d'hydrothérapie et de massothérapie suivies par des stimulations électriques pouvaient améliorer la condition des patients dans les phases précoces du développement de la maladie (4). C'est ainsi que G. Duchenne laissa son nom à la DMD en se différenciant de E. Meryon par une étude étiologique plus approfondie et en présentant une première approche thérapeutique.

II.1.A.2. Étiologie

En 1886, William Richard Gowers (1845-1915) remarqua des cas sans antécédent familial, appelés cas isolés de DMD, dont la fréquence est toutefois moins élevée que celle des cas avec antécédents. D'autre part, il constata que pour les familles touchées, les cas déclarés étaient toujours du côté maternel. Au début des années 1980, deux équipes de recherche démontrèrent que les patients touchés par la DMD avaient des altérations (translocation ou délétion) dans le chromosome X. Les erreurs chromosomiques survenaient à chaque fois dans la bande 1 de la région 2 du bras court (noté Xp21) (5, 6). Parallèlement, une autre équipe de recherche remarqua la présence des polymorphismes de séquence d'ADN (acide désoxyribonucléique) dans la région Xp21 au sein des familles où la DMD survenait. Par conséquent, des patients ne présentant aucune délétion ou translocation chromosomique pouvaient être touchés par la DMD (7). Kunkel et Monaco isolèrent un ARN messager (ARNm) correspondant à un gène, de la région Xp21 de patients atteints de DMD, où des délétions y étaient fréquentes (8, 9). Cet ARNm isolé avait une taille de 14 kilobases (kb). La séquence nucléotidique correspondante permet de découvrir la dystrophine, protéine qui était encore inconnue (10). Ainsi, la DMD se

définit comme étant une maladie génétique héréditaire récessive conduisant à l'altération du chromosome X dans la région Xp21. Cette altération engendre une absence d'expression de dystrophine au sein du tissu musculaire (11).

II.1.A.3. Gène et mutations

Le gène de la dystrophine est un des plus gros gènes connus avec une taille de 2,4 mégabases (Mb) d'ADN, soit environ 1% de l'ADN du chromosome X (12). Ce gène est localisé en Xp21 (8). 90% du gène est composé d'introns. La séquence codante est composée de 79 exons séparés par des introns de 200 kb (**Fig II.1.1-A**). Seulement 0,6% du gène code pour l'ARNm de la dystrophine (13). Ainsi, l'ARNm total ne fait que 14 kb (11), ce qui ne représente que 0,6% de la séquence génomique. Ceci est dû au fait que ce gène comporte d'énormes introns, tel l'intron 44 dont la taille est de plus de 170kb (14).

Diverses mutations peuvent survenir dans le gène de la dystrophine et induire une DMD. Des mutations par délétions ou duplications touchent de larges segments génomiques alors que des mutations ponctuelles ou micro-délétions touchent de plus petits fragments (13). Plus de 60 à 70% des cas de DMD sont associés aux mutations impliquant de grandes portions d'ADN, et le reste des cas étant imputable aux autres mutations (13). Enfin, il ne semble pas exister de corrélation entre la taille de la mutation et la sévérité de la maladie (15). Cependant, les mutations modifiant le cadre de lecture de l'ADN conduisent à une synthèse protéique partielle. Ainsi, la partie carboxy-terminale de la dystrophine est souvent manquante chez les patients atteints de DMD, la protéine obtenue est instable et dégradée (15, 16).

II.1.A.4. La dystrophine

La dystrophine est une protéine qui représente 2% des protéines sarcoplasmiques du muscle (17). La présence de plusieurs promoteurs ainsi que l'épissage alternatif des pré-ARNm conduisent à la production de plusieurs isoformes de dystrophine. L'isoforme

prédominante se retrouve dans le muscle squelettique et cardiaque. C'est une protéine de 427 kDa contenant 3685 acides aminés (1, 18). La séquence protéique de la dystrophine est relativement bien conservée entre différentes espèces telles que l'homme, les rongeurs et les oiseaux (13). Cette protéine peut être divisée en quatre domaines (**Fig II.1.1-B**):

1. Le domaine amino terminal (N-ter), formé par les premiers 240 acides aminés (16) est constitué de 2 domaines type CH « Calponin Homolgy actin binding domain » capable de lier les filaments d'actine du cytosquelette musculaire et non musculaire(19, 20). De ce fait, la dystrophine et l'actine sont liées (21), et la partie N-ter est couramment nommée ABD1 (Actin Binding Domain 1).
2. La seconde portion de la protéine, la plus longue, compte 2705 acides aminés, et est constituée de 24 répétitions homologues à la spectrine d'environ 109 acides aminés chacune. Les régions charnières flexibles (H1-H4) ou "hinges" ont des séquences riches en résidus proline qui interrompent cette région nommée "rod" domaine ou région centrale (1, 22) et confèreraient un certain degré de flexibilité à la protéine. Cette idée de structuration a découlé de l'analyse des séquences primaires des répétitions de type spectrine (23). Un domaine possédant une séquence consensus d'interaction protéique entourée de résidus tryptophane, appelé domaine WW, est présent au niveau de la quatrième charnière, entre le domaine central et le domaine riche en cystéine (24). Les répétitions 11 à 15 constituent une entité liant l'actine du cytosquelette (Actin Binding Domain 2) (25).
3. Le troisième domaine dit « riche en cystéine » est formé de 280 acides aminés, dont 15 résidus cystéine qui pourraient former un site de fixation pour les cations divalents. On distingue le domaine ZZ qui est un site potentiel de fixation du zinc (26), et deux sites potentiels de liaison au calcium : EF1 et EF2 (27). L'ensemble de ces trois domaines associés au domaine WW de l'extrémité du domaine central constitue une région de la dystrophine se liant au β -dystroglycane, protéine transmembranaire de 43 kDa, appartenant au complexe protéique dystroglycane. Ce domaine

affiche, pour une séquence de 142 acides aminés, une homologie de 24% avec la partie C-terminale de l' α -actinine (1).

- Enfin la quatrième partie de la protéine, composée de 420 acides aminés, présente une forte homologie avec un domaine de l'utrophine, une protéine encodée sur le chromosome 6 qui est de la même famille que la dystrophine (28, 29). Cette partie C-terminale est le siège d'interactions avec d'autres protéines sous sarcolemmales que sont la dystrobrevine et les syntrophines.

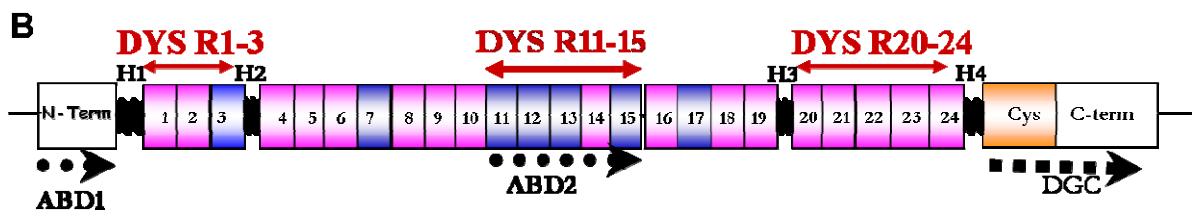
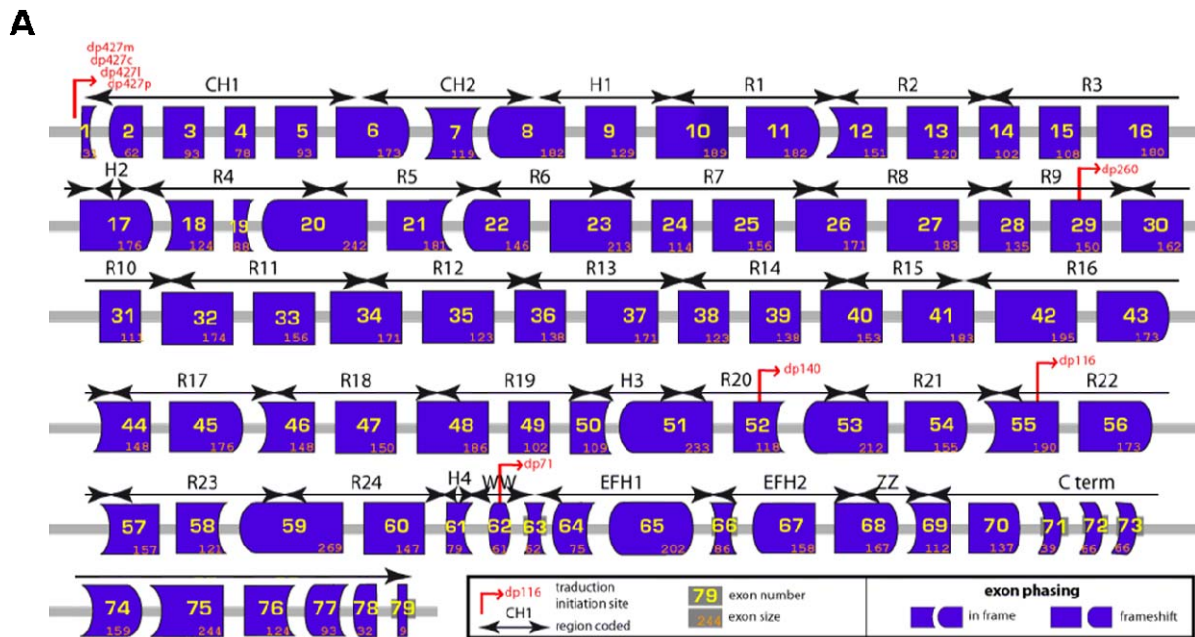


Fig II.1.1. Illustration des 79 exons du gène de la dystrophine en (A) et des 4 différents domaines protéiques (B). H1-4 correspond aux 4 charnières ; Rn répétition de type spectrine, ABD actin binding domain, DGC Complexe dystroglycane. **DYS 1-3, DYS R11-15 et DYS R20-24 sont les différents fragments du domaine central étudiés dans cette thèse.** Adapté de la base de données <http://edystrophin.genouest.org>.

La région riche en cystéine et la partie C-terminale contiennent des domaines de liaison avec le complexe dystroglycane (DGC) (30). Ces sites de liaison comprennent le domaine WW (24), le domaine ZZ et les domaines EF 1 et 2, qui sont localisés dans la région riche en cystéines, et le domaine C-terminal. En outre, cette partie de la molécule peut à la fois lier la membrane plasmique via le β -dystroglycane et le cytosquelette via des interactions avec des protéines cytosquelettiques. Les différentes interactions entre la dystrophine et son environnement seront détaillées plus tard dans ce chapitre.

La dystrophine a été retrouvée dans les muscles, le cortex, la rétine et les cellules de Purkinje (31). Une grande partie de la dystrophine exprimée dans le tissu musculaire s'accumule sur la face cytoplasmique du sarcolemme avec une distribution assez homogène qui suit la striation des fibres (32, 33) (**Fig II.1.2**). Son expression est encore plus marquée aux jonctions myotendineuses et neuromusculaires (32, 34-36).

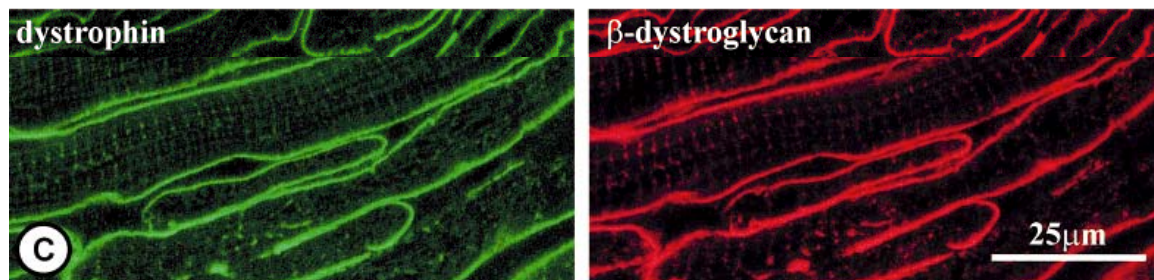


Fig II.1.2. Immunolocalisation de la dystrophine (à droite) et du β -Dystroglycane dans les cellules musculaires. Une distribution sur la face cytoplasmique du sarcolemme est observée. Ces deux protéines sont préférentiellement localisées au niveau des Stries Z des fibrilles périphériques.

II.1.A.5. Les différentes isoformes et leurs expressions tissulaires

Le gène de la dystrophine est à l'origine de protéines de différentes longueurs, ceci grâce à trois mécanismes: (i) l'activation de promoteurs alternatifs, représentés dans la (**Fig II.1.3**), ci-contre ; (ii) des phénomènes d'épissage alternatif ; et (iii) des sites de terminaison de la transcription (site de polyadénylation) alternatifs.

Outre leurs différentes tailles, ces protéines présentent une expression spatio-temporelle variable et sont exprimées dans différents types cellulaires. On utilise

l'abréviation Dp pour “*dystrophin protein*”, suivie du poids moléculaire de la protéine et éventuellement d'une lettre pour préciser son expression tissulaire principale (**Fig II.1.4**).

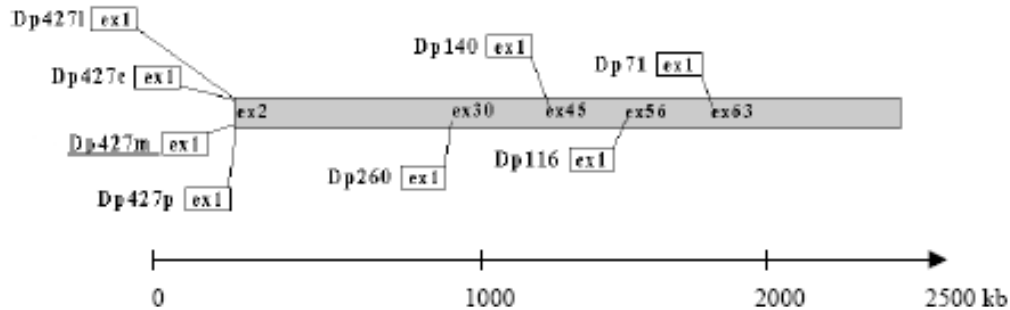


Fig II.1.3. Illustration des promoteurs alternatifs du gène de la dystrophine. La présence de plusieurs promoteurs donne naissance à des isoformes de tailles différentes. Leurs expressions tissulaires seront décrites ci-dessous.

a) Isoformes longues

Le gène de la dystrophine code pour quatre isoformes longues de 427kDa, exprimées dans différents tissus grâce à des promoteurs spécifiques. Ces isoformes ont un promoteur et un premier exon spécifique, mais partagent tout le reste de la séquence à partir de l'exon 2 (37).

- La forme appelée Dp427_m est exprimée dans les muscles squelettiques et les cellules du muscle cardiaque, ainsi que dans certaines cellules gliales du cerveau (38).
- La forme appelée Dp427_i a été trouvée dans les cellules lymphoblastoïdes (39). Cependant, des données récentes indiquent que l'expression constitutive de cette forme de dystrophine est très improbable car le promoteur a été détecté quelques 4Mb en amont de l'exon 2 de la dystrophine, et le temps de transcription d'un tel pré-ARNm est estimé à 2 jours (40).
- La forme appelée Dp427_c est exprimée dans les neurones du cortex et dans l'hippocampe (41). Son promoteur est situé environ 130kb en amont de celui de la forme musculaire Dp427_m (42).

- La forme appelée Dp427_p est exprimée dans les cellules de Purkinje, des neurones (43), mais aussi dans le reste du cortex, les muscles squelettiques et, à un taux moins élevé, dans le tissu musculaire cardiaque (44).

b) Isoformes courtes

En plus de ces formes longues, il existe 4 formes plus courtes dues à la présence de promoteurs internes.

- Dp260 est une forme courte exprimée principalement dans la rétine mais aussi dans le cerveau et le muscle cardiaque (45, 46). Son absence serait responsable du défaut de vision nocturne observé chez les garçons DMD.
- Dp140 est exprimée dans tout le système nerveux central et le rein, mais dans aucun tissu musculaire (47). Cette isoforme a été impliquée dans le développement des reins (48).
- Dp116 est exprimée dans les cellules de Schwann (49).
- Dp71 est exprimée de façon ubiquitaire dans beaucoup de tissus non musculaires, notamment le foie et le cerveau, où cette forme est majoritaire (50).

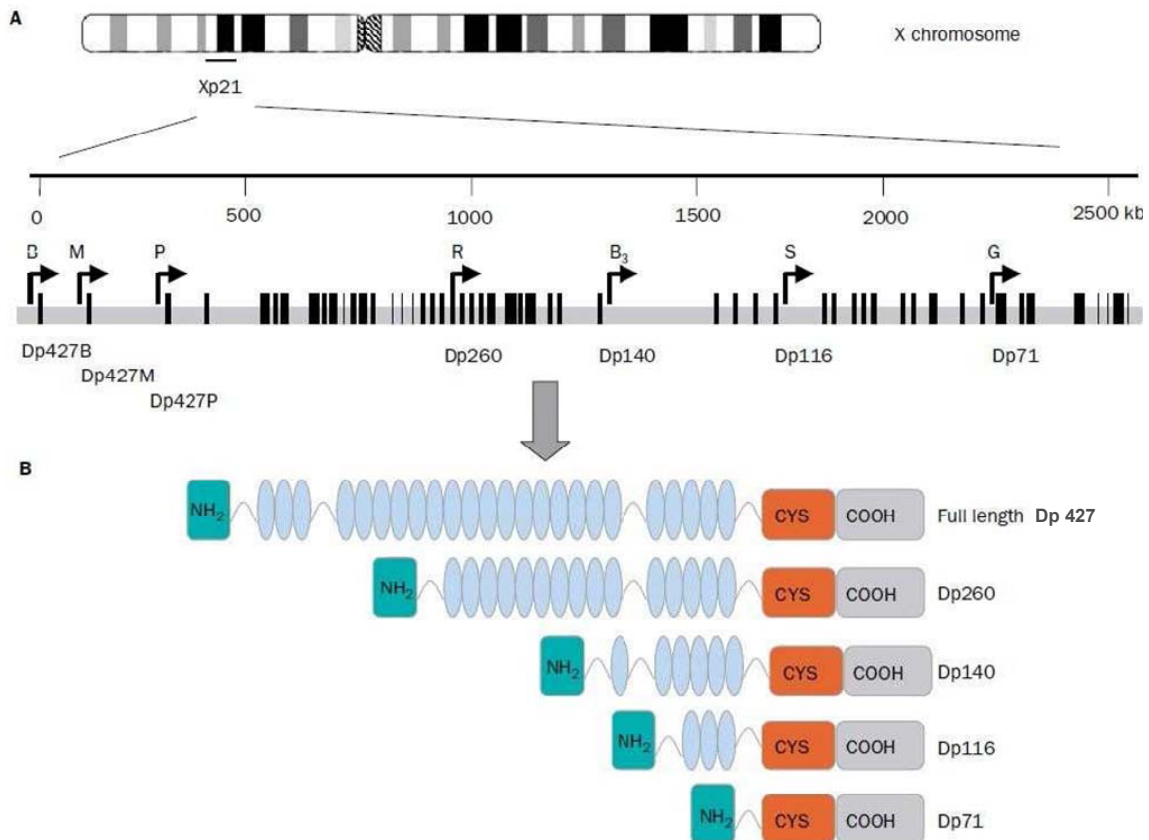


Fig II.1.4. Les principales isoformes de la dystrophine. En (A) est présenté le chromosome X et l'organisation génomique du gène de la dystrophine. Les barres verticales représentent les 79 exons. Les flèches indiquent les différents promoteurs ; en particulier du cerveau (B), muscle (M), des cellules de Purkinje (P), de la rétine (R), des cellules de Schwann (S) et du promoteur général Dp 71 (G). En (B) sont présentés les différents isoformes de la protéine. Adapté de la référence (51).

En plus des différents promoteurs, il existe des phénomènes d'épissage alternatif et un site interne de poly adénylation. Ceci peut générer à de nombreuses variantes des différents isoformes protéiques (52).

II.1.A.6. Pathologies

La myopathie de Duchenne

C'est une des formes de dystrophies la plus fréquente avec une prévalence d'environ 1 garçon sur 3500 nouveau-nés (53). C'est une maladie génétique à transmission récessive qui se caractérise par l'absence de dystrophine fonctionnelle dans

les muscles (et du complexe protéique qui lui est associé). Cette myopathie ne concerne que les garçons (qui sont encore appelés garçons DMD) car le gène de la dystrophine se situe sur le chromosome X et le mode de transmission est récessif. L'X porteur est transmis par la mère et s'exprime pleinement chez les garçons qui sont XY, alors que les filles sont dites porteuses asymptomatiques puisqu'elles ont un X porteur et un X sain. Cependant, il existe quelques rares cas de myopathie symptomatique chez des femmes porteuses. Ceci peut s'expliquer par l'inactivation aléatoire d'un des deux chromosomes X. Il est donc possible qu'une partie des cellules somatiques exprime l'X porteur alors que l'autre partie exprime l'X sain. La plupart des cas de myopathie chez les femmes sont asymétriques et moins marqués que chez les hommes car seulement une partie des muscles est touchée, les tissus où l'X porteur est exprimé (54). Dans de très rares cas, l'X porteur du gène déficient est le seul présent. C'est le cas des femmes atteintes du syndrome de Turner dont le caryotype est 45, X0.

En France, la myopathie de Duchenne est classée comme maladie orpheline. Environ les 2/3 des mutations sont héritées, le tiers restant étant des néo-mutations (55). La majorité des mutations sont des délétions (entre 60 et 65%), 6% sont des duplications et le reste des mutations ponctuelles.

Les premiers signes de la maladie sont observés lorsque les enfants apprennent à marcher ; bien que des lésions histologiques soient déjà décelables pendant la période anténatale, et que le taux de créatine kinase, une enzyme musculaire dont la présence dans le sang indique une lésion musculaire, soit élevée dans le sang dès la naissance (56).

Les garçons atteints de la myopathie de Duchenne ont souvent un retard d'apprentissage de la marche et ne courent jamais. On peut observer une hypertrophie des mollets et parfois des muscles proximaux de la jambe. Les chutes sont fréquentes, et généralement vers l'âge de 10 ou 12 ans, les garçons doivent se déplacer en fauteuil roulant. Des troubles respiratoires se manifestent. Une assistance respiratoire est alors nécessaire chez ces patients. Ces atteintes physiques sont parfois accompagnées de troubles d'ordre mental. Ceux-ci peuvent être légers comme une difficulté d'abstraction et de raisonnement, mais ils peuvent aller jusqu'au pseudo-autisme (57).

La myopathie de Becker

En 1955, *Becker et Kiener* ont identifié la myopathie dite de Becker (58). Elle est caractérisée par les mêmes symptômes que la myopathie de Duchenne, mais débute plus tardivement avec des symptômes moins prononcés. Elle est due à des mutations dans le gène de la dystrophine, principalement des délétions dans les exons 45 à 49, sans décalage du cadre de lecture. Une protéine tronquée de sa partie médiane est alors exprimée, les deux domaines amino et carboxy terminaux restant présents. Son incidence est 10 fois moins grande que celle de la myopathie de Duchenne car les mutations responsables sont beaucoup plus localisées (59). Les garçons atteints par la maladie de Becker peuvent donner une descendance, et donc la plupart des mutations sont héritées (90%) (59).

L'apparition des symptômes se fait beaucoup plus tard que chez les garçons DMD et est plus étalée dans le temps. Les problèmes moteurs apparaissent en moyenne vers 12 ans et bien souvent les personnes peuvent se déplacer de façon autonome jusqu'à leur quatrième décennie (59).

Les mutations affectant le gène de la dystrophine et conduisant à une myopathie de Duchenne ou de Becker sont principalement des délétions. Elles sont présentées **Fig II.1.5**.

Les délétions induisant des myopathies de Duchenne sont représentées par des barres bleues. Elles sont variées et couvrent une grande partie du gène de la dystrophine. Ce sont des délétions qui décalent le cadre de lecture. La forme longue musculaire de la dystrophine n'est pas produite. Ces délétions affectent parfois l'expression d'autres formes de la dystrophine.

Dans le cas de la myopathie de Becker, les délétions sont souvent observées entre les exons 45 et 49 et ne produisent pas de décalage du cadre de lecture. Ainsi, des formes tronquées des isoformes longues sont produites. Il est admis que la dystrophine tronquée puisse assurer une partie de ses fonctions ce qui expliquerait l'apparition tardive de maladie. Il est à noter qu'il n'existe aucun lien apparent entre le phénotype clinique et le degré de troncature de la dystrophine.

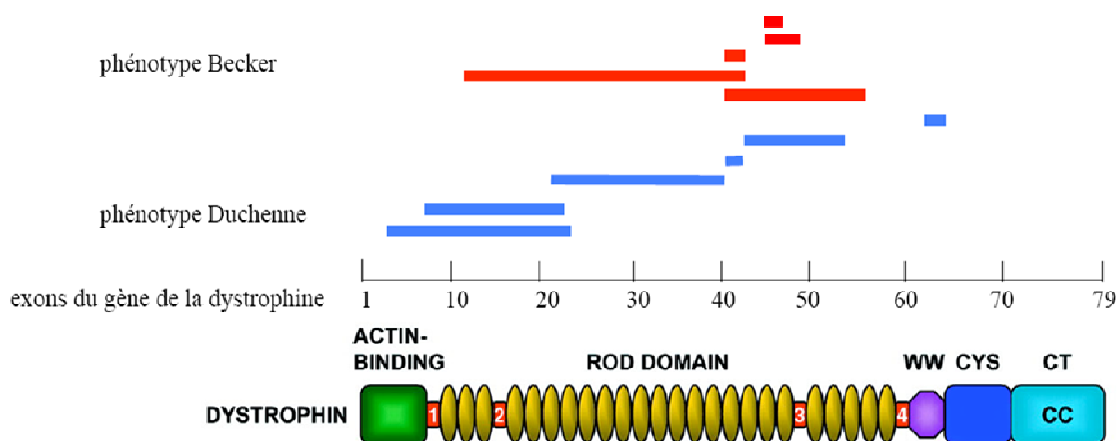


Fig II.1.5. Les principales délétions à l'origine de la myopathie de Duchenne et de Becker (en bleu et rouge respectivement). Adapté des références (60).

II.1.A.7. Signes cliniques

Les premiers signes cliniques de la DMD sont décelables à la période néonatale. Le diagnostic est plus précoce quand l'enfant a un retard psychomoteur global témoignant d'une atteinte cognitive. Les principaux symptômes sont présentés dans la **Fig II.1.6**.

Premièrement, les patients ont une concentration sérique de protéine kinase C (PCK) très élevée, témoignant d'un statut de dégénérescence musculaire. Puis, des biopsies musculaires révèlent, après analyse histologique, la présence de fibres musculaires nécrotiques (61, 62). Bien que le poids et la taille des patients soient normaux à la naissance, un ralentissement de la croissance survient dans les premières années de l'enfance (63).

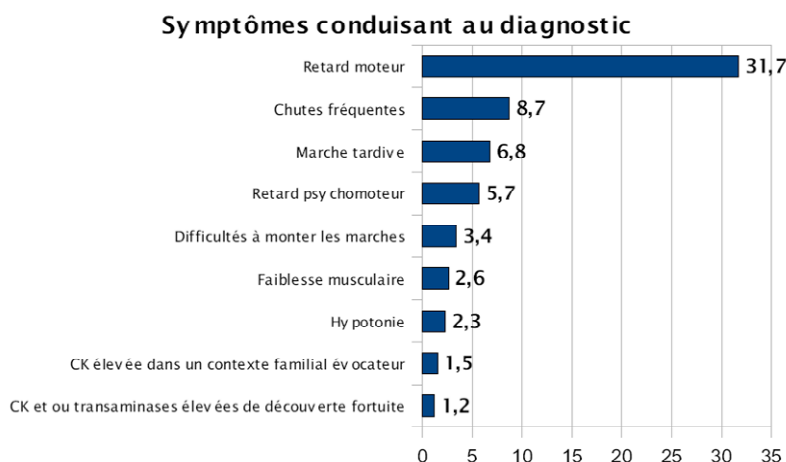


Fig II.1.6. Fréquences des principaux symptômes de la myopathie de Duchenne ; d'après la référence (64).

Quelques signes précoces sont épisodiquement rapportés par les parents tels qu'un léger retard mental, de la difficulté à courir ou encore à se déplacer dans les escaliers (65). Entre 3 et 6 ans, les enfants présentent fréquemment une lordose pathologique et une faiblesse musculaire, contraignant les patients à effectuer la manœuvre de Gowers (2) pour passer de la position horizontale à la position verticale. À ce stade, les muscles les plus touchés sont les muscles proximaux et les muscles situés dans la partie inférieure du corps. Entre 6 et 11 ans, la force des muscles du torse et des jambes baisse sensiblement et de façon linéaire (66, 67). Les réflexes tendineux diminuent jusqu'à disparaître dans les muscles les plus faibles. La capacité des patients à marcher sur une courte distance ou à se redresser décroît rapidement entre 7 et 8 ans (68). Après une dizaine d'années, et plus spécialement après que les patients aient perdu leur mobilité, la grosseur de tous les muscles des jambes et du torse diminue progressivement. Cette période régressive est également marquée par la réduction de la capacité respiratoire des patients (69, 70). En phase terminale, les infections respiratoires, la rétention de dioxyde de carbone et l'anoxémie causent le décès d'environ 40% des patients. Les autres meurent par insuffisance cardiaque (71). Une étude de cas entre 1980 et 1984 a révélé que la mort survenait en moyenne à 20 +/- 4 ans (13) et que les 3 principales causes du décès sont cardiaques 30%, insuffisance respiratoire 25%, et infection pulmonaire 18,6%.

II.1.A.8. Histopathologie du tissu musculaire

La stabilité de la structure musculaire est assurée par la présence de la dystrophine et de son complexe glycoprotéique associé. Notamment, la dystrophine joue un rôle clef lorsque les fibres musculaires sont physiquement sollicitées. L'absence de la dystrophine chez les patients DMD cause une rupture du lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine des fibres musculaires (13), fragilisant les fibres à l'effort. Cela conduit à la destruction plus fréquente et plus massive des myotubes (72, 73). La succession de phases de dégénérescence et de régénération musculaires explique l'évolution de l'histopathologie du muscle classiquement décrite chez les patients (13). La plupart des éléments caractérisant ces phases sont regroupés sur des coupes histologiques de muscle strié squelettique provenant d'un même patient DMD (*Fig II.1.7.*).

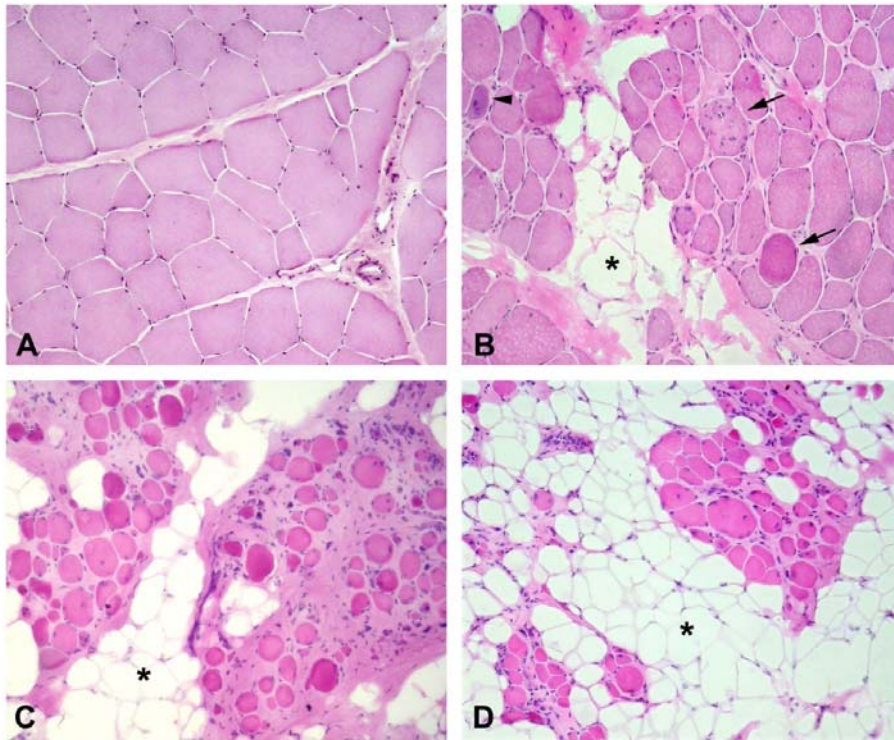


Fig II.1.7. Dégénérescence d'un muscle squelettique touché par la dystrophie musculaire de Duchenne. (A) Histologie d'un muscle sain (coloration des sections avec l'hématoxyline et l'éosin): Les myotubes ont un aspect polygonal, sont de taille normale et disposés de façon étriquée. Les myotubes sont séparés par un mince tissu conjonctif (l'endomysium) et regroupés en faisceaux séparés par le périnysium. (B) Histologie d'un muscle de patient DMD. Des signes distinctifs d'un muscle en dégénérescence apparaissent progressivement dans les muscles dystrophiques : les flèches désignent différents stades de nécrose des myofibrilles. La tête de flèche marque un myotube nouvellement formé. Dans l'ensemble, les myotubes sont plus petits et apparaissent plus arrondis qu'en (A) suite à l'épaississement des tissus conjonctifs. Les petits grains désignent une infiltration cellulaire et enfin, l'astérisque marque la présence d'un tissu adipeux infiltrant le muscle. (C) et (D) correspondent à un stade plus avancé de la maladie (74).

Les zones musculaires en phase dégénérative se distinguent par la présence de myotubes en phase de nécrose (75, 76). La fréquence pathologique des ruptures des myotubes est à l'origine du taux sérique élevé en CK des patients atteints de DMD. Cette particularité a permis le développement d'un test enzymatique utilisé fréquemment en clinique pour diagnostiquer les patients dystrophiques (77). La nécrose tissulaire est aussi à l'origine de la présence permanente de cellules inflammatoires infiltrantes (78, 79). Les cellules sont localisées aux sites péri-vasculaires ainsi qu'autour du périnysium

et de l'endomysium (80). Lors de la régénération, la formation de nouvelles fibres est caractérisée par la présence de fibres de plus petites tailles, centro-nucléées, et basophiles (13). L'évolution de la DMD chez un patient pourrait être représentée par la victoire progressive et inéluctable de la phase dégénérative musculaire sur la phase régénérative. Enfin, il est important de noter l'invasion progressive du tissu musculaire par du tissu conjonctif et adipeux (3, 81). La fibrose n'apparaît pas en période néonatale, mais elle devient évidente vers l'âge de 4-5 ans (13). La présence de tissu fibreux et adipeux au sein du tissu musculaire, est à l'origine du pseudo hypertrophie des muscles gastrocnémiens des patients. Les tissus adipeux et fibreux sont les constituants majeurs des muscles striés squelettiques des patients atteints de DMD

II.1.B. Partenaires moléculaires de la dystrophine

La dystrophine est une protéine cytoplasmique, localisée sous le sarcolemme des cellules musculaires (82). L'absence de cette protéine conduit à une désorganisation et une fragilisation du sarcolemme (83, 84), une faiblesse musculaire (85) suivie par une nécrose (86). Ces symptômes sont aggravés par le stress mécanique..Cela montre que la dystrophine stabilise le sarcolemme face aux stress mécaniques subis au cours des cycles de contraction-relaxation musculaire (87).

Dans son rôle de stabilisateur du sarcolemme, la dystrophine présente deux partenaires cruciaux : les filaments d'actine du cytosquelette et la protéine transmembranaire β -dystroglycane.

L'interaction avec l'actine se fait grâce à deux domaines homologues à la calponine (calponin like domains) et constituant ainsi le premier domaine d'interaction avec l'actine (Actin Binding Domain 1 –ABD1) situé sur la partie N-terminale de la dystrophine (19).

L'interaction avec le domaine cytoplasmique du β -dystroglycane est assurée *via* le domaine riche en cystéine de la partie C-terminale de la dystrophine (88). De ce fait, la dystrophine est connectée au complexe dystrophine-glycoprotéine (DGC : Dystrophin Glycoprotein Complex), appelé aussi « Dystrophin Associated Protein DAP » formé par différentes protéines membranaires et cytoplasmiques (**Fig II.1.8**).

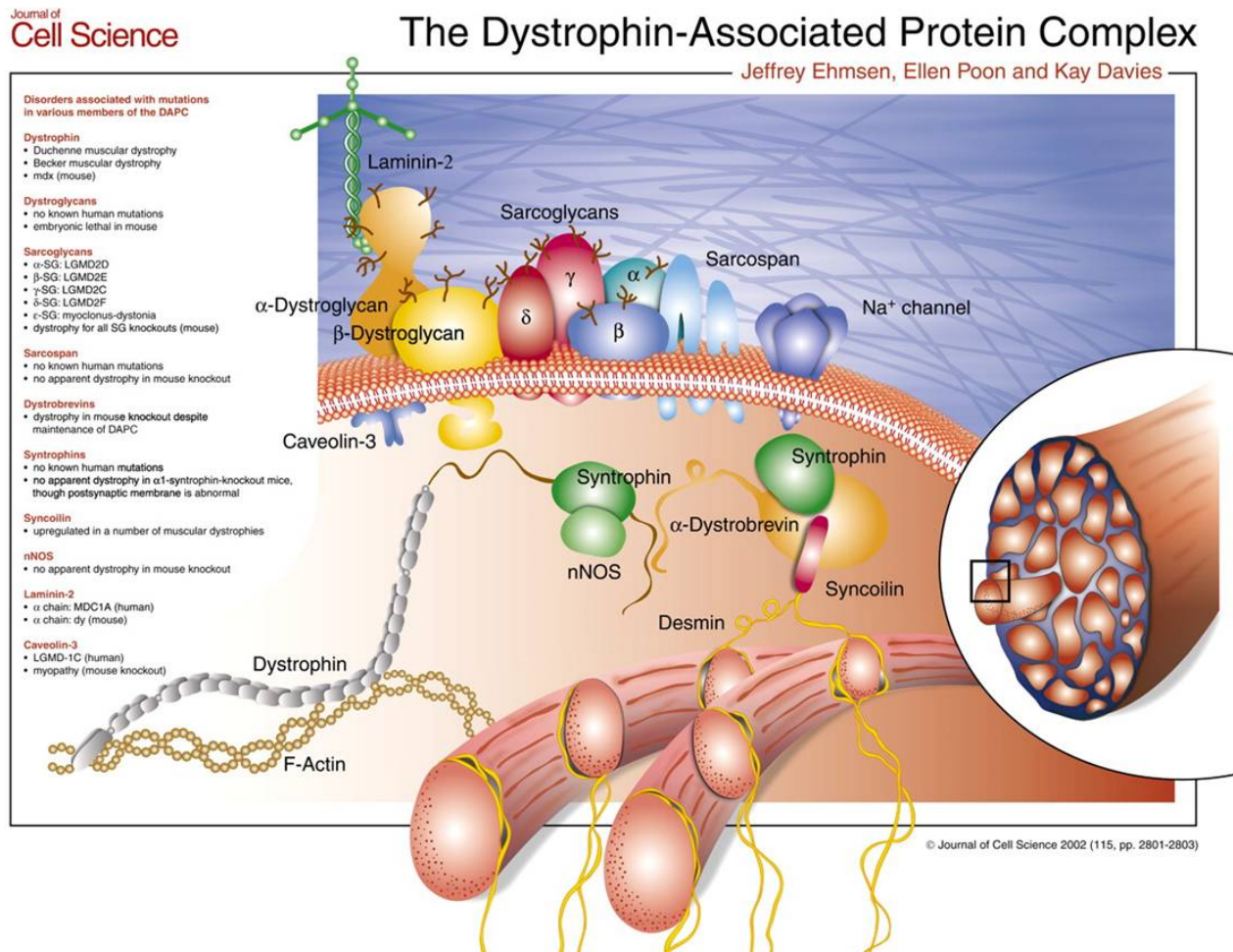


Fig II.1.8. Représentation du complexe associé à la dystrophine. Adapté de la référence (89).

Dans un premier temps, nous présenterons les différents membres du complexe DGC, et ensuite, nous discuterons des partenaires des 24 répétitions du domaine central de la dystrophine.

II.1.B-1. Le complexe DGC

En 1994, *Yoshida et al.* (90) ont réussi à purifier le complexe DGC. Trois différents complexes ont été isolés : (i) le complexe des dystroglycane, (ii) le complexe des sarcoglycane et sarcospane et (iii) le complexe cytoplasmique, formé de la syntrophine, de la dystrobrevine, et la dystrophine. Le réseau formé par le complexe DGC est présenté dans la **Fig II.1.9**.

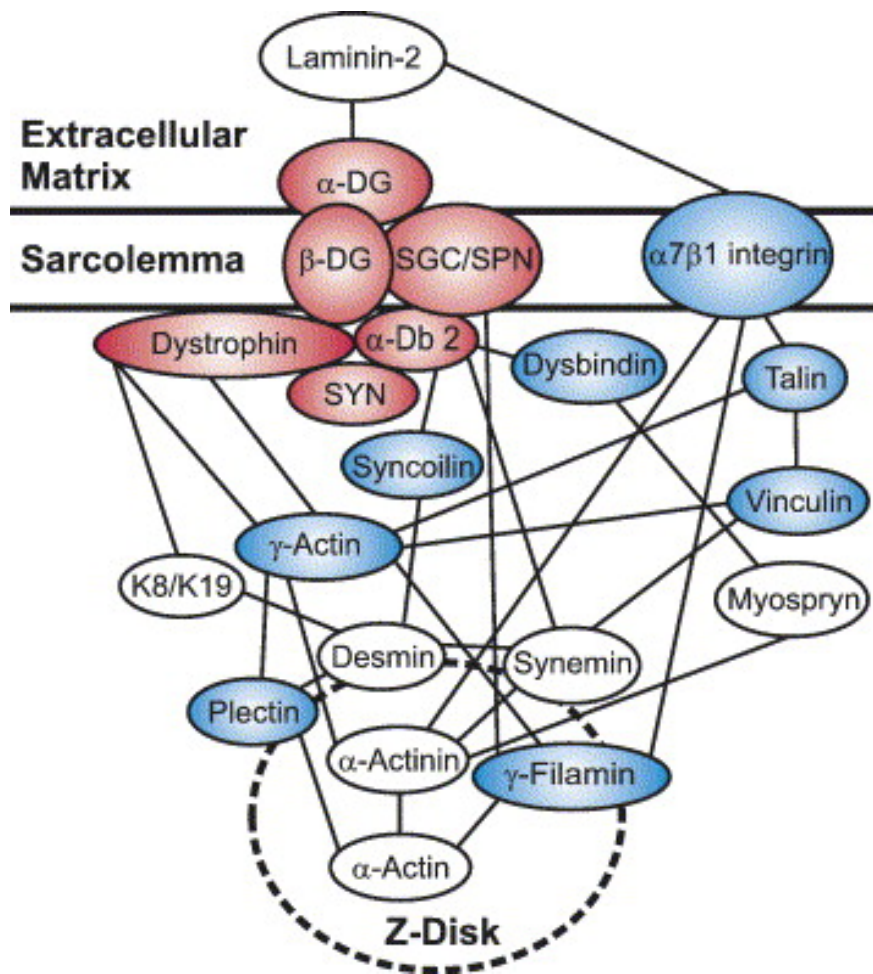


Fig II.1.9. Réseau formé par le complexe dystrophine-glycoprotéine (DGC). Le complexe DGC, présenté en rouge, est constitué de l' α -dystroglycane (α -DG) et β -dystroglycane (β -DG); le complexe sarcoglycane (SGC) et le sarcospane (SPN); l' α -dystrobrevine -2 (α -Db2) et la syntrophine (SYN). D'autres protéines qui interagissent avec le complexe DGC sont également présentées. Les protéines en bleu sont présentes en grande quantité lorsque la dystrophine est absente. Adapté de la référence (87).

Dystroglycane

Le complexe dystroglycane, identifié en 1992 (88), est formé de deux types de protéines différents par leurs degrés de glycosylation. La glycosylation est régulée et corrélée à la diversité des différents partenaires et tissus (91). On distingue l' α -dystroglycane et le β -dystroglycane.

L' α -dystroglycane est une protéine extracellulaire, liée à plusieurs protéine de la matrice extracellulaire, principalement à la laminine- α 2 liée elle-même aux intégrines

(17); ainsi qu'à d'autres tel que l'agrine, le collagène IV, le perlecan et la neuroxine (92-94). Une mutation du gène de la laminine- cause des dystrophies musculaires (95).

Le β -dystroglycane est une protéine transmembranaire, qui se lie par son côté N-terminal à l' α -dystroglycane du côté extracellulaire de la membrane plasmique ; et par son extrémité C-terminale du côté cytoplasmique au domaine riche en cystéine de la dystrophine (88). De plus, la partie C-terminale du β -dystroglycane interagit avec la cavéoline-3 (96), une protéine qui rentre dans le mécanisme d'invagination membranaire et qui est impliqué dans la régulation de nNOS (neuronal Nitric Oxide Synthase) dans les muscles squelettiques (97).

Les dystroglycanes sont essentiels pour le développement embryonnaire (98) et une interruption de l'interaction entre la dystrophine et le dystroglycane d'une part et/ou le lien dystroglycane-laminine d'autre part, conduit à des myopathies de type Duchenne.

Sarcoglycanes

Cinq protéines transmembranaires constituent la famille des sarcoglycanes (α , β , γ , δ , et ϵ -sarcoglycane) (99, 100). Les β , γ et δ -sarcoglycanes sont liés fortement entre eux et forment, avec l' α -sarcoglycane, un complexe transmembranaire dans les fibres musculaires striées (101). L' ϵ -sarcoglycane remplace l' α -sarcoglycane dans certains tissus autres que les muscles striés (102).

Des études *in vitro* ont montré que les sarcoglycanes α , β et δ interagissent avec l' α -dystroglycane du côté extracellulaire (103). D'autre part, l' α -sarcoglycane interagit directement avec la dystrophine (89), et l'absence de l'un de ces sarcoglycanes conduit à des myopathies (104, 105).

Sarcospane

C'est une protéine formée de 4 domaines transmembranaires. Les extrémités N et C-terminales sont intracellulaires (106). La stabilisation de cette protéine dans la membrane plasmique est assurée par le complexe sarcoglycanes. Aucune pathologie n'est liée à l'absence du sarcospane, et des souris déficientes en sarcospane maintiennent l'expression de toutes les autres protéines du complexe DGC, et ne développent aucune dystrophie musculaire (107).

α -Dystrobrévines

Cinq différentes isoformes d' α -dystrobrévine existent. Trois d'entre elles se trouvent dans le muscle, mais seulement l' α -dystrobrévine-2 est exprimée abondamment au niveau du sarcolemme. Cette isoforme contient 2 tandems hélicoïdaux et forme un site de liaison avec les syntrophines (108). La partie C-terminale de l' α -dystrobrévine-2 interagit avec la dystrophine (109). En 2000, *Yoshida et al.* supposent que l' α -dystrobrévine interagit aussi avec le complexe des sarcoglycanes (110).

D'autres interactions existent entre l' α -dystrobrévine et des protéines type filament intermédiaire qui constituent le cytosquelette avec l'actine et les microtubules, tel que la dysbindine, la syncoiline et la desmuline (111-113).

La syncoiline est exprimée au niveau du sarcolemme, et son interaction avec la desmuline d'une part et l' α -dystrobrévine d'autre part, constitue un lien entre le complexe DGC, le sarcolemme, et le réseau protéique des filaments intermédiaires (114).

L'absence de l' α -dystrobrévine est associée à une cardiomyopathie, le syndrome de Barth (115).

Syntrophines

Trois différentes isoformes de syntrophine ($\alpha 1$, $\beta 1$ et $\beta 2$), de 58 kDa chacune, sont exprimées sur les jonctions neuromusculaire du muscle squelettique (116); mais deux isoformes sont présentes dans le sarcolemme ($\alpha 1$, $\beta 1$). Chaque isoforme est formée de deux domaines homologues à la pleckstrine (PH domain), qui sont des modules de ~ 100 acides aminés trouvés dans les protéines de signalisation; et d'un domaine PDZ qui va faciliter l'homo ou l'hétéro-dimérisation avec d'autres protéines contenant le domaine PDZ (117). En effet, avec ce type d'interactions, les syntrophines sont impliquées dans la transduction du signal. Or, l' α -syntrophine interagit avec plusieurs protéines intracellulaires telles que : nNOS (neuronal Nitric Oxide Synthase), des canaux sodiques dépendant du voltage, la calmoduline qui est activé par le calcium, etc...(118).

Les parties C-terminales des syntrophines se lient à la dystrophine et à la dystrobrévine (116). Deux sites de fixation aux syntrophines existent sur la dystrophine et la dystrobrévine, et donc quatre syntrophines peuvent être associées au complexe DGC (108). Jusqu'à présent, aucune pathologie n'a été associée à l'absence des syntrophines. Des souris déficientes en $\alpha 1$ -syntrophine (l'isoforme prédominante dans les muscles) ne

manifestent aucun problème phénotypique ; mais nNOS est absent du sarcolemme et la membrane post-synaptique est anormale (119).

nNOS

La production du monoxyde d'azote (NO) par nNOS a pour conséquence une vasodilatation et donc une augmentation du flux sanguin local lorsque les muscles sont en exercice. La présence de nNOS au niveau du sarcolemme est assurée *via* des interactions avec les domaines PDZ des syntrophines. nNOS n'est pas détecté dans un certain nombre de dystrophies musculaires, y compris la DMD. En effet, des patients atteints de DMD montrent une constriction anormale des vaisseaux sanguins, probablement due à l'absence de nNOS. Cependant, l'arrêt de l'expression de la seule nNOS ne cause pas une dystrophie musculaire (120, 121).

L'interaction de la dystrophine avec le complexe DGC laisse deviner leur rôle de support pour la structure musculaire, via la formation d'un pont entre le cytosquelette d'actine sarcoplasmique et la matrice extracellulaire (122, 123).

L'absence de la dystrophine se traduit par une disparition du complexe DAP au niveau du sarcolemme chez les patients DMD ainsi que chez les souris *mdx* (*muscular dystrophy X-linked*, modèle de souris myopathe) (88, 124). La rupture du lien entre l'intérieur et l'extérieur des fibres musculaires fragilise le sarcolemme et facilite la destruction des myotubes lors d'un effort physique (125). Ajoutons qu'en plus de leurs rôles cruciaux de maintenir l'intégrité des fibres musculaires, la position de la dystrophine et de son complexe DAP au niveau membranaire présente une fonction de signalisation intracellulaire (126). De plus, certaines études suggèrent que la dystrophine participe au maintien de l'homéostasie du calcium. Chez les patients DMD et souris *mdx*, l'absence de la dystrophine augmente anormalement la concentration du calcium intracellulaire et affecte la perméabilité du sarcolemme (127).

II.1.B-2. Le domaine central de la dystrophine et ses partenaires

Le domaine central de la dystrophine est formé par 24 répétitions homologues à la spectrine séparés par 4 charnières donnant la flexibilité à la protéine. Chaque répétition est formée de 3 hélices- α (HA, HB et HC) organisées en "coiled-coil". De plus, les acides

aminés de chaque répétition constitue une suite de motifs en heptade (a,b,c,d,e,f,g) où les résidus hydrophobes “a” et “d” de chaque hélice constituent le noyau hydrophobe du coiled-coil (128). Deux répétitions successives sont liées par une hélice commune (HC de la première répétition est en continuité avec HA de la répétition suivante) (Fig II.1.10).

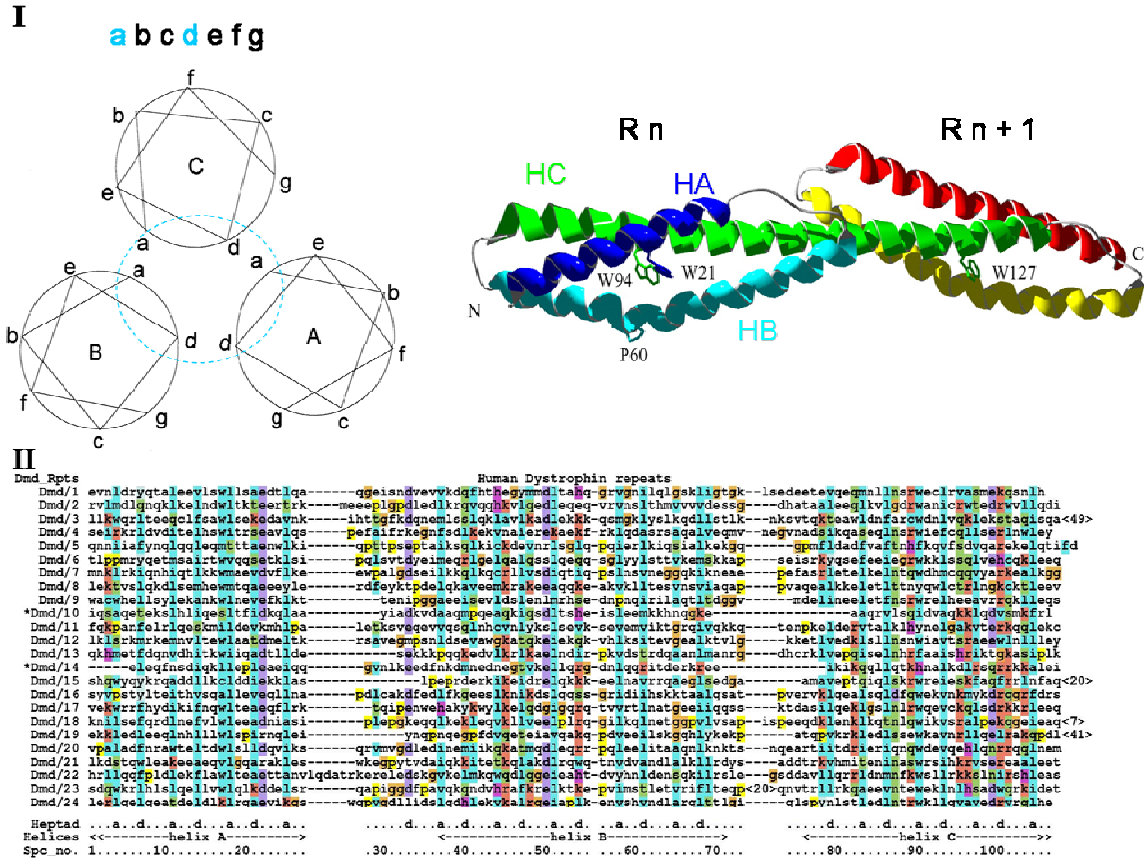


Fig II.1.10. Répétitions de type spectrine. Alignements et organisations des séquences des répétitions du domaine central de la dystrophine. (I) A droite est présentée la structure tridimensionnelle de 2 répétitions successives, Rn et Rn+1 de la spectrine. Chaque répétition est formée de 3 hélices (HA, HB et HC) structurées en coiled-coil. La dernière hélice (HC) de la répétition “Rn” est en continuité avec la première hélice (HA) de la répétition suivante “Rn+1”. A gauche sont présentées les projections de 3 hélices adjacentes d’un « triple coiled-coil » portant des motifs en heptades. Les résidus hydrophobes “a” et “d” se trouvent dans le noyau hydrophobe du coiled-coil des 3 hélices HA, HB et HC de chaque répétition. Adapté de la référence (129). (II) Alignement des acides aminés des 24 répétitions du domaine central de la dystrophine. Adapté de la référence (128).

Jusqu'à aujourd'hui, aucune structure tridimensionnelle de répétitions homologues à la spectrine du domaine central de la dystrophine n'a été déterminée expérimentalement.

Des techniques de prédiction de structure sont une alternative dans le but de déterminer les propriétés et la dynamique moléculaire de ces répétitions. Dans ce contexte, notre laboratoire a comparé toutes les répétitions du domaine central, à partir de structures tridimensionnelles obtenues par modélisation par homologie de séquence puis dynamique moléculaire en complément de leurs propriétés biochimiques déjà connues.

Dans cette nouvelle étude, *Legrand et al.* ont proposé une description moléculaire de l'ensemble du domaine central de la dystrophine (130). Malgré leurs similarités structurales (trois hélices-alpha structurées en coiled-coil), les répétitions de la dystrophine présentent une grande diversité de propriétés de surface électrostatiques et hydrophobes. En analysant ces propriétés sur des tandems formés de 2 répétitions successives, quatre différentes familles (clusters) sont identifiées (**Fig II.1.11-A**). Le ratio électronégativité/électropositivité (-/+) de la surface du tandem diminue du cluster 1 au cluster 4.

Les études de dynamique moléculaire réalisées sur un tandem de chaque famille montrent la présence d'une flexibilité significativement différente (**Fig II.1.11-B**). Les simulations montrent que les deux répétitions 10 et 11, ainsi que 15 et 16 ne se lient pas par une hélice commune comme la plupart des répétitions successives de la dystrophine, mais plutôt par un "linker" non hélicoïdal parfois nommé "*pseudo-hinge*". De plus, ces deux tandems présentent une grande flexibilité (la flexibilité entre R10 et R11 étant beaucoup plus importante qu'entre R15 et R16), ce qui n'est pas le cas des tandems 1-2 et 23-24. Cette grande flexibilité entre les répétitions 10-11 d'une part et 15-16 d'autre part donne à l'ensemble du domaine central une flexibilité spécifique. Le domaine 11-15 constitue alors une entité structurellement identifiée. La détermination de la signification fonctionnelle de cette fragmentation du domaine central fait l'objet de travaux au laboratoire et est abordée dans ce travail de thèse.

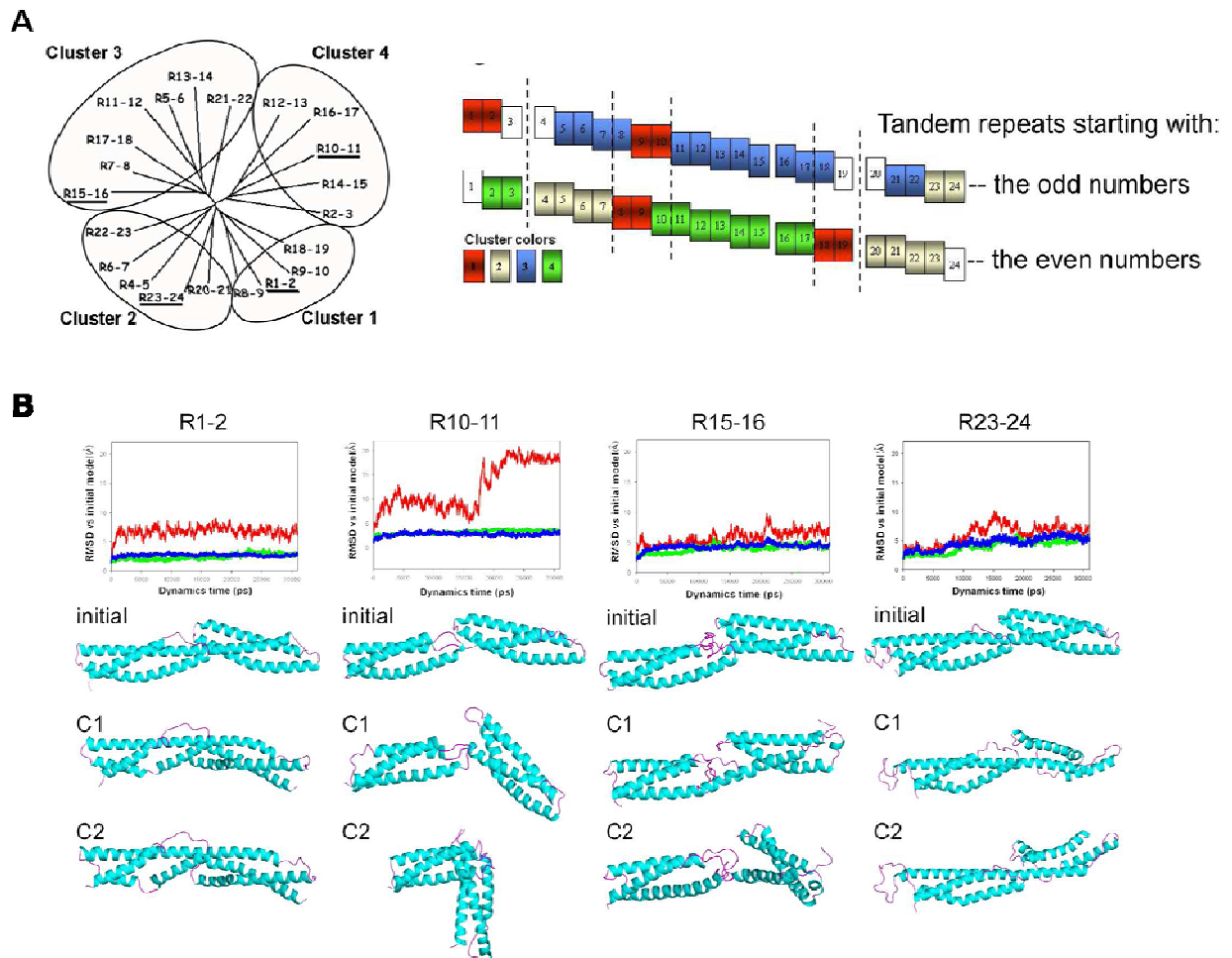


Fig II.1.11. Etude des propriétés structurales du domaine central de la dystrophine. (A) (à gauche) Regroupement PIPSA des répétitions en tandems du domaine central de la dystrophine et formant 4 familles différentes. Les tandems soulignés sont étudiés par dynamique moléculaire. (à droite) Représentation graphique des différentes familles tout au long du domaine central. Pour prendre en compte des répétitions qui se chevauchent, les tandems sont présentés en deux lignes : une pour les tandems commençant par un nombre impair (R1-2 ; R5-6 ; etc) et une autre pour les tandems commençant par un nombre pair (R2-3 ; R4-5...). Chaque couleur indique à quelle famille le tandem appartient. En (B) sont présentés les changements structuraux des quatre tandems différents au cours de la relaxation par dynamique moléculaire, allant de l'état initial puis après 1ps (C1) et 2ps (C2). La courbe en rouge représente le RMSD du tandem, en vert le RMSD du N-terminal du tandem et en bleu le RMSD (*Root mean square deviation*) du C-terminal du tandem. Adapté de la référence (130).

Le domaine central de la dystrophine présente deux partenaires potentiels, (a) les principaux phospholipides membranaires d'une part et (b) les protéines du cytosquelette d'autre part.

a. Les phospholipides membranaires

Dans les années 1980, des études ont montré que la spectrine est capable de se lier à des ligands hydrophobes et amphipatiques (131), et indiquent que la spectrine présente des sites hydrophobes. Ensuite, de nombreuses études ont précisé *in vitro* l'interaction de la spectrine avec des modèles lipidiques (vésicules et monocouches) (132, 133).

Vu la ressemblance entre la spectrine et les répétitions du domaine central de la dystrophine, *De Wolf et al.* montrent que la répétition 2 de la dystrophine interagit avec les lipides membranaires contenant de la phosphatidylsérine (PS) et de la phosphatidylcholine (PC) via des forces électrostatiques (134). C'était une étude originale montrant *in vitro* un lien direct d'une répétition du domaine centrale de la dystrophine avec la membrane.

Notre laboratoire s'est intéressé par la suite à la caractérisation des interactions du domaine central de la dystrophine avec la membrane. Dans un premier temps, *Le Rumeur et al.* affinent l'étude sur la répétition 2 et étendent les conclusions en montrant l'implication des résidus tryptophane ainsi que des forces électrostatiques dans l'interaction avec des vésicules lipidiques (135, 136).

La recherche d'interactions possibles des autres répétitions du domaine central avec des modèles lipidiques s'est poursuivie. Mais, la production *in vitro* des répétitions individuelles de la dystrophine s'est avérée pour plusieurs d'entre elles impossible. Les études se sont alors orientées sur des protéines recombinantes constituées de deux, trois, quatre ou cinq répétitions successives. La caractérisation d'interaction avec les lipides membranaires a été réalisée principalement en utilisant les SUVs comme modèle lipidique. Deux mélanges lipidiques différents ont été utilisés dans le but de caractériser d'éventuels effets de charge: un mélange anionique formé de DOPC:DOPS et un autre zwitterionique DOPC :DOPE. Ces phospholipides ont été choisis car ils sont parmi les plus abondamment représentés dans le sarcolemme (137) . Des études impliquant des phosphoinositides, lipides très faiblement représentés dans le sarcolemme, ont montré

leur non implication dans les phénomènes de liaisons aux lipides (*Le Rumeur, E.*, résultats non publiés)

En 2008, *Legardinier et al.* montrent que la région proximale du domaine central formée par les répétitions 1 à 3 interagit fortement avec des SUVs anioniques seulement, alors que la région coiled-coil distale formée par les répétitions 20-24 ne présente aucune liaison avec les lipides membranaires (138). Un an plus tard, l'interaction avec les SUVs anioniques a été montrée sur toute la région coiled-coil centrale formée des répétitions 4 à 19, et cela en utilisant des constructions de 3 ou 5 répétitions successives (4-7 ; 7-9; 9-11; 10-12; 12-14; 14-16 et 17-19 pour les groupes de 3 répétitions et 11-15 et 14-17 pour les groupes de 5 répétitions) (139). Parmi ces 24 répétitions homologues à la spectrine, seule la protéine formée par les répétitions 11-15 est capable d'interagir, en plus des SUVs anionique, avec les SUVs zwitterioniques (139).

Or, en présence des SUVs anioniques, la fluorescence du tryptophane des fragments de la dystrophine augmente, indiquant que les W de la protéine sont incorporés dans un environnement hydrophobe, probablement dans la partie hydrophobe de la bicouche des SUVs (**Fig II.1.12.**). Par contre, la présence des SUVs zwitterioniques n'engendre aucune modification de la fluorescence de W, sauf pour les répétitions R11-15 du domaine central, où un *quenching* (diminution) de fluorescence est observé (139).

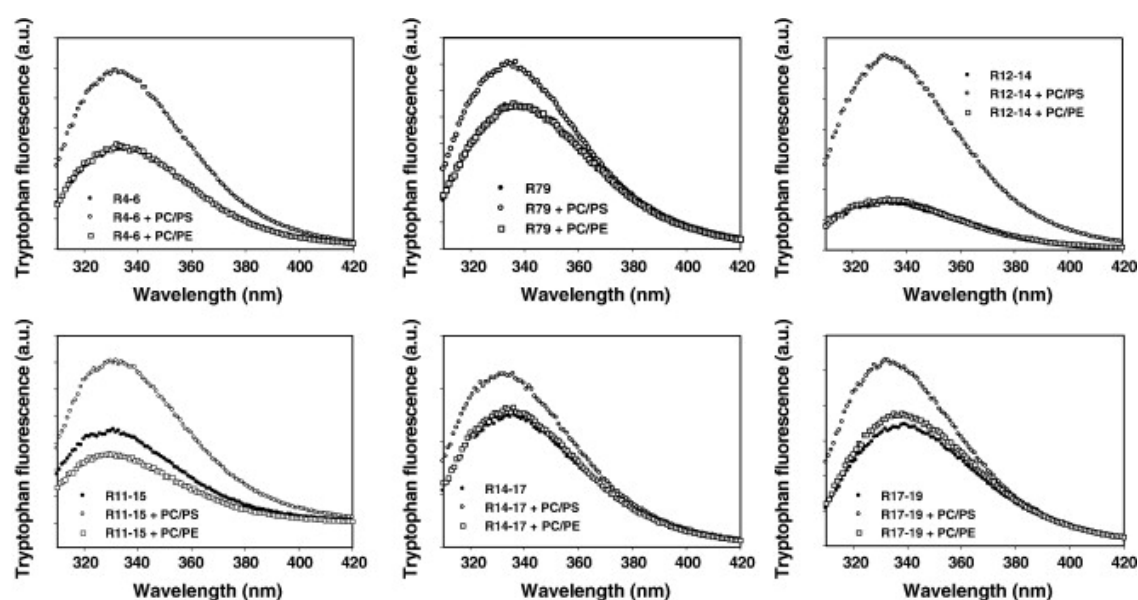


Fig II.1.12. Variation de l'intensité de fluorescence du tryptophane des différents fragments de la dystrophine, lors de l'interaction avec des SUVs anioniques et zwitterioniques. Adapté de la référence (139).

Concernant la spectrine, des études biochimiques en présence de lipides ont été réalisées sur une seule répétition, vue la possibilité de la produire *in vitro* (140, 141). Même si les auteurs ne le mentionnent pas formellement, il semble que les propriétés de liaison spectrine-lipides sont corrélées à la faible stabilité thermique de ces répétitions (142). Dans le cas de la dystrophine, les données sur répétition unique ne sont pas disponibles du fait de la difficulté de produire ces répétitions individuelles *in vitro*. Cependant, la spectrine n'existe pas sous forme monomère *in vivo*. L'organisation sous forme de dimère s'accompagne d'une haute stabilité de la protéine.

b. Les protéines du cytosquelette

Outre ses interactions avec le sarcolemme, le domaine central de la dystrophine interagit avec d'autres protéines du cytosquelette.

b.1- Les filaments d'actine

Le travail du groupe d'*Ervasti* a montré par des tests de co-sédimentation que les filaments d'actine (actine F) sont des partenaires importants pour la dystrophine. Ces filaments, en plus de leurs interactions avec la partie N-terminale de la dystrophine (ABD1), interagissent avec les répétitions 11-15 du domaine central, lequel constitue ainsi le second domaine de liaison à l'actine (ABD2) (25). Un an plus tard, il étend cet ABD2 jusqu'à la répétition 17 (143). La constante de dissociation (Kd) entre les fragments de la dystrophine et les filaments d'actine est de 13,7 μM pour ABD1 (domaine N-terminal de la dystrophine); 14,2 et 7,3 μM pour ABD2 formé respectivement des répétitions 11-15 et 11-17 du domaine central (**Fig II.1.13**) (25, 144).

La dystrophine, en présence du complexe DGC, se lie à l'actine avec une stœchiométrie de 1 dystrophine par 24 monomères d'actine constituant le filament (144). Or, la distance entre les 2 ABD, de la partie N-terminale jusqu'à la partie 11-17 du domaine central, est de l'ordre de 70 nm, ce qui correspond à 24 monomères d'actine dans un filament (un filament d'actine est formé de 370 monomères par micromètre (145)). Ainsi, on suppose qu'un seul filament d'actine relie les 2 ABD de la dystrophine.

La dystrophine complète présente une affinité plus grande pour l'actine que chacun de ses deux ABD individuels ($K_d = 320 \text{ nM}$) (144). Cette affinité relativement élevée de la dystrophine complète représente plus que la somme des affinités modérés des deux fragments ABD pour l'actine F (142). La signification physiologique de cette synergie d'affinités reste à déterminer.

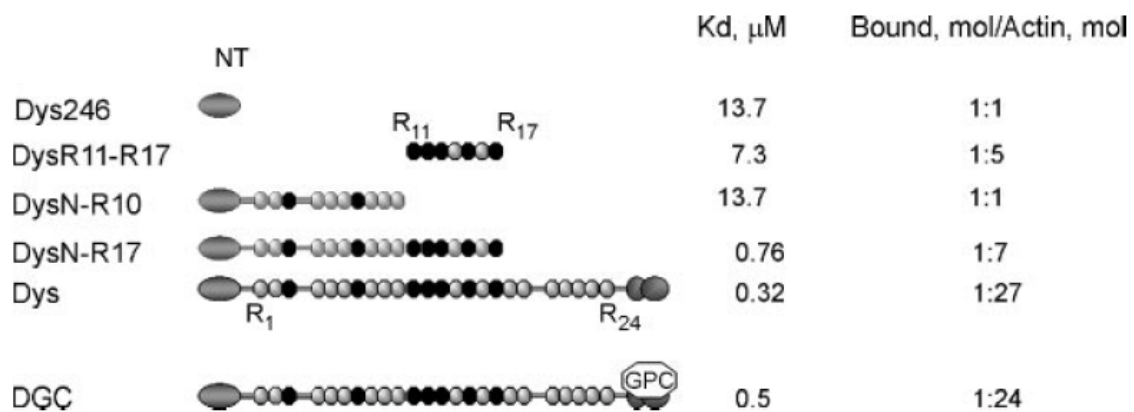


Fig II.1.13. Propriétés de liaison de la dystrophine à l'actine. Représentation schématique des différents fragments de la dystrophine (Dys246 : la partie N-terminale ; DysR11-R17 : répétitions 11 à 17 du domaine central ; DysN-R10/DysN-R17 : Partie N-terminale+ répétitions 1-10 ou 1-17 du domaine central), ainsi que de la dystrophine avec ou sans le complexe DGC (Dys ou DGC). Les zones colorées en noir sont des répétitions basiques. A droite sont présentées les valeurs de la constante de dissociation en μM , ainsi que la stœchiométrie de liaison dystrophine/actine (mole/mole). Adapté de la référence (144).

Récemment, *López-Hernández et al.* suite à des observations cliniques de phénotypes DMD, ont renforcé l'hypothèse que le site de liaison de l'actine situé dans le domaine central joue un rôle crucial dans la fonction de d'amortisseur de la dystrophine dans les cellules musculaires (146).

b.2- Les filaments intermédiaire et microtubules

En plus des filaments d'actine, le cytosquelette est constitué des filaments intermédiaires et des microtubules. Récemment, l'interaction des domaines spécifiques de la dystrophine avec ces deux éléments du cytosquelette a été identifiée

La Synémine, une protéine appartenant à la famille des filaments intermédiaires, est capable d'interagir *in vitro* avec les répétitions 11-14 du domaine ABD2 (147).

La plectine (appelé aussi *large cytolinker*), une protéine de structure qui lie les filaments intermédiaires aux filaments d'actine et aux microtubules, interagit avec la dystrophine. Cette liaison ne se fait pas au niveau du domaine central coiled-coil, mais avec le domaine adjacent riche en cystéine, créant ainsi un lien indirect avec une autre protéine intermédiaire, la desmine (148).

La Kératine 19, une protéine de la famille des filaments intermédiaires, interagit avec le domaine ADB1 N-terminal de la dystrophine (149).

Il a été observé que l'absence de la dystrophine chez les souris *mdx* conduit à une désorganisation des microtubules (150). En 2009, *Prins et al.* montrent pour la première fois que la dystrophine est capable de se lier aux microtubules (150). C'est le fragment formé par la répétition 24 du domaine central et par le domaine WW de la région riche en cystéine qui co-sédimente avec les microtubules.

b.3- Interaction avec nNOS

Comme indiqué auparavant, nNOS se lie au complexe DGC *via* son interaction avec la syntrophine. En plus de cette interaction, nNOS se lie directement à la dystrophine *via* les répétitions 16-17 du domaine central (151). *Lai et al.* montrent que l'expression des minidystrophines contenant les répétitions 16 et 17 (codé par les exons 42-45) chez les souris *mdx*, restaure une localisation de nNOS au sarcolemme (**Fig II.1.14**) avec une amélioration de la force musculaire (151). Les auteurs en déduisent alors que nNOS implique deux interactions différentes dans le sarcolemme : une première entre le domaine PDZ de nNOS et les répétitions 16-17 du domaine central de la dystrophine, et une seconde entre le domaine PDZ (*β finger*) de nNOS et le domaine PDZ de la syntrophine.

En 2010, *Yamashita et al.* montrent que les répétitions 8 et 9 de la dystrophine et de l'utrophine, interagissent avec PAR-1b (Polarity-regulating Kinase 1-b), et que la sérine en position 1258 de la répétition 9 est spécifiquement phosphorylée par PAR-1b (152).

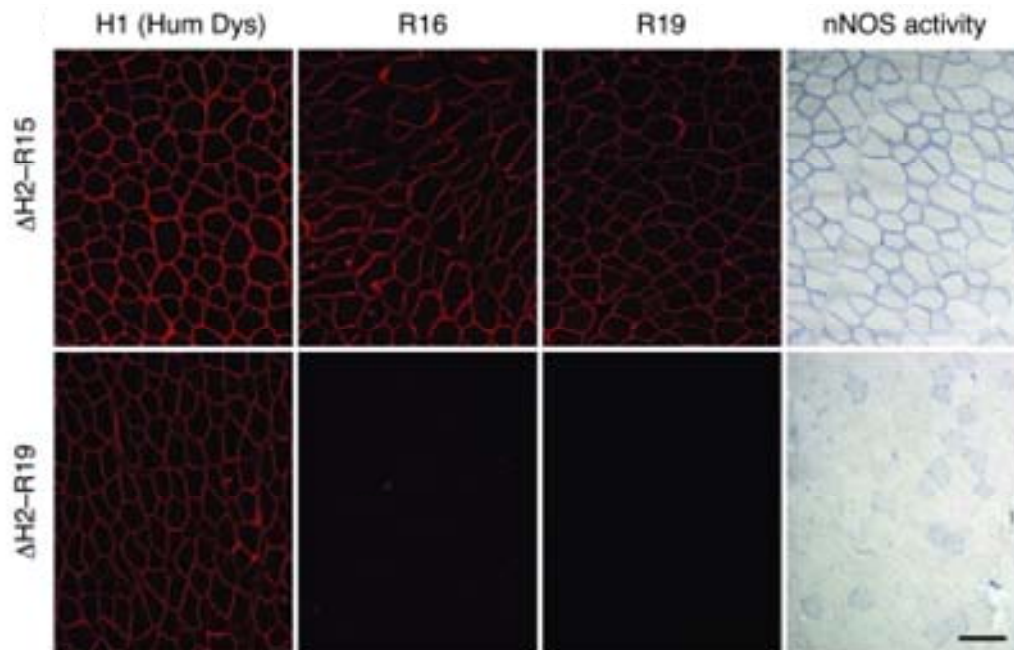


Fig II.1.14. Immunolocalisation de la dystrophine et de nNOS. L'immunolocalisation a été réalisée sur les muscles des souris *mdx*, après l'expression de deux minidystrophines : la première ayant une délétion $\Delta H2-R15$ et la seconde une délétion $\Delta H2R19$. Le marquage est fait grâce à des anticorps spécifiques de la dystrophine (au niveau H1, R16 et R19) et nNOS. Seule l'expression de la dystrophine contenant les répétitions 16-17 est associée à une activité de nNOS. Barre d'échelle de 100 μm . Adapté de la référence (151).

Comme décrit auparavant, les études de dynamique moléculaire ont montré une grande flexibilité entre les répétitions 10-11 d'une part et 15-16 d'autre part, conférant ainsi à la région R11-15 une identité spécifique. Cette région est capable de lier l'actine F (25) ; la région 11-17 a également été proposée comme ABD2 (143). Il n'existe pas à ce jour de réelle cartographie moléculaire du domaine qui est en interaction avec l'actine F. Cependant, la configuration minimale qui a été à ce jour déterminée comme liant l'actine est le fragment allant de la répétition 11 à environ la moitié de la répétition 15 (153). Le fragment R11-15 pourrait donc représenter le strict ABD2. De plus, une étude récente montre que les répétitions R16-17 jouent un rôle spécifique en interagissant avec nNOS (151). Par conséquent, la dynamique des deux *linkers* non hélicoïdaux de R10-11 et R15-16 jouerait un rôle crucial dans la régulation de l'interaction des deux régions voisines, formées par R11-15 et R16-17, avec leurs partenaires : actine F, nNOS et lipides membranaires.

Une représentation schématique actualisée de la dystrophine et de ses partenaires est présentée dans la **Fig II.1.15**.

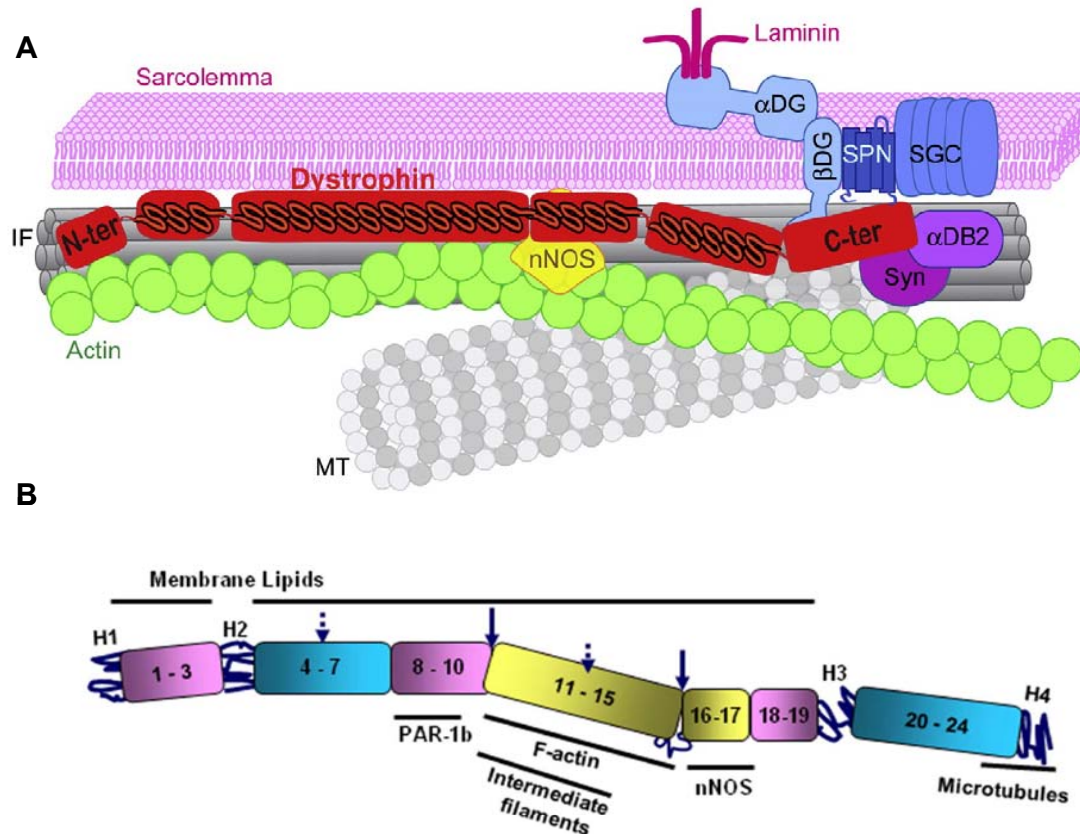


Fig II.1.15. Représentation actualisée de la dystrophine et de ses partenaires. (A) La dystrophine (en rouge) est représentée dans le contexte cellulaire avec ses différents partenaires, notamment avec les lipides membranaires du sarcolemme. IF correspond aux filaments intermédiaires, MT aux microtubules. Adapté de la référence (142). En (B) sont présentés les différents fragments du domaine central avec leurs partenaires. H1-H4 correspond aux 4 charnières. En violet sont présentées les répétitions les plus électronégatives qui appartiennent à la famille 1 identifiée par modélisation moléculaire (cluster 1). En bleu les répétitions ayant des propriétés électrostatiques intermédiaires et correspondant aux familles 2 et 3. En jaune les répétitions les plus basiques appartenant aux familles 3 et 4. Les deux flèches pleines indiquent les nouvelles jonctions identifiées comme assez mobiles. Les lignes noires indiquent les partenaires tout au long du domaine central. Adapté de la référence (130).

II.1.C. Le point sur les traitements de la myopathie

Après un siècle de caractérisation de la Myopathie de Duchenne et après 20 ans d'identification et du séquençage du gène à l'origine des myopathies (Duchenne et Becker), il n'existe toujours pas de traitements curatifs de ces pathologies. Cependant, différents traitements d'ordre palliatif sont actuellement proposés dans le but de réduire les différentes conséquences engendrées par l'absence totale de la dystrophine et sont résumés dans la **Fig II.1.16**.(154).

On distingue des traitements pharmacologiques tels que :

- Le prednisone, un glucocorticoïde avec des propriétés anti-inflammatoires (155), de promotion de la myogenèse et de la réparation des fibres (156) ; mais beaucoup des effets secondaires sont apparus et les chercheurs sont tournés vers ses dérivés comme le déflazacort (157).
- Des antibiotiques de la famille des aminoglycosides. La majorité des mutations du gène de la dystrophine induit des codons stop. Des tests chez la souris *mdx* (muscular dystrophy X-linked) ont donné des résultats prometteurs montrant la capacité de ces antibiotiques à passer le codon stop et de rétablir l'expression de la dystrophine. Malheureusement, cet effet n'est pas observé chez l'homme (158-160).
- D'autres traitements existent comme par exemple ceux qui visent à diminuer la protéolyse des fibres musculaires en réduisant l'activité des protéases calcium-dépendantes (161). Des traitements spécifiques de la réponse inflammatoire sont aussi envisageables dans le but de diminuer la mort cellulaire et la fibrose (162). Enfin, des traitements visant l'augmentation de la masse musculaire et la régénération des fibres sont basés sur l'utilisation de facteurs de croissance et d'anabolisants (163, 164) et sur l'inhibition de l'action de la myostatine, un inhibiteur de la différenciation de la prolifération des muscle (165).

Ces traitements pharmacologiques sont souvent accompagnés par des soins de kinésithérapie pour lutter contre l'affaiblissement musculaire, de la chirurgie et la mise en

place d'appareillages correctifs lors de l'apparition des problèmes moteurs, des aides à la ventilation et la kinésithérapie respiratoire et l'adaptation de la nourriture pour faciliter la déglutition.

D'autres stratégies de traitements sont aussi envisagées, notamment le remplacement de la dystrophine par l'utrophine (protéine similaire). La surexpression de l'utrophine dans les muscles des souris *mdx* diminue la nécrose et la fibrose musculaire et restaure la localisation des protéines du DGC à la membrane (166). Mais malgré son expression, l'utrophine n'est pas fonctionnellement aussi efficace que la dystrophine. Cela pourrait être dû à l'absence du domaine ABD2 qui n'existe pas chez l'utrophine(144).

Mais quelles sont les grandes stratégies thérapeutiques en cours d'exploration ?

Deux grands types se présentent:

- II.1.C-1. Les thérapies géniques.
- II.1.C-2. Les thérapies cellulaires.

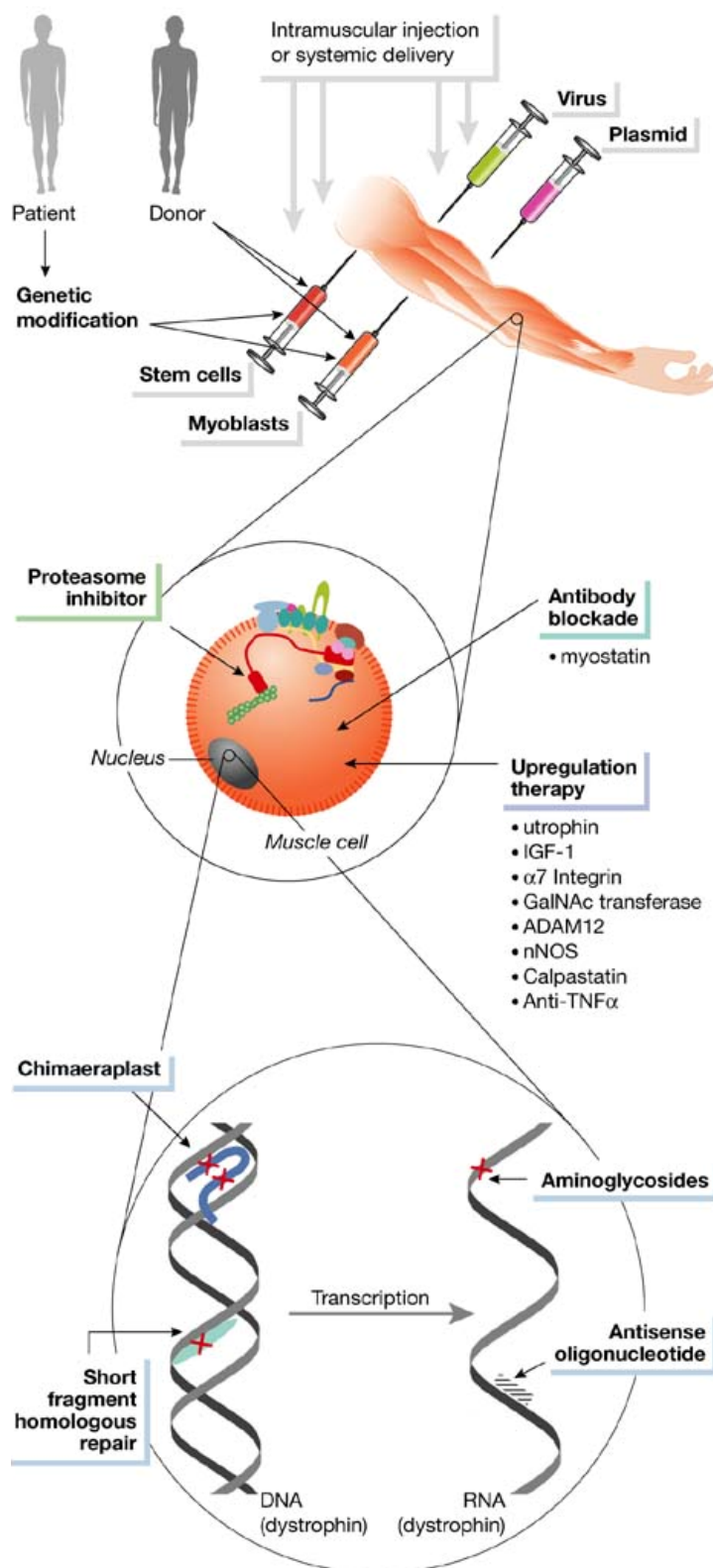


Fig II.1.16. Illustration des principales thérapies envisagées contre les myopathies de Duchenne et de Becker. Adapté de la référence (154).

Des traitements pharmacologiques sont utilisés afin d'inhiber la dégradation protéique et d'augmenter la régénération musculaire.

Une stratégie consiste à introduire une copie du gène de la dystrophine en utilisant soit des vecteurs viraux ou plasmidiques, soit des cellules souches embryonnaires ou des myoblastes adultes.

D'autres recherches se concentrent sur le remplacement de la dystrophine par l'utrophine, une protéine de la même famille.

Enfin, des études visent à réparer l'ARNm en éliminant l'exon (ou les exons) défectueux en utilisant des oligonucléotides anti-sens.

Abréviations :

GF1 : le facteur de croissance homologue à l'insuline; nNos : l'oxyde nitrique synthase; TNF- α : facteur- α de nécrose tumorale.

II.1.C-1. Les thérapies géniques

a. Transfert d'une copie sauvage du gène de la dystrophine

Le but est de réintroduire une copie du gène de la dystrophine qui doit conduire à une expression et une production de la protéine chez les patients. La difficulté est surtout d'atteindre toutes les fibres musculaires et que le gène s'exprime d'une façon pérenne sans effets nocifs pour le patient. Une autre difficulté technique s'ajoute : la taille de l'ADNc de la dystrophine qui est de 14kb alors que les capacités de transport des vecteurs viraux utilisés en thérapie génique sont beaucoup plus faibles. Différents moyens de transfert sont utilisés : les plasmides bactériens et les vecteurs viraux.

▪ *Les plasmides bactériens :*

C'est un moyen simple pour introduire de l'ADN dans un organisme avec l'avantage de production en grande quantité tout en restant peu immunogène. Au début des années 1990, *Asjadi et al.* (167) ont transféré une copie sauvage de la dystrophine en injectant directement dans le muscle des souris *mdx*, des vecteurs contenant l'ADNc. Or, la restauration de l'expression de la dystrophine n'a été observée que dans 1% des fibres musculaires. Par contre, l'injection de l'ADNc dans le système vasculaire au lieu du système musculaire, mène à l'expression de la dystrophine dans 10% des fibres musculaires (168-170). Ce type d'injection a permis, en plus de l'expression de la dystrophine, sa localisation sous la membrane avec une baisse de la dégénérescence musculaire. L'expression de la dystrophine est perdue dans les 6 mois qui suivent l'injection. Un développement d'anticorps anti-dystrophine sans réponse immunitaire cellulaire est observé à l'encontre des fibres exprimant la dystrophine. Cette méthode prometteuse a fait l'objet d'un test clinique en 2002 sur 9 patients atteints de la myopathie et 6/9 ont montré une expression de la dystrophine quelques semaines après l'injection (171).

▪ *Les vecteurs viraux :*

L'utilisation des virus comme vecteur de transfert de gène est de plus en plus répandue dans les stratégies de thérapie génique. Deux grands avantages se présentent par rapport aux plasmides : d'une part l'augmentation du potentiel de pénétration de l'ADN dans les fibres et d'autre part, la possibilité de cibler des types cellulaires spécifiques. Par contre, même si le virus est inactif, une pathogénicité accrue peut se manifester. Les vecteurs viraux les plus utilisés sont les adénovirus, les rétrovirus et les AAV (*adeno associated virus*).

Les adénovirus infectent les muscles efficacement et permettent une production de dystrophine en grande quantité chez les souris *mdx*, mais ils sont très immunogènes (172).

Les rétrovirus sont beaucoup moins immunogènes mais l'obstacle majeur est la faible efficacité d'infection des fibres musculaires. Ces virus sont de plus difficiles à produire (173).

Les AAV sont les meilleurs vecteurs viraux. Leur introduction ne provoque pas de réponse immunitaire exagérée mais par contre, ils infectent les fibres musculaires avec une grande efficacité. L'avantage majeur est l'assurance de l'expression du transgène pour une longue période (174, 175).

La capacité maximale de transport des AAV ne dépasse pas les 4kb. C'est pour cela que les chercheurs essaient d'élaborer une «dystrophine minimale» ou minidystrophine, qui rentrerait dans le vecteur d'une part, et qui permettrait de rétablir la fonction musculaire et empêcherait la dégénérescence d'autre part. La plus petite construction capable de restaurer un phénotype normal chez des souris *mdx* contient un ADNc de 3,6 kb (contre 14 kb pour le gène entier) et encodant une «micro-dystrophine». L'expression de cette protéine est plus efficace que celle d'une protéine de plus grande taille, appelée «mini-dystrophine» (**Fig II.1.17.**) (176).

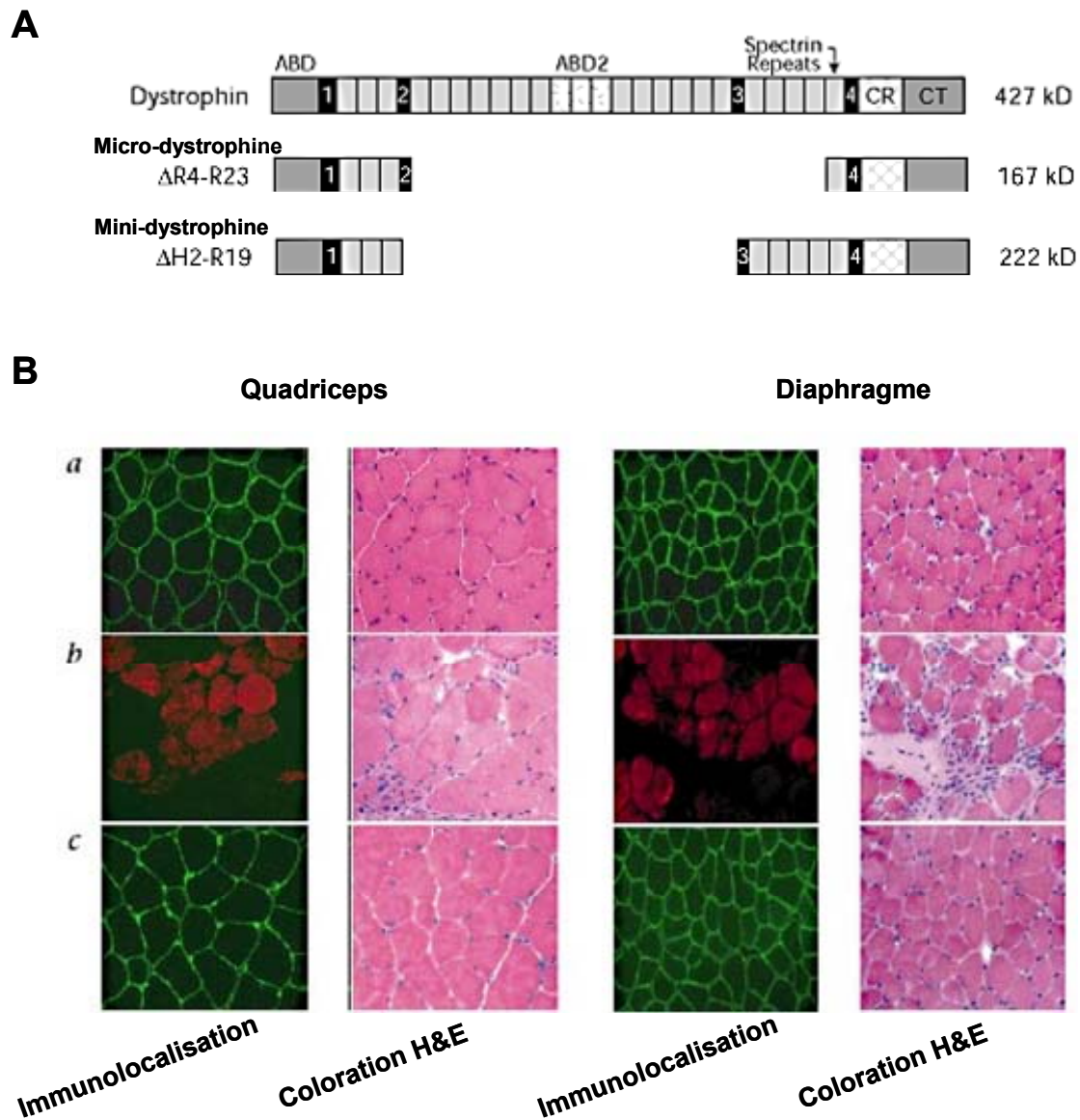


Fig II.1.17. Exemple de thérapie génique chez la souris en utilisant les vecteurs AAV.
 (A) Schéma des 2 constructions de la dystrophine les plus courtes : la mini et la micro-dystrophine. (B) Étude histologique sur les muscles du quadriceps et du diaphragme chez des souris normales (a), des souris *mdx* (b) et chez des souris *mdx* après injection de la micro-dystrophine via les AAV (c). Les images en (b) montrent l'absence de la dystrophine chez les souris *mdx* et présentent une grande perméabilité membranaire pour le bleu Evans (en rouge). L'expression de la micro-dystrophine restaure un phénotype musculaire normal chez les souris *mdx* (c). Adapté de la référence (176).

b. Réparation d'ADN ou d'ARN

Dans la plupart des myopathies, les différentes mutations affectant le gène de la dystrophine sont soit ponctuelles, soit de très courtes délétions ou insertions ne concernant qu'un exon. L'idée est alors de remplacer la séquence mutée par une séquence sauvage ; soit via le mécanisme de remplacement homologue de petits fragments d'ADN double brin (177), soit par injection de chimère ADN-ARN de séquence homologue à la région mutée pour stimuler la réparation de l'ADN (178). Ces techniques présentent une efficacité de 2 à 15% chez les souris *mdx*.

L'avancée la plus prometteuse de ces dernières années consiste à réparer l'ARNm de la dystrophine au lieu de l'ADN. C'est l'*exon-skipping* ou saut d'exon (**Fig II.1.18**). Schématiquement, le principe du « saut d'exon » est de court-circuiter les aberrations du code génétique, pour obtenir un message raccourci mais cohérent, de façon à rétablir partiellement la production de la protéine déficiente. Il s'agit d'utiliser des oligonucléotides anti-sens, capables de se fixer à la jonction exon-intron de l'ARNm de la dystrophine dans le but d'empêcher l'épissage des exons défectueux et de rétablir le cadre de lecture. De ce fait, la dystrophine est tronquée mais présente. Cela ne provoque aucune réponse immunitaire.

Une mutation ponctuelle au niveau de l'exon 23 fait apparaître un codon stop chez des patients. Une protéine incomplète est obtenue ; mais vu son instabilité, elle est rapidement dégradée. Cela conduit à une absence totale de la dystrophine et apparition d'une DMD (179). Dans le but de réparer ce problème, *Wells et al.* (180) ont utilisé des oligonucléotides capables de se lier à l'exon 23. Cette liaison rétablit le cadre de lecture et conduit à la formation d'une protéine plus courte, mais partiellement fonctionnelle. Ainsi, l'injection intramusculaire d'oligonucléotides chez les souris *mdx* augmente de 20 à 30 % l'expression de la forme tronquée de la dystrophine (180).

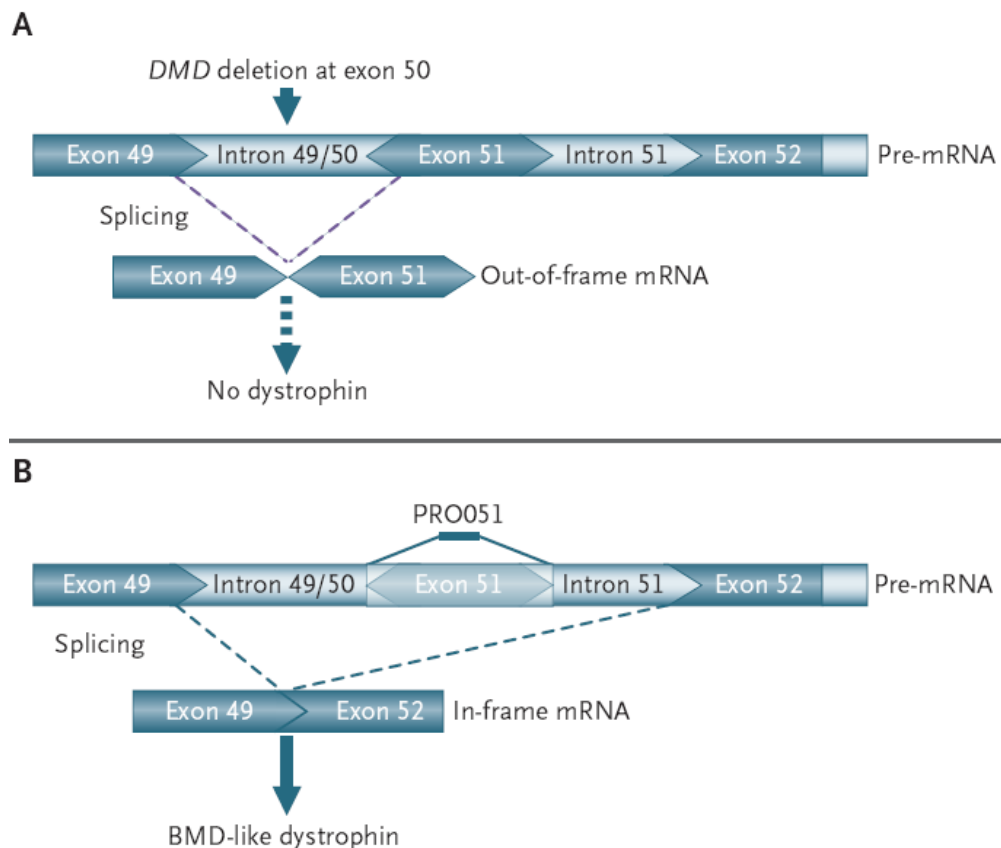


Fig II.1.18. Représentation schématique de la stratégie de saut d'exon (exon skipping). (A) La délétion de l'exon 50 chez le patient atteint d'une DMD conduit à un épissage de l'exon 49 avec l'exon 51. En conséquence, un codon stop est généré par l'exon 51 qui arrête la synthèse de la dystrophine. (B) La liaison spécifique de l'oligonucléotide antisens PRO051 avec l'exon 51 permet le saut de cet exon, et en conséquence, évite la formation d'un codon stop et rétablit le cadre de lecture. Ainsi, une dystrophine tronquée, similaire à celle observée chez des patients BMD, est obtenue. L'objectif est de transformer une DMD en BMD la moins sévère possible. Adapté de la référence (181).

Les AAV peuvent être utilisés pour délivrer les oligonucléotides anti-sens. Le grand avantage est l'augmentation d'une part de l'efficacité de l'entrée du plasmide dans les cellules et d'autre part l'efficacité de l'expression. En 2004, *Goyenvalle et al.* (182) montrent qu'une simple injection intra artérielle du vecteur AAV exprimant des oligonucléotides anti-sens chez des souris *mdx* (ciblant l'exon 23) restaure l'expression de la dystrophine tronquée à un taux comparable à celui observé chez des souris sauvages dans quasiment toutes les fibres musculaires (>80%) (**Fig II.1.19- I.**) (182). Des injections dans le muscle présentent une efficacité beaucoup plus locale (182).

Très récemment (juillet 2011), un essai clinique de pharmacogénétique, publié par *Cirak et al.* dans « *The Lancet* », s'est révélé encourageant (183). Les premiers résultats ont été présentés lors du 4^e Congrès de Myologie en mai 2011 à Lille (France). Cette étude a été menée au Royaume-Uni sur 19 garçons myopathes de 5 à 15 ans encore capables de marcher. Ils ont reçu pendant 12 semaines des injections intraveineuses du vecteur AAV exprimant des oligonucléotides anti-sens (appelés AVI-4658, capables d'engendrer un saut de l'exon 51 (184)). Le traitement a été bien toléré et, pour sept patients, la réponse a été « *significative* » pour la restauration de l'expression de la dystrophine (jusqu'à 18 % des niveaux normaux) (**Fig II.1.19- II.**). Les chercheurs n'ont cependant pas mis en évidence de modifications significatives de la fonction musculaire, comme par exemple une amélioration de la distance de marche parcourue en 6 minutes.

« *AVI-4658 a le potentiel pour améliorer l'histoire naturelle de la myopathie de Duchenne et doit maintenant être testé dans des essais cliniques d'efficacité* », ont annoncé ces chercheurs.

Des résultats prometteurs d'un autre traitement expérimental concernant le saut d'exon 51, porté par les sociétés Prosensa et GSK, ont également été présentés en mai 2011 à Lille.

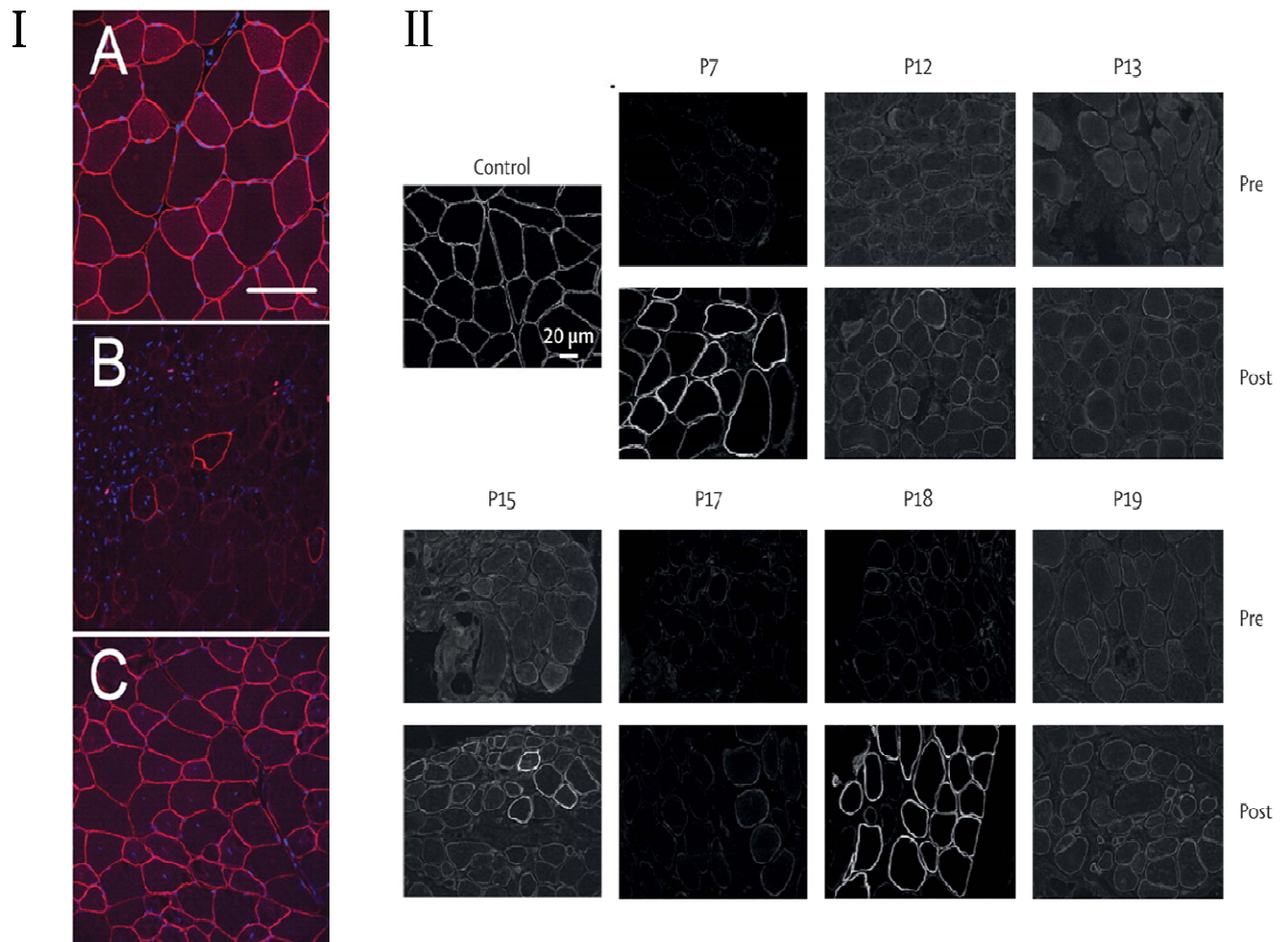


Fig II.1.19. Essais de thérapie génique par saut d'exon en utilisant les vecteurs AAV.

- (I) : Immunofluorescence de localisation de la dystrophine chez des souris normales (A), des souris myopathes *mdx* (mutation au niveau de l'exon 23) (B) et des souris *mdx* après 4 semaines de traitement (C), qui manifestent une expression normale de la dystrophine. Adapté de la référence (182)
- (II) Immunofluorescence de localisation de la dystrophine chez les garçons myopathes (DMD liée à une mutation au niveau de l'exon 51) qui ont participé au test clinique rapporté par *Cirak et al.* L'image contrôle montre la présence de la dystrophine chez les garçons non atteints de myopathies. Les autres images numérotées de P7 à P19 (P pour patient suivi par le numéro du patient) montrent les études histologiques du muscle, avant (*Pre*) et après traitement (*Post*). Les patients P7, P15 et P18 restaurent significativement l'expression de la dystrophine tronquée avec des augmentations de fluorescence de 19, 27 et 19% respectivement. Adapté de la référence (183).

II.1.C-2. Les thérapies cellulaires

Toujours dans le but de restaurer l'expression de la dystrophine chez les patients myopathes, une autre stratégie que la thérapie génique peut être envisagée : c'est la thérapie cellulaire. Dans ce type d'études, des cellules porteuses de la copie fonctionnelle du gène de la dystrophine sont introduites et fusionnent avec les fibres musculaires existantes. Cela engendre une production de dystrophine qui, idéalement, sera répandue dans toute la fibre.

Le transfert des myoblastes (ou cellules satellites qui sont engagées dans la différenciation musculaire) a été l'une des premières thérapies cellulaires mise en place en 1989 (185). D'autres tests cliniques ont été réalisés ultérieurement chez des patients DMD (186). L'inconvénient de ces thérapies est surtout la faible survie des myoblastes après injection, et leur migration qui est limitée autour de la zone d'injection. Ajoutons la réponse immunitaire importante qui conduit à un rejet des myoblastes du donneur sain par l'organisme du patient receveur.

Le transfert de cellules souches qui sont capables de se différencier en différents types cellulaires a été envisagé. Selon *Peng & Huard* (187), l'utilisation de ces cellules augmente l'expression de la dystrophine avec une régénération musculaire plus importante. Le principal avantage par rapport aux myoblastes est la capacité de prolifération plus élevée ainsi que leur pouvoir de migrer du système vasculaire jusqu'aux tissus.

En 2004, *Bachrach et al.* ont utilisé des cellules souches d'origine murine (souris *mdx*^{5cv}) infectées par un vecteur viral contenant une micro-dystrophine (188). Ces cellules ont été injectées via la veine de la queue chez des souris *mdx*. Cela a restauré l'expression de la dystrophine, et les muscles ne présentent plus le phénotype de la myopathie.

II.1.D. CONCLUSIONS ET CONTEXTE DU TRAVAIL

La dystrophine est une protéine associée au cytosquelette qui participe à un complexe macromoléculaire possédant plusieurs fonctions majeures notamment le maintien de la structure cellulaire en liant son cytosquelette à la matrice extracellulaire. Mais, le grand nombre d'interactions connues avec la dystrophine complique la compréhension de son mécanisme d'action. Malgré la grande ressemblance de ces répétitions du domaine central, il semble que la fonction de chaque répétition, ou groupe de répétitions, est bien spécifique.

D'autre part, la grande taille de la dystrophine rend difficile les essais de thérapie génique. Il est donc souhaitable de réduire la taille de la protéine exprimée. Le problème majeur reste le ciblage de la micro ou minidystrophine idéale ou au moins la plus efficace. Un aspect crucial du problème réside dans le choix des domaines/répétitions à conserver ou à éliminer. Le lien phénotype/génotype n'est pas simple à établir et ne se résume pas à une proportionnalité entre taille de la dystrophine et efficacité cellulaire.. D'où la nécessité de mieux comprendre les propriétés physico-chimiques de chaque domaine/répétition du domaine central, dans le but d'améliorer au maximum l'efficacité des mini/microdystrophines thérapeutiques, tout en ciblant une molécule la plus courte possible.

L'intégration des données physico chimiques concernant la protéine exprimée à terme et de son potentiel de propriétés biologiques est un aspect du développement stratégiques des thérapies géniques ou cellulaires qui apparaît donc aussi important que le développement des vectorisations.

Notre travail de thèse s'inscrit dans cette problématique : la connaissance approfondie des propriétés physico-chimiques du domaine central de la dystrophine est un enjeu clé dans le design de micro / minidystrophines thérapeutiques.

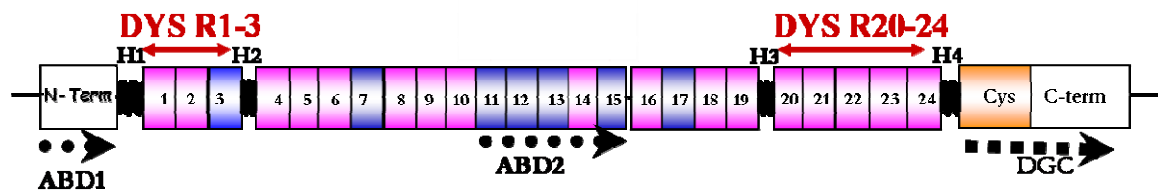
Pour l'ensemble de ce travail expérimental, nous avons ciblé des sous-domaines du domaine central de la dystrophine humaine : DYS R 1-3, DYS R20-24 et DYS R 11-15.

L'expression de ces protéines dans *E.coli* et leur purification par chromatographie d'affinité sont réalisées au laboratoire selon les protocoles expérimentaux décrits dans les références (138, 139).

Chapitre 2 – DYS R1-3, DYS R20-24 et membrane

Dans ce chapitre, nous présenterons les résultats obtenus sur deux fragments du domaine central de la dystrophine humaine.

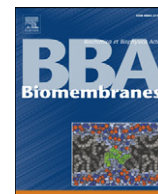
Le premier fragment est formé des répétitions 1 à 3 (DYS R1-3) situé entre les charnières 1 et 2, en aval du domaine N-terminal. Le second fragment est constitué des répétitions 20 à 24 (DYS R20-24) situé entre les charnières 3 et 4, en amont des deux domaines, riche en cystéine et le domaine C-terminal. Ces deux fragments, DYS R1-3 et DYS R20-24, se trouvent proche du domaine ayant des propriétés de liaisons à l'actine (ABD1) et de la partie qui se lie au complexe DGC, respectivement.



Cette étude, menée par l'équipe RMN-ILP et V.Vié de l'équipe Biophysique de l'Institut de Physique de Rennes (IPR), consiste à comparer les propriétés des deux fragments aux interfaces air/eau ou lipide/eau. Les études aux interfaces ont été réalisées au sein de l'IPR.

J'ai notamment contribué aux études de la cinétique d'adsorption de la protéine en présence de monocouches lipidiques, ainsi que les dépôts sur substrat solide et caractérisation topographique par AFM.

Les études d'orientation de la protéine au sein de la monocouche ont été réalisées en utilisant le PM-IRRAS (Polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy), en collaboration avec B.Desbat de l'Université de Bordeaux 1.



Specific anchoring modes of two distinct dystrophin rod sub-domains interacting in phospholipid Langmuir films studied by atomic force microscopy and PM-IRRAS

V. Vié^{a,*}, S. Legardinier^b, L. Chieze^a, O. Le Bihan^a, Y. Qin^a, J. Sarkis^{a,b}, J.-F. Hubert^b, A. Renault^a, B. Desbat^c, E. Le Rumeur^b

^a Université de Rennes 1, Institut de Physique UMR CNRS 6251, Rennes, France

^b Université de Rennes 1, UMR CNRS 6026, IFR140, Rennes, France

^c Université de Bordeaux 1, CBMN UMR CNRS 5248, ENITAB, 33607 Pessac, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 November 2009

Received in revised form 2 April 2010

Accepted 7 April 2010

Available online 14 April 2010

Keywords:

Dystrophin rod domain

Spectrin-like repeats

Langmuir films

Atomic force microscopy

Polarization modulation infrared spectroscopy

ABSTRACT

Dystrophin rod repeats 1–3 sub-domain binds to acidic phosphatidylserine in a small vesicle binding assay, while the repeats 20–24 sub-domain does not. In the present work, we studied the adsorption behaviour of both sub-domains at the air/liquid interface and at the air/lipid interface in a Langmuir trough in order to highlight differences in interfacial properties. The adsorption behaviour of the two proteins at the air/liquid interface shows that they display surface activity while maintaining their alpha-helical secondary structure as shown by PM-IRRAS. Strikingly, R20–24 needs to be highly hydrated even at the interface, while this is not the case for R1–3, indicating that the surface activity is dramatically higher for R1–3 than R20–24. Surface-pressure measurements, atomic force microscopy and PM-IRRAS are used in a Langmuir experiment with DOPC–DOPS monolayers at two different surface pressures, 20 mN/m and 30 mN/m. At the lower surface pressure, the proteins are adsorbed at the lipid film interface while maintaining its alpha-helical structure. After an increase of the surface pressure, R1–3 subsequently produces a stable film, while R20–24 induces a reorganization of the lipid film with a subsequent decrease of the surface pressure close to the initial value. AFM and PM-IRRAS show that R1–3 is present in high amounts at the interface, being arranged in clusters representing 3.3% of the surface at low pressure. By contrast, R20–24 is present at the interface in small amounts bound only by a few electrostatic residues to the lipid film while the major part of the molecule remains floating in the sub-phase. Then for R1–3, the electrostatic interaction between the proteins and the film is enhanced by hydrophobic interactions. At higher surface pressure, the number of protein clusters increases and becomes closer in both cases implying the electrostatic character of the binding. These results indicate that even if the repeats exhibit large structural similarities, their interfacial properties are highly contrasted by their differential anchor mode in the membrane. Our work provides strong support for distinct physiological roles for the spectrin-like repeats and may partly explain the effects of therapeutic replacement of dystrophin deficiency by minidystrophins.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Dystrophin is a large filamentous cytoskeletal protein of the muscle and nerve cells, localized along the internal face of the sarcolemma [1,2]. It forms an array of filaments interacting with both cytoskeletal actin and plasma membrane, via interaction with a complex of intrinsic membrane proteins [for review, see [3]]. Interactions with membrane have also been suggested by *in vitro* studies showing that specific parts of the central rod domain interact with anionic and/or zwitterionic phospholipids [4–6]. These interac-

tions, while not yet demonstrated to be involved in a cellular environment, may be a key feature in controlling resistance to the stress of contraction–relaxation cycles in muscle cells. In the absence of dystrophin due to dystrophin gene mutations, sarcolemma ruptures are frequent and lead to cellular leakage which therefore speeds up muscle degeneration, one of the major physio-pathological processes of muscular dystrophies [7–9].

Dystrophin rod domain is made up of 24 homologous spectrin-like repeats of about 110 residues, structured in three helix coiled-coils, which could be considered as a series of three sub-domains separated by hinges, i.e. repeats 1 to 3, repeats 4 to 19 and repeats 20 to 24 [10,11].

We focused our study on repeats 1 to 3 (R1–3) and repeats 20 to 24 (R20–24) sub-domains. The first is localized close to N-terminal end which is known to be an actin domain binding while R20–24 is placed close to the C-terminal end that links to the membrane dystroglycan complex.

Abbreviations: AFM, atomic force microscopy; LB film, Langmuir–Blodgett film; PM-IRRAS, polarization modulated-infrared reflection–absorption spectroscopy

* Corresponding author. Institut de Physique de Rennes, Bât. 11, Campus Beaulieu, Université Rennes 1, France. Tel.: +33 2 23 23 56 45; fax: +33 2 23 23 67 17.

E-mail address: veronique.vie@univ-rennes1.fr (V. Vié).

In a previous work, we studied the phospholipid-binding properties of the dystrophin rod domain [5,6] using small vesicles showing that R1–3 displays phospholipid-binding properties while on the contrary, the R20–24 sub-domain does not display such properties [12]. Electrostatic forces as well as hydrophobic forces likely contribute to the binding of the R1–3 sub-domain to anionic phospholipid vesicles, leading to the formation of stable phospholipid–protein complexes which can be separated by exclusion chromatography.

However, determining the relationship of structure to function requires following the potential trans-conformation of proteins upon binding to phospholipid as well as the influence of the protein upon the lipid interfacial properties. This could be achieved by changing the membrane model, which would involve switching from the small vesicle bilayer system to monolayer films [13]. Due to their amphiphilic structure, phospholipids form a two-dimension monolayer on the liquid surface, as in a Langmuir trough, and therefore resemble half of the membrane bilayer. Their molecular arrangement can be controlled by changing temperature and molecular area, as well as sub-phase and surface pressure as previously shown with spectrin, a molecule of the same family as dystrophin [14,15]. Several techniques associated with the Langmuir trough provide information about the protein and the lipid interfacial arrangements, including surface-pressure measurement, polarization modulated-infrared reflection absorption spectroscopy (PM-IRRAS) [16,17] and atomic force microscopy (AFM) [18]. These methods are particularly well suited for studying interfacial proteins which interact with biological membranes. We have previously used these methods to improve our understanding of protein–lipid interactions of the wheat protein puroindolines [19,20]. By varying parameters such as the surface pressure in order to change the density of the lipid head-groups and the charge density, it is possible to modulate the protein interaction with lipids. It is known that electrostatic interactions are favoured by a strong surface pressure, while hydrophobic interactions are facilitated by lower surface pressure. In this study, we use this modulation approach to investigate the interfacial air/liquid and lipid/liquid properties of dystrophin sub-domain R1–3 and R20–24. We show that the R1–3 domain has a very high activity with respect to anionic phospholipid films, which allows a partial insertion of the protein, at low surface pressure, into the monolayer via hydrophobic forces. On the other hand, the R20–24 domain appears to be adsorbed at the interface solely by electrostatic forces, but only via a few residues. Understanding the potential value of the therapeutic replacement of dystrophin with mini- or micro-dystrophins requires a complete structural and functional characterization of the protein domains, including the molecular mechanisms of their interactions with lipids or proteins. Our results stress that even though these repeats share large sequence homology, they display quite different physico-chemical properties, indicating that they may have different roles in the muscle cell and that a sub-set of the repeats may be present in therapeutic molecules.

2. Materials and methods

2.1. Materials

1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoserine (DOPS) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabama, US), and were used without further purification.

2.2. Preparations of recombinant dystrophin rod domain proteins

The recombinant proteins (Table 1) were expressed in *E. coli*. Isolation and purification of the GST-proteins R1–3 and R20–24 used in these experiments have been described previously [12]. The glutha-

Table 1
Human dystrophin rod domain constructs.

Construct (number of residue)	Start and end residues	N-terminus	C-terminus
R1–3 (333)	338–668	GS(S)EVNLD...	...KSTAQISQA
R20–24 (574)	2469–3040	G ^{<i>S</i>} V ^{<i>P</i>} PALA...	...VRQLHE

*Construct of DeWolf et al. [4].

Residue in bold is the start (N-terminus column) or end (C-terminus column) residue of the repeat from the Winder alignment [11].

G^{*S*} in smaller characters and italics indicates the two residues left at the N-terminus after thrombin cleavage of the GST-tag.

tion-4B-sepharose bound GST-proteins were eluted after on-column thrombin cleavage for 48 h at 4 °C in 10 mM Tris (pH 7.5) and 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (TNE buffer). Proteins were eventually further purified on ion-exchange chromatography columns from HiTrap™ IEX Selection Kit and quantified using the BCA (bicinchoninic acid) protein assay.

2.3. Monolayer measurements

The surface pressure (π) was measured with a filter paper held by a Wilhelmy balance connected to a microelectronic feedback system ($\pi = \gamma_0 - \gamma$, where γ_0 and γ were, respectively, the surface tension value without or with presence of molecules at the air/liquid interface). Before starting the experiments, the trough was cleaned with chloroform, ethanol and water, and then filled up with TNE buffer. The air/liquid interface was cleaned from impurities by repeated aspiration and filling. Each experiment was started when the fluctuation of the surface pressure was lower than 0.2 mN/m during the compression.

2.3.1. Air/liquid interface measurements

A small circular Teflon trough containing a sub-phase volume of 4 or 8 mL was used and filled with TNE buffer. The protein was then injected from a 50 μ M stock solution into the sub-phase solution through a hole in the trough using a microsyringe. The final protein concentration ranged from 4.10^{-8} to 100.10^{-8} M. The surface pressure recordings started at the moment of protein injection into the sub-phase and continued for a further 7 h after surface pressure stabilization. Each experiment was repeated at least three times. The reproducibility of π values was estimated at ± 0.5 mN/m.

2.3.2. Lipid/liquid interface measurements

Computer-controlled and user-programmable Langmuir troughs (Nima Technology, Cambridge, UK) equipped with two movable barriers were used for surface pressure-measurements, AFM sample preparations and PM-IRRAS experiments. Lipid mixture (DOPC/DOPS (1:1, M:M)) or pure DOPC or DOPS in chloroform/methanol 2:1 (v/v) was gently deposited at the air/liquid interface of the TNE buffer sub-phase. After 10 min to allow evaporation of the solvent, lipid films were compressed by moving barriers at a rate of 20 cm²/min or 8 cm²/min in function of the trough size (700 cm² or 70 cm², respectively) and equilibrated at the desired surface pressure (from 20 to 30 mN/m). Then, the protein was injected into the sub-phase just beneath the lipid monolayer. The increase of surface pressure due to adsorption of the protein onto the monolayer was recorded continuously as a function of time. Experiments were conducted at room temperature.

2.4. Atomic force microscopy

AFM imaging of Langmuir–Blodgett films (LB films) was performed in contact mode using a Pico-plus atomic force microscope (Agilent Technologies, Phoenix, AZ) under ambient conditions with a scanner of $10 \times 10 \mu\text{m}^2$. Topographic images were acquired in

constant force mode using silicon nitride tips on integral cantilevers with a nominal spring constant of 0.06 N/m. Samples for imaging were obtained using the Langmuir–Blodgett technique from Langmuir films. After stabilization of the surface pressure, the Langmuir film was transferred onto freshly cleaved mica plates at constant surface pressure by raising the mica vertically (at 1 mm/min) through the lipid/liquid interface. Images were obtained from at least two samples prepared on different days with at least five macroscopically separated areas on each sample.

2.4.1. Analysis of the shape of protein clusters on the AFM images

AFM images of $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ size were analysed to characterize the protein clusters. For these images, the height resolution is 0.078 nm (Z -range = 20 nm; 256 grey levels). Images were exported from the AFM microscope in TIFF format, at a resolution of 24 bits and with a size of 512×512 pixels. The images were analysed with ImageJ. To determine the position of the centre, area and height of objects in the AFM images, we performed the following procedure. All images were similarly thresholded. The pixels with a grey level above the threshold were given the value 255, while the others were given a null value. Therefore, in the binarized images, we could calculate the number, the position of the centre and the area of the objects. Then, the program searched on the grey-level images for the maximal grey value around the centre of the object to determine its height.

2.5. Polarization modulated-infrared reflection-absorption spectroscopy (PM-IRRAS)

The PM-IRRAS spectra were recorded on a Nicolet (Thermo Electron, Madison, WI) 870 FT-IR spectrometer. The FT is calculated with data points every 1 cm^{-1} with a final spectral resolution of 8 cm^{-1} by co-adding 600 scans (corresponding to an acquisition time of 10 min) at different surface pressures. In these experiments, intrinsic peak widths are no lower than 25 cm^{-1} , so a spectral resolution of 8 cm^{-1} represents the minimum wavelength number difference required to discriminate accurately the presence of distinct peaks. The details of the optical setup, the experimental procedure and the two-channel processing of the detected intensity have been already described [16]. Langmuir films of protein at the air/liquid or liquid/lipid interfaces were formed on 8 mL or 60 mL Langmuir troughs, respectively, as described above. The PM-IRRAS spectra were acquired at several times during the stabilization of the surface pressure, and then displayed after subtraction of the water bands from the sub-phase (TNE buffer) spectrum or subtraction of the lipid spectrum (this is noted in the legends). They were recorded from 4000 to 940 cm^{-1} . Between 3000 and 2600 cm^{-1} , two bands are associated to the anti-symmetric and symmetric CH_2 stretching mode of lipid acyl chains. In the region from 1850 cm^{-1} to 1250 cm^{-1} , there appear the two amide I and amide II bands of the proteins and several bands of the lipid head-groups (detailed in Results section).

The analysis of PM-IRRAS spectra in terms of molecular orientation relative to the interface relies on a specific surface selection rule. The intensity and the positive or negative orientation of the IR bands relative to the interface are correlated with the transition moments [21]. In particular, the simulated PM-IRRAS spectra of the amide I and II bands for an α -helix peptide with different orientations in the film show that the ratio between the intensities of amide I and amide II bands $R_{\text{I/II}}$, is dependent on the tilt angle θ of the helix with respect to the normal to the interface [21–23]. It is worth to note that dystrophin is a large filamentous protein and that the sub-domains studied here are composed of five (R20–24) or three (R1–3) repeats, each constituted by three helices structured in coiled-coil. Then the helices should be essentially parallel in a repeat and the repeats in each sub-domain are more or less in the same plane.

Experiments are conducting on different days with two batches of protein purification.

3. Results

Before investigating the properties of dystrophin repeats in interaction with lipids in the monolayer, characterization of the protein properties at the air/liquid interface was performed. This is done firstly to determine the concentration to be used to avoid a potential aggregation of protein in the solution and secondly, to establish the protein saturation of the interface. Furthermore, PM-IRRAS is used to detect the modifications of protein conformation.

3.1. The amphiphilic character of both proteins promotes their adsorption without drastic structural changes

Adsorption of the two proteins at the air/liquid interface was studied using surface pressure, and PM-IRRAS.

3.1.1. Effect of protein concentration on surface pressure at the air/liquid interface

Proteins dissolved in TNE buffer were injected into the sub-phase of a 4 mL trough filled with the same buffer in the range 4.10^{-8} to 100.10^{-8} M . For each concentration, the kinetic of the protein adsorption was followed by recording the surface pressure. The maximal surface pressure or final surface pressure reached at the equilibrium (“pseudo equilibrium”) protein adsorption is noted. Fig. 1A reports the variations of the final surface pressures according to the protein concentration in bulk. It can be observed that increasing concentrations of both proteins led to a progressively greater interfacial pressure until maximal values of 20.4 and 19.7 mN/m observed for R1–3 and R20–24, respectively. Above a protein concentration of 20.10^{-8} M surface pressures were effectively constant. These results show that the proteins display a pronounced surface activity. The beginning of this plateau is observed at a protein concentration of $16.6.10^{-8} \text{ M}$ then this concentration was sufficiently low to avoid potential aggregation of proteins in the sub-phase and it was adopted for further experiments.

3.1.2. PM-IRRAS spectroscopy

Possible changes in conformation and orientation of the two proteins at the air/liquid interface were examined using polarization modulated-infrared absorption-reflection spectroscopy (Fig. 1B and C). Spectra were acquired immediately after the protein injection at the bulk concentration of $16.6.10^{-8} \text{ M}$, when the surface pressure started to increase, at the beginning of the plateau (only for R20–24) and after complete stabilization of the surface pressure at 18.5 mN/m and 18.7 mN/m for R20–24 and R1–3 respectively.

A general inspection of the graphs indicates the presence of two specific bands centred at 1653 cm^{-1} and 1545 cm^{-1} attributed to the amide I and amide II signals, respectively.

As regards R20–24 (Fig. 1B), in the first spectrum acquired just after the protein injection, the amide I region is strongly distorted by the presence of a negative band appearing between 1500 and 1700 cm^{-1} with a very weak maximum at 1655 cm^{-1} . This behaviour has been previously observed and calculated for a highly hydrated protein monolayer at the interface [24]. In this condition, the amide bands are very broad and their intensities sometimes decrease by one order of magnitude. First of all, the amide I peak is very broad and the spectra show shoulders characteristics of turns and random structure (~ 1675 and $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$) in addition to the alpha-helix structure. The amide I signal increases and remains stable during stabilization of the surface pressure at 18.5 mN/m. In contrast to amide I, the amide II band increases during the kinetic experiment. Therefore, during the adsorption, there is an increase of matter at the interface as well as a reorientation. We previously showed that it is possible to use the amide I/II intensity ratio, $R_{\text{I/II}}$, to determine the average angle with respect to the normal to the monolayer between the protein and the interface [25]. Here, the very high value of $R_{\text{I/II}}$ indicates an alpha-

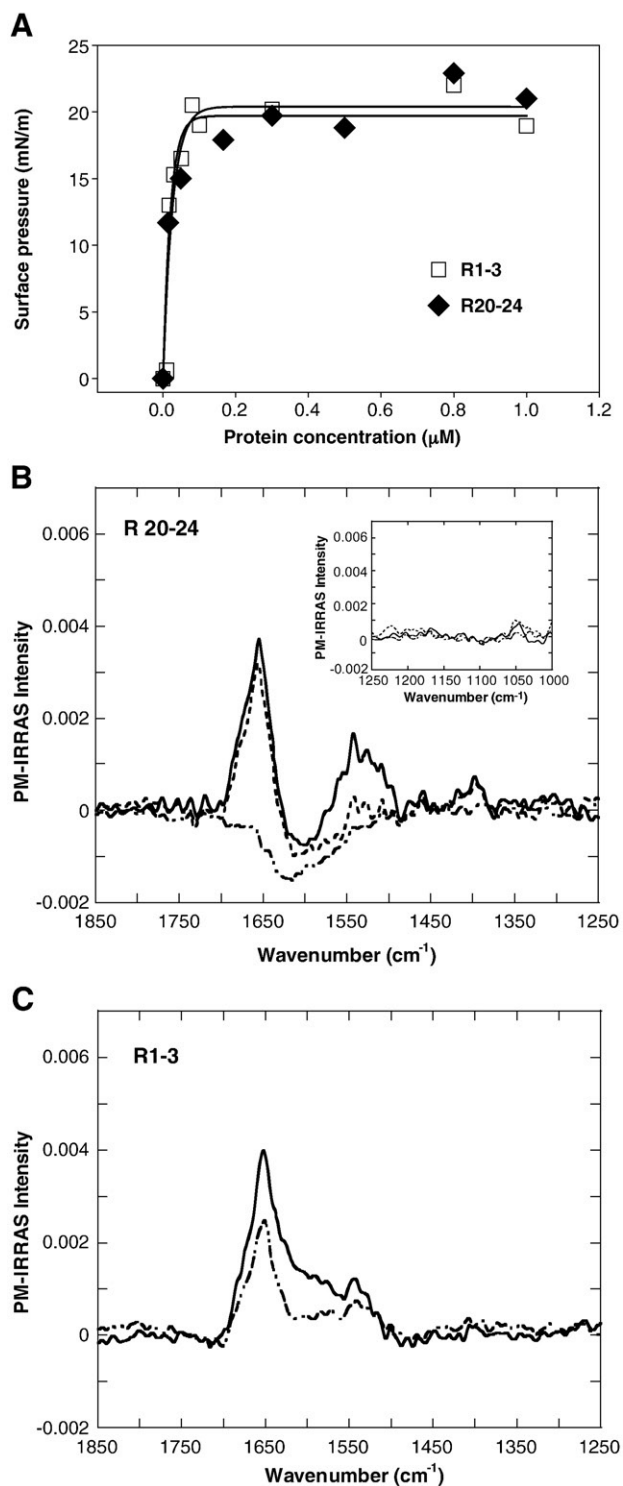


Fig. 1. Adsorption of proteins at the air/liquid interface. (A) Final surface pressure reached at the end of the adsorption kinetic experiment as a function of the protein sub-phase concentration in a Langmuir trough. Each point corresponds to the mean value of three kinetic experiments. (B, C) PM-IRRAS spectra acquired during protein adsorption at the air/liquid interface of R20–24 (B) and R1–3 (C). Spectra are acquired at the initial surface pressure (dash-dot-dot), at the beginning of the surface pressure plateau (short dash) and after stabilization of the surface pressure (solid line). The insert in B shows the region between 1000 and 1150 cm^{-1} for R20–24. The protein concentrations on the sub-phase are 0.166 μM .

helical arrangement rather parallel to the air/liquid interface at the beginning of the plateau. Later, the ratio decreases and becomes close to 2.75 (i.e. the amide II band increases faster than the amide I band),

indicating an average angle of 57° with respect to the normal at the air/liquid interface. Two peaks were observed, located at 1397 cm^{-1} and 1050 cm^{-1} , having similar intensity specifically for R20–24 (Fig. 1B insert). A spectrum of the buffer was recorded using ATR (spectra not shown here), which showed the same peak positions, indicating that R20–24 promotes a higher local concentration or induces a specific orientation of Tris molecules at the interface.

The spectra recorded from R1–3 are quite different from those obtained from R20–24. The amide I and II bands remain very sharp throughout the experiment and there is no evidence of recruitment or reorientation of Tris molecules. Two spectra from R1–3 were recorded at the beginning and after stabilization of the surface pressure at 18.7 mN/m (Fig. 1C). In the first spectrum, the amide I and amide II bands appear with a maximum wavenumber located at 1653 cm^{-1} and 1545 cm^{-1} , respectively, mainly reflecting a high content of α -helix protein structure. After stabilization of the surface pressure, the intensity of the two peaks increases, indicating an increase of matter at the air/liquid interface. During the same time, RI/II remains at a value of 3.2, which yields an average angle of 61° of the protein with respect to the normal of the monolayer. Therefore, it appears that the protein moves to the interface without further reorientation. In the region situated between the two amide I and II bands, the signal increases to form a shoulder around 1600 cm^{-1} . Such a spectrum shape could be due to the modification of the optical indices of the buffer, or more likely, the presence of N–H bending mode due to the very high number of lysine, arginine, glutamic and aspartic acid residues [26] which account for 99 over the 333 total residues.

Overall, these results show that the proteins remain structured in α -helices as previously shown by circular dichroism [12].

3.2. The two sub-domains behave very differently in contact with lipid monolayers

Previous data have shown that R1–3 interacts with DOPC/DOPS small vesicles forming a stable lipid/protein complex isolated by exclusion chromatography. In contrast any stable lipid/protein complex is detected between R20–24 and these small vesicles [12]. Moreover, none of the proteins bind to PC/PE vesicles. Therefore, in this study, we attempt to further characterize the interaction with anionic lipids (DOPS). The lipid mixture is essentially DOPC/DOPS 1:1 nevertheless additional experiment with each pure lipid was performed for R1–3. Evaluation of the adsorption was carried out using atomic force microscopy (AFM) and PM-IRRAS.

3.2.1. Effect of protein injection on surface pressure of lipid film

The lipid mixture was spread at the interface Langmuir trough to form a monolayer. After compression and stabilization of the lipid film to 20 mN/m the proteins dissolved in TNE buffer were injected into the sub-phase while the surface pressure was continuously monitored (Fig. S1 in the Supplementary material). R1–3 induced a progressive increase to a stable plateau at 27 mN/m. By contrast, R20–24 induced a first increase to 25 mN/m, but later on the surface pressure declined progressively to a lower value of 21 mN/m. For the initial lipid surface pressure of 30 mN/m, no modification of the surface pressure is measured after proteins injection.

3.2.2. Atomic force microscopy and image analysis

Atomic force microscopy images were acquired on transferred lipid and protein/lipid films using the Langmuir–Blodgett technique. For both proteins, transfer for AFM was done at the end of the adsorption kinetic for the two initial surface pressures of 20 and 30 mN/m. The images obtained for DOPC/DOPS 1:1 films at 20 mN/m and at 30 mN/m without protein are presented in Fig. 2, A and B respectively. These images show a flat surface without defects. The protein/lipid film displayed in Fig. 2C to 2F appears as a homogeneous dark flat background dotted with isolated white protrusions.

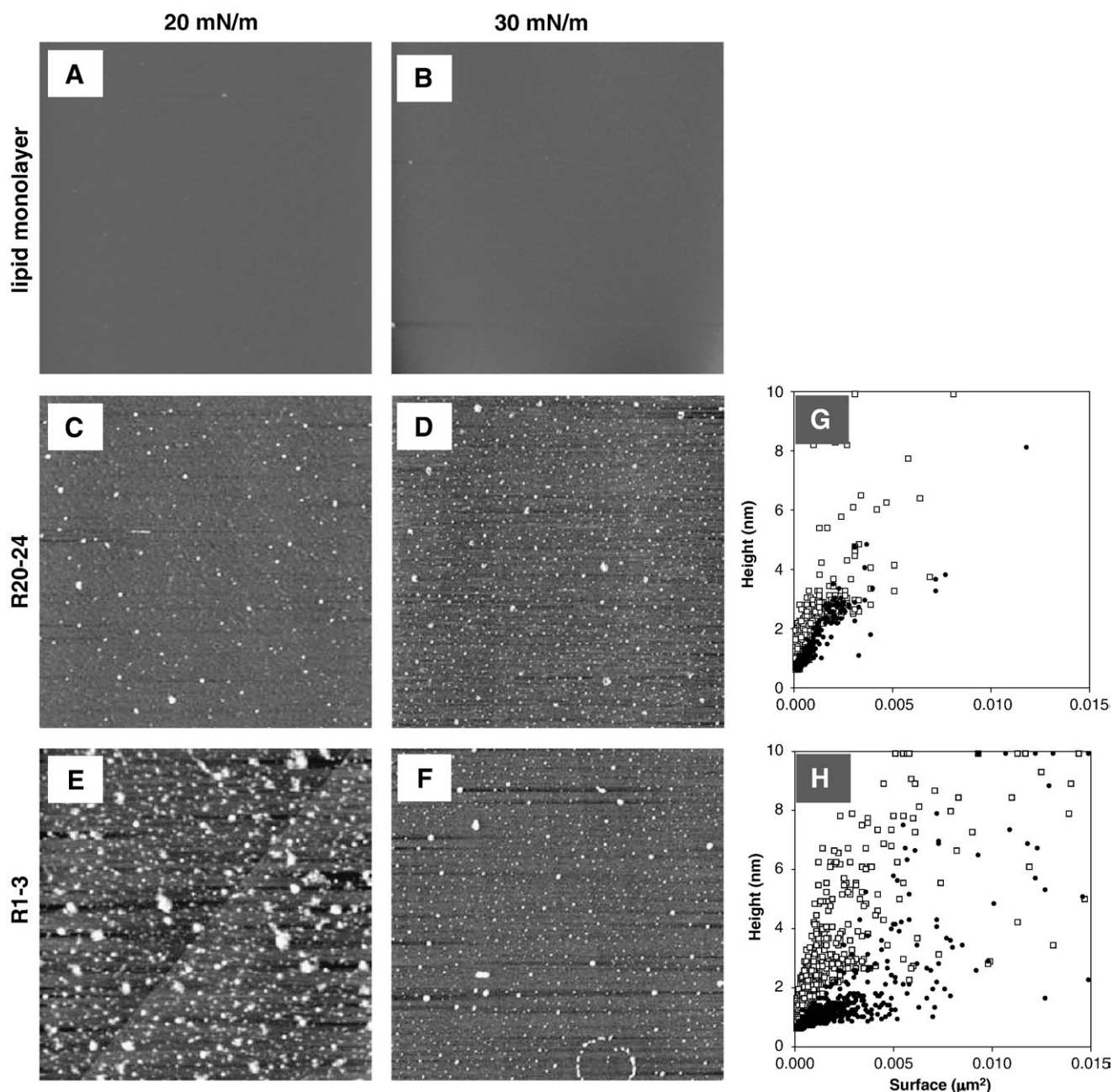


Fig. 2. AFM images of transferred monolayers. A and B correspond to the DOPC/DOPS 1:1 monolayer at 20 and 30 mN/m respectively. C–F are obtained imaging the transferred protein/lipid films for protein adsorption onto lipid films at an initial pressure of 20 (C and E to B) or 30 (D and F to D) mN/m for R20–24 (C and D), and R1–3 (E and F). The scan size is $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$. Grey scale: z-range is 10 nm, meaning that higher objects appear lighter. The graphs (G–H) present the height versus the occupied surface of the objects on typical AFM images for initial surface pressures of 20 mN/m (black dots) and 30 mN/m (open squares) for R20–24 (G) and R1–3 (H).

Compared with the pure lipid images, these protrusions are attributed to the presence of the proteins forming clusters with varying from grey to white color depending on their height relative to the background. The analysis of these images allows us to assess the variation of the height of the objects versus the surface-area occupied by the protein (Fig. 2G and H). In addition, the number of clusters and the total surface occupied were calculated (Table S1 of Supplementary material).

The image of R20–24 adsorption in DOPC/DOPS 1/1 film at an initial surface pressure of 20 mN/m (Fig. 2C) shows a heterogeneous distribution of protein clusters of variable surface-area making up 0.5% of the total surface (Table S1 in the supplementary material). When the lipid initial surface pressure is 30 mN/m, the number of these clusters is increased ten-fold and the cluster height two-fold

compared to clusters at 20 mN/m (Table S1 and Fig. 2D and G), leading to a four-fold increase in the percentage of protein surface. In the latter case, some larger clusters appear with a surrounding zone devoid of protein, indicating that these large clusters are formed by the recruitment of several smaller clusters. At an initial pressure of 20 mN/m, the lipid compacity is rather low and thus could promote the insertion of proteins into the lipid film by means of hydrophobic forces. Nevertheless, the number of R20–24 clusters at this initial surface pressure of 20 mN/m is rather small and the amount of protein at the interface is very low despite its amphiphilic character. Then, it is likely that the protein interacts slightly with the lipid film and remains largely in the solution. At the higher initial surface pressure of 30 mN/m the negative charge density is higher than at 20 mN/m, which therefore favours an electrostatic interaction of the

protein with the lipid polar heads. That seems to be the case; indeed the number and the height of clusters are higher at 30 mN/m than at 20 mN/m suggesting a recruitment and a piling up of the protein at the lipid interface. As the surface occupied by R20–24 clusters is higher at 30 mN/m than at 20 mN/m, it appears that there is an electrostatic binding of the protein to the lipids without contribution of hydrophobic forces.

The image of R1–3 at the interface at an initial lipid surface pressure of 20 mN/m is shown in Fig. 2E. R1–3 is present with a 3.5-fold higher number of clusters compared to R20–24 (Table S1). Moreover, there is a very heterogeneous distribution of clusters with a highly variable surface and a low height (Fig. 2B and F). The total surface occupied by the protein is as high as 3.3% (6.6 times the surface occupied by R20–24). At an initial pressure is 30 mN/m (Fig. 2D and F), the film appears completely different from the film at 20 mN/m, with twice as many clusters occupying a smaller surface of 2.2% compared to 3.3% at 20 mN/m (Table S1). The clusters are more heterogeneous in height and surface at 30 mN/m than at 20 mN/m, in accord with the decrease in surface occupied by the protein. These changes reveal an electrostatic character at the lipid/protein binding. As a control, additional experiments with R1–3 were performed with each of the lipids alone to ensure that the binding was related to the electrostatic charge of the anionic lipid, the AFM image analysis (Table S1) showed that the number of particles is significantly lower for the DOPC monolayer compared to the DOPS monolayer and confirms the electrostatic effect.

At an initial pressure of 20 mN/m, the low lipid compacity promotes a partial insertion of R1–3 into the lipid film associated with hydrophobic interaction, and the protein spreads out over the lipid film without piling up. The insertion occurs without a regular arrangement of the protein being promoted by the lipid surface. Variations in height of the clusters at the lowest initial pressure could be due to two different processes. Firstly, protein adsorption takes place under the lipid film due to the anionic electrostatic forces of PS, while, secondly, protein insertion is promoted by hydrophobic forces. By contrast, at the high initial pressure of 30 mN/m anionic electrostatic forces prevail over hydrophobic forces, while the stronger lipid packing appears to limit the possibility of protein insertion for R1–3 as well as R20–24, leading to a piling up of the proteins. Indeed, AFM data show that for the high initial surface pressure the behaviour of both proteins seems very close. At the lower initial surface pressure R1–3 partially inserts into the monolayer while R20–24 remains only bound by electrostatic forces without insertion.

3.2.3. Orientation and conformation of proteins in interaction with lipid monolayer studied by PM-IRRAS spectroscopy

PM-IRRAS spectra were collected after injection of the protein into the sub-phase beneath the DOPC/DOPS (1:1) monolayer stabilized at 20 mN/m. Three spectra were recorded, two during the kinetic absorption and stabilization of the surface pressure and one after compression of the mixed protein/lipid monolayer up to 30 mN/m.

First of all, before injection of the proteins beneath the lipid film, a lipid spectrum was recorded at a surface pressure of 20 mN/m. This lipid monolayer spectrum is in accordance with previously published results (Fig. 3A) [27–29]. It shows a positive band around 1726 cm^{-1} , which corresponds to the CO stretching vibration ($\nu(\text{CO})$) of the head-group of both lipids. A very small peak at 1464 cm^{-1} can be attributed to the stretching vibration of the C–H groups of the lipid alkyl chains ($\nu(\text{C–H})$). A noisy signal is observed in the region between 1500 and 1600 cm^{-1} . Le Calvez et al. [30] reported that the signal of carboxylate antisymmetric band ($\nu_a(\text{COO}^-)$) appears in this wavenumber range. Therefore, the perturbation observed in the lipid monolayer spectrum could be attributed to the presence of phosphatidylserine COO^- head-group, which makes up half of the lipid film.

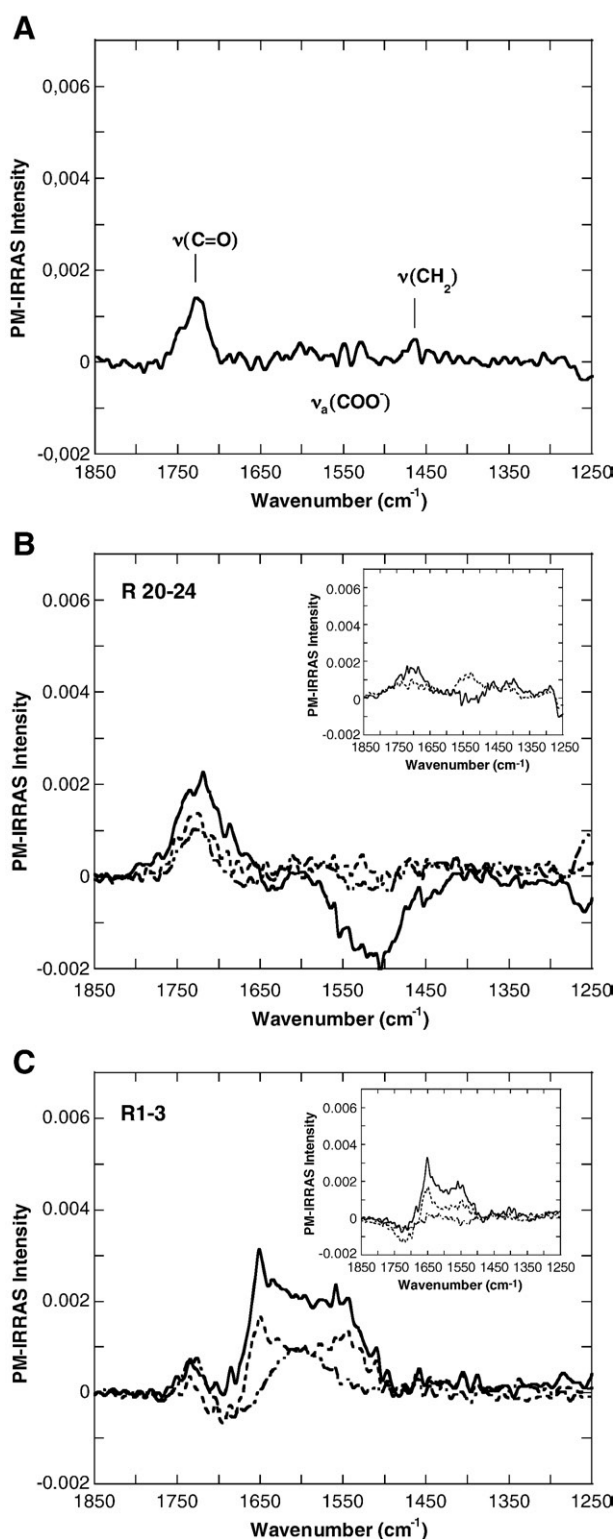


Fig 3. Representative PM-IRRAS spectra acquired during adsorption of proteins onto the lipid monolayer. The lipid film composed of DOPC/DOPS 1:1 is formed at the air/liquid interface at a surface pressure of 20 mN/m. (A) a control spectrum is recorded before protein injection beneath the lipid monolayer formed at the air/liquid interface at a surface pressure of 20 mN/m. No significant changes appear on the spectrum during compression up to 30 mN/m. (B, C) spectra are recorded during the adsorption of R20–24 and R1–3, respectively and obtained by calculating the ratio with the buffer spectrum, except in the insert where the ratio is calculated with the lipid spectrum. Spectra are acquired after the protein injection during the surface pressure increase (dash-dot-dot), during the surface pressure plateau (short dash) and after the film compression at 30 mN/m (solid line).

The NH^{3+} head-group of this lipid could give a band at 1050 cm^{-1} , but no signal is detected at this surface pressure.

Fig. 3B, C shows the spectra of the two proteins in the presence of a DOPC/DOPS monolayer.

There are no clear changes observed during the adsorption of R20–24 at the lipid/liquid interface (Fig. 3B), and no modification of the positive peak corresponding to the C O stretching vibration at about 1733 cm^{-1} . However, the intensity of this peak increases slightly, indicating that lipid packing is not modified by the protein. To eliminate the lipid signal from the protein signal, we represent the ratio of protein/lipid with respect to lipid in the insert of Fig. 3B. Very small signals are observed in the amide I and II region, meaning that the presence of the protein cannot be clearly demonstrated. However, the compression of the film up to 30 mN/m induces an enhancement of the peak located around 1733 cm^{-1} , with a shoulder at 1686 cm^{-1} , and the appearance of a negative band around 1510 cm^{-1} . The 1550 to 1500 cm^{-1} band of the COO^- vibration is attributed to the serine head-group in both spectra. The very large magnitude of this band leads us to propose a major reorientation of the PS head-group in contact with the protein. Moreover, the absence of any clear amide I or II bands suggests that the major part of each protein molecule remains in the sub-phase, with only a few residues being involved in binding to the serine lipid head-group. Furthermore, the intensities of the bands assigned to the acyl chain (spectra shown in the Fig. S2 A) are slightly affected by the injection of R20–24 under the lipid film suggesting few changes in the amount of lipidic matter under the infrared beam and in the hydrophobic organization of the film.

By contrast to R20–24, the injection of R1–3 clearly modifies the spectrum in the region from 1500 cm^{-1} to 1700 cm^{-1} (Fig. 3C). Three maxima are observed on the plateau (with stable surface pressure, Fig. S1), at 1733 cm^{-1} , 1651 cm^{-1} and 1553 cm^{-1} , which are attributed to the lipid carbonyl group and the protein amide I and II bands, respectively. Furthermore, the two latter are representative of the α -helical structure, indicating that the protein is clearly present at the interface, in contrast with R20–24, and that its alpha-helical structure is preserved. The C O peak intensity decreases with respect to the lipids alone, implying a reorientation of lipids at the interface. However, the carbonyl vibration is still at a high frequency which reflects the presence of a dehydrated ester group even after the protein adsorption. When the surface pressure of the mixed R1–3/lipid monolayer is increased to 30 mN/m , the three peaks are maintained at the same wavenumber and their intensity increases. The C O peak intensity recovers its initial intensity, which is representative of the lipid packing observed at 20 mN/m before protein injection.

Amide I and amide II peaks increase in the same proportion. Therefore, the amount of R1–3 at the interface increases without any change in the protein helical content. RI/II rises from 1 to 1.55, which reflects a minor change from 40° to 45° in the average angle of helices with respect to the monolayer normal. Consequently, we may conclude that the film is compressed without expulsion of the protein and that the lipids and the protein are stabilized at the interface even at the highest surface pressure, indicating an involvement of strong interactions in the binding of R1–3 to lipids. In the region of the C–H stretch of acyl chains (wavenumber range from 3000 to 2600 cm^{-1} , Fig. S2 B), the presence of R1–3 causes a disappearance of two bands. In accordance with the previous results, the acyl chains are clearly affected by the protein R1–3 suggesting the insertion of the protein in the hydrophobic part of the film and its stabilization during compression.

4. Discussion

The present work is focused on the properties of two sub-domains of the dystrophin central domain with respect to an anionic lipid monolayer. R1–3 and R20–24 are composed of three and five spectrin-

like repeats respectively. The two proteins are stable and soluble in solution (non-aggregation), and their secondary structure is composed at least of 75% of α -helices [12]. Each repeat is structured in a triple helical coiled-coil and the multirepeat proteins are formed of chained-up repeats [31]. The surface pressure-measurements at the air/liquid interface show that the pure adsorbed proteins exhibit a high affinity for the interface where they are able to form stable interfacial films. To account for the high surface pressure observed with the two proteins, we should bear in mind that high surface pressure is related to a high degree of lateral protein packing and a large area occupied by the protein at the air/liquid interface. Therefore, it is clear that the two proteins display an amphiphilic character. A similar conclusion was previously proposed for a construct of R2 with the same plateau value of about 20 mN/m observed at the air/liquid interface [4]. In addition, we show here that longer proteins such as R1–3 and R20–24 display similar properties at the interface. PM-IRRAS spectra show a high α -helix content with no strong structural changes appearing at the air/liquid interfaces, indicating that the proteins maintain their helical secondary structure [16].

From these results, it appears that this strong interfacial activity without α -helical unfolding could be a characteristic feature of all spectrin-like repeats of dystrophin, as previously shown for a single repeat [4]. Nevertheless, there could be some differences between the repeats, including the requirement of a highly hydrated environment for R20–24.

After this preliminary study of the behaviour of the two proteins at the air/liquid interface, we then applied the membrane model to investigate the interactions of the proteins with lipids.

The AFM image analyses clearly show an effect of the lipid initial surface pressure on the number of protein particles observed at the interface as well as the total surface occupied by the protein. Although the lipids stay in a liquid-expanded state both proteins are more present in the anionic lipid film when the initial surface pressure is 30 mN/m compared to 20 mN/m . The value of the higher surface pressure is chosen from the literature as corresponding to a reasonable estimate of the surface pressure in biological membranes [32–35]. However, although R20–24 is an amphiphilic protein, it displays a poor ability to bind strongly with the anionic lipid monolayer as shown by AFM and PM-IRRAS. This is in line with previous results showing that R20–24 is not able to form stable lipid-protein complexes and that the Trp environment in the protein is not modified by the presence of anionic vesicles [12]. These latter authors [12] used the highly curved model of membrane of small unilamellar vesicles, while, in the present study, we investigate planar geometry with phospholipid monolayers at two surface pressures, thus making up a large range of studied situations. All together, these observations lead us to conclude that the R20–24 sub-domain of the dystrophin rod interacts only very weakly with membrane phospholipids by means of a few electrostatic forces. The main part of each R20–24 molecule remains in the sub-phase. Then we could hypothesize that this part is free to interact with intracellular molecules.

In the case of R1–3 at the low surface pressure of 20 mN/m , hydrophobic interactions with lipids facilitate a partial insertion of the protein in the monolayer and promote a lateral interaction between close protein molecules, thus explaining the large surface-area occupied by R1–3. By contrast, at the high surface pressure of 30 mN/m , the proximity of anionic head-group precludes the spreading out of each protein molecule relative to its neighbours, and instead favours their piling up. In conclusion, R1–3 clearly shows a preference for the lipid/liquid interface, which can facilitate hydrophobic interactions needed for the insertion. Very interestingly, the insertion as well as the piling up does not induce unfolding of the α -helices.

In addition, even though it is very difficult to interpret the angular data as the protein is made up of nine helices, the helices form bundles

that could be assigned to a single global elongated macromolecule. The angle with respect to the normal at the monolayer ranges from 40 to 45°, depending on the surface pressure. This angle is smaller compared to the angle of 61° observed for the protein at the air/liquid interface. This is highly indicative of a preference of the protein for the lipid environment, in agreement with its high interfacial activity.

R1–3 represents a true sub-domain of the dystrophin rod domain delineated by two hinges. It could be an essential domain in the stabilization of protein–membrane interaction, and could be biologically highly relevant [36]. Dystrophin mechanically anchors cytoplasmic γ -actin filaments of the cortical cytoskeleton to the sarcolemma via a direct interaction of the N-terminal actin-binding domain of dystrophin with γ -actin [3]. This actin-binding domain is separated from the R1–3 rod sub-domain only by a hinge. Thus, it is tempting to hypothesize that R1–3 binding to membrane lipids could strongly help to localize γ -actin close to the sarcolemma. On the C-terminal end of the rod domain, the R20–24 sub-domain could even provide a weak electrostatic binding to the membrane, thus reinforcing the dystrophin WW domain interaction with the membrane protein β -dystroglycan by maintaining dystrophin near the membrane layer [36]. On the other hand, a recent study based on microtubule cosedimentation assay suggests that the repeat 24 with the first third part of WW domain is involved in binding of microtubules [37]. Then, if only few residues of R20–24 interact with anionic lipids of the membrane, the other ones could interact with components of the cellular cytoskeleton such as microtubules.

In addition, in dystrophin-deficient muscles, it is striking that the sarcolemma ruptures very frequently. Moreover, a higher susceptibility to eccentric contractions is observed, which leads to calcium entry into the damaged cells and leakage of the cellular content such as creatine kinase [7,38]. Accordingly, immobilization of dystrophin-deficient muscles by knocking out of the acetylcholinesterase receptor gene is accompanied by reduced signs of dystrophy [39]. This provides clear evidence that dystrophin is involved in the resistance of sarcolemmal membrane against stress induced by the contraction–relaxation cycles of active muscle. As shown in the present study, the R1–3 sub-domain of the dystrophin rod could play a central role in such a resistance, and could be partly inserted into the monolayer at low surface pressure through hydrophobic forces and under compression could remained tightly attached to the monolayer through electrostatic forces. This model of modulation of the monolayer by surface pressure is close to the situation that takes place in the muscle at work, i.e. dynamic and cyclic changes of membrane tensile strength encountered by the muscle membrane during contraction (higher surface pressure) and relaxation (lower surface pressure). Therefore, dystrophin sub-domain R1–3 could provide the phospholipid membrane with a solid support that is essential for maintaining membrane cohesion [40,41]. Finally, in support of a role of R1–3 binding to membrane lipids, it is known that truncated dystrophins lacking this region are less efficient to rescue the normal phenotype of the dystrophin-deficient *mdx* mouse [42,43], compared to constructs containing these repeats, showing that this part of the rod domain is essential for a normal function of dystrophin.

Acknowledgements

This work was supported in part by the “Association Française contre les Myopathies” (AFM). SL was a recipient of a grant from the “Conseil Régional de Bretagne” (PRIR 1351). The authors wish to thank S. Pezennec for valuable discussions. M.S.N. Carpenter post-edited the English style.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbame.2010.04.005.

References

- [1] M. Koenig, A.P. Monaco, L.M. Kunkel, The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein, *Cell* 53 (1988) 219–226.
- [2] K. Ohlendieck, K. Campbell, Dystrophin constitutes 5% of membrane cytoskeleton in skeletal muscle, *FEBS Lett.* 283 (1991) 30–234.
- [3] J.M. Ervasti, Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy, *Biochim. Biophys. Acta* 1772 (2007) 108–117.
- [4] C. DeWolf, P. McCauley, A.F. Sikorski, C.P. Winlove, A.I. Bailey, E. Kahana, J.C. Pinder, W.B. Gratzner, Interaction of dystrophin fragments with model membranes, *Biophys. J.* 72 (1997) 2599–2604.
- [5] E. Le Rumeur, Y. Fichou, S. Pottier, F. Gaboriau, C. Rondeau-Mouro, M. Vincent, J. Gally, A. Bondon, Interaction of dystrophin rod domain with membrane phospholipids: evidence of a close proximity between tryptophan residues and lipids, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 5993–6001.
- [6] S. Legardinier, C. Raguénès-Nicol, C. Tascon, C. Rocher, S. Hardy, J.F. Hubert, E. Le Rumeur, Mapping of the lipid-binding and stability properties of the central rod domain of human dystrophin, *J. Mol. Biol.* 389 (2009) 546–558.
- [7] B.J. Petrof, J.B. Shrager, H.H. Stedmann, A.M. Kelly, H.L. Sweeney, Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 3710–3714.
- [8] V. Straub, J.A. Rafael, J.S. Chamberlain, K.P. Campbell, Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption, *J. Cell Biol.* 139 (1997) 375–385.
- [9] F. Nguyen, Y. Chérel, L. Guigand, I. Goubault-Leroux, M. Wyers, Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal golden retriever puppies, *J. Comp. Pathol.* 126 (2002) 100–108.
- [10] M. Koenig, L.M. Kunkel, Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 4560–4566.
- [11] S. Winder, T. Gibson, J. Kendrick-Jones, Dystrophin and utrophin: the missing links! *FEBS Lett.* 369 (1995) 27–33.
- [12] S. Legardinier, J.-F. Hubert, O. Le Bihan, C. Tascon, C. Rocher, C. Raguénès-Nicol, A. Bondon, S. Hardy, E. Le Test, Sub-domains of the dystrophin rod domain display contrasting lipid-binding and stability properties, *Biochim. Biophys. Acta* 1784 (2008) 672–682.
- [13] H. Brockman, Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein–membrane interactions? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9 (1999) 438–443.
- [14] W. Diakowski, A. Sikorski, Brain spectrin exerts much stronger effect on anionic phospholipid monolayers than erythroid spectrin, *Biochim. Biophys. Acta* 1564 (2002) 403–411.
- [15] M. Grzybek, A. Chorzalska, E. Bok, A. Hryniewicz-Jankowska, A. Czogalla, W. Diakowski, A.F. Sikorski, Spectrin–phospholipid interactions. Existence of multiple kinds of binding sites? *Chem. Phys. Lipids* 141 (2006) 133–141.
- [16] D. Blaudez, T. Buffeteau, J.-C. Cornut, B. Desbat, N. Escafe, M. Pézolet, J.-M. Turllet, Polarization-modulated FT-IR spectroscopy of a spread monolayer at the air/water interface, *Appl. Spectrosc.* 47 (1993) 869–874.
- [17] E. Bellet-Amalric, D. Blaudez, B. Desbat, F. Graner, F. Gauthier, A. Renault, Interaction of the third helix of Antennapedia homeodomain and a phospholipid monolayer, studied by ellipsometry and PM-IRRAS at the air–water interface, *Biochim. Biophys. Acta* 1467 (2000) 131–143.
- [18] V. Vié, N. Van Mau, L. Chaloin, E. Lesniewska, C. Le Grimellec, F. Heitz, Detection of peptide–lipid interactions in mixed monolayers, using isotherms, atomic force microscopy, and fourier transform infrared analyses, *Biophys. J.* 78 (2000) 846–856.
- [19] L. Dubreil, V. Vie, S. Beaufils, D. Marion, A. Renault, Aggregation of puroindoline in phospholipid monolayers spread at the air–liquid interface, *Biophys. J.* 85 (2003) 2650–2660.
- [20] C. Bottier, J. Gean, B. Desbat, A. Renault, D. Marion, V. Vie, Structure and orientation of puroindolines into wheat galactolipid monolayers, *Langmuir* 24 (2008) 10901–10909.
- [21] D. Blaudez, J.-M. Turllet, J. Dufourcq, D. Bard, T. Buffeteau, B. Desbat, Investigations at the air/water interface using polarization modulation IR spectroscopy, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 92 (1996) 525–530.
- [22] S. Castano, B. Desbat, M. Laguerre, J. Dufourcq, Structure, orientation and affinity for interfaces and lipids of ideally amphipathic lytic LKJ($i=2j$) peptides, *Biochim. Biophys. Acta* 1416 (1999) 176–194.
- [23] T. Buffeteau, E.L. Calvez, S. Castano, B. Desbat, D. Blaudez, J. Dufourcq, Anisotropic optical constants of α -helix and β -sheet secondary structures in the infrared, *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 4537–4544.
- [24] H. Lavoie, B. Desbat, D. Vaknin, C. Saless, Structure of rhodopsin in monolayers at the air–water interface: a PM-IRRAS and X-Ray Reflectivity study, *Biochemistry* 41 (2002) 13424–13434.
- [25] F. Picard, T. Buffeteau, B. Desbat, M. Auger, M. Pezolet, Quantitative orientation measurements in thin lipid films by attenuated total reflection infrared spectroscopy, *Biophys. J.* 76 (1999) 539–551.
- [26] F. Ronzon, B. Desbat, J.P. Chauvet, B. Rous, Behavior of a GPI-anchored protein in phospholipid monolayers at the air–water interface, *Biochim. Biophys. Acta* 1560 (2002) 1–13.
- [27] I. Estrela-Lopis, G. Brezesinski, H. Möhwald, Dipalmitoyl phosphatidylcholine/phospholipase D interactions investigated with polarization-modulated infrared reflection absorption spectroscopy, *Biophys. J.* 80 (2001) 749–754.
- [28] S. Castano, D. Blaudez, B. Desbat, J. Dufourcq, H. Wroblewski, Secondary structure of spiralin in solution, at the air/water interface, and in interaction with lipid monolayers, *Biochim. Biophys. Acta* 1562 (2002) 45–56.
- [29] J. Saccani, S. Castano, B. Desbat, D. Blaudez, A phospholipid bilayer supported under a polymerized Langmuir film, *Biophys. J.* 85 (2003) 3781–3787.

- [30] E. Le Calvez, D. Blaudez, T. Buffeteau, B. Desbat, Effect of cations on the dissociation of arachidonic acid monolayers on water studied by polarization-modulated infrared reflection-absorption spectroscopy, *Langmuir* 17 (2001) 670–674.
- [31] R. Calvert, E. Kahana, W.B. Gratzer, Stability of the dystrophin rod domain fold: evidence for nested repeating units, *Biophys. J.* 71 (1996) 1605–1610.
- [32] M.C. Phillips, R.M. Williams, D. Chapman, On the nature of hydrocarbon chain motions in lipid liquid crystals, *Chem. Phys. Lipids* 3 (1969) 234–244.
- [33] R.A. Demel, W.S. Geurts van Kessel, R.F. Zwaal, B. Roelofsens, L.L. van Deenen, Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers, *Biochim. Biophys. Acta* 406 (1975) 97–107.
- [34] J.F. Nagle, Theory of lipid monolayer and bilayer phase transitions: effect of headgroup interactions, *J. Membr. Biol.* 27 (1976) 233–250.
- [35] A. Blume, A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers, *Biochim. Biophys. Acta* 557 (1979) 32–44.
- [36] G.B. Banks, J.S. Chamberlain, The value of mammalian models for Duchenne muscular dystrophy in developing therapeutic strategies, *Curr. Top. Dev. Biol.* 84 (2008) 431–453.
- [37] K.W. Prins, J.L. Humston, A. Mehta, V. Tate, E. Ralston, J.M. Ervasti, Dystrophin is a microtubule-associated protein, *J. Cell Biol.* 186 (2009) 363–369.
- [38] N. Deconinck, B. Dan, Pathophysiology of Duchenne muscular dystrophy: current hypotheses, *Pediatr. Neurol.* 36 (2007) 1–7.
- [39] C. Etard, M. Behra, R. Ertzer, N. Fischer, S. Jesuthasan, P. Blader, R. Geisler, U. Strahle, Mutation in the delta-subunit of the nAChR suppresses the muscle defects caused by lack of Dystrophin, *Dev. Dyn.* 234 (2005) 1016–1025.
- [40] O. Hamill, B. Martinac, Molecular basis of mechanotransduction in living cells, *Physiol. Rev.* 81 (2001) 685–740.
- [41] M.P. Sheetz, J.E. Sable, H.G. Dobereiner, Continuous membrane-cytoskeleton adhesion requires continuous accommodation to lipid and cytoskeleton dynamics, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 35 (2006) 417–434.
- [42] S.Q. Harper, M.A. Hauser, C. DelloRusso, D. Duan, R.W. Crawford, S.F. Phelps, H.A. Harper, A.S. Robinson, J.F. Engelhardt, S.V. Brooks, J.S. Chamberlain, Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy, *Nature Med.* 8 (2002) 253–261.
- [43] M. Liu, Y. Yue, S. Harper, R. Grange, J. Chamberlain, D. Duan, Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury, *Mol. Ther.* 11 (2005) 245–256.

Supplementary data to:

“Specific anchoring modes of two distinct dystrophin rod sub-domains interacting in phospholipid Langmuir films studied by atomic force microscopy and PM-IRRAS”

V. Vié^a, S. Legardinier^b, L. Chieze^a, O. Le Bihan^a, Y. Qin^a, J. Sarkis^{a, b}, J.-F. Hubert^b, A. Renault^a, B. Desbat^c, E. Le Rumeur^b

Table S1. Quantitative analysis of AFM images of the two proteins at the lipid/liquid interface.

Surface pressure	Lipids	Mean number of clusters (% protein surface)	
		R20-24	R1-3
20 mN/m	PC/PS 1:1	120 (0.5)	430 (3.3)
30 mN/m	PC/PS 1:1	1230 (2)	920 (2.2)
	PS alone	nd	900 (2.1)
	PC alone	nd	140 (0.5)

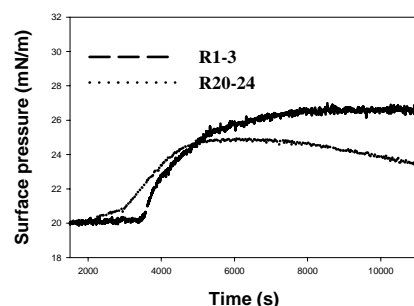


Fig. S1. Kinetics of adsorption of R1-3 and R20-24 injected below a lipid layer of DOPC/DOPS 1:1. The lipids are spread at the air/liquid interface at a surface pressure of 0mN/m and compressed to reach a surface pressure of 20 mN/m then the proteins are injected in the sub-phase at the final protein concentration of 0.166 μ M. The surface pressure increases revealing protein-lipid interactions up to 27 mN/m and 21 mN/m for R1-3 and R20-24 respectively.

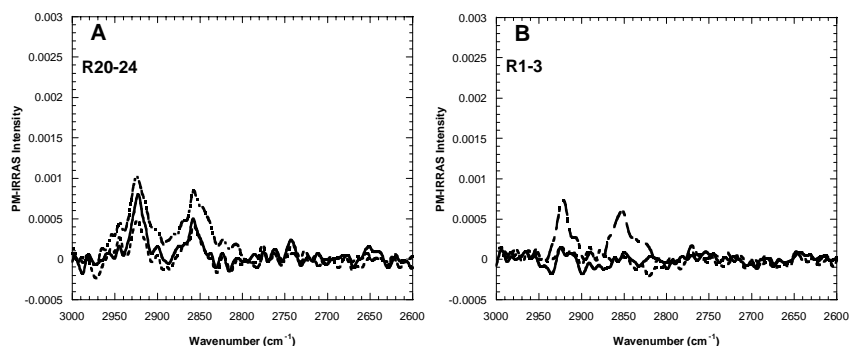
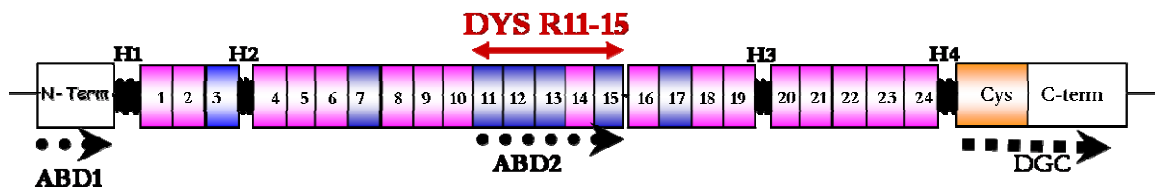


Fig. S2. PM-IRRAS spectra acquired during adsorption of R20-24 (A) and R1-3 (B) injected below a lipid layer of DOPC/DOPS 1:1 at an initial surface pressure of 20 mN/m. The spectra are recorded and obtained by calculating the ratio with the buffer spectrum in the wavenumber range from 3000 to 2600 cm^{-1} to visualize the C-H stretch bands. Spectra are acquired before the protein injection (dash-dot-dot), during the surface pressure plateau (short dash) and after the film compression at 30 mN/m (solid line). At these surface pressures, the lipids are in liquid expanded phase.

Une discussion de ces résultats, suivie d'une discussion générale de nos travaux sur la dystrophine et de notre conclusion seront présentées dans le chapitre 5 de cette partie

Chapitre 3 – DYS R11-15 et membrane

Dans ce troisième chapitre de la partie II, nous nous intéressons aux répétitions 11 à 15 du domaine central de la dystrophine humaine (DYS R11-15). Ces cinq répétitions, riches en acides aminés basiques, constituent le deuxième domaine de liaison aux filaments d'actine de la dystrophine (ABD2). Dans un premier temps, nous analyserons le comportement de ce fragment en présence de phospholipides.



Différents modèles membranaires seront utilisés : (i) les liposomes de différentes tailles (SUVs et LUVs), dans le but de comparer l'influence de la courbure membranaire sur l'interaction entre DYS R11-15 et les lipides ; et (ii) les monocouches lipidiques en cuve de Langmuir, qui permettent la modulation de la pression de surface du film et ainsi la détermination de l'effet du "lipid packing" sur l'interaction.

La combinaison de différentes techniques biochimiques, biophysiques et bioinformatiques a été réalisée grâce à nos différentes collaborations, en interne à l'équipe, ou avec d'autres instituts.

Spectrin-like Repeats 11–15 of Human Dystrophin Show Adaptations to a Lipidic Environment*[§]

Received for publication, March 25, 2011, and in revised form, June 24, 2011. Published, JBC Papers in Press, June 28, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.243881

Joe Sarkis^{‡§¶1}, Jean-François Hubert^{‡§}, Baptiste Legrand^{‡§}, Estelle Robert^{‡¶}, Angélique Chéron^{‡§}, Julien Jardin^{¶||}, Eric Hitti^{‡***}, Elisabeth Le Rumeur^{‡§}, and Véronique Vie^{‡¶12}

From the [‡]Université Européenne de Bretagne, 35000 Rennes, France, [§]UMR-CNRS 6026-IFR 140, Equipe RMN-Interactions Lipides Protéines, Faculté de Médecine, CS 34317, 35043 Rennes, France, and [¶]UMR-CNRS 6251, Institut de Physique de Rennes, Université de Rennes 1, 35042 Rennes, France, the ^{||}Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), AGROCAMPUS-OUEST, UMR 1253, Science et Technologie du Lait et de l'Oeuf, 35042 Rennes, France, and the ^{**}Laboratoire Traitement du Signal et de l'Image (LTSI), INSERM 642, 35042 Rennes, France

Dystrophin is essential to skeletal muscle function and confers resistance to the sarcolemma by interacting with cytoskeleton and membrane. In the present work, we characterized the behavior of dystrophin 11–15 (DYS R11–15), five spectrin-like repeats from the central domain of human dystrophin, with lipids. DYS R11–15 displays an amphiphilic character at the liquid/air interface while maintaining its secondary α -helical structure. The interaction of DYS R11–15 with small unilamellar vesicles (SUVs) depends on the lipid nature, which is not the case with large unilamellar vesicles (LUVs). In addition, switching from anionic SUVs to anionic LUVs suggests the lipid packing as a crucial factor for the interaction of protein and lipid. The monolayer model and the modulation of surface pressure aim to mimic the muscle at work (*i.e.* dynamic changes of muscle membrane during contraction and relaxation) (high and low surface pressure). Strikingly, the lateral pressure modifies the protein organization. Increasing the lateral pressure leads the proteins to be organized in a regular network. Nevertheless, a different protein conformation after its binding to monolayer is revealed by trypsin proteolysis. Label-free quantification by nano-LC/MS/MS allowed identification of the helices in repeats 12 and 13 involved in the interaction with anionic SUVs. These results, combined with our previous studies, indicate that DYS R11–15 constitutes the only part of dystrophin that interacts with anionic as well as zwitterionic lipids and adapts its interaction and organization depending on lipid packing and lipid nature. We provide strong experimental evidence for a physiological role of the central domain of dystrophin in sarcolemma scaffolding through modulation of lipid-protein interactions.

Dystrophin is a rod-shaped cytoplasmic protein that constitutes a vital part of a protein complex that connects the cytoskeleton of muscle fibers to the surrounding extracellular matrix through the cell membrane. This long, filamentous pro-

tein (Fig. 1A) is essential to skeletal muscle function, which is demonstrated by the lethal pathophysiology associated with its deficiency, namely Duchenne muscular dystrophy (1). Several membrane and cytoskeletal binding partners of dystrophin have been identified, including β -dystroglycan from the dystrophin-glycoprotein complex (2, 3). β -Dystroglycan interacts with the cysteine-rich region of dystrophin that is located between the stabilizing central domain, which consists of 24 spectrin-like repeats and is known as the rod domain, and the C-terminal end of the molecule. Cytoskeletal actin interacts with the dystrophin molecule through two actin-binding domains, ABD1 and ABD2, which are situated at the N-terminal end and at the center of the dystrophin rod domain (repeats 11–15), respectively (4). The subsarcolemmal location of dystrophin and its association with both the cytoskeleton and membrane suggest a role in the mechanical regulation of membrane stress during contraction and elongation of muscle fibers at work (5), when bending, blebbing, and various levels of packing occur. In particular, phenotype rescues of Duchenne muscular dystrophy mouse models have shown that some parts of the rod domain of dystrophin are essential for dystrophin function (6). We recently reviewed dystrophin function (7) and concluded that although little is known about the mechanisms that trigger dystrophy disease at the molecular level, the rod domain of dystrophin is no longer considered to be a passive linker; rather, it is thought to have a key role in regulating the membrane cytoskeleton and the extracellular matrix scaffold. Nevertheless, many aspects of rod domain structure and function are still unknown, and it is of great interest to map the entire protein for binding domains and mechanical properties, particularly those linked to membrane. Our previous studies have shown that DYS R1–3³ strongly interacts with small unilamellar vesicles (SUVs), whereas DYS R20–24 displays very weak lipid binding properties (8, 9). In addition, repeats 1–3 and 4–19 are able to bind to anionic lipids and represent two lipid

* This work was supported by the "Association Française contre les Myopathies" and by RTR-BRESMAT (Université Européenne de Bretagne).

[§] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1–S4.

¹ Recipient of a doctoral fellowship from the French Minister of Research.

² To whom correspondence should be addressed: 263 Av. Général Leclerc, Institut de Physique de Rennes, UMR CNRS 6251-Bât 11 A, 35042 Rennes Cedex, France. Tel.: 33-2-23-23-56-45; E-mail: veronique.vie@univ-rennes1.fr.

³ The abbreviations used are: DYS R1–3, DYS R11–15, and DYS20–24, sub-domain comprising human dystrophin repeats 1–3, 11–15, and 20–24, respectively; SUV, small unilamellar vesicle; LUV, large unilamellar vesicle; DOPC, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; DOPS, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine; DOPE, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-ethanolamine; mN, millinewtons; AFM, atomic force microscopy; HA, HB, and HC, helix A, B, and C, respectively; PM-IRRAS, polarization modulation infrared reflection adsorption spectroscopy.

Behavior of Dystrophin R11–15 with Membrane Models

TABLE 1

Human dystrophin rod 11–15 subdomain construct

Residues in boldface type indicate the start (N terminus column) or end (C terminus column) residue of the repeat from the alignment of Winder *et al.* (13). Underlined residues indicate the start (N terminus column) or end (C terminus column) residue of the repeat from the alignment of Koenig and Kunkel (57). GS, residues left at the N terminus after cleavage of the tags.

Construct (number of residues)	Start residue	End residue	N terminus	C terminus
DYS R11–15 (515) ^a	1461	1973	<u>GS</u> FQK <u>PAN</u> RLN <u>F</u> <u>Q</u>

^a The DYS R11–15 (residues 1–515) protein used in this study corresponds to residues 1461–1973 of native full-length dystrophin.

binding domains, called LBD1 and LBD2 (7, 10), respectively. The lipid-binding properties of the rod domain are probably required to provide mechanical stability to the sarcolemma, as shown in the case of the spectrin-related cytoskeleton of the erythrocyte (11). Among the repeats and subdomains that have been previously studied, DYS R11–15 corresponds to a unique region of the dystrophin rod domain that is rich in basic amino acids and interacts with anionic membrane lipids. In contrast with other repeats, this domain exhibits slight tryptophan fluorescence quenching when in contact with zwitterionic SUVs, which suggests a binding interaction with these lipids (10). The region DYS R11–15 has also been reported as a second actin-binding domain (ABD2) (4) in dystrophin. These five repeats are part of the rod domain that may constitute a direct link between the sarcolemma and cytoskeleton. It is of great interest to characterize the behavior of these repeats in order to understand the adaptation mechanisms of cell muscle membranes to mechanical stress. To investigate the impacts of lipid packing and lipid composition on DYS R11–15 function, we characterized the interaction and the organization of DYS R11–15 with two lipid mixtures, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine/1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (DOPC/DOPS) (1:1) and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine:1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPC/DOPE) (1/1), in vesicles (SUVs and LUVs) and monolayer lipid membrane models. These lipids were chosen because of their presence in the sarcolemma (12), where DO fatty acids constitute 12% of the global membrane composition. We used DOPC/DOPS or DOPC/DOPE lipid mixtures at a 1:1 ratio (mol/mol) because phosphatidylcholine represents ~45%, phosphatidylethanolamine 23%, and phosphatidylserine 18% of the total phospholipids and to enhance potential specific effects of phosphatidylethanolamine compared with PS.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials

All lipids were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) and were used without further purification. The pGEX-4T1 plasmid vector and a GST-TrapTM HP column were purchased from GE Healthcare. Ozyme (St. Quentin-en-Yvelines, France) supplied the ER2566 bacteria and restriction enzymes. Sequencing grade trypsin was from Promega.

Protein Expression and Purification

Protein constructs were designed as described in Table 1. The boundaries of the DYS R11–15 protein were chosen without any extension based on the original alignment described by Winder *et al.* (13). DYS R11–15, R1–3, and R20–24 were expressed as GST-tagged proteins in *Escherichia coli* and were purified as described previously (10). Purity was assessed by

SDS-PAGE with Coomassie Blue staining, and protein concentrations were determined using the bicinchoninic acid protein assay (14).

Phospholipid Vesicle Preparations

Multilamellar vesicles were prepared first. Mixtures containing one part DOPC to one part DOPS or DOPE (mol/mol) in chloroform were dried overnight under vacuum and were suspended in 150 mM NaCl and 0.1 mM EDTA buffered with 100 mM Tris-HCl at pH 7.5 (TNE buffer). SUVs with a mean diameter of 30 nm were prepared from multilamellar vesicles diluted to 25 mg of lipid/ml and sonicated at 4 °C (U200S, UKA Labortechnik) for 2 min with half-duty cycles. Oxidation products were not detected in the SUVs obtained after sonication (15). The sizes of the SUVs and LUVs were verified by dynamic light scattering (4700/PCS100 spectrometer, Malvern) and electron microscopy (JEOL 100 CX).

DYS R11–15 and Liposome Interactions

Steady-state Fluorescence Measurements—Steady-state fluorescence measurements were performed by adding 0.5 μM DYS R11–15 in TNE buffer to liposomes at different concentrations to achieve a final volume of 300 μl. Tryptophan fluorescence emission spectra were recorded between 310 and 420 nm using an excitation wavelength of 295 nm (bandwidth, 2 nm) on a Fluorolog spectrofluorometer (Jobin-Yvon, Longjumeau, France) using 10 × 2-mm quartz cuvettes at 20 °C.

Proteolytic Digestions on Vesicles—Samples containing 0.5 μM DYS R11–15 alone, with 0.5 mM SUVs (30 nm), and with 0.5 mM LUVs (100, 200, and 400 nm) were incubated for 2 h at room temperature in TNE buffer. SUVs and LUVs were generated with a DOPC/DOPS or DOPC/DOPE lipid mixture. Samples were incubated with 200 μg/ml trypsin. Aliquots were removed at different time intervals after the addition of the protease and transferred into Laemmli denaturing buffer. Samples were visualized using 15% SDS-PAGE stained by silver nitrate.

DYS R11–15/Langmuir Experiments

Before the experiments were begun, small circular Teflon troughs with subphase volumes of 3 or 8 ml were cleaned with ethanol and water and filled with TNE buffer. All experiments were performed between 19 and 21 °C.

Air/Liquid Interface Measurements—The experiments in the absence of lipid at the air/liquid interface, prior to lipid/liquid interface, allow determination of the following: (i) the amphiphilic properties of the protein; (ii) the concentration at which the protein saturates the lipid-free interface (16) in a way to minimize the protein aggregation that could result from a high protein concentration; and (iii) the concentration of the protein

that will be used in the experiments with lipids. In these studies, this concentration is usually chosen slightly lower than the concentration of saturation (16–18). The protein was injected into the subphase solution at final concentrations ranging from 0.01 to 1 μM . The surface pressure was recorded continuously until it stabilized. Each experiment was repeated at least three times, and the π values were found to be reproducible to within ± 0.3 mN/m.

In situ infrared spectroscopy was used to study the stability and the secondary structure of the protein at the air/liquid interface. The PM-IRRAS spectra were recorded on a Nicolet 870 FT-IR spectrometer (Thermo Electron, Madison, WI). PM-IRRAS combines Fourier transform infrared reflection spectroscopy of an interface with fast modulation of the polarization of the infrared radiation between parallel (p) and perpendicular (s) directions with respect to the plane of incidence (19, 20). The FT is calculated with data points every 1 cm^{-1} with a final spectral resolution of 8 cm^{-1} by co-adding 2400 scans. The details of the optical setup, experimental procedure, and two-channel processing of the detected intensity have been described previously (20). The PM-IRRAS spectra were acquired over several time intervals while the surface pressure stabilized and are displayed after the water bands were subtracted from the subphase (TNE buffer) spectrum.

Lipid/Liquid Interface Measurements—Monolayer films have become a standard model for studying lipid-protein interactions and associations in biological membranes (21). Lipid mixtures (DOPC/DOPS and DOPC/DOPE) in a 2:1 chloroform/methanol solution (v/v) were gently spread at the air/liquid interface of the TNE buffer subphase in the 8-ml circular Teflon trough at the desired surface pressure, which ranges from 15 to 32 mN/m. This surface pressure is called the initial lipid surface pressure (π_i). The protein was injected into the subphase just beneath the lipid monolayer at a final concentration of 0.1 μM . The increased surface pressure and ellipsometric angle due to adsorption of the protein to the monolayer were recorded continuously as functions of time.

Surface Pressure and Ellipsometry—The ellipsometric angle (Δ) and surface pressure (π) in the trough were recorded simultaneously. The surface pressure was measured using the Wilhelmy method (Nima Technology, Cambridge, UK). The ellipsometric measurements were carried out with a conventional null ellipsometer using a helium-neon laser operating at 632.8 nm. In this “null ellipsometer” configuration (22), the analyzer angle, multiplied by 2, yielded the value of the ellipsometric angle Δ . Variations in the ellipsometric angle are related to the phase difference between the parallel and perpendicular polarizations of the reflected light. The procedure is described elsewhere (23).

Atomic Force Microscopy—A computer-controlled and user-programmable Langmuir trough (Nima Technology) equipped with two movable barriers was used to measure the surface pressure and prepare AFM samples. Imaging samples were obtained using the Langmuir-Blodgett technique. The process requires a slow vertically lifting of the slides from the subphase to air, termed Blodgett deposition (24, 25), and is usually associated with AFM to characterize molecular organization of the monolayer. After the surface pressure stabilized, the Langmuir film was transferred to freshly cleaved mica plates at constant surface pressure by vertically raising (1 mm/min) the mica

through the lipid/liquid interface. In some cases, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ trypsin was injected into the subphase 20 min or 2 h before the Langmuir-Blodgett transfer. AFM imaging of Langmuir-Blodgett films was performed in contact mode using a Pico-plus atomic force microscope (Agilent Technologies, Phoenix, AZ) under ambient conditions with a scanning area of $10 \times 10 \mu\text{m}^2$. Topographic images were acquired in constant force mode using silicon nitride tips on integral cantilevers with a nominal spring constant of 0.06 newtons/m. Representative images were obtained from at least two samples prepared on different days and from at least five macroscopically separated areas on each sample.

Identification of Peptides by Nano-LC/MS/MS

Samples containing DYS R11–15 alone or in the presence of SUVs in a 1:1000 (mol/mol) ratio were prepared. Trypsin was added to a final concentration of 0.1 g/liter. After 20 min, digestion was stopped by adding 0.2% trifluoroacetic acid (TFA) (Pierce), and the samples were analyzed by tandem mass spectrometry (MS/MS). All mass spectra were measured using a hybrid quadrupole TOF mass spectrometer QStar XL (MDS Sciex, Toronto, Canada). The instrument was calibrated with a multipoint calibration that used fragment ions resulting from collision-induced decomposition of a peptide from β -casein, β -CN(193–209) (NeoMPS S.A., Strasbourg, France). After dilution in 0.1% TFA, the peptide fraction (10 μl) was trapped onto a C18 PepMap 100 (300- μm inner diameter, 5 mm; Dionex) microprecolumn cartridge before the peptides were separated on a C18 PepMap column (75 μm , inner diameter 150 mm; Dionex). Solvent A contained 2% acetonitrile, 0.08% formic acid, and 0.01% TFA in LC grade water, and solvent B contained 95% acetonitrile, 0.08% formic acid, and 0.01% TFA in LC grade water. The separation began with 5% solvent B for 5 min, and the concentration of solvent B was linearly increased from 5 to 50% over 60 min at a flow rate of 200 nl/min. The separated peptides were analyzed by ESI quadrupole TOF in positive ion mode. A voltage of 3 kV was applied to the nano-electrospray ion source (Proxeon Biosystems A/S, Odense, Denmark). MS and MS/MS data were acquired in continuum mode. Data-direct analysis was used to perform MS/MS analysis on 1+ to 3+ charged precursor ions. Spectra were collected in the selected mass range of 400–1500 m/z for MS spectra and 60–2000 m/z for MS/MS spectra. The mass spectrometer was operated in data-dependent mode using Analyst QS 1.1 software (Applied Biosystems, Framingham, MA) and automatically switched between MS and MS/MS acquisition when the intensity of the ions was above 10 counts per second. All data (MS and MS/MS) were submitted to MASCOT (version 2.2) to identify peptides. The search was performed against a home-made data base composed of 200 sequences of proteins from the common Repository of Adventitious Proteins (cRAP project; see the Global Proteome Machine Web site). A semitryptic enzymatic cleavage with five possible missed cleavages was used, and the peptide mass tolerance was set to 0.2 Da for MS and 0.2 Da for MS/MS data. Two variable modifications were selected to allow for the oxidation of methionine residues and deamidation of asparagine and glutamine residues. For each peptide identified, a maximum p value of 0.001, which corresponds to an average MASCOT score of at least 39, was consid-

Behavior of Dystrophin R11–15 with Membrane Models

ered to be the prerequisite for peptide validation with a high degree of confidence. Under these conditions, the false peptide discovery rate was found to be 1.35% for the three samples. The identified peptides were quantified in a label-free manner (26) using the peak height of the extracted ion chromatograms in the raw MS chromatograms (± 0.2 atomic mass units) using Analyst QS 1.1. Intensity variation between peptides from different samples (free or liposome-complexed) was considered significant when the intensity changed by a factor of at least 1.5.

Molecular Modeling

Individual residues were assigned to the “*a–g*” positions within the heptads proposed by Winder (13) in predicted coiled-coil repeats. The fold recognition program mGenTHREADER (27, 28) was run to detect the best templates for comparative modeling. The alignment proposed by mGenTHREADER is consistent with the pattern proposed by Winder *et al.* (13) and Kusunoki *et al.* (29) with respect to the heptad motifs conserved in the spectrin repeats. Secondary structure predictions were performed by PSIPRED (27), which incorporates four feed-forward neural networks that analyze the output obtained from PSI-BLAST (available from the NCBI, National Institutes of Health, Web site). Homology models of DYS R11–15 were built using the software MODELLER 9.7 (30). MODELLER is a program based on satisfaction of spatial restraints generated on the target sequence using alignment with the three-dimensional structure of the template. The loop modeling protocol of MODELLER 9.7 (31) was used to refine the loops of the selected model. Starting with a random conformation, 40 structures were built for each loop. The generated structures were assessed using MODELLER output as well as additional evaluations. The program PROCHECK was used to assess the stereochemical quality of the structures (32) and was supplemented by ProSA-WEB (33), the Web-based version of ProSA (34), by VERIFY3D (35), and by examination on a graphic display. The secondary structure of the models was analyzed and represented with PyMOL (DeLano Scientific). Hydrophobic and electrostatic potentials on the molecular surfaces were calculated using rTools (Kristian Rother) and the Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (36) software package, respectively, implemented in PyMOL.

RESULTS

Protein Purification and Amphiphilic Properties

DYS R11–15 presents a unique band on SDS-PAGE and Coomassie Blue staining at the expected molecular mass of 59 kDa (Fig. 1B). The protein identification was further confirmed by tandem mass spectrometry. The monomeric state with a Stokes radius of 3.4 nm was confirmed by size exclusion chromatography (Fig. 1C). On representative negatively stained electron micrographs, DYS R11–15 appears as an elongated or slightly curved rod 25–30 nm in length (Fig. 1D). Purified DYS R1–3 and R20–24 rod domains were used as controls in this study and were generated as described previously (9). At the air/liquid interface, adsorption of DYS R11–15 was followed by surface pressure measurements while varying the subphase protein concentration over the range 0.1–1 μM . At each protein concentration, the surface pressure increased to a stable value,

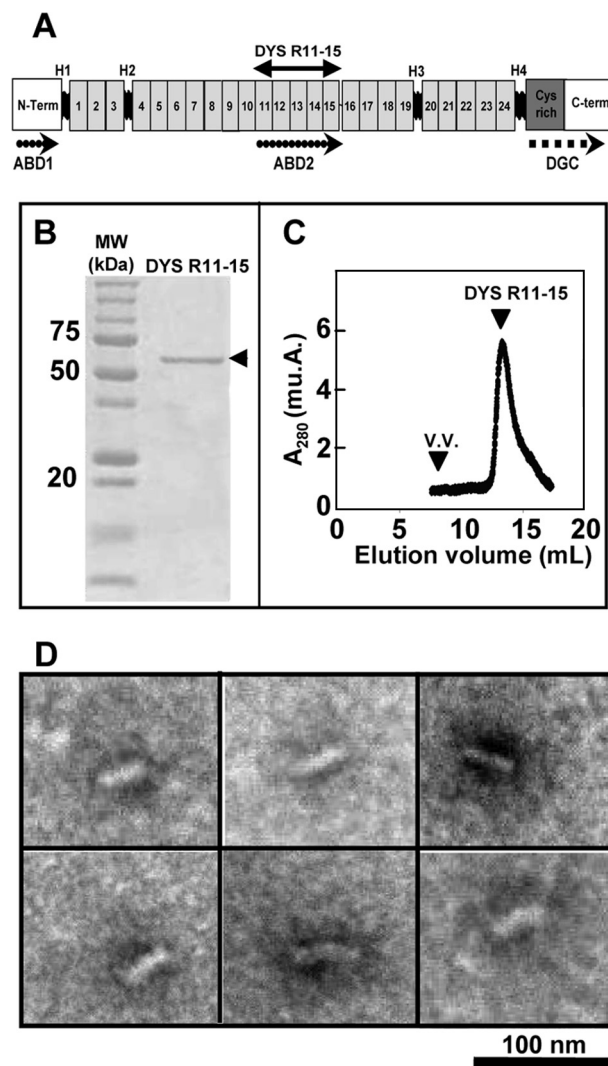


FIGURE 1. A, schematic illustration of the dystrophin protein. H1–H4, hinges 1–4; DGC, dystrophin-glycoprotein complex; ABD, actin binding domain; LBD, lipid binding domain as defined in Ref. 10. B, SDS-PAGE analysis of purified DYS R11–15 subdomain revealed by Coomassie Blue staining. DYS R11–15 is indicated by an arrow at 59 kDa. C, size exclusion chromatography of DYS R11–15. D, transmission electron micrographs of negatively stained DYS R11–15. V.V., void volume; *mu.A.*, milliunit of absorbance.

which indicated the end of the adsorption kinetics. This stable surface pressure increased with the protein concentration (Fig. 2A) up to a maximal value of 20.5 mN/m. At this surface pressure, the interface was saturated by protein regardless of the subphase concentration. The onset of this plateau was observed at a protein concentration of 0.1 μM , and this concentration was therefore chosen for further experiments. To follow putative changes in the conformation of the protein at the air/liquid interface, PM-IRRAS spectra were acquired 20 h after protein injection at a bulk concentration of 0.1 μM and a surface pressure of 20.5 mN/m. The spectra (Fig. 2B) contained one band located between 1700 and 1600 cm^{-1} (centered at 1655 cm^{-1}) and another between 1600 and 1500 cm^{-1} (centered at 1541 cm^{-1}). These bands attributed to the amide I and amide II signals, respectively (37), are characteristic of an α -helical structure (38, 39). Therefore, the protein maintained its α -helical structure at the interface. SDS-PAGE analysis indicated that no proteolysis had occurred (not shown).

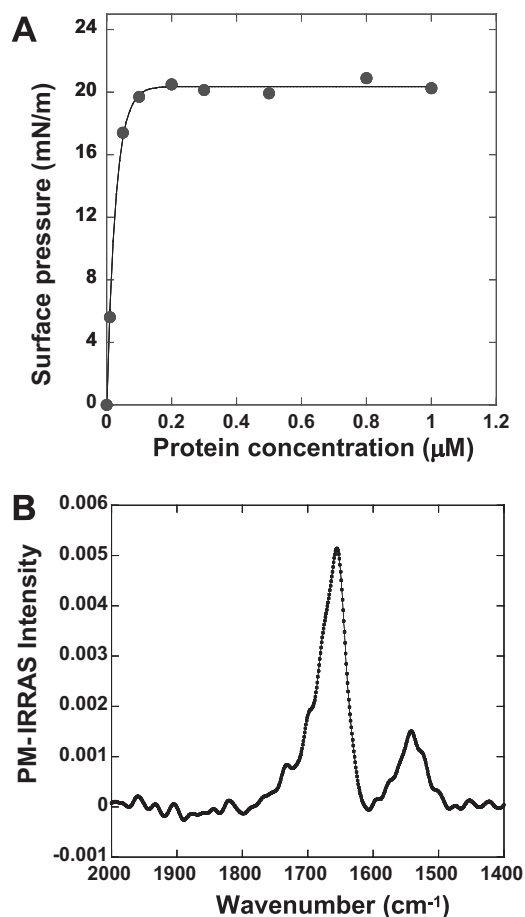


FIGURE 2. Absorption of protein at the air/liquid interface. *A*, the final surface pressure for different subphase concentrations reached at the end of kinetic adsorption. Each point corresponds to the mean value of three kinetic experiments. *B*, PM-IRRAS spectra acquired after protein adsorption at the air/liquid interface of DYS R11–15 (overnight after injection). The protein concentration in the subphase was 0.1 μM.

In conclusion, the protein is adsorbed at the air/liquid interface while remaining in a stable and folded state after overnight adsorption, which demonstrates a strong amphiphilic character. This allowed for further experiments at the lipid/liquid interface.

DYS R11–15 and Liposome Interaction

When the anionic SUV (30 nm) concentration was increased, the fluorescence emission of tryptophan increased and reached a plateau. In contrast, DYS R11–15 tryptophan fluorescence progressively decreased in the presence of anionic LUVs of 100, 200, and 400 nm in diameter (Fig. 3*A*) and also decreased in the same manner in the presence of zwitterionic SUVs and LUVs of various diameters (Fig. 3*B*).

DYS R11–15 and Monolayer Interaction

Interaction of DYS R11–15 with DOPC/DOPS and DOPC/DOPE Monolayers—The binding between DYS R11–15 and anionic SUVs is well established; however, it appeared that binding was weak with anionic LUVs or with zwitterionic SUVs and LUVs. The contrast in binding properties between SUVs and LUVs could be accounted for by differences in curvature, whereas the contrast in binding with anionic *versus* zwitteri-

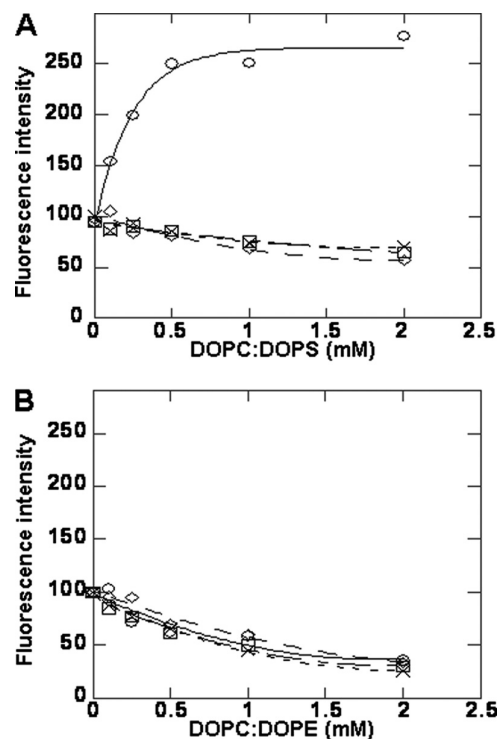


FIGURE 3. Tryptophan fluorescence intensity of DYS R11–15 (0.5 μM) following 2 h of incubation in the presence of different concentrations of lipid vesicles with DOPC/DOPS (*A*) and with DOPC/DOPE (*B*). Lipid vesicle diameters were as follows: 30 nm (○), 100 nm (□), 200 nm (◇), and 400 nm (×).

onic SUVs is accounted for by differences in charges. Combining both low curvature and zwitterionic lipids might induce even weaker binding. Because it is known that the surface pressure of a monolayer can induce different binding properties for amphiphilic proteins by favoring electrostatic and hydrophobic forces, we examined the adsorption of DYS R11–15 to phospholipid anionic and zwitterionic monolayers at various initial surface pressures (π_i). Both the DOPC/DOPE and DOPC/DOPS mixtures contained unsaturated hydrocarbon chains, so the pressure-area isotherms at the air/liquid interface are typical of a single liquid-expanded phase.

For all lipid compositions and initial surface pressures below a critical value (π_c) discussed below, the pressure-area isotherms exhibited variations in both the surface pressure, ($\Delta\pi = \pi_{\max} - \pi_i$) (Fig. 4*A*) and the ellipsometric angle ($\delta\Delta = \Delta_{\text{final}} - \Delta_{\text{lipid}}$) (Fig. 4*B*) due to the adsorption of DYS R11–15 to the lipid monolayer, which indicated that DYS R11–15 bound to both lipid mixtures. Such curves are classically drawn to analyze lipid-protein interaction and to highlight electrostatic and hydrophobic interactions (16–18, 40, 41).

These variations ($\Delta\pi$ and $\delta\Delta$) were greater at lower initial pressures (40). As π_i was increased, a critical surface pressure was achieved (π_c), after which no further modification of the ellipsometric angle and overpressure were observed. These results indicated that no more protein could penetrate the monolayer. Thus, more DYS R11–15 can be inserted into the monolayer if the film is less condensed. However, π_i did exhibit some differences in its behavior in the two different lipid mixtures. Below $\pi_i \sim 22.5$ mN/m, $\Delta\pi$ and $\delta\Delta$ varied slightly

Behavior of Dystrophin R11–15 with Membrane Models

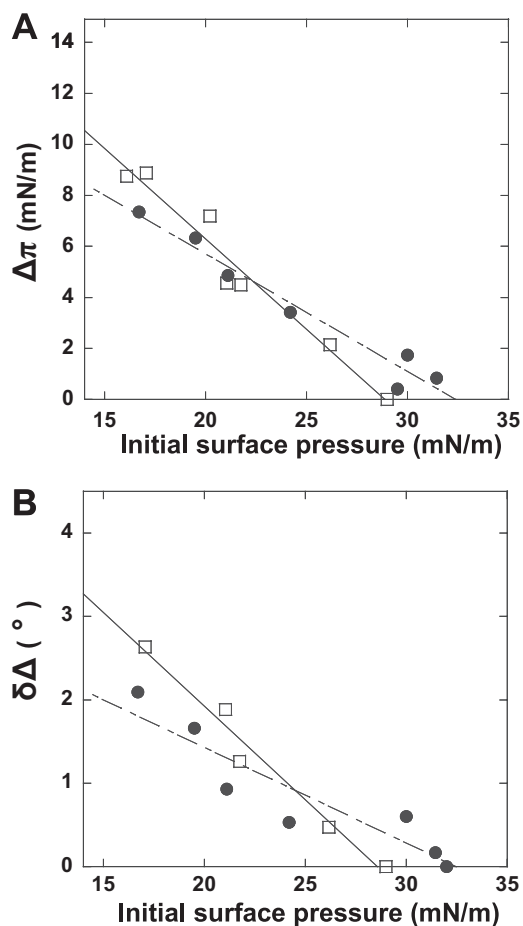


FIGURE 4. Increase of the surface pressure $\Delta\pi$ (A) and of the ellipsometric angle $\delta\Delta$ (B) at the end of the kinetic absorption of DYS R11–15 in phospholipid films versus the initial surface pressure (π_i) of the monolayers of DOPC/DOPS (●) and DOPC/DOPE (□). The subphase concentration of R11–15 was $0.1 \mu\text{M}$. The measured critical surface pressures were 32 and 29 mN/m for the anionic and zwitterionic monolayers, respectively ($T = 19^\circ\text{C}$; subphase, TNE buffer).

more in DOPC/DOPE than in DOPC/DOPS. Above $\pi_i \sim 22.5$ mN/m, the opposite behavior was observed. The critical surface pressures were 32 and 29 mN/m for DOPC/DOPS and DOPC/DOPE, respectively. These differences show that, at lipid surface pressures below 22.5 mN/m, the binding of DYS R11–15 to lipid monolayers depends on the accessibility of hydrophobic zones, which dominate the DOPC/DOPE film. At surface pressures above 22.5 mN/m, binding is driven mostly by electrostatic forces, which dominate the DOPC/DOPS film. Therefore, DYS R11–15 inserts into less condensed films of zwitterionic lipids and into condensed films of anionic lipids.

In the presence of lipid monolayers and at a surface pressure of 20 mN/m, the variation of the overpressure versus DYS R11–15 concentration was measured with both lipid mixtures. We noticed that, in both cases, identical saturation concentrations ($0.1 \mu\text{M}$) were determined with anionic (DOPC/DOPS) and zwitterionic (DOPC/DOPE) lipids (supplemental Fig. S1). These values are the same as those observed for saturation of the air/liquid interface by DYS R11–15, as shown in Fig. 2A. It appears that the saturation does not require higher concentrations when changing the lipid mixtures.

DYS R11–15 Organization Depends on Lipid Packing—To study the organization and to understand the evolution of the layer structure at the interface, AFM was used to image DYS R11–15 inserted into phospholipid layers at the mesoscopic scale. Results are displayed at initial surface pressures of 16, 20, and $(\pi_c - 2)$ mN/m (i.e. 27 and 30 mN/m for DOPC/DOPE and DOPC/DOPS, respectively). These values were chosen because they are representative of significant changes in the organization of DYS R11–15. AFM images of the pure protein show a protein monolayer corresponding to the dark background, with some brighter spots formed by protein aggregation (Fig. 5G). Comparison of the AFM images of a pure lipid film (Fig. 5G, inset) and mixed phospholipid/protein films (Fig. 5, A–F) allows the bright protrusions (1.8–2.5 nm) to be attributed to the presence of proteins or protein-lipid complexes embedded in a darker matrix corresponding to the lipid monolayer. Images of DYS R11–15·DOPC/DOPS at π_i of 16 mN/m (Fig. 5A) show a heterogeneous distribution of protein or lipid/protein clusters with filament aggregation, whereas a network is observed at π_i of 20 and $(\pi_c - 2)$ mN/m (Figs. 5, B and C). With DOPC/DOPE at π_i of 16 mN/m, DYS R11–15 is locally organized into interconnected clusters (Fig. 5D). At the initial surface pressures of 20 and $(\pi_c - 2)$ mN/m, complete networks are observed (Fig. 6, E and F). The height (H) and the width (W) of the ridges that form the networks observed at 20 mN/m are significantly larger for DOPC/DOPE ($H = 1.95$ nm, $W = 78$ nm) than for DOPC/DOPS ($H = 1.16$ nm, $W = 58$ nm). At $(\pi_c - 2)$ mN/m, the network height is quite similar in both lipid mixtures (~ 1.8 nm), whereas the network width in the anionic monolayer (~ 58 nm) is larger than that in the zwitterionic monolayer (39 nm). In agreement with the preceding data, which show that a low initial surface pressure favors protein insertion into DOPC/DOPE over DOPC/DOPS, the protein appears to be present in greater amounts in the AFM images of DOPC/DOPE than those of DOPC/DOPS. Moreover, the zwitterionic lipids induce organization of the protein molecules that leads to the beginning of a network, whereas in anionic lipid films, the proteins stay in individual clusters. By increasing the surface pressure, a network appears regardless the lipid nature. Nevertheless, a fine characterization of networks highlights little differences. Such behavior suggests that lipid/protein interactions induce molecular orientation changes and modulate protein/protein interactions depending on both the lipid type (anionic or not) and the lipid packing (initial surface pressure).

Because a similar protein network was observed at an initial surface pressure of 20 mN/m, we wondered whether the conformation of the protein was the same in the two cases. To investigate this possibility, the trypsin was injected into the subphase, and an Langmuir-Blodgett transfer was performed. After 20 min of proteolysis, a non-connected network remained in the DYS R11–15·DOPC/DOPS (Fig. 6A) sample. In contrast, the network in the DYS R11–15·DOPC/DOPS sample was nearly completely digested, and only a few protein clusters remained (Fig. 6C). After 2 h of trypsin digestion, both networks were entirely digested (Fig. 6, B and D). These results show that the network is primarily composed of DYS R11–15 and that trypsin accessibility to the protein is higher in the presence of zwitterionic lipids than in the presence of an anionic lipid.

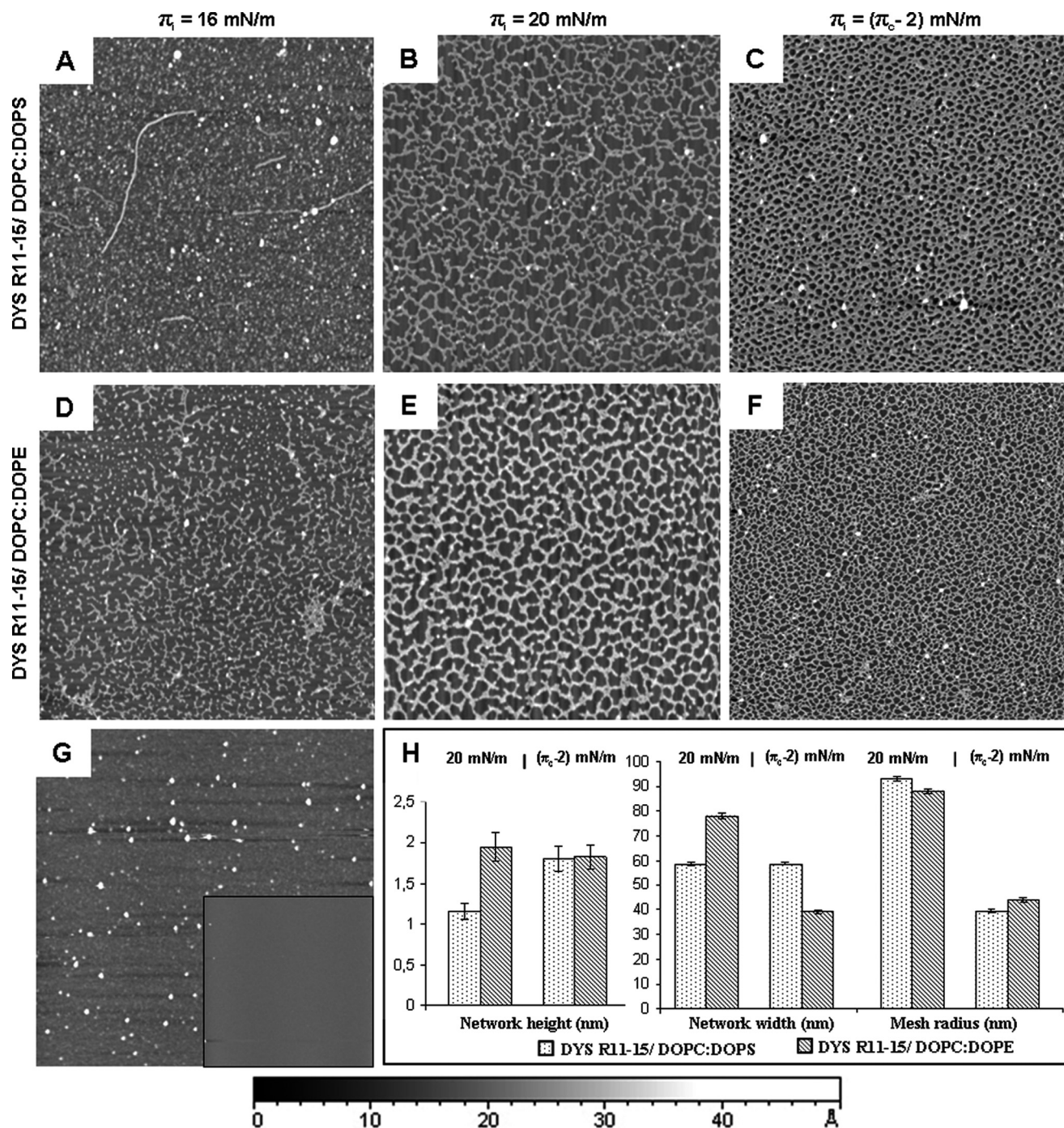


FIGURE 5. **AFM topographic images of transferred monolayers.** A–F correspond to the transferred protein/lipid films for protein adsorption onto the lipid monolayer at initial surface pressures of 16 mN/m (A and D), 20 mN/m (B and E), $(\pi_c - 2)$ mN/m (C and F) using DOPC/DOPS (A–C) and DOPC/DOPE (D–F) as the lipid mixtures. G corresponds to DYS R11–15 at the air/liquid interface, and the *inset* represents the lipid monolayer DOPC/DOPS at 20 mN/m. In all images, the scan size is $5 \times 5 \mu\text{m}$, and the height scale is 5 nm. The histogram (H) presents the statistical analysis of the AFM images in B, C, E, and F (for details, see supplemental material).

onic monolayer. This difference in accessibilities strongly suggests that the conformation of DYS R11–15 is dependent on the nature of the lipid monolayer and that different regions of the protein may be involved in binding to the two distinct lipids. Therefore, it is of great interest to map the interacting regions. However, obtaining reliable detailed information at the molecular level from proteins processed under a monolayer in a Langmuir trough is quite difficult. Therefore, we chose to investigate the effects of proteolysis on DYS R11–15 using the vesicle model.

DYS R11–15 Proteolysis Patterns

Trypsin proteolysis of the protein and protein/vesicle mixtures was followed by SDS-PAGE (supplemental Fig. S2). When alone or in contact with DOPC/DOPS LUVs, the 59-kDa signal of full-length DYS R11–15 disappears after 20 min of digestion. In contrast, the signal disappears after only 5 min when the protein is in contact with DOPC/DOPS SUVs. A specific proteolysis product appears at 23 kDa when trypsin acts on DYS

Behavior of Dystrophin R11–15 with Membrane Models

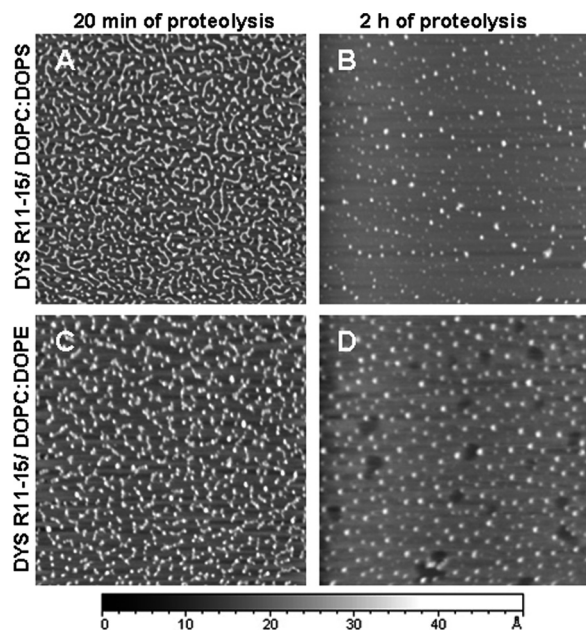


FIGURE 6. **AFM topographic images of transferred monolayers after trypsin proteolysis.** A–D, organization of DYS R11–15 in DOPC/DOPS (A and B) and DOPC/DOPE (C and D) monolayers at 20 mN/m after 20 min (A and C) or 2 h (B and D) of trypsin digestion. In all images, the scan size is $5 \times 5 \mu\text{m}$, and the height scale is 5 nm.

R11–15 that is bound to DOPC/DOPS SUVs. No significant changes in the proteolysis patterns were observed in SDS-PAGE when DOPC/DOPE SUVs or LUVs were mixed with the protein. The most significant differences between free DYS R11–15 and the lipid-protein complexes were observed when the protein was in contact with anionic SUVs. We focused label-free quantitative proteomics on trypsinized DYS R11–15 in the absence or presence of SUVs. We used biostatistical profiling (42) in which changes in the intensities of the peptide ions are recorded. MS/MS spectra allowed us to compare the ratios of the integrated peak areas/intensities of the peptide ions across samples (supplemental Fig. S4). The presence of the peptides that correspond to trypsin cleavage from residue 171 to residue 235 dramatically decreased when the protein was pre-incubated in the presence of DOPC/DOPS SUVs. The trypsin accessibility to the protein in this zone is reduced, which may be because DYS R11–15 interacts with lipid SUVs through this region or because the presence of the liposomes changes the conformation of the protein. Therefore, we named this region the zone protected from trypsin digestion in the presence of DOPC/DOPS SUVs, and this zone corresponds to residues 1632–1696 of full-length human dystrophin. When compared with trypsin action on the protein without any lipids, the intensity of the proteolytic peptides that ranged from residue 250 to residue 392 increased significantly when DYS R11–15 was pre-incubated in the presence of both DOPC/DOPS and DOPC/DOPE SUVs. These results reflect higher trypsin accessibility in the presence of liposomes, and this region was called the zone unprotected from trypsin digestion in the presence of SUVs and corresponds to residues 1711–1753 of full-length human dystrophin. The peptide intensities from residues 6–181 were slightly higher when DYS R11–15 was in the presence of the zwitterionic SUVs (supplemental Fig. S3A) and slightly lower in

the presence of the anionic SUVs (supplemental Fig. S3B). The explanation for these data is that, when the DOPC/DOPS protected zone interacts with the anionic SUVs, the area formed by amino acids 6–181 are brought very close to the membrane and will be less suitable for proteolysis. This explanation also accounts for the increase in fluorescence intensity that was observed with anionic SUVs due to the proximity of two tryptophan residues, Trp¹²⁸ and Trp¹⁵⁵, with the hydrophobic lipid tails. The intensity variations between the peptides of different samples (free or with SUVs) in the other protein zones did not meet our criteria for significance.

Modeling and Mapping the Interactions Resulting from MS/MS Data

As expected, mGenTHREADER revealed that the best templates for DYS R11–15 were spectrin repeat proteins, particularly repeats 14–16 of human spectrin (Protein Data Bank code 3edv) (43) and repeats 15–16 of the chicken brain spectrin (Protein Data Bank code 1u5p) (44). DYS R11–13 shares 10.6% sequence identity with 3edv, and DYS R14–15 shares 19.6% sequence identity with 1u5p. As previously described (29), despite a relatively low percentage of sequence identity, the structures of individual spectrin-like repeats are nearly identical and provide good models for comparative modeling. Supplemental Fig. S4 presents the sequence alignments of DYS R11–15 with Protein Data Bank entries 3edv and 1u5p. We used MODELLER to build the model of DYS R11–15, and more than 100 homology models were generated in this manner. The models with GA341 scores higher than 0.6 with the lowest target function and DOPE scores were evaluated with ProSA-WEB and VERIFY3D. For the representative results shown in Fig. 7, profiles indicate a high quality model with a ProSA global score of -8.84 and a positive mean force potential from VERIFY3D. After minimization, the Ramachandran map shows 93.6% of the residues in the most favored regions, 6.4% in the allowed zones, and no residues in the forbidden zones (see supplemental material). On a ribbon plot of the protein (Fig. 7A (a)), each repeat is structured as a triple α -helical conventional coiled-coil (helices A–C). The DYS R11–15 model shows that the repeats are connected by the last helix (HC) of one repeat in continuity with the first helix (HA) of the next repeat. According to the selected model, the “a” and “d” residues (13) in the heptads lie on the inward facing surfaces of the helices and form the hydrophobic interaction core among the three helices. Fig. 7A (b and c) presents the hydrophobic and electrostatic surface properties, respectively. As expected for a soluble protein, the molecular surface of DYS R11–15 is mainly hydrophilic. The electrostatic potential at the molecular surface shows a distribution of negative and positive charge on the molecule. An intense negative charge is observed mainly on the repeats R12 and R13 of DYS R11–15. Visualization of the zones protected and unprotected from trypsin digestion defined earlier from MS data were performed on the three-dimensional structure obtained from homology modeling. The DOPC/DOPS SUVs protected zone from trypsin digestion is formed by the distal part of HB, the entire HC of repeat 12, and the proximal part of HA of repeat 13, as shown in red (Fig. 7B). The zone unprotected from trypsin digestion, formed by HB and HC of repeat

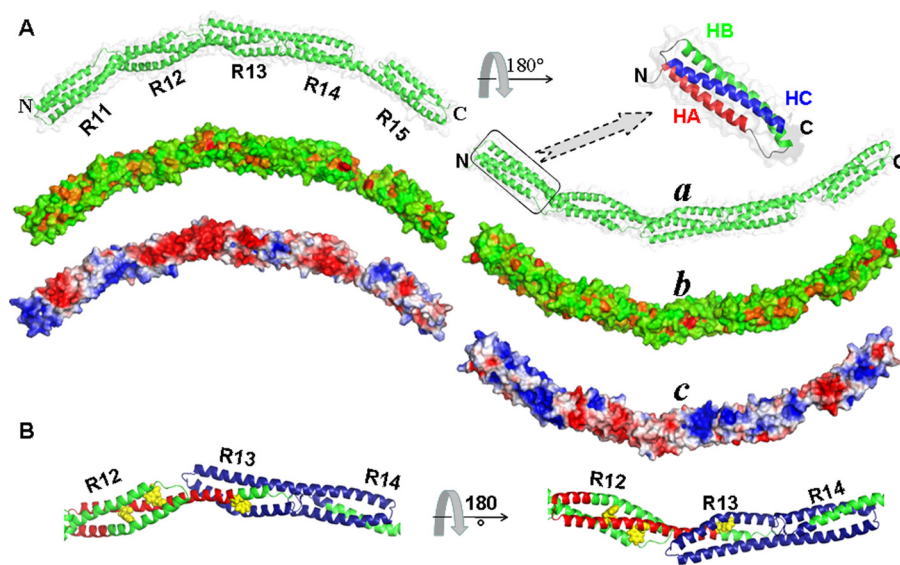


FIGURE 7. **Molecular modeling of DYS R11–15.** *A*, PyMOL representation of DYS R11–15 global fold (*a*). N and C termini are indicated as well as the repeat numbers of the central rod domain (R11–R15). Zooming in on repeat 11 of DYS R11–15 shows the triple coiled-coil helix formed by helices A, B, and C. The hydrophobic potential at the molecular surface (*b*) is colored by increasing hydrophobicity from green to red. The electrostatic potential at the molecular surface (*c*) is colored by increasing electrostatic potentials from red to blue. *B*, PyMOL representation of DYS R11–15 after peptide quantification using the MS/MS label-free technique. In red, the DOPC/DOPS protected zone (HB and HC of R12 and HA of R13) from trypsin digestion is shown, and in blue, the unprotected zone from trypsin digestion in the presence of lipids is shown (DOPC/DOPS or DOPC/DOPE). The tryptophan residues are shown in yellow.

13 and HA and HB of repeat 14, is shown in blue. Of the seven tryptophan residues in DYS R11–15, Trp²⁰² and Trp²¹² on HC of R12 are in the DOPC/DOPS protected zone (shown in yellow), and the environment of Trp²³⁶ is probably exposed to changes in the protected zone.

DISCUSSION

In this study, we focused on the behavior of the central domain repeats (repeats 11–15) of dystrophin. Using two experimental membrane models, vesicles and monolayers, we demonstrated that the binding of DYS R11–15 to lipids is dependent on membrane curvature and lipid packing. We used recombinant DYS R11–15 protein that had been previously shown to exhibit 71% α -helical content in solution and is considered to be properly folded (10). Our first observation was that DYS R11–15 displays an amphiphilic character and maintains its secondary helical structure at the interface. Similar conclusions have been reported for the DYS R2 single repeat and the DYS R1–3 multirepeat protein (8, 45).

We further investigated the interaction of DYS R11–15 with lipids. Steady-state fluorescence data demonstrated that the binding of DYS R11–15 was stronger to anionic than to zwitterionic SUVs or to either type of LUVs. However, when using lipid monolayers, it was determined that the mode and strength of the DYS R11–15 interaction with lipids depend more on the lipid nature and on the initial surface pressure of the monolayer. DYS R11–15 interacts more with the zwitterionic lipids than with the anionic monolayer when the initial surface pressure is less than 22.5 mN/m, because the headgroup of the DOPE phospholipid is smaller than that of DOPS. In addition, the hydrophobic tail is more accessible to the protein when the electrostatic contribution is very low or negligible. Conversely, when π_i is higher than 22.5 mN/m, DYS R11–15 has more affinity to the anionic monolayer, which is probably due to elec-

trostatic effects. Therefore, the critical surface pressure ($\pi_c = 32$ mN/m) was slightly higher than that of DOPC/DOPE ($\pi_c = 29$ mN/m). The interactions between DYS R11–15 and lipids are dependent on several factors, such as hydrophobic interactions, steric hindrance, and electrostatic attractions (46).

AFM image analyses show that the initial surface pressure of the lipids affects the organization of DYS R11–15 regardless of lipid composition. The formation of this network is a characteristic behavior of DYS R11–15, whereas DYS R1–3 and DYS R20–24 do not form networks under the same conditions (8). Although the lipids remain in a liquid-expanded state, the organization of DYS R11–15 is completely different at $\pi_i = 16$ or 20 mN/m and with anionic or zwitterionic lipid mixtures. At an initial surface pressure of 16 mN/m, the less compact lipids promote partial insertion of DYS R11–15 into the lipid film, which is associated with a hydrophobic interaction, and the protein spreads over the lipid film. DYS R11–15 starts to organize into interconnected clusters with DOPC/DOPE at $\pi_i = 16$ mN/m and generate a complete and well defined network at 20 mN/m. The same network was observed with DOPC/DOPS. Therefore, formation of the protein network through specific protein-protein interactions was promoted by the lipid monolayer and is due to the interfacial orientation of the proteins, which is observed at a lower pressure with DOPC/DOPE than with DOPC/DOPS. The headgroups of DOPC/DOPS are larger and more mobile than those of DOPC/DOPE, making DOPC/DOPS a more dynamic monolayer, and the hydrophobic tails of DOPC/DOPS are less accessible than those of the zwitterionic mixture. When the initial surface pressure ($\pi_i = 20$ mN/m) increases, the film fluidity decreases and favors interfacial stabilization, orientation, and finally protein-protein interactions. In this case, the nature of the lipids does not play the major role. This result is in accordance with the same behavior observed in

Behavior of Dystrophin R11–15 with Membrane Models

tryptophan fluorescence data of anionic and zwitterionic LUVs. DYS R11–15 is a monomer in solution and forms a protein monolayer with protein clusters at the air/liquid interface. We showed that the presence of a lipid monolayer induces protein-protein interactions, which do not form a random network but reflect a specific orientation of the protein. The results indicate that the dominant effects on protein organization are due to lipid packing rather than the charge and size of lipid heads. Nevertheless, the statistical characterization of the network at 20 mN/m shows differences on the protein network suggesting that a different and specific anchoring of the protein occurs with both lipid mixtures.

To better characterize the network and the orientation of the proteins under the monolayer, we used trypsin proteolysis in the subphase of a Langmuir trough. To our knowledge, this was the first time that trypsin accessibility assays were used under these conditions. The proteolysis patterns of DYS R11–15 under DOPC/DOPE and DOPC/DOPS monolayers are different after 20 min of trypsin action. Because the initial pressures were identical for both lipid mixtures, the results obtained by this approach confirm the conclusion that the molecular anchoring of DYS R11–15 beneath the monolayer depends on the nature of the lipid, whereas its organization depends on lipid packing.

No experimental x-ray or NMR structures are available for any of the dystrophin rod domain repeats. To date, only homology-based models have been proposed for single or several repeats of dystrophin (47, 48). We built a homology model of the three-dimensional structure of DYS R11–15 to gain insight into new structural information about the dystrophin rod domain and its binding to lipids. Interestingly, the five-repeat construct exhibits a regularly curved organization. Although unexpected, this *in silico* observation is compatible with transmission electron microscopy negative staining of the monomeric DYS R11–15 protein, which exhibited abundant curved forms with a mean length of 30 nm. Previous transmission electron microscopy studies on whole dystrophin also observed a long and relatively flexible rod-shaped molecule (49). Investigations of the biological significance of the flexibility of DYS R11–15 are in progress.

The three-dimensional structural model was used to interpret fluorescence data and label-free mass spectroscopy data with the aim of mapping the parts of the protein that interact with SUVs. The present study provides a detailed comparative analysis of the accessibility of lysine and arginine residues free and in SUV·DYS R11–15 complexes. The nano-LC/MS/MS allowed us to determine the protein interaction zone, which should be closely related to the changes in the fluorescence data. Interestingly, we were able to discriminate DOPC/DOPS and DOPC/DOPE specificity at the protein lipid interface on SUVs. We identified an area protected from trypsin action, one part of repeat R12 (HB and HC) and repeat R13 (HA), which is probably in contact with the lipid layer. Nevertheless, upon lipid binding, structural rearrangements within helix-helix interactions by moving heptads and rearrangements of hydrophobic residues in contact with lipids are likely to occur. This remark is in agreement with our previous circular dichroism analyses, which demonstrated that the protein remains structured in α -helix when it interacts with DOPC/DOPS SUVs (10).

Three tryptophan residues are in the DOPC/DOPS protected zone, and no tryptophan residues are present in R11 and R14. Upon lipid binding to DOPC/DOPS SUVs, the fluorescence signal of DYS R11–15 changes because of changes in the environment of the tryptophan residues (Trp²⁰², Trp²¹², and Trp²³⁶) located in R12 and R13. One particular target is amphiphilic helix C in repeat R12, which has two tryptophan residues (Trp²⁰² and Trp²¹²). Penetration of these residues into the hydrophobic core of the liposome could explain the degree of variation in the fluorescence intensity when the protein binds to anionic SUVs. Moreover, we identified a region (HB-HC of R13 and HA-HB of R14) common to zwitterionic and anionic SUV binding where trypsin accessibility is higher than that of the protein in solution. Surprisingly, R13 is involved in protected and unprotected zones, so the binding to SUVs is probably due to R13, regardless of the lipid composition. In the three-dimensional model, the DOPC/DOPS protected areas exhibit a negative electropotential that, if the triple-coiled coil remains folded, would not be fully compatible with a strong interaction with negatively charged SUVs. Thus, in DOPC/DOPS SUVs, R13 binding would induce new folding interactions that would lead to favorable electrostatic and hydrophobic interactions and increase the stability of the DYS R11–15 DOPC/DOPS SUV complex. In addition, because the fluorescence signals were identical for DOPC/DOPE SUVs and LUVs, it is tempting to postulate that the binding or destabilizing interaction with R13 may also appear with DOPC/DOPE LUVs. These results corroborate the above conclusions that the protein is more influenced by packing than by the lipid nature in SUVs, where the balance between hydrophobic and hydrophilic zones is very different due to the geometric lipid shapes (50). Moreover, the highly curved bilayers exhibit defects in lipid packing, and the amphipathic helices can insert as hydrophobic wedges (51). The ability of DYS R11–15 to bind lipids could be a result of a helix insertion being facilitated by a transient low density region.

Taken together, the present data concerning the behavior of DYS R11–15 in the presence of vesicles (SUVs/LUVs) and under monolayers lead to interesting conclusions. It is striking that the sarcolemma ruptures very frequently (52) in dystrophin-deficient muscles. In normal muscles, packing of lipids and the curvature of membrane blebs may vary according to the muscular status during contraction (high surface pressure) or extension (low surface pressure). Little is known about full-length dystrophin self-organization in living cells, except that its presence as subsarcolemmal orthogonal arrays has been revealed by immunofluorescence (53). There is clear evidence that dystrophin is involved in the resistance of sarcolemmal membranes to stress induced by the contraction-relaxation cycles of active muscles. Our study demonstrates that the DYS R11–15 subdomain of the dystrophin rod plays a central role in membrane resistance through interactions with lipid bilayers at different curvatures. The proteins insert into the lipid layer at low lipid packing through hydrophobic forces, and under higher lipid packing, they are tightly attached to the lipids through electrostatic forces. We showed that the helical structure is maintained, and the protein organization is modified by the lateral pressure of the associated lipids. In cellular conditions, events in which some parts of the rod domain

bind more strongly when lipid packing is high could stabilize blebs or membrane reservoirs; our present findings reflect a physiologically adaptive process. Therefore, the dystrophin DYS R11–15 could provide the phospholipid membrane with the solid support essential to maintaining membrane cohesion (54, 55). In support of this role for DYS R11–15 binding to membrane lipids, it is worth mentioning that truncated dystrophin that lacks this region is less efficient at rescuing the normal phenotype of the dystrophin-deficient mdx mouse (6, 56).

Finally, DYS R11–15 is known as the actin-binding domain ABD2. Data from the present work show that DYS R12 and R13 bind lipids. Because the actin-binding domain of DYS R11–15 is not precisely mapped, one exciting question concerns the possibility that both sarcolemma and actin filaments simultaneously bind to dystrophin through the DYS R11–15 region.

Acknowledgments—We thank Christophe Tascon, Agnès Burel, and the IFR 140 Microscopy Department for technical support.

REFERENCES

- Koenig, M., Hoffman, E. P., Bertelson, C. J., Monaco, A. P., Feener, C., and Kunkel, L. M. (1987) *Cell* **50**, 509–517
- Ervasti, J. M., Kahl, S. D., and Campbell, K. P. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 9161–9165
- Campbell, K. P., and Kahl, S. D. (1989) *Nature* **338**, 259–262
- Amann, K. J., Renley, B. A., and Ervasti, J. M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 28419–28423
- Deconinck, N., and Dan, B. (2007) *Pediatr. Neurol.* **36**, 1–7
- Harper, S. Q., Hauser, M. A., DelloRusso, C., Duan, D., Crawford, R. W., Phelps, S. F., Harper, H. A., Robinson, A. S., Engelhardt, J. F., Brooks, S. V., and Chamberlain, J. S. (2002) *Nat. Med.* **8**, 253–261
- Le Rumeur, E., Winder, S. J., and Hubert, J. F. (2010) *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 1713–1722
- Vié, V., Legardinier, S., Chieze, L., Le Bihan, O., Qin, Y., Sarkis, J., Hubert, J. F., Renault, A., Desbat, B., and Le Rumeur, E. (2010) *Biochim. Biophys. Acta* **1798**, 1503–1511
- Legardinier, S., Hubert, J. F., Le Bihan, O., Tascon, C., Rocher, C., Raguénès-Nicol, C., Bondon, A., Hardy, S., and Le Rumeur, E. (2008) *Biochim. Biophys. Acta* **1784**, 672–682
- Legardinier, S., Raguénès-Nicol, C., Tascon, C., Rocher, C., Hardy, S., Hubert, J. F., and Le Rumeur, E. (2009) *J. Mol. Biol.* **389**, 546–558
- Manno, S., Takakuwa, Y., and Mohandas, N. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 1943–1948
- Fiehn, W., Peter, J. B., Mead, J. F., and Gan-Elepano, M. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 5617–5620
- Winder, S. J., Gibson, T. J., and Kendrick-Jones, J. (1995) *FEBS Lett.* **369**, 27–33
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685
- Le Rumeur, E., Fichou, Y., Pottier, S., Gaboriau, F., Rondeau-Mouro, C., Vincent, M., Gally, J., and Bondon, A. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 5993–6001
- Larios, C., Miñones, J., Jr., Haro, I., Alsina, M. A., Busquets, M. A., and Trillo, J. M. (2006) *J. Phys. Chem. B* **110**, 23292–23299
- Vié, V., Van Mau, N., Pomarède, P., Dance, C., Schwartz, J. L., Laprade, R., Frutos, R., Rang, C., Masson, L., Heitz, F., and Le Grimellec, C. (2001) *J. Membr. Biol.* **180**, 195–203
- Sospedra, P., Nagy, I. B., Haro, I., Mestres, C., Hudecz, F., and Reig, F. (1999) *Langmuir* **15**, 5111–5117
- Blaudez, D., J.-M. Turllet, Dufourcq, J., Bard, D., Buffeteau, T., and Desbat, B. (1996) *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **92**, 525–530
- Blaudez, D., Buffeteau, T., Cornut, J. C., Desbat, B., Escafre, N., Pézolet, M., and Turllet, J. M. (1993) *Appl. Spectrosc.* **47**, 869–874
- Brockman, H. (1999) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 438–443
- Azzam, R. M. A., and Bashara, N. M. (1977) *Ellipsometry and Polarized Light*, p. 340, Elsevier/North Holland, Amsterdam
- Berge, B., and Renault, A. (1993) *Europhys. Lett.* **21**, 773–777
- Mikrut, J. M., Dutta, P., Ketterson, J. B., and MacDonald, R. C. (1993) *Phys. Rev. B* **48**, 14479
- Chi, L. F., Anders, M., Fuchs, H., Johnston, R. R., and Ringsdorf, H. (1993) *Science* **259**, 213–216
- Boutrou, R., Jardin, J., Blais, A., Tomé, D., and Léonil, J. (2008) *J. Agric. Food Chem.* **56**, 8166–8173
- Jones, D. T. (1999) *J. Mol. Biol.* **287**, 797–815
- McGuffin, L. J., Bryson, K., and Jones, D. T. (2000) *Bioinformatics* **16**, 404–405
- Kusunoki, H., MacDonald, R. I., and Mondragón, A. (2004) *Structure* **12**, 645–656
- Sali, A., and Blundell, T. L. (1993) *J. Mol. Biol.* **234**, 779–815
- Fiser, A., Do, R. K., and Sali, A. (2000) *Protein Sci.* **9**, 1753–1773
- Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R., and Thornton, J. M. (1996) *J. Biomol. NMR* **8**, 477–486
- Wiederstein, M., and Sippl, M. J. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**, W407–W410
- Sippl, M. J. (1993) *J. Comput. Aided Mol. Des.* **7**, 473–501
- Lüthy, R., Bowie, J. U., and Eisenberg, D. (1992) *Nature* **356**, 83–85
- Baker, R. D. (2001) *Lifetime Data Anal.* **7**, 65–83
- Jackson, M., and Mantsch, H. H. (1995) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **30**, 95–120
- Lavoie, H., Blaudez, D., Vaknin, D., Desbat, B., Ocko, B. M., and Salesse, C. (2002) *Biophys. J.* **83**, 3558–3569
- Bottier, C., Géan, J., Desbat, B., Renault, A., Marion, D., and Vié, V. (2008) *Langmuir* **24**, 10901–10909
- Chièze, L., Bolanos-Garcia, V. M., Pinot, M., Desbat, B., Renault, A., Beau-fils, S., and Vié, V. (2011) *J. Mol. Biol.* **410**, 60–76
- Pérez, J. A., Haro, I., Martín, I., Alsina, M. A., and Reig, F. (1995) *Anal. Chim. Acta* **303**, 65–72
- Kearney, P., and Thibault, P. (2003) *J. Bioinform. Comput. Biol.* **1**, 183–200
- Davis, L., Abdi, K., Machius, M., Brautigam, C., Tomchick, D. R., Bennett, V., and Michaely, P. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 6982–6987
- Kusunoki, H., Minasov, G., Macdonald, R. I., and Mondragón, A. (2004) *J. Mol. Biol.* **344**, 495–511
- DeWolf, C., McCauley, P., Sikorski, A. F., Winlove, C. P., Bailey, A. I., Kahana, E., Pinder, J. C., and Gratzner, W. B. (1997) *Biophys. J.* **72**, 2599–2604
- Demel, R. A., Paltauf, F., and Hauser, H. (1987) *Biochemistry* **26**, 8659–8665
- Legardinier, S., Legrand, B., Raguénès-Nicol, C., Bondon, A., Hardy, S., Tascon, C., Le Rumeur, E., and Hubert, J. F. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 8822–8832
- Krieger, C. C., Bhasin, N., Tewari, M., Brown, A. E., Safer, D., Sweeney, H. L., and Discher, D. E. (2010) *Cytoskeleton* **67**, 796–807
- Pons, F., Augier, N., Heilig, R., Léger, J., Mornet, D., and Léger, J. J. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 7851–7855
- Israelachvili, J. N., Mitchell, D. J., and Ninham, B. W. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* **470**, 185–201
- Hatzakis, N. S., Bhatia, V. K., Larsen, J., Madsen, K. L., Bolinger, P. Y., Kunding, A. H., Castillo, J., Gether, U., Hedegård, P., and Stamou, D. (2009) *Nat. Chem. Biol.* **5**, 835–841
- Petrof, B. J., Shrager, J. B., Stedman, H. H., Kelly, A. M., and Sweeney, H. L. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 3710–3714
- Prins, K. W., Humston, J. L., Mehta, A., Tate, V., Ralston, E., and Ervasti, J. M. (2009) *J. Cell Biol.* **186**, 363–369
- Hamill, O. P., and Martinac, B. (2001) *Physiol. Rev.* **81**, 685–740
- Sheetz, M. P., Sable, J. E., and Döbereiner, H. G. (2006) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35**, 417–434
- Liu, M., Yue, Y., Harper, S. Q., Grange, R. W., Chamberlain, J. S., and Duan, D. (2005) *Mol. Ther.* **11**, 245–256
- Koenig, M., and Kunkel, L. M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 4560–4566

Suuplement to “ADAPTATION OF HUMAN DYSTROPHIN REPEATS 11-15 SUBDOMAIN TO ITS LIPIDIC ENVIRONMENT”

Joe Sarkis^{1,2}, Jean-François Hubert¹, Baptiste Legrand¹, Estelle Robert², Angélique Chéron¹, Julien Jardin³, Eric Hitti⁴, Elisabeth Le Rumeur¹, Véronique Vié².

From Université Européenne de Bretagne (UEB), ¹UMR-CNRS 6026 - IFR 140, Equipe RMN-Interactions lipides protéines, Faculté de Médecine, CS 34317, Université de Rennes 1, ²UMR-CNRS 6251, Institut de Physique de Rennes (IPR), Université de Rennes 1, ³INRA, AGROCAMPUS-OUEST, UMR 1253, Science et Technologie du Lait et de l'œuf and ⁴Laboratoire Traitement du Signal et de l'Image (LTSI), INSERM 642, Rennes, France.

Materials and Methods:

Statistical analysis of the AFM images

The images collected were 512 x 512 pixels. AFM images with 256 gray levels correspond to 5 µm x 5 µm images with a maximum of 5 nm of height. The mean network height was calculated by fitting the histogram of the gray levels to a sum of two extreme density functions (1). The height is given by $m_2 - m_1$.

$$F = \frac{A_1}{\sigma_1} e^{-\left(\frac{m_1 - x}{\sigma_1}\right)^2} + \frac{A_2}{\sigma_2} e^{-\left(\frac{m_2 - x}{\sigma_2}\right)^2}$$

Where A , m and σ are the amplitude, mean and standard deviation, respectively, of each density function. The mean width of the network and the mean radius of the mesh were calculated using granulometry techniques. Granulometry estimates the intensity distribution over the surface area of an object (usually a circle) as a function of size. Granulometry likens image objects to stones whose sizes can be determined by sifting them through screens of increasing size and collecting the remnants after each pass. Image objects are sifted by using a structuring element of increasing size over the image and counting the intensity of the remaining surface area (summation of the pixel values in the image) after each opening.

The network width is the mean width of the ridges that form the network, including the nodes which are larger than the wall. The “network radius” is the radius of the cell or mesh.

Supplemental material reference:

1. Petrou, M., and Sevilla, P. G. (2006) *Image Processing: Dealing With Texture* John Wiley & Sons, Ltd, UK

Results:

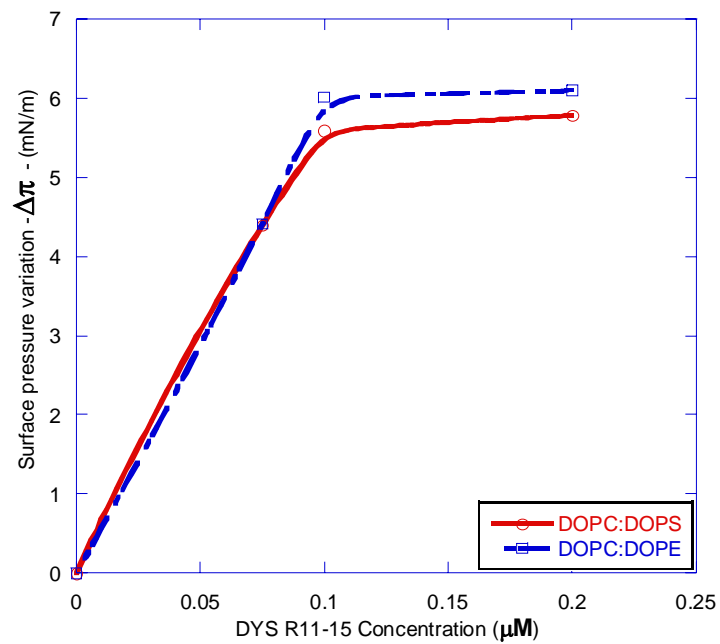


Figure S1: Variation of the surface pressure (mN/m) of lipid monolayer at 20mN/m, after injection of DYS R11-15 at different concentration (μM).

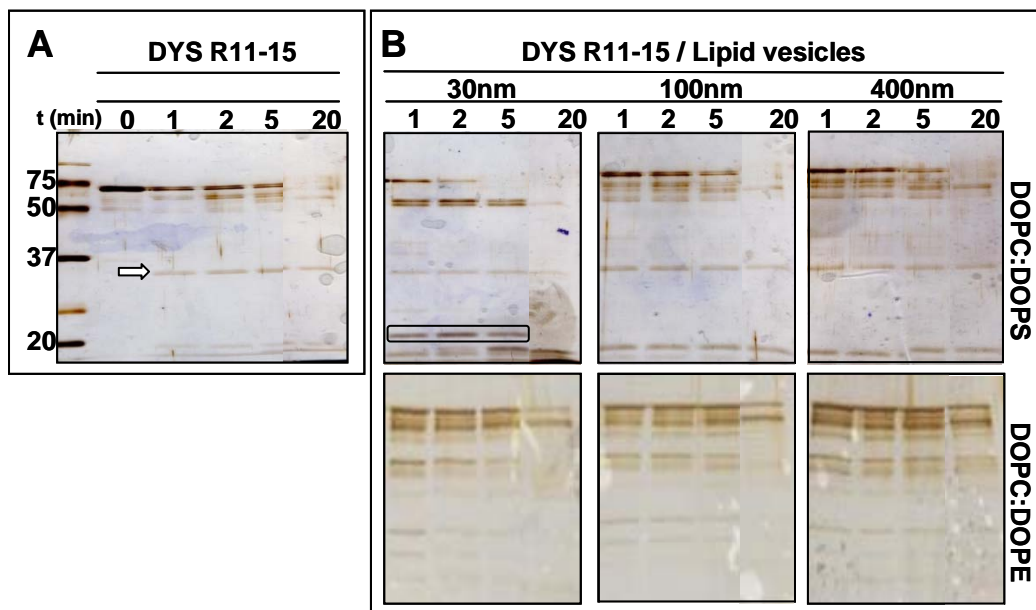


Figure S2: SDS-PAGE analysis of DYS R11-15 following 0, 1, 2, 5 and 20 min of trypsin digestion at 20°C. Gels were stained with silver nitrate. **(A)** DYS R11-15 alone. White arrow indicates the trypsin strain. **(B)** DYS R11-15 was preincubated for two hours in the presence of DOPC:DOPS or DOPC:DOPE lipid vesicles of different diameters: 30, 100 and 400 nm. The protein/lipid molar ratio was 1/1000. A specific proteolytic product at 23 kDa, encircled in black, is observed when DYS R11-15 was preincubated in the presence of 30 nm DOPC:DOPS (SUVs) vesicles.

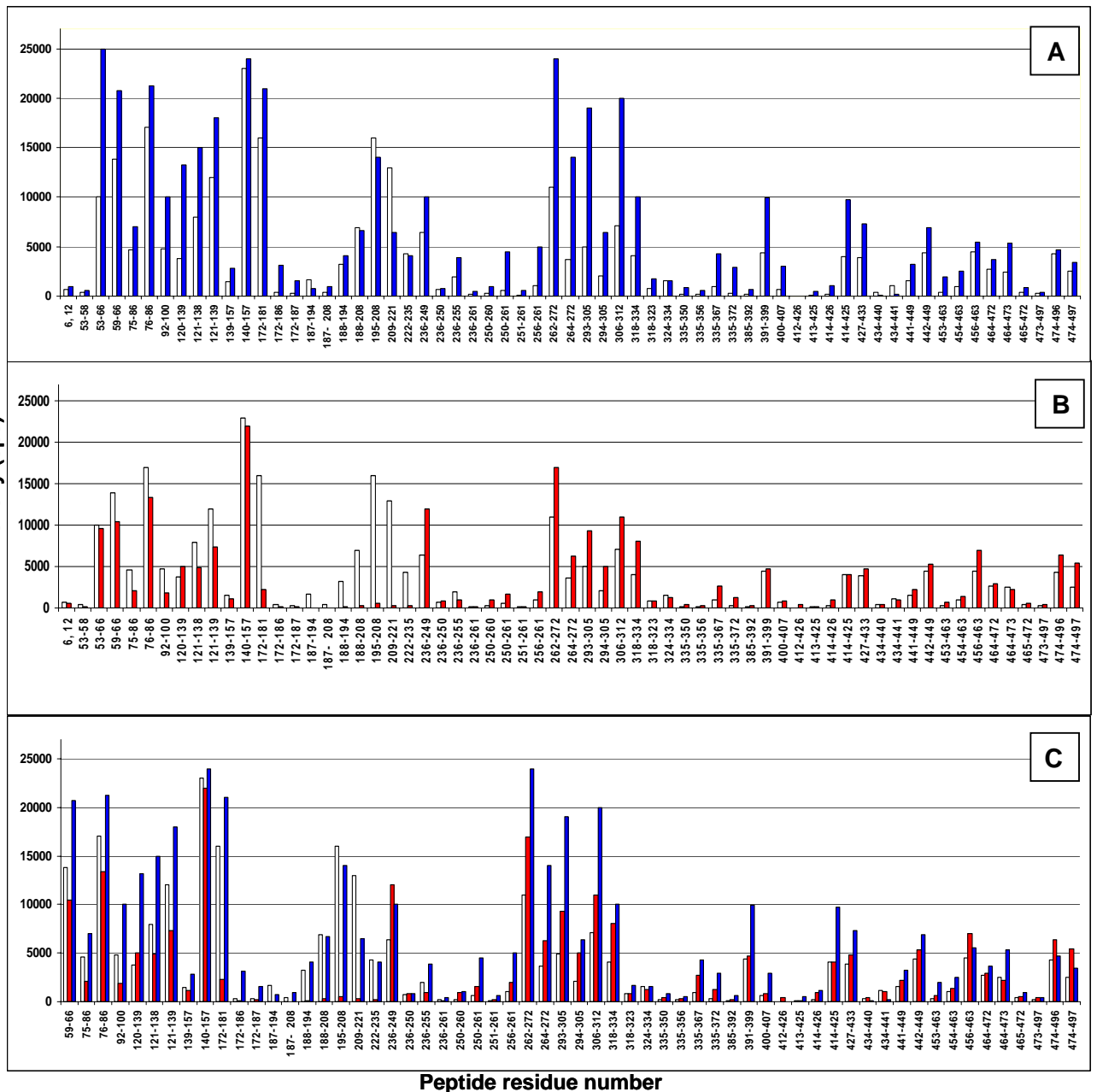


Figure S3: Mass spectrometry data of MS/MS free labeling after 20 min of trypsin digestion of DYS R11-15 in TNE buffer (white), after incubation with DOPC:DOPE (blue) or with DOPC:DOPS SUVs (red).

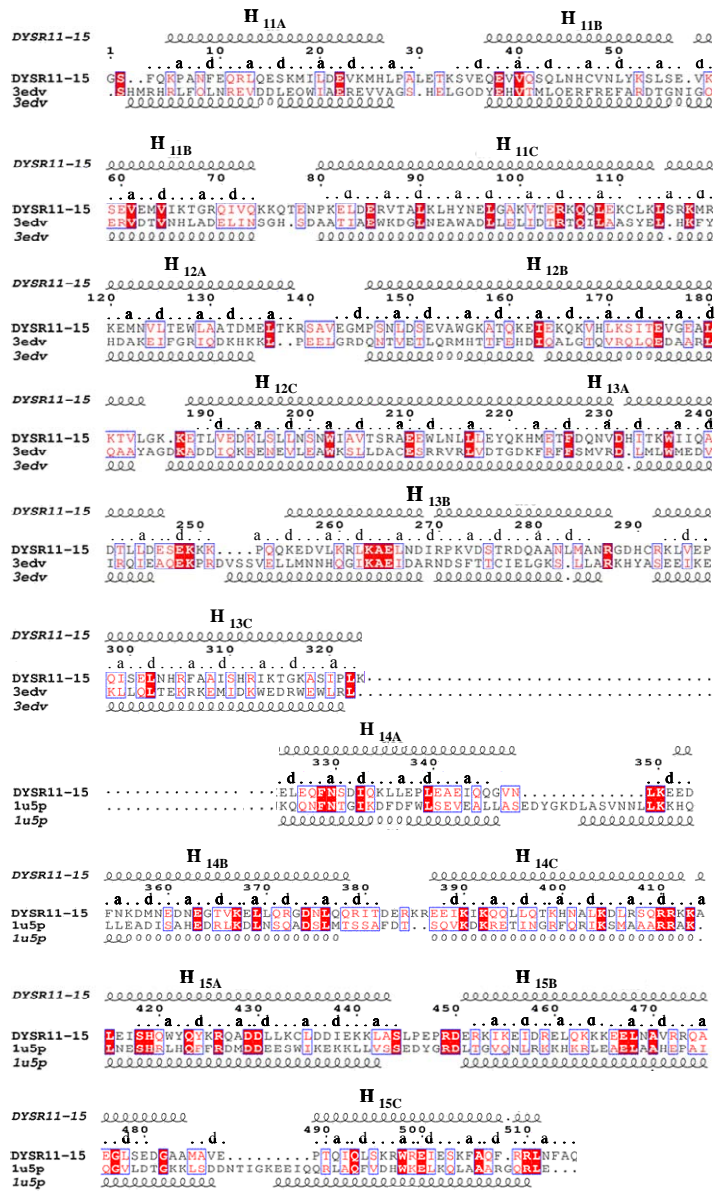


Figure S4: Sequence alignment of human repeats 14-16 of Beta2-Spectrin (3edv), and repeats 15 and 16 of chicken brain Alpha Spectrin (1u5p) with repeats 11-15 of human dystrophin (DYS R11-15). Alignment is represented using ESPrnt. The numbers above the sequences correspond to DYS R11-15. Identical residues are indicated with white letters on a red background, whereas similar residues are indicated with red letters. The helices for templates 3edv and 1u5p, as well as those predicted by PSIPRED for DYS R11-15, are represented as squiggles. Assignment of the heptad repeat is from Winder Gibson Kendrick-Jones (WGK) alignment.

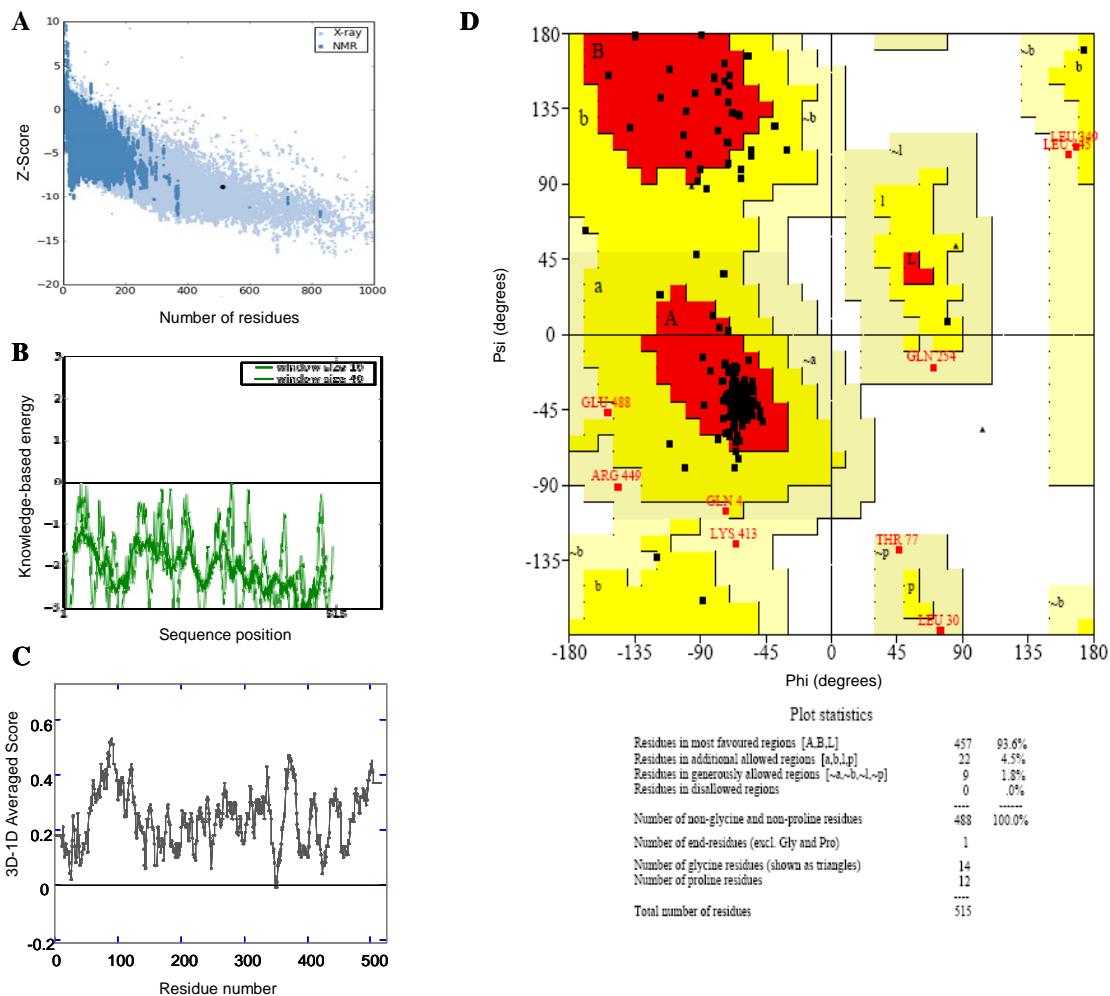


Figure S5: (A and B) Prosa-WEB overall quality score (Z-score) and local energy profile. (A) The Z-score characteristic of an NMR-determined structure in the PDB is displayed in the dark-blue region, and X-ray-determined structures are in blue. (B) The energy profile shows the local model quality (energies as a function of the sequence). (C) Verify3D energy profile (3D profiles). (D) shows a Ramachandran plot that depicts the distribution of the ϕ - ψ values.

En complément des expériences ayant abouti aux résultats présentés dans l'article ci-dessus, nous avons réalisé des analyses de comportement de DYS R 11-15 aux interfaces. Les résultats des expériences de résonance plasmonique de surface et d'AFM présentées ci-dessous confortent nos conclusions.

Dans un premier temps, nous avons exploité les résultats de l'ellipsométrie de manière originale pour la détermination du coefficient de diffusion de DYS R11-15.

II.3.A. Adsorption de DYS R11-15 à l'interface liquide/air : Calcul du coefficient de diffusion

Dans l'étude de l'adsorption de protéines, l'ellipsométrie permet de déterminer la quantité de matière Γ présente à l'interface. *Jönsson et al.* ont montré qu'il existe une relation linéaire entre Δ et la concentration de surface Γ de protéines adsorbées à l'interface solide-air (189). Cette linéarité a également été observée à l'interface eau-air (190). La valeur du coefficient de proportionnalité varie cependant d'un auteur à l'autre. Cette différence pourrait en partie être attribuée à différents réglages des systèmes de mesure (angle d'incidence ou longueur d'onde du faisceau lumineux réfléchi) ainsi qu'à différentes conditions expérimentales, notamment au niveau de la nature du substrat (solide ou liquide).

Nous avons choisi d'estimer Γ à partir de mesures de Δ en utilisant la relation suivante :

$$\Gamma(\text{mg} / \text{m}^2) = 0,2 \times \Delta(^{\circ}). \quad (\text{eq. 1})$$

Celle-ci est extraite des données ellipsométriques publiées par *de Feijter* pour l'étude de l'adsorption de κ -caséine à l'interface eau-air (**Fig II.3.1.**) (190).

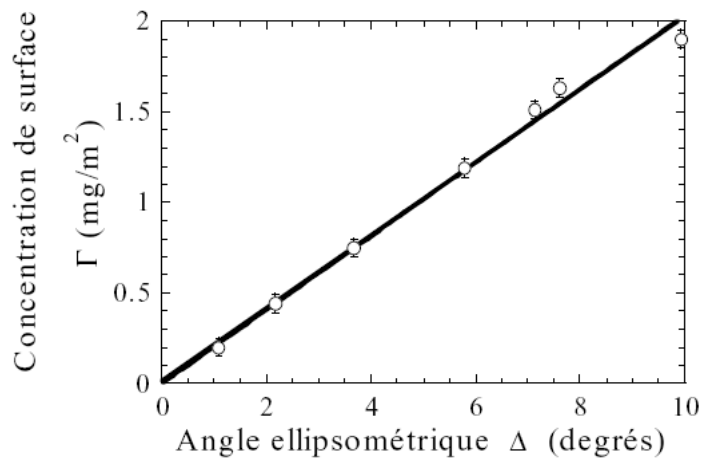


Fig II.3.1. Adsorption de la κ -caséine à l'interface eau-air. Relation entre l'angle ellipsométrique Δ mesuré et la concentration de surface Γ . Adapté de la référence (190).

Plusieurs contraintes sont imposées pour le choix de cette relation en particulier. Lors des mesures réalisées par *de Feijter*, deux autres méthodes en plus de l'ellipsométrie ont été utilisées pour estimer Γ . Les résultats de ces mesures sont concordants, avec un faible écart (moins de 5%). Ainsi, l'équation (*eq.1*) est applicable pour l'exploitation de l'ellipsométrie et notamment dans le cas de l'adsorption de κ -caséine. D'autres études ont suggéré que cette équation devait également être applicable à notre dispositif et pour l'adsorption d'autres protéines (191, 192). D'une part, notre configuration expérimentale (décrite dans *Experimental Procedures* (193)) est aussi proche que possible de celle de *de Feijter*. L'étude est réalisée à l'interface eau-air, la source lumineuse est un laser de même longueur d'onde et les angles d'incidence sont quasi identiques dans les deux cas. D'autre part, il semble raisonnable que l'équation (*eq.1*), déterminée pour l'adsorption de κ -caséine, reste utilisable pour d'autres protéines solubles (191, 192, 194) telles que celles que nous désirons étudier comme DYS R11-15.

Les incertitudes expérimentales sont de ± 0.2 mN/m pour la pression de surface et $\pm 0.2^\circ$ pour l'angle ellipsométrique.

Il est possible de déterminer le coefficient de diffusion des protéines d'après les données ellipsométriques :

Lors de la première étape de l'adsorption, le transport des molécules protéiques de la sous-phase à l'interface est supposé être un processus à diffusion contrôlée. Ainsi, la

concentration de surface suit la relation de *Ward et Tordai* (195) décrite par l'équation suivante :

$$\Gamma = 2.C_b.\left(\frac{D.\Delta t}{\pi}\right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{eq. 2})$$

où Γ est la concentration de surface, C_b est la concentration de protéine en solution, D est le coefficient de diffusion et Δt le temps.

A l'Institut de Physique de Rennes, la détermination de coefficient de diffusion de cette manière a été réalisée en utilisant différentes protéines globulaires, telles que la caséine cappa de chèvre (191) et l'ovotransferrine (194).

DYS R11-15 est une protéine plutôt filamentaire que globulaire et présente des propriétés amphipatiques. Les différentes manipulations réalisées sur cette protéine ont cependant montré qu'elle est stable en solution.

Dans la cuve de Langmuir, DYS R11-15 est injectée dans la sous-phase (Tampon TNE à pH 7,5) à une concentration finale de $1.10^{-8} \text{ M} = 590 \text{ mg.m}^{-3}$ (Masse Moléculaire =59 KDa). La cinétique d'adsorption de DYS R11-15 à l'interface TNE-air est suivie en mesurant simultanément la variation de l'angle ellipsométrique Δ et de la pression de surface π au cours du temps. Ainsi, nous déterminons la concentration de surface en utilisant l'équation (*eq. 1*) (*Fig II.3.2*).

Notons que l'angle ellipsométrique de référence a été mesuré sur le tampon TNE. Comme l'angle de réfraction du tampon n'est pas différent de celui de l'eau, l'angle ellipsométrique est égal à zéro.

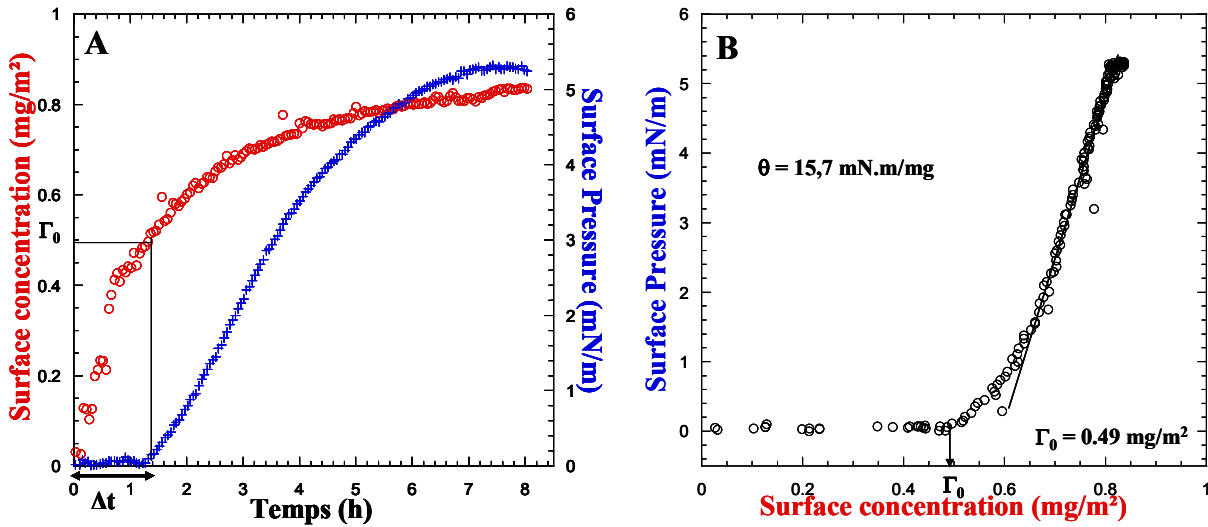


Fig II.3.2. Adsorption de DYS R11-15 (1.10^{-8} M) à l'interface TNE-air (pH 7,5). (A) variation de la concentration de surface Γ (mg/m^2) et de la pression de surface π (mN/m) au cours du temps (h). (B) variation de la pression de surface π en fonction de la concentration de surface Γ .

D'après la figure II.3.2, la concentration surfacique en fin de cinétique est de $0,84 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$. On peut remarquer que l'angle ellipsométrique Δ passe de 0 à $4,2^\circ$ après l'injection de la protéine dans la cuve. Cet angle étant sensible à la quantité de matière à la surface, il semble que les protéines migrent vers l'interface.

La représentation de valeurs de π en fonction de Γ (**Fig II.3.2-A**) permet de déterminer le taux de couverture Γ_0 et le temps Δt à partir duquel la pression de surface devient différente de zéro ($\pi > 0,2 \text{ mN}/\text{m}$). Ainsi, la pression de surface commence à augmenter après $\Delta t = 1,53 \text{ h} = 5508 \text{ s}$, et $\Gamma_0 = 0,49 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$.

Le coefficient de diffusion de DYS R 11-15 calculé à partir de l'**eq. 2** est $19,8 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

La concentration de surface critique Γ_0 à partir de laquelle la pression de surface commence à augmenter peut être mise en évidence en représentant la valeur de π en fonction de Γ (**Fig II.3.2-B**). Une fois la concentration critique dépassée ($\Gamma > \Gamma_0$), la pression de surface varie linéairement avec Γ . La pente de cette corrélation linéaire est $\theta =$

15,7 mN.m/mg. Elle correspond à l'augmentation de la pression de surface relative à l'augmentation de la concentration surfacique (196).

Protéine	MW (kDa)	$D \times 10^{-10}$ (m ² /s)	Γ_0 (mg.m ⁻²)	θ (mN.m/mg)
Pin-a	13	8	0,9	5
Caséine-κ	19,3	0,5	12	3,3
Ovotransferrine (pH6,5)	77,7	0,053	0,77	6
(pH 8)	77,7	0,0017	0,45	6
DYS R11-15	59	0,98	0,49	15,7

Tableau II.3.1. Comparaison des valeurs du coefficient de diffusion D entre plusieurs protéines globulaires de poids moléculaires différents. La puroindoline A (pin a) est une protéine du blé étudiée par *Bottier C et al.* (197). La caséine κ est une protéine du lait de chèvre (191). L'ovotransferrine est une protéine du blanc d'œuf, très sensible aux variations de pH (194).

Le **Tableau II.3.1.** résume le comportement de plusieurs protéines. En comparant le coefficient de diffusion de ces trois protéines globulaires (pin a, caséine κ et ovotransferrine), nous remarquons que D diminue si le poids moléculaire augmente. Mais cette variation n'est pas linéaire et d'autres facteurs interviennent, notamment la nature de la protéine, sa forme, son degré d'hydratation et les conditions physico-chimiques de son environnement tel que le pH.

Même si la caséine κ présente un poids moléculaire (19,3 kDa) légèrement plus élevé que celui de pin a (13 kDa), son coefficient de diffusion est largement inférieur à celui de pin-a. Cela est un cas particulier, causé par la nature de la caséine κ, capable de s'agréger, diminuant ainsi leur diffusion en solution(191).

Dans le même contexte, les conditions du milieu influencent la dynamique et ainsi, la diffusion de certaines protéines. Or, l'ovotransferrine est très sensible à la variation du pH et présente une conformation plus compactée au pH 6,5 qu'à pH 8. Ceci est aussi détecté par la mesure de son coefficient de diffusion où D est plus grand à pH 6,5 qu'à pH 8 (194).

Concernant notre protéine filamenteuse DYS R11-15, son poids moléculaire (59 kDa) se situe entre ceux des deux protéines globulaires pin a (13 kDa) et l'ovotransferrine

(77,7 kDa). De plus, nous remarquons que la valeur de D calculée se situe bien entre les deux valeurs ($D \times 10^{-10}$ (m²/s) : $0,053 < 0,98 < 8$). Ainsi, en mettant le cas particulier de la caséine κ à part, nous pouvons déduire que notre mesure de D est cohérente.

Une autre méthode de détermination du D de DYS R11-15 a été utilisée à titre comparatif. Comme indiqué dans l'article (193), le rayon de Stokes de DYS R11-15 déterminé par chromatographie d'exclusion de taille est de 3,4 nm. Ainsi, en utilisant la relation de Stokes-Einstein (*eq. 3*), il est possible de calculer un coefficient de diffusion D , et de comparer ainsi les deux valeurs.

$$R_H = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D} \quad (\text{eq. 3})$$

Avec k_B est la constante de Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23}$ N.m.K⁻¹), T la température (en °Kelvin), η la viscosité de la solution (N.m⁻²) et D le coefficient de diffusion (m².s⁻¹).

Ainsi, à une température de 20°C, et avec une viscosité du tampon égale à celle de l'eau $1 \cdot 10^{-3}$ N.m⁻².s, nous déterminons un coefficient de diffusion de DYS R11-15 égal à $6,3 \cdot 10^{-11}$ m².s⁻¹.

Les deux valeurs du coefficient de diffusion de DYS R11-15, obtenues par chromatographie d'exclusion de taille ($D = 0,63 \cdot 10^{-10}$ m².s⁻¹) et par les mesures d'ellipsométrie et de tensiométrie ($D = 0,98 \cdot 10^{-10}$ m².s⁻¹), sont de même ordre de grandeur. Nous concluons d'abord que la protéine se trouve sous forme monomérique en solution. Ensuite, l'adsorption à l'interface eau-air d'une protéine non globulaire mais soluble, telle que DYS R11-15, permet d'estimer un coefficient de diffusion en suivant la cinétique par ellipsométrie et tensiométrie.

II.3.B. Analyse d'interaction de DYS R11-15 / SUVs par résonance plasmonique de surface (SPR) – Biacore

L'étude de DYS R11-15 en interaction avec les SUVs a été réalisée en utilisant la spectroscopie de Fluorescence du tryptophane et la spectrométrie de masse (193). En complément des travaux exposés dans l'article 3, une approche pour l'étude de cette interaction a été réalisée par résonance plasmonique de surface.

Des biocapteurs optiques peuvent convertir l'accumulation de masse à une surface en un signal optique pour surveiller un large éventail d'interactions. La technologie Biacore repose sur la résonance plasmonique de surface qui est employée afin de détecter optiquement des variations de masse sur une surface d'or (**Fig II.3.3**). Ce principe est utilisé dans une puce « *sensor chip* » sur laquelle un ligand est immobilisé (généralement d'une manière covalente). Le second partenaire est injecté par un système microfluidique dans un flux continu de tampon à la surface de la *sensor chip*.

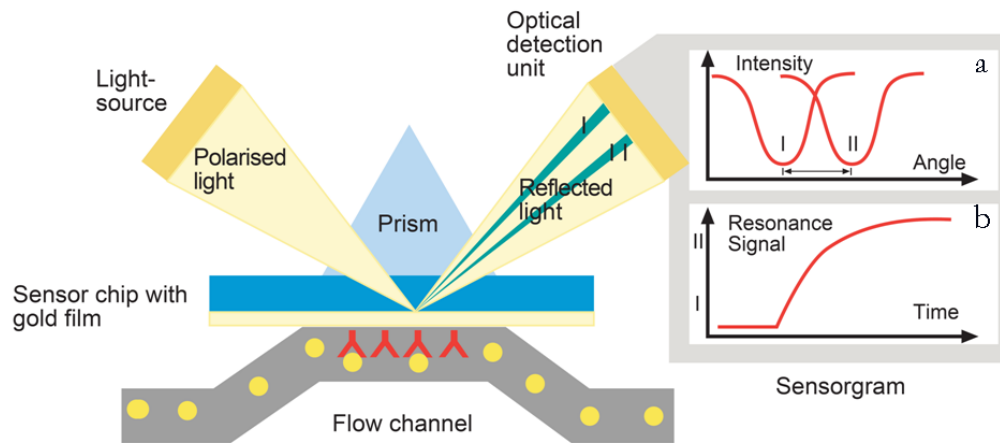


Fig II.3.3. Principe de l'analyse d'interaction des biomolécules par résonance plasmonique de surface. Le système de micro fluidique est posé sur le senseur composé d'une feuille d'or et de verre. Les ligands (en rouge) sont fixés d'une manière covalente sur la surface du sensor chip. Les analytes (en jaune) sont entrainés par un système micro fluidique sur la surface du bio-senseur. Une interaction analyte-ligand fait augmenter l'intensité du signal de résonance.

L'association et la dissociation des molécules en solution avec les récepteurs immobilisés modifient l'indice de réfraction du milieu proche de la surface. Ces changements sont suivis en temps réel pour mesurer la quantité de molécules liées, leur affinité pour le récepteur et la cinétique de l'association et de dissociation de l'interaction. Les niveaux d'interaction sont exprimés en unités arbitraires appelées unités de résonance (RU) (**Fig II.3.4**).

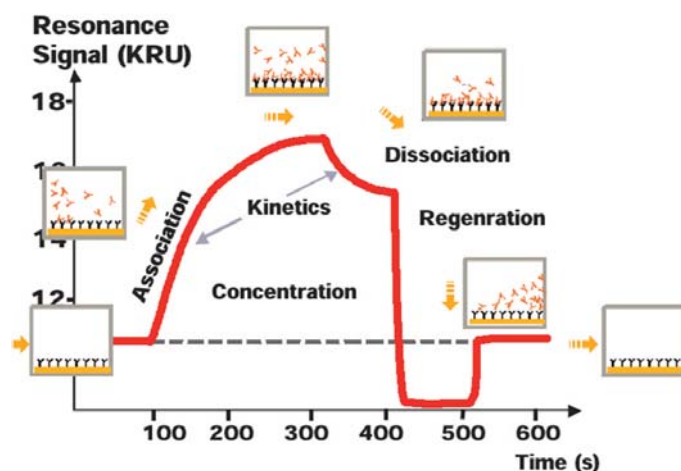


Fig II.3.4. Sensogramme montrant la variation du signal de résonance en fonction du temps, lors d'une association ou dissociation entre le ligand et l'analyte. Une phase de régénération est possible dans le but de libérer tous les analytes qui sont associés aux ligands.

Pour l'analyse des interactions de DYS R11-15 avec les SUVs (anioniques et zwitterioniques), la première étape a consisté en la fixation des liposomes sur la sensor chip. De la streptavidine a été préalablement immobilisée, puis des SUVs contenant 0,1% de lipides biotinylés sont fixés sur la surface grâce à l'interaction forte streptavidine-biotine. Ensuite, l'injection de DYS R11-15 dans le système microfluidique permet de caractériser le comportement de la protéine vis-à-vis des SUVs en fonction du temps.

Dans notre étude, les analyses de SPR ont été effectuées à 25°C en utilisant un appareil Biacore 3000 équipé des sensor chip type CM5 (carboxy-méthyle dextrane) (*GE Healthcare*). Les analyses sont réalisées en collaboration avec le Dr. D. Dupont au laboratoire STLO de l'INRA de Rennes. Suite à des réactions de type "amine coupling", la streptavidine est fixée sur la surface.

Avant l'immobilisation, la puce CM5 a été préconditionnée dans l'eau à un débit de 100 ml/min suivie par deux injections successives de 20 µl de NaOH 50mM. Ensuite, la surface a été activée par l'injection d'un mélange 1:1 de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) et la N-hydroxy succinimide (NHS) pendant 15 min à 5 ml/min (**Fig II.3.5**). Les tampons utilisés pour l'immobilisation covalente du ligand ont été optimisés avant l'expérience en utilisant le logiciel d'assistance pH (*GE Healthcare*).

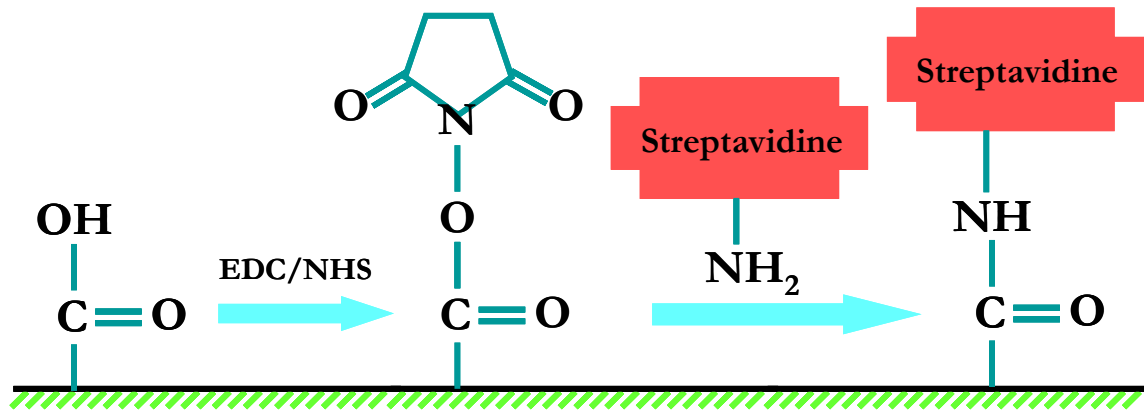


Fig II.3.5. Fixation de la streptavidine sur la sensor chip type CM5.

La streptavidine (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) est diluée dans 10 mM d'acétate de sodium pH 5,0 pour une concentration finale de 300 mg/ml. Ensuite, 60 ml du ligand dilué sont injectés sur la surface pendant 12 min. Les injections sont répétées jusqu'à saturation. Enfin, les esters de succinimide restants n'ayant pas réagi sont désactivés avec l'éthanolamine pendant 7 min. La surface est ensuite lavée avec 5 ml de NaOH 50 mM. Une surface de dextrane non modifiée est utilisée comme surface de référence.

Les réactifs utilisés, 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC), la N-hydroxysuccinimide (NHS) et 1 M éthanolamine HCl pH 8,5 sont fournis par Biacore *GE healthcare*.

Une fois que la streptavidine est fixée, nous injectons des SUVs biotynilés (DOPC :DOPS ou DOPC :DOPE SUVs contenant 0,1 % de biotinoyl dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoéthanolamine (*invitrogen*)). Une augmentation du signal de résonance jusqu'à saturation témoigne de la fixation des liposomes sur la surface par l'interaction streptavidine-biotine.

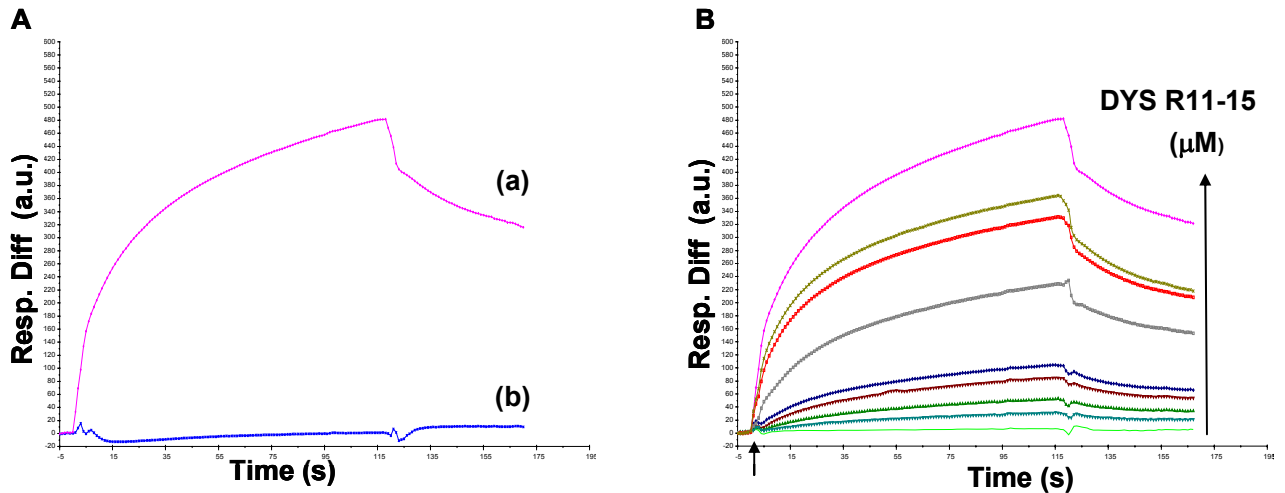


Fig II.3.6. Interaction de DYS R11-15 avec les SUVs immobilisées. (A) Variation de l'intensité de résonance (en unité arbitraire) après injection de DYS R11-15 (5 μM) sur le sensor chip chargé en DOPC :DOPS SUVs (a) et en DOPC :DOPE SUVs (b). **(B)** Variation de liaison de DYS R11-15 avec DOPC :DOPS SUVs à différentes concentration de protéine (0 ; 0,3 ; 0,5 ; 1 ; 1,8 ; 3 ; 4 et 5 μM).

Lorsque des SUVs anioniques (DOPC :DOPS) sont fixées sur la sensor chip, DYS R11-15 (5 μM) est injectée dans le système microfluidique (flux de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$). Le signal augmente significativement (de 0 à 300 RU) montrant qu'une interaction protéine-lipide se forme (**Fig II.3.6.A-a**). Plus DYS R11-15 est injectée à une concentration élevée, plus l'intensité de la réponse est grande (**Fig II.3.6.B**). Par contre, le passage de DYS R11-15 (5 μM) sur des SUVs zwitterioniques (DOPC :DOPE) n'engendre aucune modification significative de signal (**Fig II.3.6.A-b**). Dans les mêmes conditions expérimentales, DYS R20-24 ne génère aucun signal ; cette protéine a été jusqu'à présent considérée comme non interagissant avec les SUVs (138). Ceci souligne la spécificité de liaison que nous observons avec DYS R11-15

Dans le cas des SUVs DOPC :DOPE, aucune réponse significative n'est obtenue par Biacore, alors qu'une diminution de fluorescence du tryptophane a été observée lorsque les partenaires sont mis en contact en solution. L'interaction DYS R11-15-DOPC :DOPE SUVs apparaît donc faible et non détectable par Biacore. Cette méthode nécessite l'existence d'un flux continu (minimum 5 $\mu\text{L}/\text{min}$) dans le système microfluidique. Ce flux peut être suffisant pour rompre des interactions de faible intensité, ce qui est vraisemblablement le cas pour nos études en présence de

DOPC :DOPE SUVs. Par contre, les cinétiques de dissociation de DYS R 11-15 en présence de SUVs DOPC :DOPS sont lentes et il n'est pas observé de retour du signal au niveau de base. La fixation de la protéine sur ces vésicules anioniques est donc forte et non totalement rompue par le flux de tampon sur le dispositif.

Nous avons observé par fluorimétrie que les résidus tryptophane de la protéine sont exposés à un environnement beaucoup plus hydrophobe en présence des SUVs anioniques que zwitterioniques, et conclu que l'interaction de DYS R11-15 avec les SUVs est considérablement plus forte avec les lipides anioniques qu'avec les lipides zwitterioniques (*Figure 3* dans l'article (193)). Les analyses par Biacore confirment donc cette conclusion.

Les interactions entre DYS R11-15 et les SUVs DOPC :DOPS détectées par spectrofluorescence et par Biacore apparaissent donc de forte intensité. Suite à la mise en évidence de ces interactions, nous avons envisagé de déterminer les constantes d'association et de dissociation entre la protéine et les liposomes. Des SUVs anioniques sont fixées en surface puis la protéine DYS R11-15 est injectée à différentes concentrations (de 0 à 5 μM) (**Fig II.3.6.B**). L'intégration des données de cinétiques et d'amplitude de signal de liaison permet de calculer les constantes d'affinité via le logiciel BIAevaluation. Malgré plusieurs tentatives et modification des conditions expérimentales, variations du flux (de 5 à 70 $\mu\text{L}/\text{min}$), des intervalles de concentrations de protéines injectées et des quantités de liposomes immobilisées, les tests de validations statistiques des déterminations de constantes n'ont pas permis d'obtenir des valeurs chiffrées avec un indice de confiance satisfaisant.

Notre analyse par résonance plasmonique de surface a donc permis une caractérisation qualitative de l'interaction DYS R11-15 liposomes. L'aspect quantitatif n'a pu être mené à terme. Les conclusions tirées de ces expériences de Biacore sont toutefois en complet accord avec celles tirées des autres approches expérimentales, à savoir que la protéine interagit beaucoup plus fortement avec des SUVs anioniques qu'avec des liposomes zwitterioniques.

II.3.C. Images AFM de DYS R11-15 et monocouche lipidique

Nous présentons des images AFM complémentaires à celles qui ont été sélectionnées pour l'article (193). La première série concerne l'organisation de DYS R11-15 dans les monocouches, en fonction de la nature et du *packing* lipidique (pression de surface initiale- π_i) (**Fig II.3.7.** et **Fig II.3.8.**). Ensuite, les images montrant l'organisation de DYS R11-15 dans les monocouches lipidiques, après protéolyse par la trypsine (**Fig II.3.9.** et **Fig II.3.10.**). Pour la publication, nous avons choisi de montrer uniquement des images de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$. Dans le but de montrer différentes zones d'analyse, nous ajoutons ci-dessous des images supplémentaires avec différentes tailles de zone de balayage : $10 \times 10 \mu\text{m}^2$, $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ et $2 \times 2 \mu\text{m}^2$.

DYS R11-15 / DOPC:DOPS

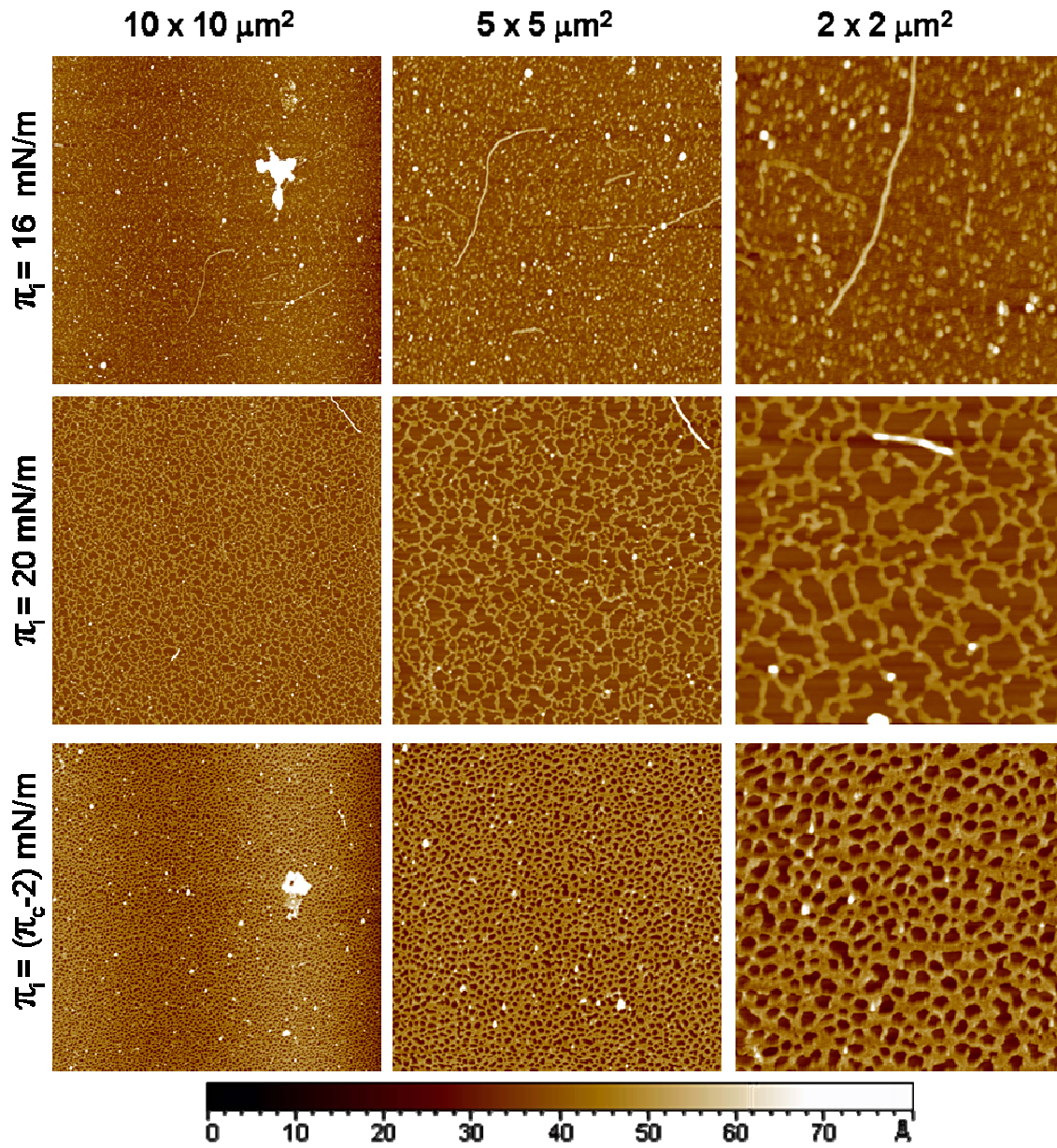


Fig II.3.7. Images AFM montrant l'organisation de DYS R11-15 dans une monocouche de DOPC :DOPS, à différentes pressions initiales de surface (16, 20 et 30 mN/m).

DYS R11-15 / DOPC:DOPE

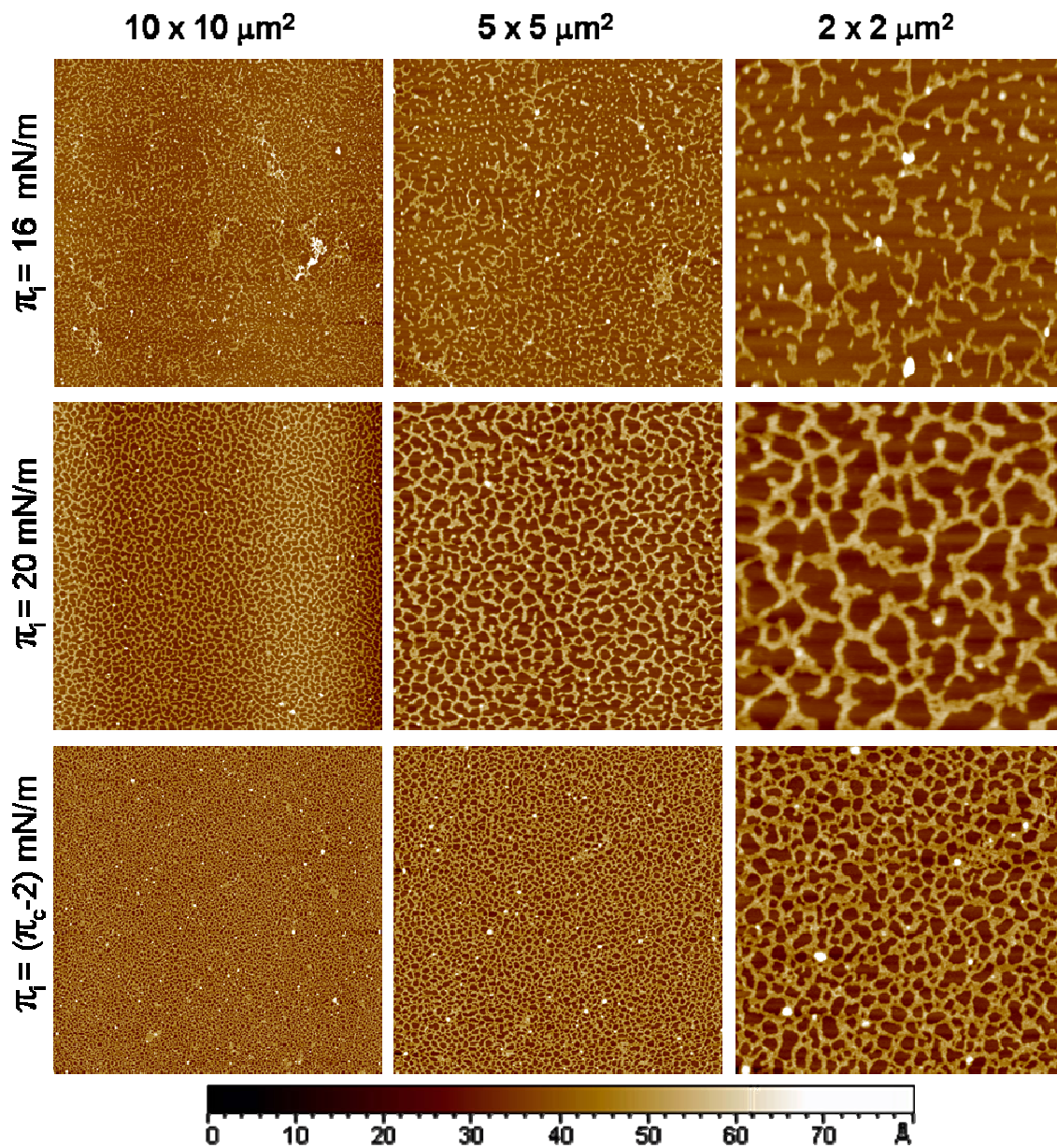


Fig II.3.8. Images AFM montrant l'organisation de DYS R11-15 dans une monocouche de DOPC :DOPE, à différentes pressions initiales de surface (16, 20 et 27 mN/m).

DYS R11-15 / DOPC:DOPS à 20 mN/m

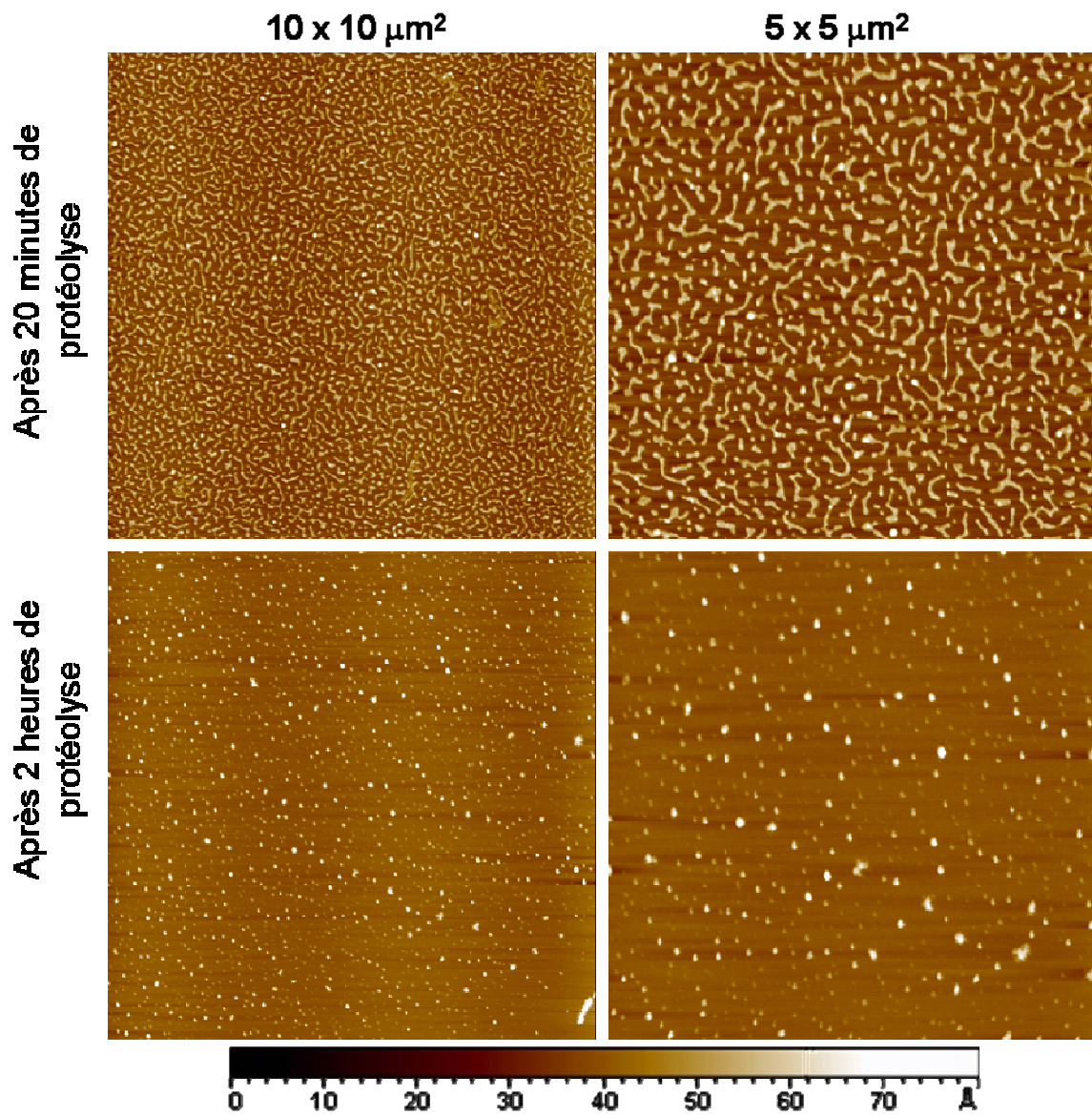


Fig II.3.9. Images AFM montrant la dégradation du réseau de DYS R11-15 dans une monocouche de DOPC : DOPS à 20 mN/m, après 20 minutes et 2 heures de protéolyse par la trypsine.

DYS R11-15 / DOPC:DOPE à 20 mN/m

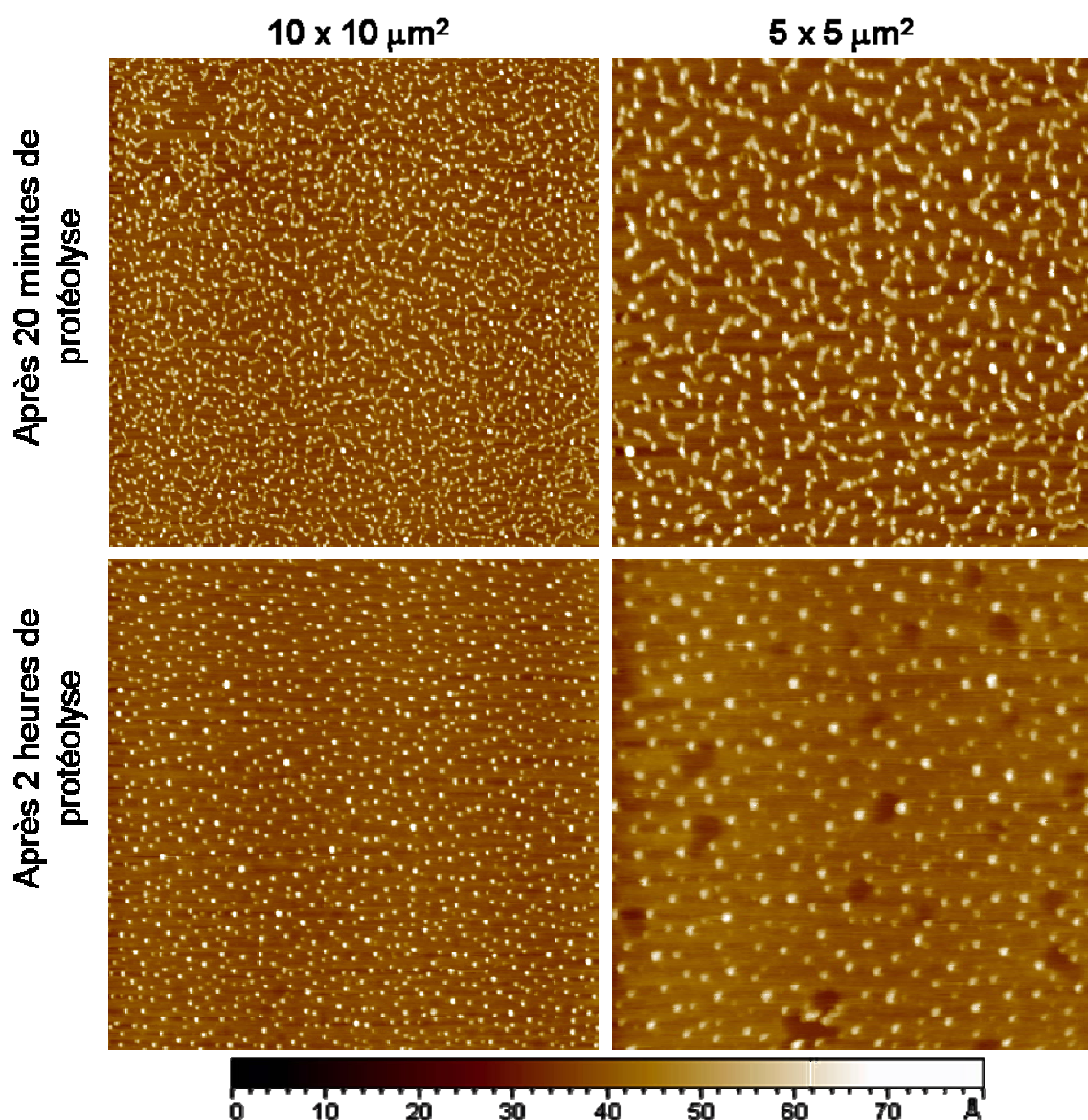


Fig II.3.10. Images AFM montrant la dégradation du réseau de DYS R11-15 dans une monocouche de DOPC : DOPE à 20 mN/m, après 20 minutes et 2 heures de protéolyse par la trypsine.

En utilisant le transfert de type Langmuir-Blodgett (LB) et l'AFM, nous avons réussi à montrer l'influence de la nature mais surtout de la pression de surface initiale (π_i) de la monocouche, donc indirectement du *lipid packing*, sur l'interaction et l'organisation de DYS R11-15. C'est grâce cet étude qu'on déduit que la présence de lipide semble induire une interaction protéine-protéine, laquelle induit la formation du réseau observé à des π_i supérieures ou égales à 20 mN/m, indépendamment de la nature lipidique.

D'autre part, nous avons étudié d'une manière originale, la conformation de DYS R11-15 adoptée lorsqu'elle forme le réseau avec les lipides anioniques et zwitterioniques. Selon nos sources de connaissance, c'est la première fois que les tests d'accessibilité à la trypsine sont réalisés de cette manière, en sous-phase de cuve de Langmuir. Ainsi, nous montrons en suivant la cinétique de dégradation du réseau que DYS R11-15 présente une conformation différente en fonction de la nature du mélange lipidique avec lequel elle interagit.

II.3.D. Image AFM de DYS R11-15 et bicouche lipidique

Nous avons préalablement observé par AFM l'organisation de DYS R11-15 en présence de monocouche lipidique. Ce modèle de monocouche est adapté à l'analyse du comportement interactif d'une protéine périphérique telle que DYS R11-15 qui n'interagit qu'avec le feuillet interne de la membrane. Nous avons souhaité vérifier l'organisation de DYS R11-15 *in vitro* en présence cette fois d'une bicouche lipidique.

Nous avons formé une bicouche de DOPC :DOPS par éclatement de vésicules sur mica (en présence d'ions Mg^{2+} pour favoriser l'éclatement des SUVs). Une incubation de DYS R11-15 pendant 30 minutes a ensuite été réalisée en milieu TNE. Plusieurs rinçages sont réalisés dans le but d'éliminer l'excès de DYS R11-15 resté potentiellement en solution. L'échantillon est ensuite observé sur un microscope AFM MultiMode 8 (*BRUKER*) en utilisant le mode Peak-Force Tapping. Le résultat est présenté figure **Fig II.3.11**.

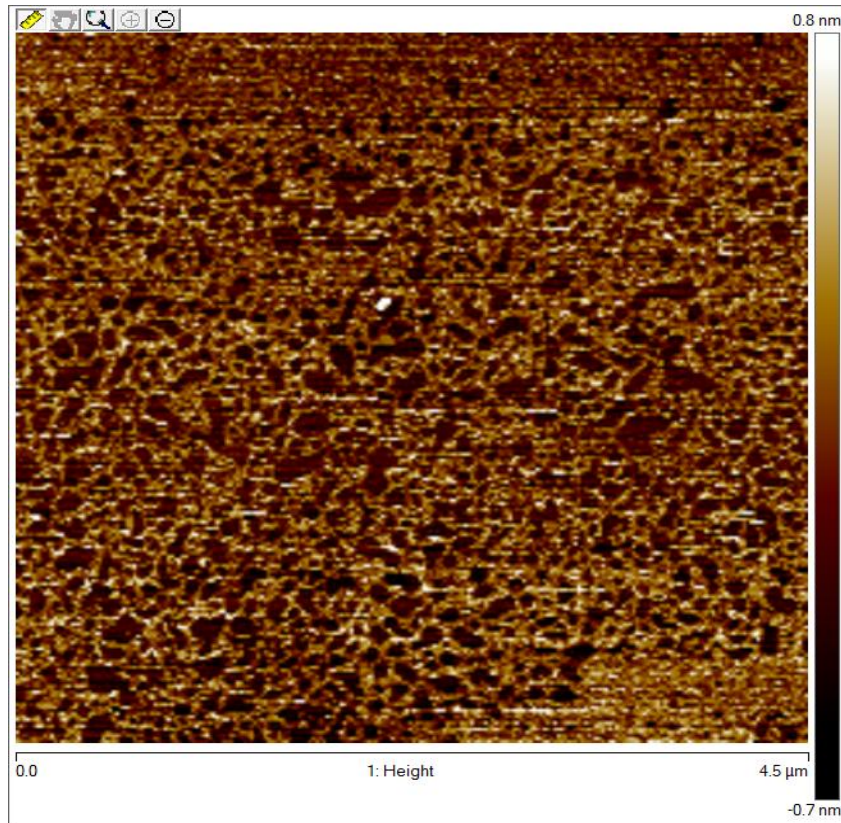


Fig II.3.11. Image AFM montrant la formation d'un réseau de DYS R11-15 en présence d'une bicouche lipidique de DOPC :DOPS.

DYS R11-15 apparaît organisée en réseau protéique (ou lipoprotéique) en présence d'une bicouche de DOPC :DOPS. Le comportement observé est identique sur bicouche et monocouche ; ceci conforte nos précédentes conclusions sur l'aptitude de DYS R11-15 à former un réseau. Même si le système bicouche a priori se rapproche plus de la situation physiologique, l'approche en monocouches conserve l'avantage majeur de permettre un contrôle des pressions initiales et donc de permettre une analyse fine des interactions.

Une discussion de ces résultats, suivie d'une discussion générale de nos travaux sur la dystrophine et de notre conclusion seront présentées dans le chapitre 5 de cette partie.

Chapitre 4 – DYS R11-15 : Un pont de connexion membrane-cytosquelette?

Ce quatrième chapitre est la suite des travaux présentés dans le chapitre précédent. Nous avons montré précédemment que l'interaction et l'organisation de DYS R11-15 avec la membrane dépend d'une part de la nature des phospholipides, et d'autre part de la courbure et du "*packing*" lipidique dans la membrane. Ces nouvelles propriétés attribuées à cette protéine s'ajoutent au fait que ce fragment constitué de cinq répétitions du domaine central de la dystrophine se lie, *in vitro*, aux filaments d'actine du cytosquelette et constitue ainsi l'Actin BindingDomain 2 (25).

Or, la question de la simultanée de liaison de DYS R11-15 à la membrane d'une part, et aux filaments d'actine d'autre part se pose. Nous avons émis l'hypothèse que cette protéine puisse former un pont de connexion non encore décrit entre le cytosquelette et la membrane.

Et si tel est le cas, étant donné nos précédents résultats, il est pertinent de s'interroger sur l'impact potentiel du "*packing*" lipidique sur ces interactions.

Dans un premier temps, nous présentons une introduction générale sur le cytosquelette et plus précisément sur l'actine et ses différentes formes. Ensuite, et dans le but d'étudier si DYS R11-15 est capable de lier la membrane et les filaments d'actine, nous utilisons un rhéomètre de surface "*home made*" afin de comparer la rigidité de la monocouche lipidique à l'interface et de suivre la variation de ses propriétés rhéologiques en présence de DYS R11-15 et d'actine-F. Les résultats seront présentés sous forme d'un article scientifique, et le dispositif sera décrit dans la partie *Materiels & Methods*.

II.4. Cytosquelette et actine

Les cellules ne sont pas figées au sein d'un organisme, elles sont capables de changer certaines de leurs propriétés telles que leur forme, leur position ou leur fonction. Ces modifications et ces ajustements sont assurés par de réseau de polymères biologiques dynamiques, nommé cytosquelette.

Le cytosquelette est un système dynamique, formé par un ensemble protéique rigide organisé à l'intérieur de la cellule, s'assemblant et se désassemblant constamment. Cet assemblage en fibres est construit par polymérisation de sous-unités protéiques identiques. Ces sous-unités s'attirent mutuellement et s'assemblent spontanément en longues chaînes. De la même manière, ces fibres se dissocient et leurs sous-unités se libèrent les unes après les autres d'une des extrémités de la chaîne : c'est la dépolymérisation.

Ces différentes fibres se distinguent par leurs tailles, leurs propriétés mécaniques et leurs fonctions (198). Trois types de fibres différents se distinguent, en fonction de leurs sous-unités constitutives (**Fig II.4.1.**) :

- Les microfilaments ou filaments d'actine : ce sont des filaments flexibles et polarisés, formés d'actine polymérisée, d'un diamètre de 7 nm. Pour notre étude, ce sont les filaments d'actine qui ont été ciblés. C'est pour cette raison que cette partie sera plus détaillée par la suite.

- Les microtubules : ce sont des tubes creux, très rigides, de 25 nm de diamètre, formé de 13 protofilaments de tubuline. Chaque protofilament est un assemblage de dimères de tubuline, tubuline α et tubuline β , relié par des liaisons non covalentes. Les microtubules prennent naissance au centre de nucléation situé au centre de la cellule, et irradient vers la périphérie. La demi-vie moyenne d'un microtubule est de 20 secondes à 10 minutes dans une cellule animale, selon qu'elle est en division ou non. Les microtubules proches du centre de nucléation sont désignés (-) et ceux qui sont éloignés (+). Ce sont les microtubules qui forment le fuseau mitotique lors de la mitose.

- Les filaments intermédiaires : ce sont les composants les plus stables du cytosquelette des cellules animales, et sont constitués de protéines fibreuses résistantes, entrelacées selon un système d'imbrication particulier (voir **Fig II.4.1.**). Leur diamètre situé entre celui des microfilaments et celui des microtubules varie de 8 à 10 nm, d'où leur dénomination filaments intermédiaires. Contrairement aux microfilaments et aux microtubules qui sont en constant état dynamique de polymérisation et de dépolymérisation, les filaments intermédiaires une fois constitués sont stables et ne se dissocient pas. Leur composition protéique dépend du type de cellule et on distingue cinq différentes espèces biochimiques de filaments intermédiaires : les kératines épithéliales, les neurofilaments dans la plupart des neurones, les filaments de desmine des cellules musculaires, les filaments gliaux des cellules gliales et les filaments de vimentine des cellules d'origine mésenchymateuses.

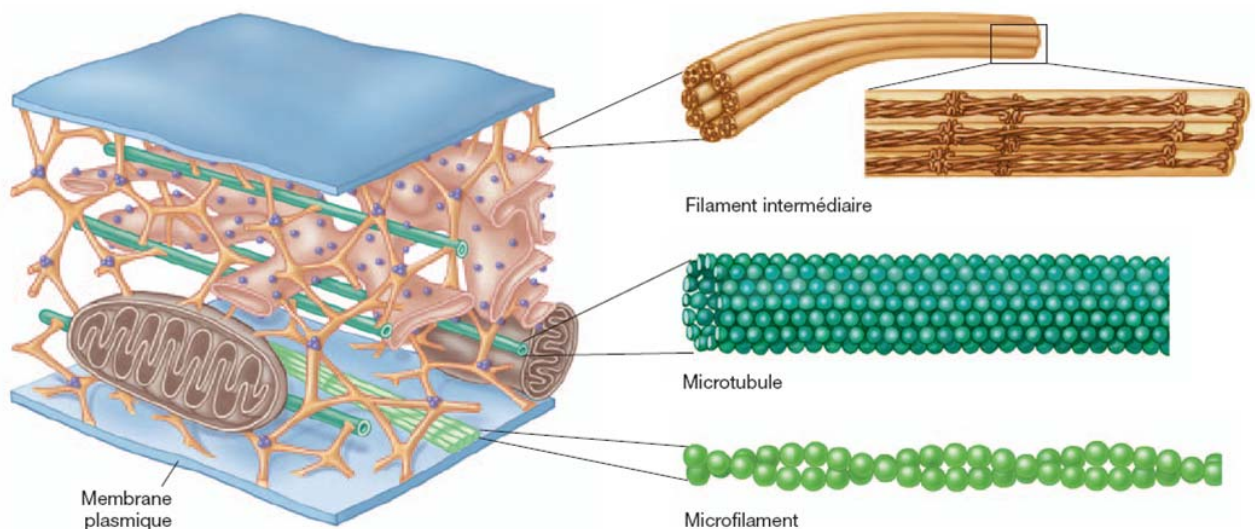


Fig II.4.1. Illustration schématique des molécules constitutives du cytosquelette. *Microfilaments* : constitués d'actine en deux brins torsadés. Ils sont regroupés sous la membrane plasmique et jouent un rôle dans la fonction contractile. *Microtubules* : formé par les sous-unités de tubuline, et impliqués dans l'organisation du métabolisme, le transport intracellulaire et la stabilisation de la structure cellulaire. *Filaments intermédiaires* : ce sont des composés de tétramères imbriqués et décalés de protéines. Cette disposition confère une force mécanique importante à la cellule. Adapté de la référence (199).

II.4.1. L'actine

Les propriétés mécaniques de la cellule dépendent surtout du cytosquelette et du réseau de filaments. Nous nous intéressons plus particulièrement aux filaments d'actine. Ce sont eux qui permettent à la cellule d'être mobile.

Le monomère

Historiquement, *Straub* découvre l'actine en 1940 et l'identifie comme le composant principal des fibres musculaires (200). C'est une protéine globulaire de 375 résidus d'acides aminés (appelé également actine-G sous sa forme monomérique) d'environ 43 kDa de poids moléculaire, et de 5,5 nm de diamètre. Au pH physiologique, l'actine est chargée quatre à six fois négativement. Le point isoélectrique du monomère (pH = 5,5) reflète la légère prépondérance de résidus acides dans la séquence.

La tendance de l'actine à s'assembler en microfilaments empêche la formation des cristaux de monomères. La structure de l'actine G a donc longtemps été impossible à résoudre par cristallographie. C'est à travers l'étude de co-cristaux d'actine complexée à des protéines inhibant la polymérisation (la DNase I) que la première structure d'actine-G est obtenue (201). En 2006, *Rould et al.* ont réussi à cristalliser l'actine-G seule, qui est légèrement modifiée par deux mutations ponctuelles, n'affectant pas le *folding* du monomère (202).

L'actine se replie en quatre sous-domaines, et la jonction forme une crevasse dans laquelle réside un complexe métal (Ca^{2+} ou Mg^{2+})-nucléotides (Adénosine Tri- ou Di-Phosphate) (**Fig II.4.2.**). Ce complexe stabilise le monomère, et son absence entraîne la dénaturation de l'actine-G (203). Il est admis que dans la cellule, la majorité de l'actine-G est liée à une molécule d'ATP et à un ion magnésium (198).

Bien que les structures de l'actine-ATP et de l'actine-ADP soient presque identiques, la nature du nucléotide influe fortement sur les propriétés biochimiques et mécaniques du microfilament, ainsi que sur les mécanismes de polymérisation (204).

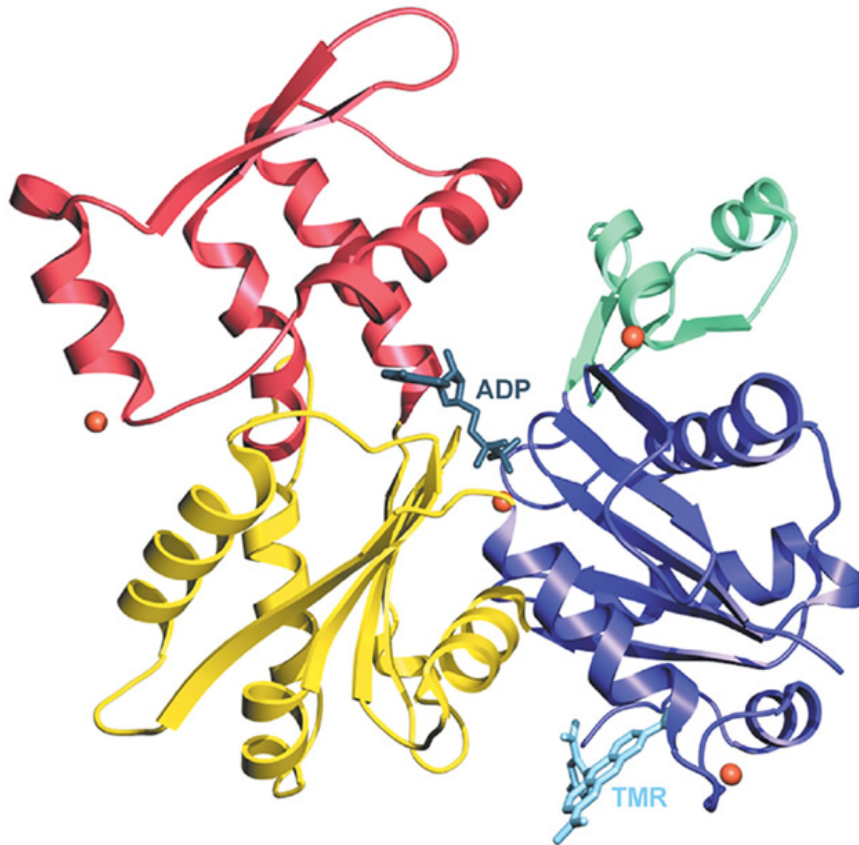


Fig II.4.2. Structure de l'actine-G (PDB 1J6Z). Les quatre sous-domaines sont représentés en différentes couleurs, et l'ADP est lié au centre où les quatre sous-domaines se rencontrent. Quatre ions Ca^{2+} sont liés au monomère et sont représentés comme des sphères en orange. Dans cette structure, le tétraméthylrhodamine-5-maléimide (TMR) a été fixé de manière covalente sur le résidu cystéine 374, dans le but de bloquer la polymérisation des monomères et favoriser la cristallisation. Adapté de la référence (205)

Le microfilament

Les monomères d'actine s'associent en filaments (actine F) lorsque les conditions favorables sont présentes, notamment la présence des ions divalents, d'ATP et en concentration d'actine-G supérieure à la concentration critique de polymérisation (206). Les monomères s'associent par des liaisons non-covalentes, et forment une structure unidimensionnelle, sous forme d'une double hélice d'un diamètre de 7 nm environ. Le pas de cette hélice est de 71,5 nm et englobe 13 sous unités (**Fig II.4.3**).

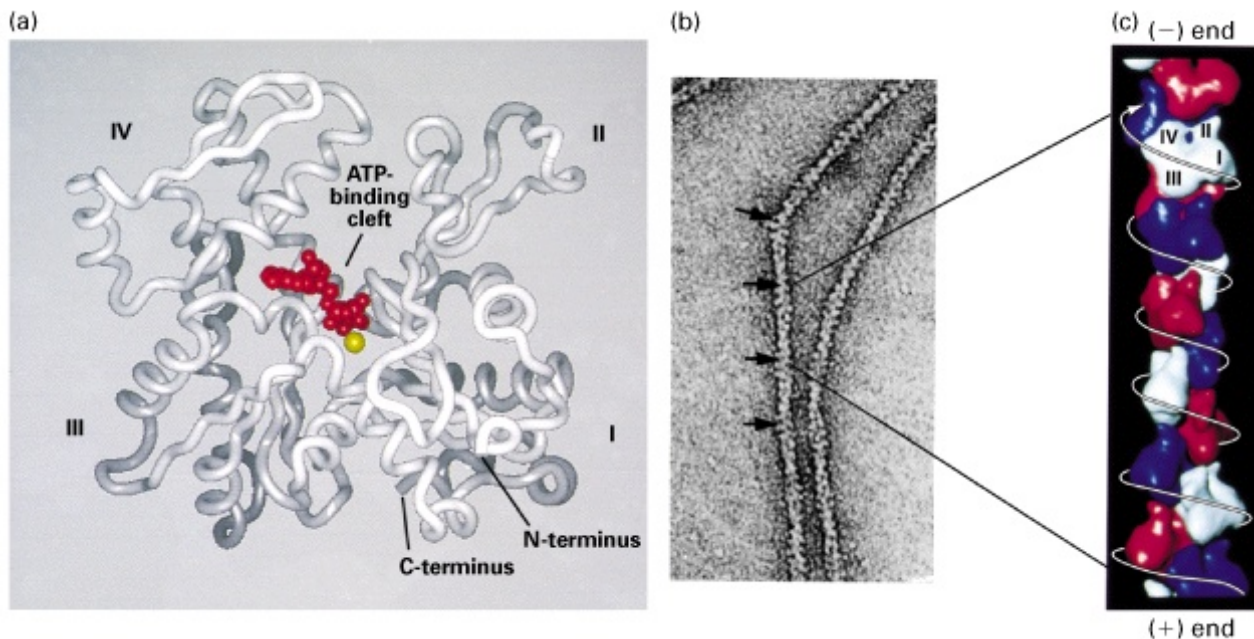


Fig II.4.3. Structure du microfilament d'actine. (a) le monomère d'actine-G. (b) microfilament d'actine-F observé par MET. (c) simulation montrant l'association du monomère pour former un filament avec une polarité bien spécifique. Adapté de la référence (207).

L'ajout d'un monomère augmente la longueur du filament de 2,75 nm. On compte ainsi 370 sous-unités par micromètre. Chaque filament est polarisé car toutes les molécules d'actine globulaire sont orientées dans la même direction, vers une extrémité appelée pointue (ou extrémité -), l'autre extrémité étant nommée barbée (ou extrémité +) (198). Le taux d'association k^+ aux sous-unités de l'extrémité barbée est supérieur à celui mesuré à l'extrémité pointue (208).

II.4.2. Mécanisme de polymérisation

La polymérisation de l'actine-G en microfilament (actine-F) est un mécanisme important et très étudié. *In vitro*, ce mécanisme peut être induit biochimiquement (ions, ATP...) ou par la présence des membranes cationiques.

Polymérisation en solution

La polymérisation de l'actine-G en actine-F se réalise par la formation des liaisons faibles, et le filament obtenu est donc en équilibre par son extrémité avec le monomère.

La polymérisation comporte trois phases (209) :

- *L'activation* des monomères est induite par la présence des ions chargés positivement tel que Ca^{2+} , Mg^{2+} ou K^+ . Ces ions se lient à l'actine et écartent progressivement les charges négatives de la protéine, induisant ainsi un changement conformationnel.

- *La nucléation* commence tout d'abord par la formation d'un dimère d'actine (à partir de deux sous-unités) énergétiquement défavorable, puis d'un trimère hélicoïdal de façon totalement spontanée. Ces associations sont thermodynamiquement instables, ce qui rend le mécanisme de nucléation très lent. Une fois ce trimère formé, et quand la concentration d'actine est supérieure à la concentration critique, l'étape suivante peut commencer.

A noter que dans certaines situations cellulaires, la présence de protéines spécifiques telles que les protéines de la famille des formines ou le complexe Arp2/3 favorisent la nucléation (210). Les protéines de la famille des formines ont en commun un sous-domaine, appelé FH2, qui joue un rôle fondamental dans l'activité de nucléation de l'actine. Un modèle cinétique appliqué à des données expérimentales a permis d'expliquer ce rôle nucléateur : le sous-domaine FH2 stabilise les dimères d'actine, étape la plus instable de la polymérisation (211).

Arp2/3 est un complexe de sept protéines qui se trouve sur les extrémités mobiles des cellules. C'est un nucléateur qui se fixe sur le côté d'un filament existant pour en nucléer un nouveau avec un angle d'approximativement 70° (212).

- *L'élongation* : une fois le noyau constitué, plusieurs points de contact apparaissent et facilitent l'ajout des monomères. L'affinité des monomères d'actine pour le filament dépend de l'état du nucléotide de la sous-unité à insérer, ainsi que de l'extrémité sur laquelle il va s'insérer (barbée ou pointue). Généralement, l'élongation du filament se fait par l'extrémité barbée ayant une forte affinité pour

le monomère actine-ATP (k^+ de l'ordre de $11 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) (213). Ainsi, une concentration d'actine-G-ATP de $10 \mu\text{M}$ allonge l'extrémité barbée de 110 sous-unités ($0,3 \mu\text{m}$) par seconde. En même temps, l'extrémité pointue perd des monomères d'actine-ADP (k^- de l'ordre de $0,1 \text{ s}^{-1}$) (**Fig II.4.4.**).

Lorsque la concentration en actine-G est égale à la concentration critique (K ou $C_c = k^- / k^+$), l'équilibre est atteint. La taille du microfilament est alors constante et l'élongation est nulle.

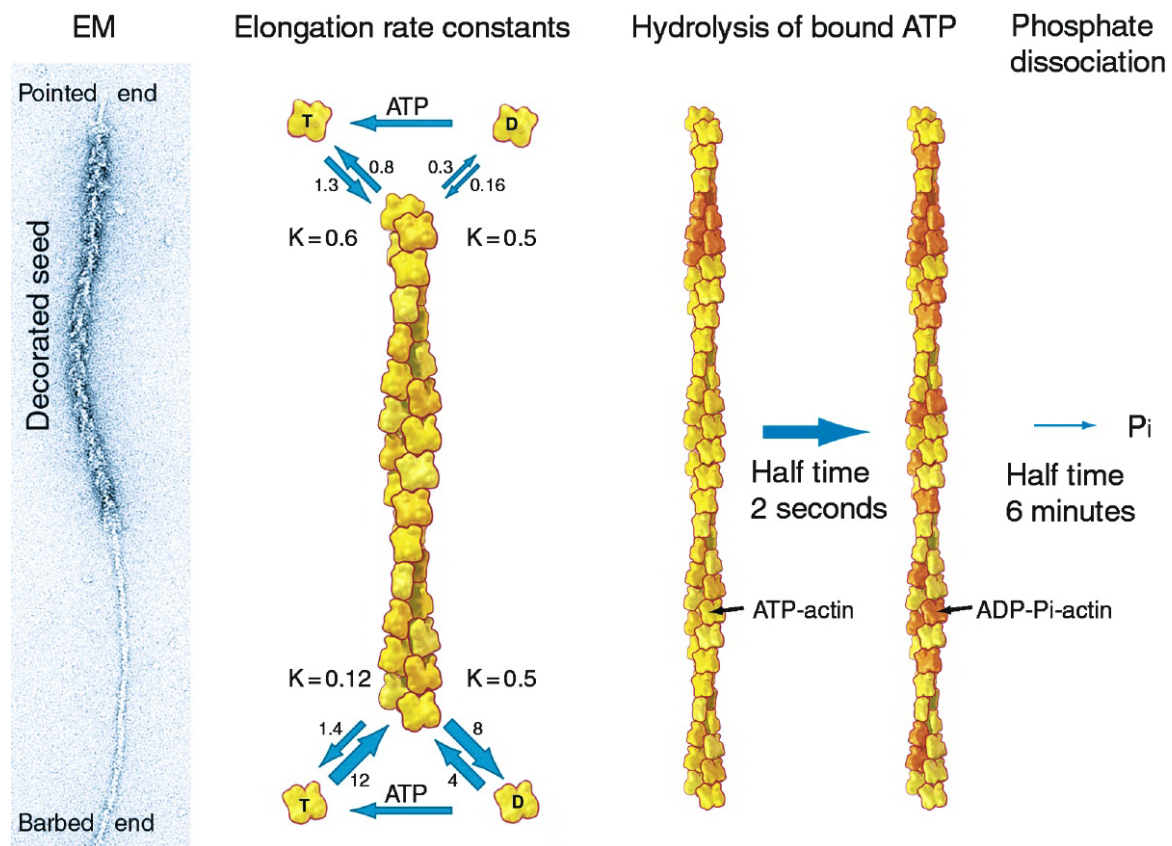


Fig II.4.4. Dynamique du filament d'actine. Un filament d'actine présente deux extrémités qui sont structurellement différentes : l'extrémité barbée (« barbed end » sur l'image en microscopie électronique) et l'extrémité pointue (« pointed end »). La polymérisation et la dépolymérisation des monomères se font à des taux qui varient selon l'extrémité et l'état du nucléotide concerné. Les K représentent l'affinité des monomères (ATP (T) et ADP (D)) : il s'agit de constantes de dissociation ($K = k^- / k^+$). A l'intérieur du filament, les nucléotides liés aux monomères subissent d'abord une hydrolyse, puis libèrent leur phosphate inorganique. Les monomères d'actine-ATP sont représentés en jaune, ceux d'actine-ADP-Pi en orange clair, ceux d'actine-ADP en orange foncé. Adapté de la référence (213).

La dynamique des microfilaments ne se limite pas aux extrémités. Une fois que les monomères sont ajoutés aux filaments, l'ATP change d'état au cours de son séjour dans le filament (213). Il subit tout d'abord une hydrolyse et passe de l'état ATP à ADP-Pi et le phosphate inorganique reste lié au monomère. C'est une réaction rapide de demi-vie de 2 secondes. Ensuite, le phosphate se dissocie lentement avec un temps de demi-vie de 6 minutes (**Fig II.4.4**). Ainsi, les nouveaux nucléotides se trouvent dans le microfilament sous forme actine-ATP et les plus anciens sous forme actine-ADP.

Le passage du nucléotide dans ces différents états se produit d'une façon aléatoire dans le filament (214). Cependant, *Carlier et al.* ont suggéré que l'hydrolyse et la dissociation du phosphate se réalise en allant de l'extrémité pointue vers l'extrémité barbée (215). Ce mécanisme est un aspect fondamental de la dynamique des filaments d'actine, comme il affecte les propriétés physico-chimiques, la mécanique et la cinétique de la polymérisation du filament.

Lorsque la dépolymérisation se produit à l'extrémité pointue du polymère, les monomères qui viennent de quitter le filament sont essentiellement de l'actine-ADP. Ces derniers seront recyclés en actine-ATP, et seront de nouveau utilisés pour la polymérisation. Ce phénomène de "*turnover*" rentre dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, en recyclant les anciennes structures pour reconstruire de nouvelles là où elles sont nécessaires.

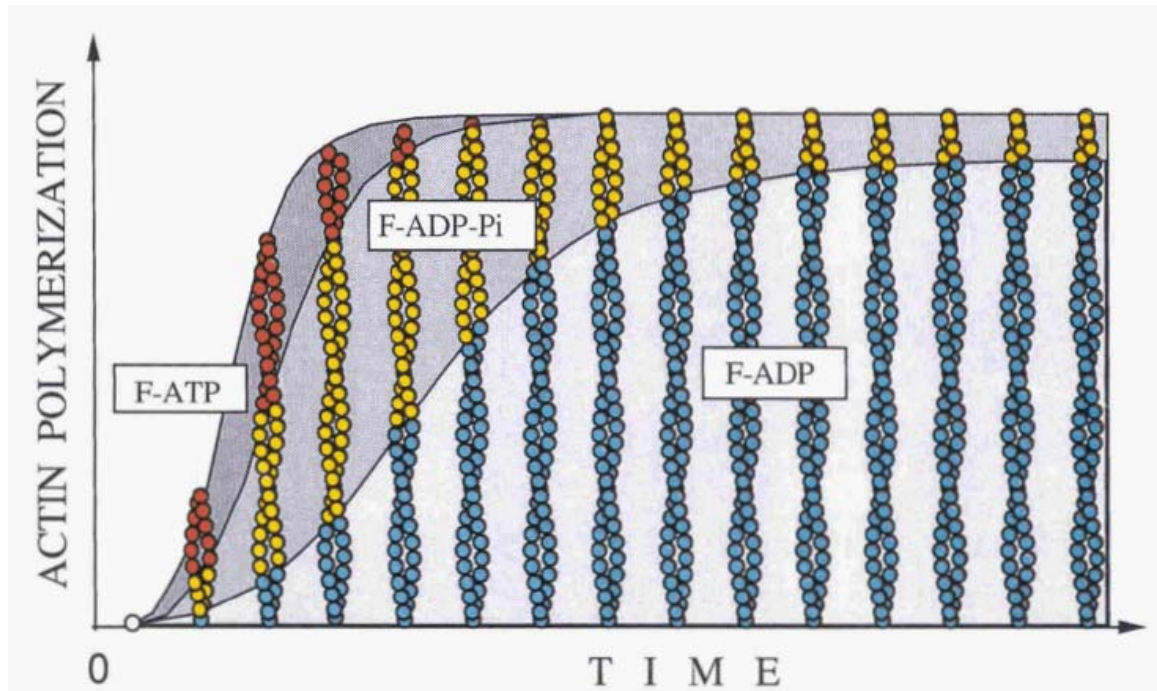


Fig II.4.5. Evolution schématique du filament d'actine au cours du temps. Les filaments s'allongent d'abord à un rythme rapide sur l'extrémité F-ATP (en rouge). À l'état stationnaire, le filament est majoritairement constitué de sous-unités F-ADP (en bleu) à l'exception de l'extrémité barbée où se trouvent des sous-unités F-ADP-Pi. Adapté de la référence (209).

Notons qu'une forte concentration d'actine-G favorise la polymérisation et l'ajout de l'actine-ATP aux extrémités est ainsi plus rapide que l'hydrolyse de l'ATP au sein du microfilament. Inversement, quand la concentration en monomère diminue, l'ajout de l'actine-ATP devient plus lent que l'hydrolyse de l'ATP, et l'extrémité actine-ADP dans le filament devient instable. Cela montre l'influence non linéaire de la concentration d'actine sur la vitesse d'allongement du filament (**Fig II.4.5.**).

Enfin, la nature des cations utilisés dans la solution peut jouer sur la dynamique de la polymérisation (209). Un Mg-ATP-actin par exemple, présente une tendance plus élevée d'induction de nucléation, une élongation et une hydrolyse plus rapide qu'un Ca-ATP-actine (216, 217). Ainsi, les filaments Mg-actin-F sont plus dynamiques que Ca-actine-F car ils ont une large différence entre les constantes de dissociation des sous-unités de l'ADP et de l'ADP-Pi (ou ATP). En d'autres termes, l'hydrolyse de l'ATP dans Mg-actine-F cause un plus grand changement structural sur le filament, qu'avec Ca-actine-F (217). Ainsi, la différence énergétique entre les deux extrémités du filament est

très grande pour Mg-actine-F, alors qu'une concentration critique similaire est observée sur les deux extrémités du filament Ca-actine-F.

Polymérisation induite par une membrane

La polymérisation de l'actine peut être induite par une autre voie que la présence des ions positifs. En 1988, *Laliberté et Gicquaud* ont montré qu'en mélangeant de l'actine-G avec une solution de liposomes chargés positivement, une polymérisation de l'actine est observée à la surface des liposomes (218). Cette polymérisation est localisée sur la surface lipidique vu que la force ionique est très faible et le reste de l'actine en solution reste ainsi sous forme monomérique. Ainsi, cette étude suggère que les phospholipides chargés positivement sont capables d'activer les monomères d'actine et d'initier une polymérisation purement bidimensionnelle. A la surface des liposomes, les microfilaments s'organisent systématiquement en paracristaux qui sont des structures ordonnées de compaction maximale (**Fig II.4.6-A.**).

Une autre étude par *Renault et al.* montre aussi qu'une monocouche lipidique positive induit la polymérisation de l'actine (219). En utilisant la cuve de Langmuir, et en mettant en présence des phospholipides positifs et de l'actine G en sous-phase, des microfilaments individuels sont formés à la surface de la membrane sans formation des paracristaux (**Fig II.4.6-B.**). De plus, des mesures de rhéologie de surface confirment que la rigidité de la monocouche augmente significativement lorsqu'il y a une polymérisation des filaments induite par la membrane, avec une valeur de constante de cisaillement μ de l'ordre de 30 et 50 mN/m en absence ou en présence des cations divalents, respectivement. Cependant, une légère agitation de la solution fait disparaître les microfilaments, indiquant une certaine instabilité (**Fig II.4.6-C.**).

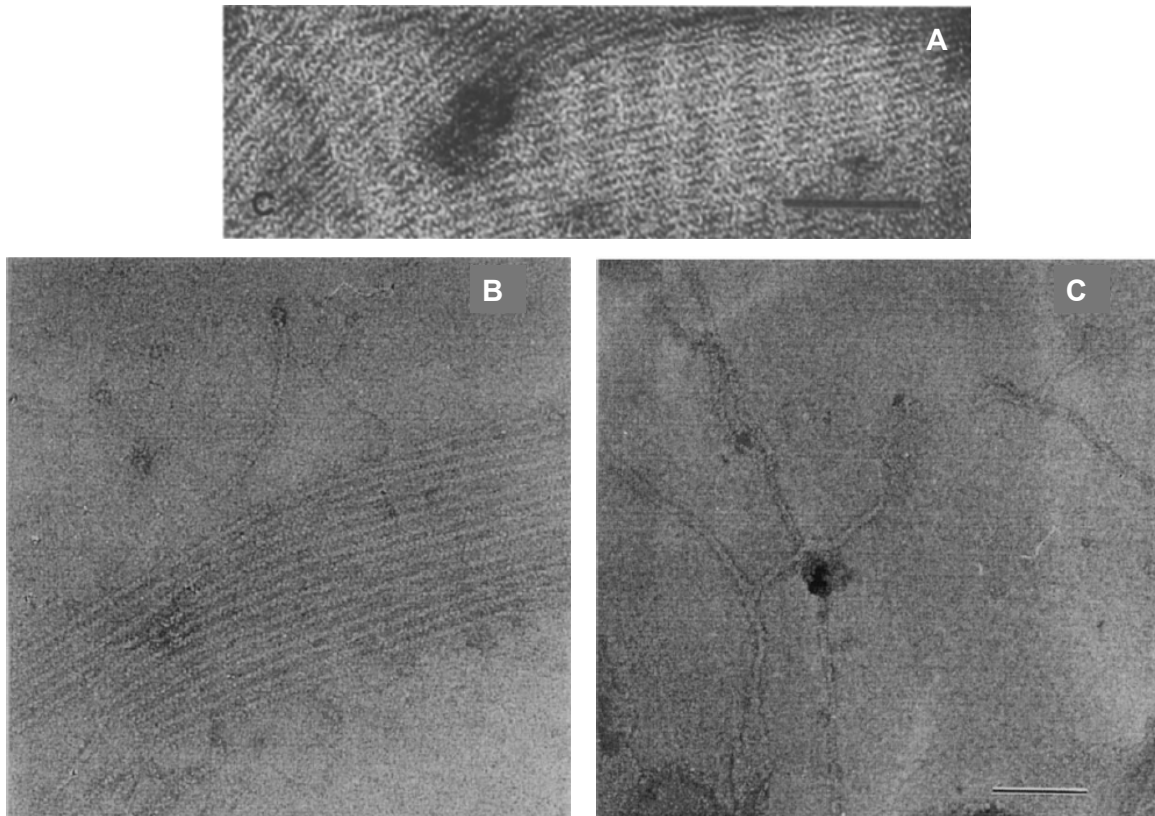


Fig II.4.6. Polymérisation induite par une membrane. (A) Image MET de paracristsaux de filaments d'actine en surface de liposomes cationiques (barre 0,1 μm). Adapté de la référence (218). (B-C) Image MET des microfilaments en surface de monocouche lipidique cationique avant (B) et après (C) agitation de la solution (barre 0,1 μm). Adapté de la référence (219).

Il est donc possible d'induire *in vitro* la polymérisation de l'actine, soit biochimiquement en ajoutant de sels et d'ATP, soit localement à la surface des membranes cationiques.

II.4.3. l'actine *in vivo*

In vivo, les microfilaments d'actine du cytosquelette sont capables de s'organiser en structures variées et participer ainsi aux différents processus cellulaires.

Lorsque les filaments d'actine s'associent pour créer une déformation très locale de la membrane ayant la forme d'un "doigt", il y a formation d'un filopode. Cette structure allongée permet à la cellule de sonder le milieu extérieur. A l'origine de cette déformation, on trouve un câble de filaments d'actine, appelé bundle. Les filaments sont maintenus côte à côte par des protéines de liaison ou par de simples interactions non

spécifiques (220). La rigidité d'un tel assemblage est bien supérieure à celle d'un filament simple, et la polymérisation de nouveaux monomères au niveau de la membrane (par des protéines de la famille des formines par exemple) permet d'allonger le câble en repoussant l'obstacle. (**Fig II.4.7-a**) (213, 220).

Lors du processus de migration cellulaire, un dense réseau de filaments d'actine polymérisant à la surface de la membrane se développe avec apparition de larges protrusions membranaires appelées lamellipodes (**Fig II.4.7-b**) (221). Ces filaments enchevêtrés permettent la production des forces nécessaires au déplacement de la membrane.

Les filipodes et les lamellipodes déforment la membrane cellulaire. C'est en déformant sa membrane dans une direction privilégiée que la cellule peut initier sa migration. Or, la déformation de cette membrane nécessite de produire des forces importantes dans une zone localisée de la cellule. La production de forces par le biais des filaments d'actine est aussi un aspect fondamental de la motilité de certaines bactéries, comme *Listeria monocytogenes* et *Shigella flexneri* (222).

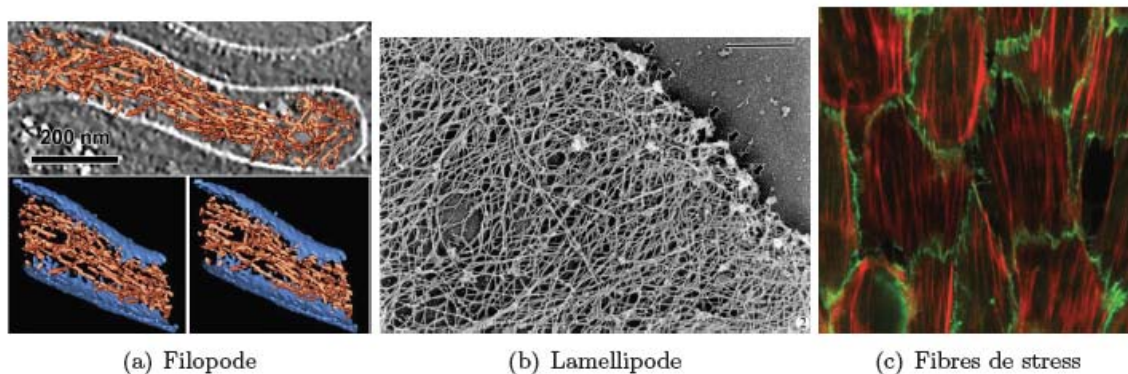


Fig II.4.7. Structure des microfilaments dans le cytosquelette. (a) Un filopode formé de plusieurs filaments. Tomographie en cryo-électromicroscopie. Actine en rouge et membrane en bleu. Adapté de la référence (220). (b) Un lamellipode observé par microscopie électronique. La barre représente 0,5 μm . Adapté de la référence (221). (c) Des fibres de stress (en rouge) observés par microscopie confocale. La bordure de la cellule est représentée en vert. Adapté de la référence (223).

Enfin, lorsque les microfilaments sont liés par des moteurs moléculaires, les myosines, ils présentent des structures appelées fibres de stress. Ces myosines se

déplacent sur les filaments d'actine et les font glisser les uns par rapport aux autres. Cette opération contracte la fibre et produit une tension donnant leur nom à ces structures (**Fig II.4.7-c**) (223).

L'actine est essentielle pour une très large gamme de fonctions cellulaires. Elle intervient dans la division cellulaire, la migration, la formation des jonctions, le remodelage de la chromatine, la régulation transcriptionnelle, le trafic vésiculaire et la régulation de la forme cellulaire.

Comment est-il possible qu'une molécule peut accomplir une telle diversité de "tâches" ?

Une réponse à cette question est que l'actine n'est pas une entité unique. Elle présente en effet différents isoformes. Six gènes d'actine existent chez les mammifères, chacun codant pour une isoforme de protéine (224). Les séquences des six isoformes sont identiques à 95% et la partie variable concerne quelques acides aminés à l'extrémité N-terminale (sur un total de 375 résidus). On distingue 4 isoformes; α_{skeletal} -actin, α_{cardiac} -actin, α_{smooth} -actin, et γ_{smooth} -actin; qui sont exprimés dans les muscles squelettiques, cardiaques et lisses. Les deux autres isoformes ; β_{cyto} -actin et γ_{cyto} -actin ; sont présentes dans tous les types cellulaires (**Fig II.4.8**).

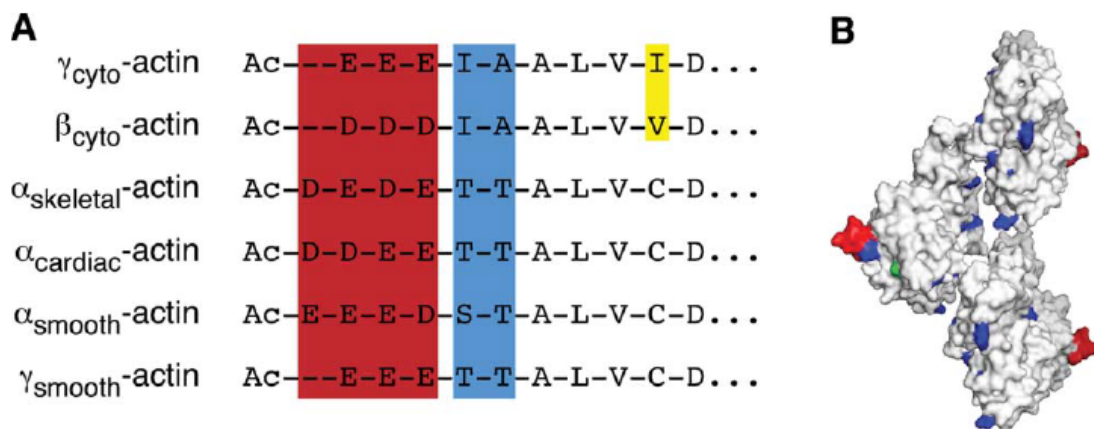


Fig II.4.8. Différence de séquence des isoformes d'actine. (A) Alignement de la partie N-terminale des 6 isoformes d'actine humaine. (B) Localisation des acides aminés modifiés entre les isoformes sur la structure 3D d'un filament d'actine, (ici avec trois monomères) Adapté de la référence (224).

Actine et contraction musculaire

Dans les muscles, l'actine présente un rôle crucial dans les cycles de contraction-relaxation musculaire et contribue au maintien de la structure cellulaire lors de ces mouvements (59). En effet, les sarcomères sont reliés au sarcolemme par l'intermédiaire de filaments de γ_{cyto} -actine, eux-mêmes en association avec diverses protéines dont l'alpha actinine, les complexes intégrines et les complexes dystroglycane ; pour ce dernier, la l'actine est liée à l'ABD1, et vraisemblablement l'ABD2, de la dystrophine.

(Fig II.4.9.)

Les fibres musculaires sont des multitudes de myofibrilles qui sont des répétitions de sarcomères. Un sarcomère, formé principalement d'actine α (Thin filaments) et de myosine, est défini de chaque côté par une strie ou ligne Z. Les filaments d'actine sont ancrés dans les stries Z de façon à former deux « peignes », l'un en face de l'autre. Entre ces deux peignes se trouvent les filaments épais de myosine, constituant ainsi la strie ou ligne M (**Fig II.4.9.**).

A l'état inactif, la tropomyosine recouvre le domaine d'interaction avec l'actine de la myosine. Lorsque la cellule musculaire est stimulée par le motoneurone, il y a activation de canaux calciques voltage-dépendants. La fixation du calcium sur la troponine libère le domaine d'interaction de la myosine. Ainsi, la myosine est fixée à l'actine. Lorsque la myosine et l'actine sont en interaction, la molécule d'ADP sur la tête de la myosine est libérée, ce qui provoque un changement de conformation et bascule la tête de la myosine. Ce basculement tracte l'actine vers la bande M (le centre du sarcomère) provoquant ainsi un raccourcissement du sarcomère.

Après ce mouvement, une molécule d'ATP se lie à la tête de la myosine et provoque son détachement de l'actine, et le retour à une position repliée de basse énergie. Ensuite, l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP (en ADP+Pi) permet le passage de la myosine à un état de haute énergie, capable d'interagir avec l'actine. Si la troponine ne fixe plus le calcium, elle interagit avec la myosine empêchant ainsi l'interaction de la myosine avec l'actine. Sinon, le cycle peut recommencer.

C'est ainsi que des milliers de têtes de myosines parviennent, en réalisant ce cycle, à contracter la taille du sarcomère de 3,4 μm (forme étirée) à 2,4 μm (forme contractée).

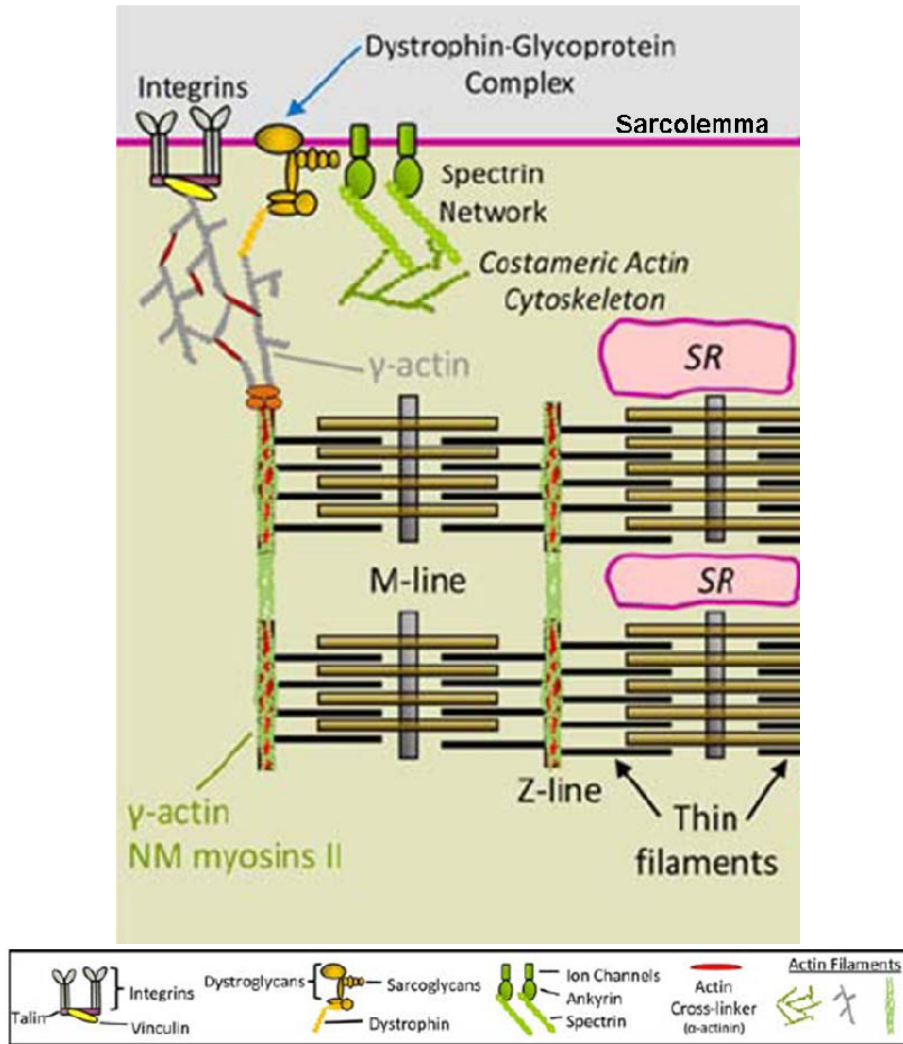


Fig II.4.9. Représentation schématique du cytosquelette d'une fibre musculaire. Le sarcomère est formé des microfilaments fins d' α_{skeletal} -actine fixés à la strie Z (Z disc), et de filaments plus épais de myosine. La contraction du sarcomère est le résultat du glissement des filaments d'actine sur les filaments de myosine. Les filaments de γ_{cyto} -actin assurent la cohésion du cytosquelette particulier de la cellule musculaire : les sarcomères sont reliés à la matrice extracellulaire par l'intermédiaire du complexe dystroglycane et le complexe d'intégrine. Au sein du complexe dystroglycane, l'actine est associée via le domaine ABD1, et vraisemblablement ABD2 de la dystrophine. Adapté de la référence (225).

Une déficience d'une isoforme d'actine peut conduire à des pathologies plus ou moins graves selon la nature de l'isoforme manquante (224). Le remplacement chez la souris d'une isoforme manquante par une autre isoforme d'actine montre que les phénotypes obtenus sont variables en fonction de la nature de l'isoforme manquante, ainsi que de la nature de ou des isoformes exprimées, comme illustré par les exemples ci-dessous,

En 2002, *Crawford et al.* (226) ont bloqué le gène de l'actine squelettique ($\alpha_{\text{skeletal-actine}}^{-/-}$) chez des souris. Ces animaux apparaissent normaux à la naissance, capables de respirer et de marcher normalement. Dans les 4 jours qui suivent la naissance, les souris déficientes en actine squelettique présentent un poids inférieur à celui des individus de la souche sauvage et développent une scoliose. Enfin, vers le neuvième jour, une perte de glycogène est observée chez les souris $\alpha_{\text{skeletal-actine}}^{-/-}$, avec une faiblesse musculaire de type myopathie, suivie par la mort (**Fig II.4.10**). Quelques années plus tard, *Nowak et al.* ont montré que l'expression de l' $\alpha_{\text{cardiac-actine}}$ chez les souris $\alpha_{\text{skeletal-actine}}^{-/-}$ est capable de restaurer un phénotype normal (227), ce qui n'est pas le cas si on exprime $\gamma_{\text{cyto-actin}}$ (228).

D'autres expériences montrent que les souris déficientes en $\beta_{\text{cyto-actine}}$ présentent une létalité embryonnaire (229, 230), alors que les souris déficientes en $\gamma_{\text{cyto-actine}}$ sont capables de survivre mais avec une surdité progressive (231, 232). De plus, l'absence de $\gamma_{\text{cyto-actine}}$ dans le muscle n'a pas des conséquences directe sur le développement musculaire (233), malgré la présence d'évidences *in vitro* que la $\gamma_{\text{cyto-actine}}$ est indispensable pour l'assemblage des sarcomères (234). Ainsi, les souris déficientes en $\gamma_{\text{cyto-actine}}$ développent des myopathies progressives (233).

A noter que dans tous les types cellulaires provenant des souris $\gamma_{\text{cyto-actine}}^{-/-}$, la concentration totale en actine reste constante. Ceci est le résultat de phénomènes physiologiques de compensation par surexpression d'autres isoformes d'actine (231, 232).

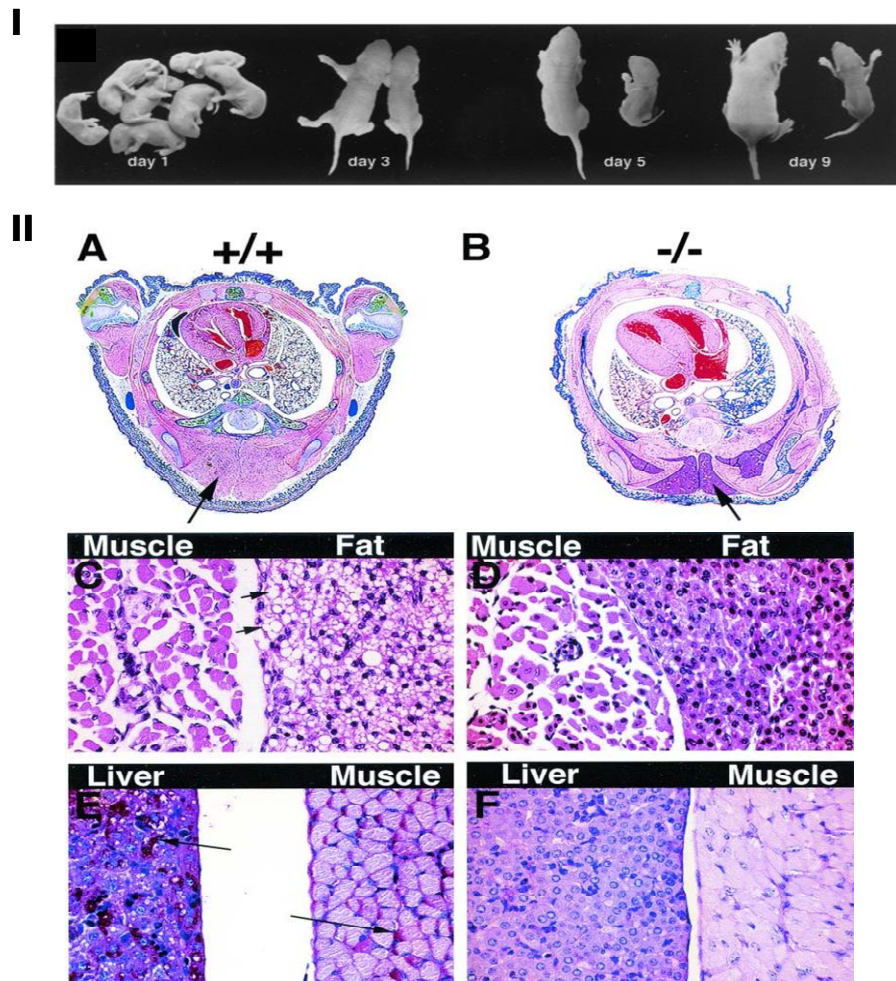


Fig II.4.10. Comparaison phénotypique et histologique de souris normales et déficientes en $\alpha_{\text{skeletal-actine}}^{-/-}$. (I) Les souris déficientes en actine α squelettique apparaissent normales à la naissance (jour 1), mais ne parviennent pas à se développer, avec une apparition de scoliose (jour 5) suivie par la mort à J9. A partir du jour 3, les souris sont présentés en couple, à gauche la souris normale, et à droite la souris $\alpha_{\text{skeletal-actine}}^{-/-}$. (II) À l'âge de 4 jours, les souris $\alpha_{\text{skeletal-actin}}^{-/-}$ montrent des signes de famine. Les sections au niveau du thorax montrent un taux normal du tissu adipeux gris (*Brown Fat*, indiqué par une flèche) chez les souris sauvages (A), alors qu'une réduction de ce tissu est observée chez les souris $\alpha_{\text{skeletal-actine}}^{-/-}$ (B). Les souris déficientes en actine α squelettique présentent une réduction du tissu adipeux (D) (flèche) par rapport aux souris saines (C). De même, une déplétion du glycogène musculaire et hépatocytaire est observée chez les souris $\alpha_{\text{skeletal-actine}}^{-/-}$ (F) ce qui n'est pas le cas chez les souris sauvages (E). Le glycogène (en magenta, indiqué par une flèche) est abondant en (E) et absent en (F). C et D : coloration hématoxyline/éosine. E et F : coloration acide périodique / Schiff pour marquer le glycogène. Adapté de la référence (226).

les protéines liant l'actine (Actine Binding Proteins-ABP)

L'actine du cytosquelette présente différentes fonctions tel que le maintien de la morphologie et la polarité cellulaire, la participation dans les phénomènes d'endocytose, le trafic intracellulaire, la contraction, la mobilité et la division cellulaire. Au sein de la cellule, l'assemblage et l'organisation des filaments d'actine est réglé par plusieurs protéines capable de se lier à l'actine et nommé *Actin Binding Proteins* (ABP) (235, 236). Ceci est illustré dans la **Fig II.4.11**.

Certaines protéines sont capables de lier le monomère d'actine. Or, comme on l'a déjà indiqué auparavant, la nucléation de l'actine est une étape instable. L'interaction de certaines protéines avec le monomère d'actine G peut stabiliser cette étape. C'est le cas du complexe Arp2/3 et la formine qui se lie à l'actine G, stabilisant ainsi la nucléation (213). Durant le mécanisme de polymérisation/dépolymérisation, certaines protéines interviennent dans la livraison du monomère et la dépolymérisation telle que la twinfiline, et la profiline.

D'autre part, l'organisation des filaments d'actine en réseaux ou en structures bien organisés est cruciale pour assurer les fonctions cellulaires. Cela est assuré par des ABP capables de se lier aux filaments d'actine.

L'interaction de l' α -actinine ou la fascine avec les l'actine-F par exemple, permet l'alignement des filaments d'une façon parallèle ou antiparallèle. L'interaction d'autres types d'ABP comme la spectrine ou la filamine avec les filaments d'actine permet l'arrangement de l'actine-F en matrices orthogonales. C'est le phénomène de *Crosslink*. Une organisation des filaments d'actine en forme « de branche » est assuré par l'interaction de l'actine-F avec des complexes protéiques tels qu'Arp2/3.

D'autres interactions ABP-actine-F permettent de lier les filaments d'actine avec d'autres filaments du cytosquelette. Citons par exemple la spectrine, liant l'actine F aux filaments intermédiaires, et la plectine liant l'actine F aux microtubules.

En dernier point, nous citons la dystrophine, la spectrine et l'annexine qui sont des ABPs capable de relier les filaments d'actine à la membrane.

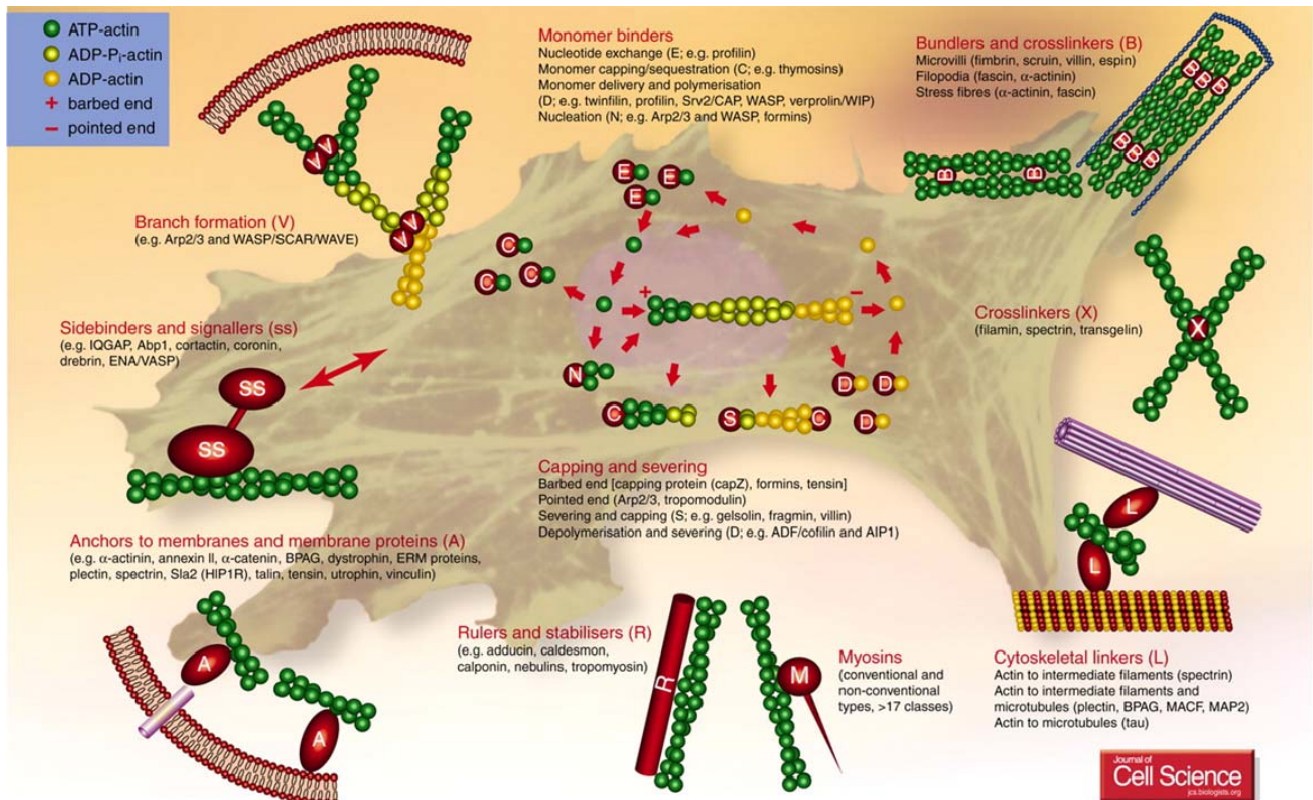


Fig II.4.11. Illustration des majeures conséquences de l'interaction de différentes ABPs avec l'actine. Adapté de la référence (237).

II.4.4. Conclusion

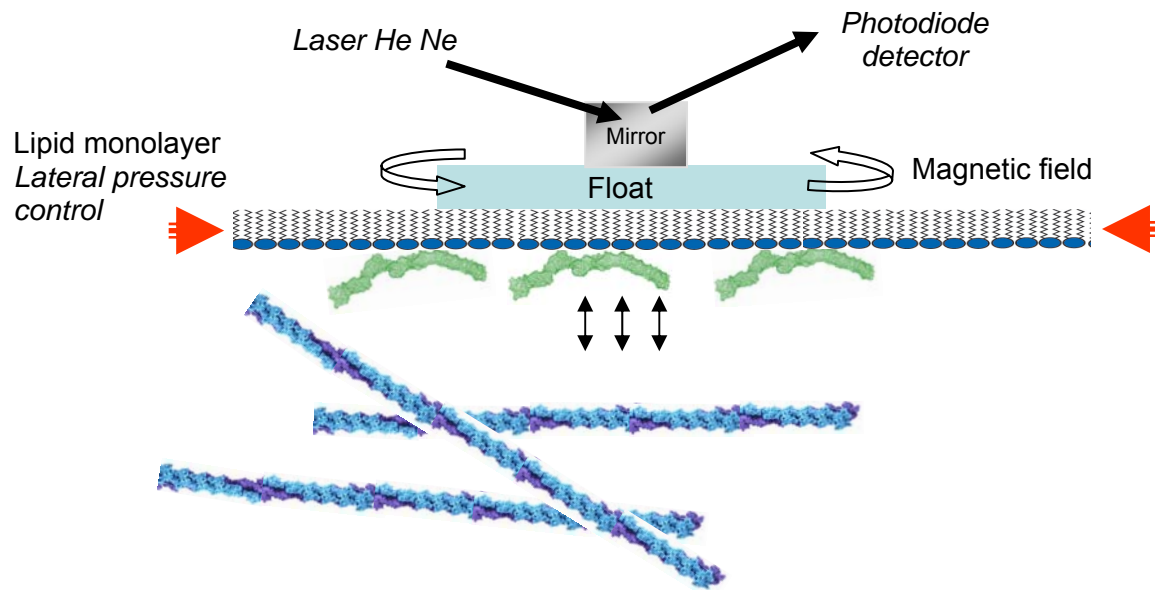
En conclusion, les différentes adaptations du cytosquelette pour générer des fonctions diverses sont liées à la nature des isoformes d'actine. Il est à noter que physiologiquement, des compensations entre isoformes sont observées. C'est l'alliage de ces isoformes et le ratio de chaque type d'actine qui va conférer les caractéristiques et les propriétés physico-chimique et fonctionnelle du cytosquelette.

Ainsi, selon la terminologie proposée par *Perrin & Ervasti*, l'actine semble être l' "acier cellulaire" (224). Par analogie, l'acier est un alliage composé de nombreux métaux différents, et le ratio de chaque composant détermine les caractéristiques de l'acier, tel que le poids, la résistance....

En modifiant les ratios des isoformes d'actine, un filament peut ajuster ses propriétés afin de répondre aux besoins spécifiques des différentes cellules.

RÉSULTATS

Nous présentons par la suite les résultats obtenus sous forme d'un article scientifique.



F-actin injection into the subphase. See Materials & Methods.

SPECTRIN-LIKE REPEATS DYS R11-15 OF HUMAN DYSTROPHIN: A LINK BETWEEN CYTOSKELETON AND PLASMA MEMBRANE IN MUSCLE CELLS? ¶

Joe Sarkis^{*,†,‡}, Véronique Vié^{*,‡}, Steve Winder[§], Isabelle Cantat^{*,‡}, Anne Renault^{*,‡}, Elisabeth Le Rumeur^{*,†}, Jean-François Hubert^{*,†}.

From the ^{*}Université Européenne de Bretagne (UEB), 35000 Rennes. [†]UMR-CNRS 6026, IFR 140, Equipe RMN-ILP, Faculté de Médecine, CS 34317, Université de Rennes 1, 35043 Rennes. [‡]UMR-CNRS 6251, Institut de Physique de Rennes (IPR), Université de Rennes 1, 35042 Rennes. [§]Department of Biomedical Science, University of Sheffield, Sheffield, S10 2TN, UK.

Running head: Dystrophin creates a direct bridge between actin and membranes.

Address correspondance to: Pr. Jean-François Hubert, UMR CNRS 6026, Equipe RMN-Interactions lipides protéines, Faculté de Médecine, CS 34317, 2 Av. Du Pr. Léon Bernard, 35043 Rennes cedex FRANCE. Fax: +33 2 23 23 46 06;
E-mail : jean-francois.hubert@univ-rennes1.fr

Inherited absence or modifications of dystrophin are responsible of more or less severe forms of muscular dystrophy. Dystrophin is reported in muscle cells to create a link between skeletal actin and sarcolemma through its N and C terminus respectively. In addition, in the long rod shaped central domain of dystrophin, repeats 11 to 15 have been described as a second filamentous actin (F-actin) binding domain, of which physiological role is still unclear. More recently, we showed that this part of the rod domain of dystrophin also exhibits binding properties to lipid layers which highly depend on lipid nature and packing. One exciting hypothesis in dynamics of muscle cell thus concerns the possibility that both sarcolemma and actin filaments simultaneously could bind to dystrophin through DYS R11–15 region, contributing to sarcolemma resistance to mechanical stress. We measured the shear elastic constant (μ) of lipid monolayers in Langmuir films, in the presence of DYS R11-15 and/or F-actin in the sub phase. At 20°C, DOPC-DOPS, DOPC-DOPE monolayers, exhibit μ values of $\approx 0\text{mN/m}$, independently of lipid nature and initial surface pressure. DYS R11-15, when injected into the subphase, modifies a little bit the shear constant, while it binds to the monolayer. We show that when actin is injected into the subphase following binding of DYSR11-15 to lipids, the lipid layer shear elastic constant is significantly increased in a manner that depends on the initial concentration of

DYSR11-15, the nature of phospholipids and the values of initial lateral surface pressures on lipid layers. The lipid monolayer is essentially elastic but when both DYS R11-15 and F-actin are added, a visco-elastic system is progressively obtained with an increase of the surface viscosity (η_s). Globular actin has no effect, but transition from G to F-actin in the subphase progressively increases μ and η_s when DYSR11-15 is present. Control experiments with other parts of the central domain of dystrophin devoid of actin binding properties demonstrate the specificity of the effects observed with DYS R11-15. Our data provide strong evidence that the rod domain of dystrophin could by itself scaffold sarcolemma through interactions with both actin and lipids. This mechanical link could contribute *in vivo* to the shock absorber function of dystrophin in muscle cells.

INTRODUCTION

Dystrophin and sarcolemma- When the subsarcolemmal fibrous protein dystrophin is absent from muscle, the sarcolemma is more frequently disrupted. Patients with Duchenne Muscular Dystrophy DMD, a genetic disease characterised by a lack of dystrophin, show increased serum levels of soluble muscle enzymes and growth factors, indicating that proteins leak from damaged muscle. Many studies have shown

that dystrophin-deficient muscle sustains more contraction-induced damage and exhibit greater susceptibility to damage from eccentric contractions than normal muscle (1, 2). Dystrophin is expressed in skeletal muscle at the sarcolemma and is enriched at the myotendinous junction (MTJ; the junction of muscle fibres and tendons) where high mechanical stretches occur (3). Moreover, the absence of dystrophin in patients with DMD is associated with defects in sarcolemmal integrity (4). Physical attachment of the basal lamina to the sarcolemma through Dystroglycan complex (DGC), which includes dystrophin, is important for cohesion of the muscle tissue and to provide resistance to mechanical stress (5).

All together these observations are consistent with the idea that dystrophin helps maintain membrane integrity during periods of mechanical stress.

Based on these observations, ongoing therapeutic programmes for DMD aim to restore normal myofiber elasticity in dystrophic muscles through gene-mediated expression of full length or truncated dystrophins (6). Even if first promising clinical data (7-9) are highly encouraging, more exhaustive knowledge about dystrophin biology and partnership is needed. In fact, new therapies aim to get high levels of expression, and efficiency in restoring a normal phenotype, of the so-called micro or mini dystrophins. These truncated dystrophins lack part of the central domain. In parallel to optimisation of gene introduction and expression methods, the appropriate design of the therapeutic truncated rod domain has to be based on knowledge of the physico-chemical properties of the resulting proteins.

It is established that dystrophin contributes to support and distribute the stress developed within the membrane during muscle contraction and elongation, and therefore prevents membrane leakage. However, the molecular bases for these mechanisms remain to be fully established (10). Continuity of internal cytoskeleton and extracellular matrix is ensured by binding of dystrophin at its N terminus through a calponin like actin binding domain (ABD1) and at its C terminus, to beta DG, which by himself spans the membrane and anchors the DGC in continuity with proteins from extracellular matrix. When muscle cell are stressed stress and membrane stretch, bend

or bleb, the scaffold resulting from binding extracellular matrix to cytoskeleton, through dystrophin binding/bridging, is thought to prevent membrane ruptures (11).

Dystrophin is a fibrous protein composed of four domains, the largest one being the central rod domain. The rod domain of dystrophin is to date no longer considered to be a passive linker between ABD1 and the C-terminus; rather, it is thought to have a key role in regulating the membrane cytoskeleton and the extracellular matrix scaffold (11). This central rod domain is constituted of 24 spectrin-like repeats of approximately 100 residues. It has been shown that numerous partners such as n-nitric oxide synthase (12), F-actin (13, 14) and lipids (15-18) interact with specialised parts of the dystrophin central domain, each of them constituted by a cluster of few spectrin-like repeats.

Dystrophin Actin binding properties

The N terminus binds to F-actin : ABD1

Early work from the Ervasti group demonstrated that in the *mdx* mouse, a rodent model of muscular dystrophy that lacks dystrophin, the entire subsarcolemmal γ -actin network is poorly connected (19, 20) suggesting a role for dystrophin in maintaining the subsarcolemmal F-actin network in close register with the membrane to provide mechanical stability. Homology with calponin and with proteins from the spectrin family allowed identifying the N-terminal domain of dystrophin as an actin-binding. Experimental work determined the structure and binding characteristics to actin of the so called actin binding domain 1 of dystrophin (ABD1) (21, 22) or its homologous domain in utrophin (23). Analysis of several single mutations or exon deletions in the N terminus part of dystrophin show that absence or misfolding of ABD1 rise to either Duchenne or Becker dystrophy (22, 24) highlighting the key role of actin-dystrophin partnership *in vivo*.

Part of the central domain binds to F-actin : ABD2

The Ervasti group demonstrated that ABD1 is not the only actin binding domain of dystrophin. Early co-sedimentation experiments showed that a proteolytic product of dystrophin made of aminoacids 1416-1880, from repeats 11 to

15 (DYS R11-15) exhibit actin binding properties (13, 25). Further works lead to the conclusion that dystrophin, but not its homologue utrophin, contains a second actin-binding domain (ABD2) (14, 25, 26). Biological role of this second actin binding site could serve to reinforce the association of actin with membrane. This is corroborated by phenotype restoring efficiency in mdx mouse. ABD 2 of human dystrophin is encoded by exons 32 to 42. Patients with in frame mutation in the *dmd* gene resulting to the expression of a dystrophin lacking all, or parts of, ABD2 exhibit various phenotypes. For instance, deletions of exons 24 to 41, or 30 to 42 lead to severe DMD phenotypes (27, 28) while patients with deletions of exons 32 to 42 or of a single exon 34 have the less severe phenotype of a BMD and even deletions of exons 32 to 44 or 35 to 44 (29, 30) are asymptomatic. In the same manner, in frame duplications of exons leading putatively to the presence of two ABD2 domains, cause either DMD (exons 19-44 (28)) or BMD (17-44 (31)).

All this support the hypothesis that the actin-binding site located in the central rod domain plays a crucial role in the shock absorber function of dystrophin in muscle cells. Nevertheless lots of works have to be done before a complete understanding of the link between phenotype and genotype in muscular dystrophies.

Biological significance of the two actin binding sites in dystrophin- It is now established that dystrophin binds laterally along an actin filament through the concerted effect of two distinct low affinity binding sites. The presence of two independent but synergistic actin-binding sites on dystrophin may hold important clues to its mechanical function *in vivo* (13, 26). As discussed previously, the dystrophin monomer is able to bind along the length of one single actin filaments (25). The presence of two low-affinity actin-binding sites in dystrophin likely allows for a more elastic response of the actin–dystrophin–sarcolemma linkage to muscle stretches, compared for instance with binding of utrophin via one contiguous actin-binding domain (26). This could generate a high affinity and quite stable interaction which, in conjunction with the DGC associated proteins, takes part to the cytoskeletal cortex of muscle cells (11).

The Rod domain also binds to lipids- Since the early work of Dewolf (32), the lipid binding properties of the spectrin like repeats of the rod domain have been analyzed by our group; Amongst the 24 repeats that constitute the central domain, only repeats 20 to 24 have been shown not to bind lipids. Interestingly, all other parts of the central domain do bind anionic lipids *in vitro*. Their binding characteristics have been largely investigated (15-18, 33). Within the lipid binding repeats of the rod domain from 1 to 19, the sub domain constituted by the repeats 11 to 15 (DYS R11-15) exhibits particular lipid binding properties. We showed that DYS R11-15 constitutes the only part of dystrophin interacting with anionic as well as zwitterionic lipids and which adapts its interaction and organization depending on lipid-packing and lipid-nature (17). From these studies we suggested that the physiological role of the central domain of dystrophin on sarcolemma scaffolding could partly occur through modulation of lipid-protein interactions. Moreover we identified repeats R12 and R13 being more strongly involved in lipid binding within the whole DYS R11-15 protein. Therefore, in addition to its actin binding properties described above, the affinity for lipids of dystrophin DYS R11-15 could provide the phospholipid membrane with an additional support essential to maintaining membrane cohesion. In support of this role for DYS R11–15 binding to membrane lipids, it is worth mentioning that truncated dystrophin that lacks this region has less efficiency to rescue the normal phenotype of the dystrophin-deficient *mdx* mouse (30).

In addition to the above considerations, an exhaustive molecular modelling analysis of the whole rod domain recently show that the 24 repeats of the rod domain have a large diversity of electrostatic and hydrophobic surfaces. Particularly, DYS R 11-15 is delimited by two newly identified flexible junctions and therefore appears by himself as an individual subdomain of dystrophin (34). The biological function of this subdomain has now to be fully established.

DYS R 11-15 binds F-actin and lipids : Aim of the present study- As the actin-binding domain of DYS R11-15 is not to date precisely mapped, one exciting question concerns the possibility that both sarcolemma and actin filaments could either

compete or simultaneously bind to dystrophin through the DYS R11-15 region. While it is clear that DYS R11-15 (=ABD2) is crucial for normal function of dystrophin, the biological significance of its ability to bind *in vitro* actin as well as sarcolemmal lipids has not yet been investigated. Interaction of repeats 11 to 15 of the rod domain with both partners, namely actin and sarcolemma, could contribute to the mechanical role of dystrophin by creating a link between cytoskeleton and sarcolemma.

In the present study, we aimed to verify the hypothesis that DYS R11-15 could bind simultaneously actin filaments and sarcolemma and by the way largely contribute to membrane resistance to stress. For that purpose, we analysed the surface shear rheology of model Langmuir monolayer.

Lipid bilayers are usually considered as a simple Newtonian fluids, however they possess a bending and a compression elasticity. In fluid phase, the acyl chains show in-plane nematic order but lack short-range translational and orientational order, then they do not resist shear. Recently, *Espinosa et al.* (35) have tested several lipid monolayers to mimic different biological membranes. They show that a fluid lipid layer is a Newtonian fluid characterized by a low shear viscosity ($\eta \sim 10^{-5}$ N.s/m). We used a rheometer based on a rotating magnetic disk in a Langmuir trough and we measured the shear elastic constant of lipid layers in the presence of DYS R11-15 and F-actin. The shear elastic constant increases as the viscosity of the system, indicating the presence of strong interactions between these partners.

We show for the first time that the central domain of dystrophin, which was previously known to bind individually to F-actin or to membrane lipids, is able to create a bridge between both molecular partners. DYS R11-15 thus creates a mechanical link which likely contributes *in vivo* to the shock absorber function of dystrophin in muscle cells

MATERIALS AND METHODS

Materials - DOPC, DOPS, and DOPE phospholipids were purchased from Avanti polar lipids.

Methods

Protein purification : Human dystrophin multirepeat domains DYS R11-15 and DysR1-3 were expressed in *E.coli* and purified as described previously (16, 17). Actin G from rabbit muscle were prepared as in (36).

Actin polymerisation and sedimentation assays : G actin stored in G buffer (2mM Tris pH 8.0, 0.2mM ATP, 0.5mM DTT, 0.2mM CaCl₂, 1mM NaN₃) was diluted in polymerisation buffer (= F-buffer; final composition : Hepes 20 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, ATP 2 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, Dithiothreitol 1 mM) and allowed to polymerise at room temperature for 1h. For sedimentation assays, 100µl samples in ultracentrifuge tubes were prepared in F-buffer. The final concentration of actin and DYS R 11-15 were 10µM and 2-5 µM respectively. Following 30 min of incubation, actin, DYS R11-15 or both proteins were centrifuged for 30 min at 100.000g at 20°C. Supernatants and pellets were analysed by SDS-PAGE. Gels were stained by Coomassie Blue.

Electron microscopy : Samples containing 10 µM polymerised actin with or without 5 µM DYS R 11-15 were loaded on microscope grids. Negative staining was performed with 2% uranyl acetate for 2 min and samples were observed on a GEOL 100CX electron microscope.

Measurements of shear elastic constant:

We analyzed the surface shear rheology of model Langmuir monolayer. Several apparatus designs for the measurement of interfacial shear viscosity and viscoelasticity exist and can be classified in two systems, the indirect shear rheometers where the displacement of tracer particles placed at the interface is recorded and analyzed by image analysis, and the direct shear rheometers where the torque or displacement of a probe located within the interface is directly measured. The probe consists in a ring or plate slightly posed at the interface on which mechanical forces are applied. To avoid a mechanical link maintaining the probe, others set ups were developed as a needle or small magnet setting in oscillation by a magnetic field (37, 38). Our rheometer belongs to the last family. Then a shear force is applied on the monolayer although a small magnet which oscillates by magnetic field application.

While interfacial rheology has been mainly applied in the studies of behaviour of protein (essentially food proteins but also blood proteins) (39, 40), new studies deal with the behaviour of lipid films experimentally or by molecular dynamic simulation (41). Finally, the rheological behaviour of lipid bilayer is still unfamiliar.

The set up used is described in (42) and presented in *Figure 1*. Briefly, a circular Teflon trough (48 mm diameter) is filled by the subphase lipid free or covered by a lipid monolayer where its surface pressure is controlled. A float containing a small magnet is maintained at the center of the trough by a magnetic field induced by a solenoid. This magnetic field and the earth field give a total field of $B_0 = 6.4 \pm 0.5 \cdot 10^{-5}$ T. This field acts as a torsion wire by giving an equilibrium position and orientation to the float.

The trough is placed at the middle of two large peripheral Helmholtz coils in which a current moves creating a B perpendicular (B_{\perp}) to B_0 . This torque applied to the magnet tends to induce a rotation of the float around its vertical axis. The absolute value of B_{\perp} is $10^{-4} \cdot B_0$ and the frequency range used is from 0.01 Hz to 100 Hz. The value of the magnetic moment of the magnet is $m = 8 \pm 1.5 \cdot 10^{-4}$ A.m². To follow the rotation of the magnet a small piece of unpolished glass is glue on the top of the magnet and reflects a laser beam to a four dials photodiode.

The model to depict the behaviour of the monolayer is viscoelastic and we apply the model of the Kelvin-Voight solid. The viscosity of the film is the resistance to flow under stress whereas elasticity is the instantaneous deformation and recovery from the stress.

The value of the shear deformation ϵ_{xy} produced by the B (addition of B_{\perp} and B_0) is $\sim 10^{-7}$. Nevertheless the deformation induced on the monolayer is not homogeneous and is larger close to the float and null close to the wall of the trough. It is used to be that the interfacial flow is assumed to be completely decoupled from the bulk phase flow. The rheometer using float is treated as a two-dimensional couette device.

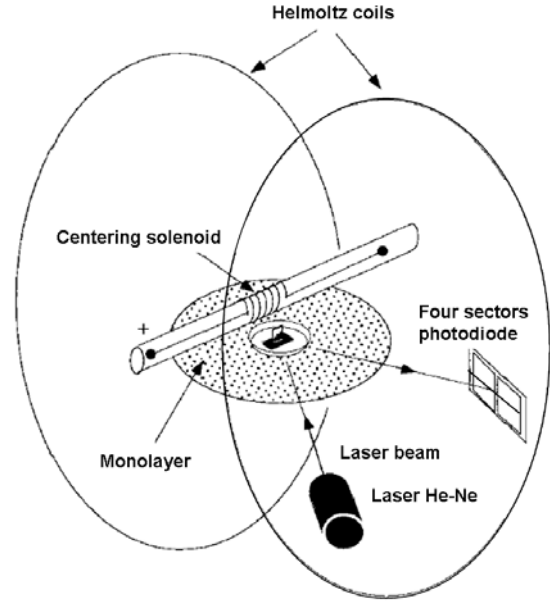


Figure 1: Schematic representation of the setup built for the measurement of the surface rheology. A torque is applied on the float by the two Helmholtz coils. In response to the torque, the float rotates on its vertical axis and the amplitude of rotation depends on the rheological properties of the monolayer.

General equation of conservation of momentum

$$J \frac{d^2 \theta}{dt^2} = M_{subphase} + M_{monolayer} + M_{magnetic}$$

J is the inertia momentum of the float

- **Expression of $M_{magnetic}$:**

$\alpha(t) = \alpha e^{i\omega t}$ angle of the magnetic field B with the origin

$\theta_0(t) = \theta_0 e^{i\omega t}$ angle obtained on the lipid interface (with θ_0 complex number)

$$M_{magnetic} = -Bm(\theta_0 - \alpha)$$

- **Expression of $M_{subphase}$:**

In contrast with the paper of *Erni et al.* (43) where he works in rotating mode (the velocity is constant), in our case we discuss only about the behavior respect to the frequency. The momentum varies as $-\frac{\eta a^3 v_{\theta}}{\delta}$ With δ the distance

characterizing the variation of v_{θ} in the z direction. For this distance three choices are possible: the depth of the trough H $\sim 10^{-2}$ m, the

float radius a $\sim 5 \cdot 10^{-3}$ m and the depth of dynamic penetration correspond to:

$$h = \sqrt{\frac{\eta}{\rho\omega}} \sim 10^{-3} \text{ m (for } \omega = 1 \text{ Hz)}$$

Because the length shorter should be considered, *a priori* it is h . However, the data treatment on the pure water give solution independent of ω , then we can write :

$$M_{\text{subphase}} = -K\eta a^2 \nu_\theta = -\nu_0 \frac{d\theta}{dt}$$

ν_0 represents the viscous forces of the subphase

- **Expression of $M_{\text{monolayer}}$:**

The rheological relation between the strain and the deformation in complex notation is

$$\sigma_{r\theta} = (G' + iG'')\varepsilon$$

The deformation for a shear movement in cylindrical geometry is : $\varepsilon = 2\varepsilon_{r\theta} = r \frac{\partial\theta}{\partial r}$

To determine the profile of $\theta(r)$, we suppose that the deformation in the volume subphase does not impact the monolayer. Then the $M_{\text{monolayer}}$ is independent of r :

$$2\pi r^2 (G' + G'') r \frac{\partial\theta}{\partial r} = M_{\text{monolayer}}$$

$$\theta(r) = \theta_0 \frac{a^2}{r^2}$$

the trough is larger enough for that θ become null for high value of r

$$M_{\text{monolayer}} = -4\pi(G' + G'')a^2\theta_0$$

Finally,

$$J \frac{d^2\theta}{dt^2} = M_{\text{subphase}} + M_{\text{monolayer}} + M_{\text{magnetic}}$$

$$-\omega^2 J\theta = -4\pi(G' + G'')a^2\theta_0 - i\omega\nu_0\theta_0 - Bm(\theta_0 - \alpha\theta)$$

In the case of the *Kelvin-Voight* solid:

$$G' = \mu$$

$$G'' = \omega\eta_s$$

then,

$$\theta_0 = \frac{Bm\alpha}{Bm + i\omega\nu_0 + 4\pi(G' + iG'')a^2 - \omega^2 J}$$

For each experiment, frequency spectra of the oscillator response were measured in the range of 0.01 -100Hz on pure water, on TNE or F-actin buffer and lipid monolayers. Any change in the resonance frequency was observed. Indeed, lipid mixture (DOPC:DOPS (1/1) or DOPC:DOPE (1/1)) in chloroform/methanol 2:1 (v/v) was gently deposited at the air/liquid interface at the desired surface pressure (20,27, 30 or 32 mN/m). The lipids are in the liquid expanded state and the rheological characteristic of the interfacial film did not change. The resonance frequency depends of the value of the shear elastic constant μ . By fitting the frequency spectra, μ was calculated, for water, buffer or lipid film at this surface pressure, μ was equal to 0mN/m.

Then, the protein was injected, into the subphase just beneath the lipid monolayer at a final concentration of 0.025, 0.05 or 0.1 μ M. In order to follow the effect of the protein absorption of the rheological film properties, the oscillator response at a fixed frequency (5Hz) was recorded versus the time and μ was calculated. Before the F-actin fiber in the subphase, a new frequency spectrum was measured to check the resonance frequency variation and the μ value. The F-actin solution was injected in the sub-phase (0.125 μ M) and the evolution was recorded function of the time. At the end of the experiment, a new frequency spectrum was performed.

RESULTS

Following purification of DYS R 11-15, cosedimentation assays with F-actin were performed. As shown in *Figure 2-A*, DYS R 11-15 alone does not sediment. In the presence of actin filaments, a significant amount of DYS R 11-15 is found in the pellet. In the same conditions, DYS R1-3 or DYS R20-24 do not sediment. We conclude that our DYS R 11-15 construct as

expected behaves as an actin binding protein. Electron micrographs of actin in buffer F show the filaments that were used for cosedimentation assays and further microrheology experiments *Figure 2-B*. Diameter of actin filaments is 6-8 nm; this is consistent with previously reported values (44). In *Figure 2-C* is shown an actin filament coated with a negatively stained elongated object whose size is equivalent to the other DYS R11-15 monomers present in the medium. No bundling or cross-linking of DYS R11-15 decorated actin filaments were observed.

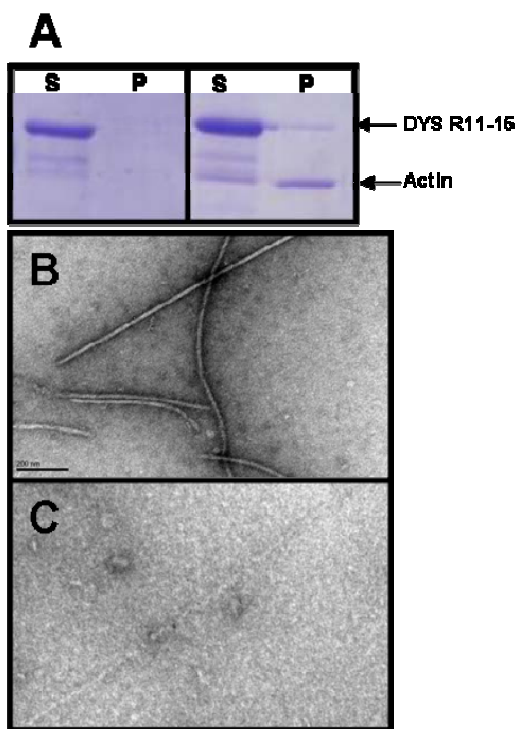


Figure 2: DYS R11-15 and actin. **(A)** F-actin cosedimentation assay. $5\mu\text{M}$ of DYS R11-15 was ultracentrifuged alone or following 1 hour of incubation in the presence of $10\mu\text{M}$ F-actin in F buffer. Supernatants (S) and pellets (P) were analyzed by EGPA-SDS. The protein alone is in the supernatant, while significant amounts of DYS R11-15 co sediment with the actin filaments. **(B)** negatively stained F-Actin filaments observed by electron microscopy. Bar 100nm. **(C)** Negatively stained DYS R 11-15 monomers in the presence of F-actin. *t* The actin filament is coated with a monomer of DYS R11-15.

We concluded from the above cosedimentation experiments, that G actin polymerise in F-actin and that DYS R 11-15 is able to bind actin filaments in the experimental conditions that were used for 2D rheological

analyses. We then used the Langmuir trough and measured the shear elastic constant of lipid monolayers as described in the Experimental procedure of this paper.

First experiments were done in F-buffer with a layer initial surface pressure value of 20mN/m , with DOPC:DOPS or DOPC:DOPE lipid mixtures at molar ratio 1:1. As shown in *Figure 3-A.a.* and *Figure 3-B.a.* the shear elastic constant of both lipid monolayers are similar to that of water at the air/water interface with values close to zero ($\mu = 0\text{ mN/m}$ and $\eta_s < 10^{-5}\text{ N.s/m}$). Following injection of the protein DYS R11-15 into the subphase at a final concentration of $0.1\mu\text{M}$, a low variations of shear constant is observed ($\mu = 0.3$ and 0.1 mN/m with anionic and zwitterionic monolayer, respectively) (*Figure 2-A.b* and *2-B.b.*) and η_s is around 10^{-5} N.s/m with both lipid mixtures (data not shown). Then actin filaments at a final concentration of $0.125\mu\text{M}$ are injected. Under both lipid monolayers, the actin filaments alone have no effect on the shear elastic constant. However, an increase of the shear elastic constant is observed if DYS R11-15 is present before actin injection. Value of the shear elastic constant of 2.9 and 5.5 mN/m (*Figure 3-A.c.* and *3-B.c.*) and increases of the surface viscosity η_s to reach 1.3×10^{-4} and $2.4 \times 10^{-4}\text{ N.s/m}$ were observed with anionic and zwitterionic monolayer, respectively. Actin alone was ineffective on lipid layer rheology and likely does not interact with the membrane (*Figure 3-A.d.* and *3-B.d.*). In parallel with DYS R11-15, we injected DYS R1-3 into the sub-phase. DYS R1-3 is another part of the central domain of dystrophin which was demonstrated to bind lipid layers in Langmuir trough (18), but for which no actin binding activity is reported. Interestingly, a null shear elastic constant and no change of the surface viscosity ($\eta_s < 10^{-5}\text{ N.s/m}$, data not shown) were obtained after injection of the actin filaments following DYS R1-3 equilibration in the system (*Figure 3 inset*)...

Taken together, these results show that DYS R11-15 is able to create a bridge between actin filaments and the membrane; such link dramatically modifies the rheological properties of the membrane.

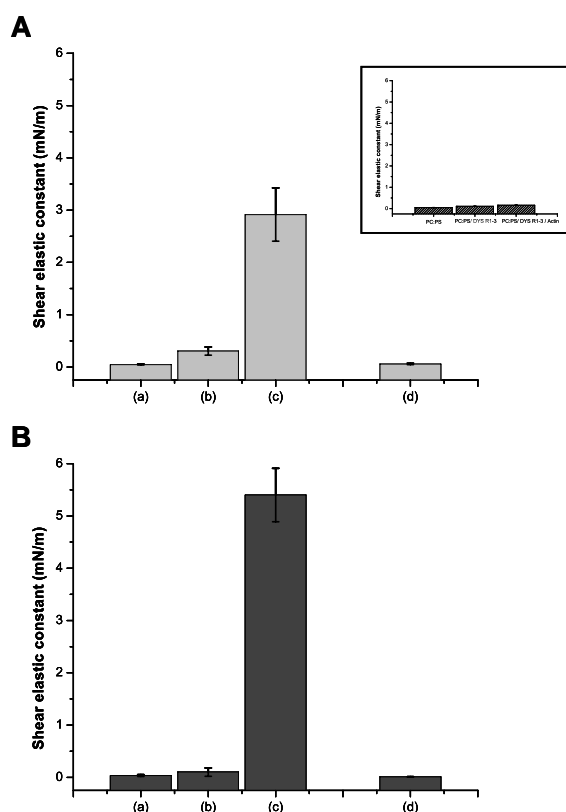


Figure 3: DYS R11-15 link the lipid monolayer to actin filaments. Shear elastic constant of the lipid monolayer [DOPC:DOPS (A) and DOPC:DOPE (B)] at 20mN/m (a), after injection of DYS R11-15 (0.1 μ M) (b) and Actin filaments (0.125 μ M)(c). In (d) is presented the negative control of lipid monolayer followed by injection of actin filament without DYS R11-15. No increase of shear elastic constant is observed. In the inset is presented the negative control by using DYS R1-3 that binds DOPC:DOPE lipids only. Shear elastic constant of DOPC:DOPS 20mN/m (a), followed by the injection of DYS R1-3 (0.1 μ M) (b) and actin Filaments (0.125 μ M).

When actin is injected first, followed by DYS R 11-15, no effect on μ and η_s are observed. While it is likely that amounts of DYS R11-15 bind to the actin filaments, no subsequent association with lipids is done. This might be due to a very low diffusion of DYS R11-15 towards the lipid layer once bound to actin, or that the conformation of DYS R11-15 is modified in a way that does not longer allow binding to lipids.

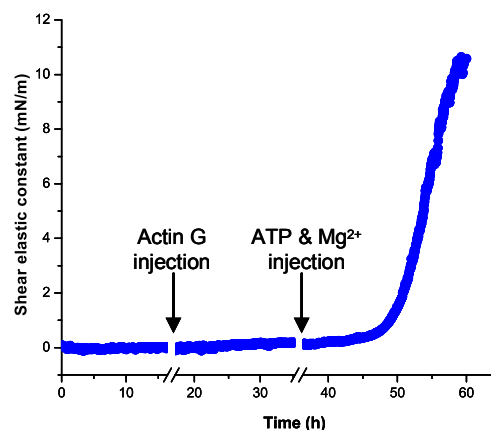


Figure 4: Transition from G to F Actin G is required for creation of a bridge between membrane and actin through DYS R11-15. Shear elastic variation μ (mN/m) of DOPC:DOPS monolayer (at $\pi_i=20$ mN/m) with 0.1 μ M of DYS R11-15 in a G buffer subphase, following the injection of 0.125 μ M monomeric actin G, and finally the injection of 5 mM ATP and Mg²⁺.

In order to verify if changes of μ are due to an association of the monolayer with the F-actin network, we then built a PC/PS layer over G buffer, which does not induce actin polymerisation. *Figure 4* shows the time course of shear elastic constant of the lipid monolayer in this experiment. The μ values are stabilised close to zero; then 0.1 μ M DYS R11-15 is injected. No significant change of rheology is detected neither following injection of 0.125 μ M of G actin in the subphase. We then gently injected a mix of concentrated ATP and Mg⁺⁺. As no stirring is allowed in the subphase, quite high concentrations were chosen giving expected final concentrations of 5mM for ATP and Mg⁺⁺. Diffusion of activators of actin polymerisation in the subphase progressively is followed by an increase of shear elastic constant and the surface viscosity, to values of ~ 10 mN/m and 1.7×10^{-4} N.m.s⁻¹ respectively. We conclude that filamentous actin rather than globular actin, affects rheological properties of the monolayer when, and only when, DYS R11-15 is present.

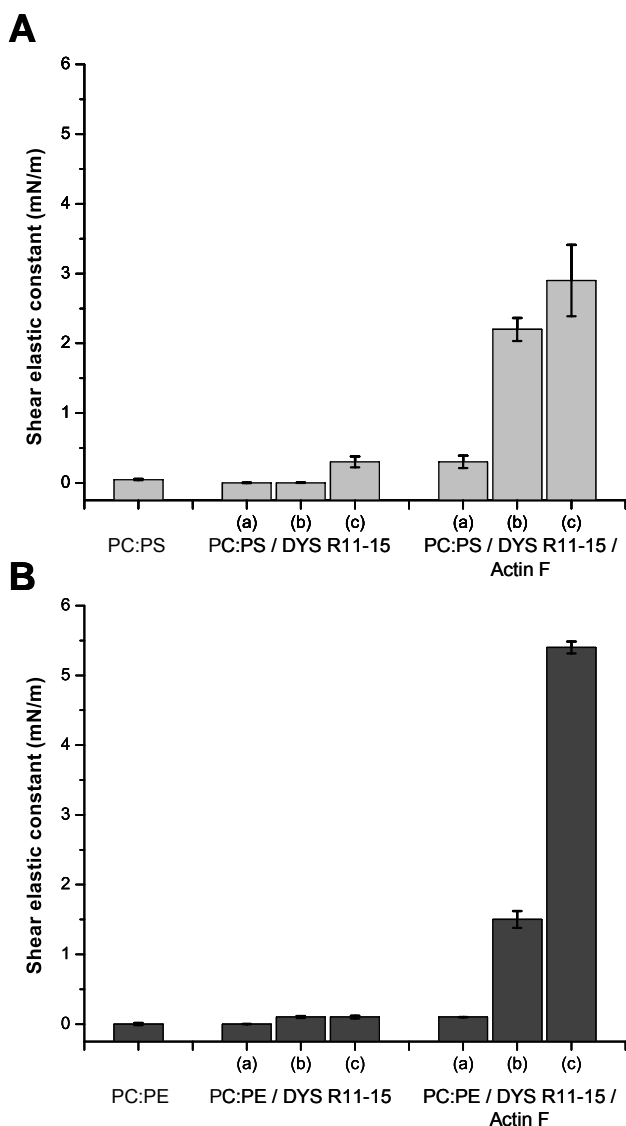


Figure 5: Influence of DYS R11-15 concentration: Shear elastic constant of DOPC: DOPS (A) or DOPC:DOPE (B) lipid monolayer at 20 mN/m, following injection of DYS R11-15 at different concentrations (2.5 ; 5 and $10.10^{-8}M$ corresponding to (a), (b) and (c) respectively), and Actin filaments at a final concentration of $0.125 \mu M$.

We then renewed experiments in the same conditions than those used in *Figure 3*, except that various initial concentrations of DYS R 11-15 were injected into the subphase (0.025 , 0.05 and $0.1 \mu M$) prior to F-actin injection at a final concentration of $0.125 \mu M$. As shown on *Figure 5*, shear elastic constants of DOPC: DOPS (*Figure 5-A*) or DOPC:DOPE (*Figure 5-B*) lipid monolayers do increase significantly, only in the presence of F-actin, in a manner that depends on the amount of

DYS R11-15, from zero to 2.9 mN/m for DOPC: DOPS and 5.5 mN/m for DOPC:DOPE. These results indicate that the effect of DYS R11-15 on changes of shear elastic constant depends on the protein concentration in the subphase. By increasing DYS R11-15 concentration, the surface viscosity became also significant and higher than 10^{-5} N.s/m. It reach $\eta_s = 1.3 \times 10^{-4}$ and 2.4×10^{-4} N.s/m with anionic and zwitterionic monolayer respectively for a DYS R11-15 concentration of $0.1 \mu M$.

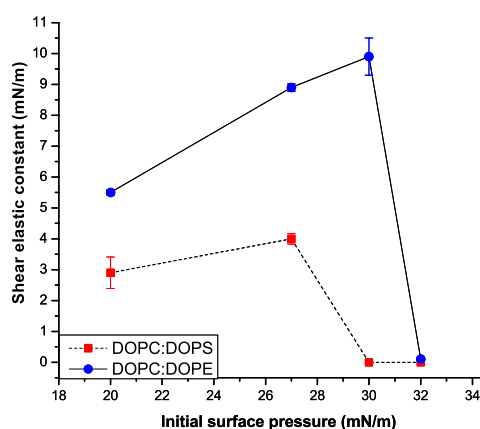


Figure 6: Effect of lipid packing on the interaction of DYS R11-15 with membrane and actin filaments. Shear elastic variation μ (mN/m) of the lipid monolayer surface, after injection of actin filaments ($0.125 \mu M$) under the monolayer/DYS R11-15 film at different initial surface pressures (20, 27, 30 and 32 mN/m).

We then investigated the influence of the initial pressure of the lipid layer on the interaction and the rheological properties. Various initial surface pressures of lipid layers in the Langmuir through were established to 20, 27, 30 and 32 mN/m, then measurements of shear elastic constants of lipid layers, alone or in the presence of DYS R11-15 or DYS R11-15 and F-actin, were performed. These values for initial pressures were chosen because they represent critical values for the binding of $0.1 \mu M$ DYS R11-15, as determined in a recent study (17). No significant values of μ and η_s were measured with lipid mixtures alone and very low values are obtained with the lipid monolayer /DYS R11-15, at all initial surface pressures tested (not shown). *Figure 6* summarizes the evolution of μ in function of initial pressure, after adding actin filaments under the

monolayer/DYS R11-15 film. Addition of F-actin into the subphase increase μ with both lipid mixtures, for an initial pressure of 20 mN/m. A higher values are obtained at 27 mN/m. At 30mN/m, the shear elastic constant becomes null with the anionic monolayer, while the highest value is observed with the zwitterionic monolayer. At 32 mN/m, μ is null for both lipids. A similar behaviour is observed when measuring the surface viscosity. η_s increase from 1.3×10^{-4} N.s/m at 20 mN/m to 1.5×10^{-4} N.s/m at 27 mN/m and became less than 10^{-5} N.s/m at 30 and 32 mN/m with DOPC:DOPS. With the zwitterionic lipid mixture, η_s increase from 2.4×10^{-4} N.s/m at 20 mN/m to 1.2×10^{-3} N.s/m at 30 mN/m and became less than 10^{-5} N.s/m at 32 mN/m (Data not shown).

The critical shear elastic constant and the critical surface viscosity, for which μ remains close to zero and η_s less than 10^{-5} N.s/m after actin injection, is obtained at 30 mN/m with the anionic monolayer and at 32 mN/m with the zwitterionic monolayer. In a previous study (17) we showed that at these critical values, some changes of the orientation or organisation of the protein at the layer surfaces are observed (see discussion). Nevertheless, 32mN/m represents the pressure at which DYS R11-15 is excluded from both kinds of layer. We show that exclusion of DYS R11-15 from the layer prevents the bridging effect on layer rheology. This result therefore strongly reinforces our above conclusion that the three components, namely membrane, DYS R11-15 and F-Actin, are able *in vitro* to get organised in a way creating a mechanical bridge between the actin filaments and the lipid layer.

DISCUSSION

DYS R11-15 creates a bridge

In this study, we measured the rheological shear elastic constant of monolayers composed of lipids mimicking sarcolemmal membrane. The choice of lipid mixtures was driven by their reported abundance in the inner sarcolemma leaflet (45). We show that resistance of lipid layers to mechanical stress is increased when the R11 to R15 spectrin-like repeats of the central domain of dystrophin create a bridge between the membrane and filamentous actin. This modulated interacting process could represent a way for the muscle cell to adapt to mechanical stresses. We analysed lipid

rheology in a range of initial lateral pressure that is a representative state of lipid packing in physiological conditions (46).

Significance of our μ and η_s measurements

The lipid monolayer is always in a fluid state, when using PC/PS or PC/PE, independently from the surface pressure. The surface rheological behaviour of the lipid monolayer is similar to the surface properties measured on the air/water interface ($\mu \sim 0$ mN/m and η_s less than 10^{-5} N.s/m). When DYS R11-15 adsorbs and interacts with the membrane at an initial surface pressure of 20 mN/m for example, a low modification of the surface properties are detected on the monolayer ($\mu=G' = \sim 0.3$ and 0.1 mN/m for anionic and zwitterionic lipids respectively, and η_s is around 10^{-5} N.s/m at $\omega=5$ Hz with both lipid mixture). By adding the actin filaments, higher values of shear elastic constant and surface viscosity are obtained (*Table 1*).

<i>At $\omega = 5$ Hz</i>	DOPC :DOPC 20 mN/m			DOPC :DOPE 20 mN/m		
	Monolayer	+DYS R11-15	+ActinF	monolayer	+DYS R11-15	+ActinF
$\mu = G'$ (mN/m)	0	0.3	2.9	0	0.1	5.5
η_s (N.s/m)	<10 ⁻⁵	2×10 ⁻⁵	1.3×10 ⁻⁴	<10 ⁻⁵	1×10 ⁻⁵	2.4×10 ⁻⁴
G'' (mN/m)	<0.05	0.1	0.65	<5. 10 ⁻²	0.05	1.2

Table 1: Example of the variation of the rheological properties of lipid monolayer at an initial surface pressure of 20 mN/m; when adding DYS R11-15 protein, followed by actin filaments under the monolayer.

On the other hand, *Roberts et al.* (47) followed the rheological behavior of the interfacial lipid film during the penetration of two protein models. The phospholipid monolayer alone present a behavior where $G' < G''$. The penetration of the protein into the membrane change its properties and G' became higher than G'' . The authors explained this behavior as the following: while the protein penetrates the lipidic film, the interaction between proteins leads to the formation of cross-links between adjacent proteins within the surface film. Therefore, it seems that the interaction of the protein with the monolayer induces a transition from liquid-like ($G' < G''$) to gel-like ($G' > G''$) rheological behavior by partially unfolding and strong lateral interactions.

In our case, the PC/PS or PC/PE monolayer has the same properties as described in (47), where $G' < G''$ (see *Table 1*). The interaction of DYS R11-15 with the membrane changes the monolayer rheological properties ($G' > G''$).

The presence of actin filaments in the subphase increase both parameters G' and G'' , but whatever the lipid mixtures is, the values of G' increase at a faster rate than the value of G'' ($G' \gg G''$). Then a transition between the liquid-like monolayer to a gel-like behavior occurs. This phenomena reveals a formation of cross-links between actin filaments and the membrane *via* DYS R11-15.

This behavior ($G' \gg G''$) is also observed when a protein monolayer of DYS R11-15 is formed at the air/water interface ($G' = 22.6$ mN/m and $G'' = 3.2$ mN/m, data not shown), due to high lateral interaction between the protein molecule.

These results show that linking the membrane to actin filaments *via* DYS R11-15 reinforce the membrane resistance to mechanical stress. We therefore strongly suggest that our measurements under shear stress are relevant to explain what could happen in a muscle cells.

Difference in response depending to lipids and initial surface pressure

The organization of DYS R11-15 under the monolayer depends on the initial surface pressure and the lipid nature. We previously showed that the binding modes of DYS R11-15 to zwitterionic and anionic vesicles are different. AFM data showed that more protein is able to bind on PCPE than on PC:PS layers (17). The present rheology data are in good agreement with these observations: higher μ values are observed with PCPE than for PCPS films when initial surface pressures are 20 and 27 mN/m. Therefore, more protein bound to lipids likely leads to a higher amount of actin bound and a higher value of μ . Interestingly, when initial pressures reached the critical exclusion values for DYSR11-15, μ remains close to zero after actin injection at 30 mN/m with the anionic monolayer and at 32 mN/m with the zwitterionic monolayer. Additionally, slight differences in the 3D structure of DYSR11-15 occur depending on the lipid they are bound to (17). Our data suggest that conformation of DYS R11-15 bound to

zwitterionic lipids might be more favourable for association with the actin network.

The variation of membrane rheology reflects the variation of the intensity of the bridge depending on initial surface pressure conditions and lipid nature. As mentioned above, when the initial pressure of the lipid layer reached a value that prevents DYS R11-15 protein binding, whatever the nature of the lipids, no lipid layer rheology is induced when actin is present. These observations reinforce our conclusion that the effect that we observe on μ of lipid layers are due to a coupling of actin and membrane through the dystrophin fragment.

Cytoskeleton actin

In this study, we used actin from rabbit muscle. The sarcolemmal alpha isoform of actin is the most abundant in the experimental samples. The alpha actins are found in muscle tissues and are a major constituent of the contractile apparatus. The alpha isoform from rabbit is 98.1% identical to human alpha actin and 98.1% identical to human gamma actin. The difference between the two isoforms is largely at the N terminus (48). According to immunostaining and genetic data (20), the gamma isoform of actin is which is the isoform present at the cortex of muscle cells and is the putative partner for the actin binding domains 1 and 2 of dystrophin *in vivo*. It has to be taken in account however that transgenic mice studies showed that gamma cytoskeletal actin and alpha sarcolemmal actin partly substitute to each other without functional consequences (49). Moreover, *in vitro* studies showed that that dystrophin is capable of interacting with filamentous actin in nonmuscle tissues through its amino terminal domain and interestingly that intact dystrophin in the dystrophin-glycoprotein complex bound with equal avidity to muscle and brain F-actin (50). We can therefore conclude to the biological relevance of our results even if the alpha isoform of actin is present in our samples. *Rybakova et al.* (25) showed that depolymerisation rate of actin can be modified *in vitro* by ABD2 (DYS R11-15). In the present study we assume that actin network in the sub phase of the Langmuir through is not significantly affected by DYS R11-15 binding; whatever, this leads to no change in our qualitative conclusions.

What part of DYS R 11-15 could be involved in the bridge?

The part of DYS R11-15 ABD2 which is strictly involved in binding to actin is not yet known. The first discovery of the actin binding domain 2 was done by co sedimentation experiments using DYS1416, a proteolytic product of dystrophin which was constituted by amino acids 1416 to 1880 of the wild type protein. It contains the sequence of repeats R11 to repeat R14 and approximately half of repeat 15 (13). We used in this study a construct which leads to the synthesis and purification of a protein made of R11 to the whole R15 repeat. As demonstrated by Amann *et al.* (14), the interaction between ABD2 and F-actin is mostly driven through electrostatic forces. On the other hand, we demonstrated that the interaction of ABD2 with lipids is driven either through electrostatic or hydrophobic forces in function of lipid packing. No experimental data about three dimensional structure of the central domain of dystrophin are yet available. However the surfaces of the 3D structural models of DYS R 11-15 obtained by homology modelling show that both faces of the elongated protein exhibit negative and positive clusters (17, 34). Clustered basic residues are tightly distributed on the rod shaped protein, in repeats 11, the R11-R12 junction, repeats 13 and 15. Preliminary data would suggest that these areas represent most of the F-actin binding surface of DYS R11-15 (Delalande O. unpublished data). We also showed that repeats 12 to 14, but not R11 and 15, are involved in binding to lipid vesicles (17). Appropriate localisation of these electrostatic clusters therefore would allow simultaneous binding to electronegative actin and to anionic as well as zwitterionic lipids. Work is in progress for a more precise knowledge of these binding domains.

Interestingly, we observed that when the mixture of actin and DYS R 11-15 is injected in the Langmuir trough, no subsequent increase of μ is obtained. The increase is observed only when ABD2 is injected first and then actin. This would mean that i) some structural changes occur when ABD2 is bound to actin and these changes modify the affinity for lipids; this could be linked to a physiological situation. ii) diffusion coefficients of ABD2 when bound to actin is likely very low; therefore our system does not allow analysis of

such a delayed phenomenon. Additional experiments have to be done to fully answer the question!

Implications for pathophysiology and importance of our results for therapeutics

Our data bring new evidence that the rod domain of dystrophin is not a passive linker. In addition to the reported lipid binding properties of repeats 1 to 19, the repeats 11 to 15 in the middle part of the rod domain of dystrophin could play a strategic physiological role. It is obvious that several mechanisms of regulation do exist in a muscular cell, concerning dynamics and behaviour of the three molecular partners evidenced in our study. Amongst them, one can consider i) the actin polymerisation levels or the affinity of actin with ABD1 and ABD2 depending on the ionic or electrostatic environment; ii) the putative recruitment pathways of lipids in the area of the membrane which interacts with DYS R11-15; iii) any involvement of membrane bending or stretching, or partnership of other yet unknown binding proteins or signalling complexes. All these events may be subject to local or temporal regulation during cell life or cell stress. So many levels of regulation were not taken in account in the present study. Nevertheless, our finding of a new dystrophin dependent scaffolding way in muscle cells provides significant knowledge. It provides strong help for understanding of how the mechanical behaviour of the F-actin cytoskeleton can be modulated during cell muscle elongation or contraction. This new concept should be taken in account for interpreting experimental as well as clinical data.

Lack of whole or part of ABD2 in patients is characterised by DMD or BMD. Recently, Henderson *et al.* (51) analysed *in vitro* some short dystrophins resulting from the deletion of some exons. Their results suggest that the functionality of dystrophin therapeutics based on mini- or micro-constructs may be worsened by the presence of some parts of the non-native central domain that result in protein misfolding, instability and aggregation. Even promising, genetic clinical protocols are very demanding and difficult to support by patients. Developing optimised and efficient therapies more and more requires an exhaustive knowledge of the “protein phenotype” of dystrophin. The behaviour of the wild type

protein as well as that of proteins which would result from the expression of a modified/truncated gene for rescuing normal phenotype in DMD patients has to be fully investigated. Significant insights in this field are brought by our present data about reinforcement through dystrophin of the basal lamina–sarcolemma attachment that allows cell survival in tissues subjected to mechanical stress.

FOOTNOTES

¹J.S. is recipient of a doctoral fellowship from the French Minister of Research.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Christophe Tascon, Angélique Chéron & Estelle Robert for technical assistance; Aurélie Nicolas for BMD database; the “centre de biochimie des protéines” from UMR-CNRS 6026 and the “centre de microscopie électronique” from IFR 140 at the University of Rennes1. This work was supported by the “Association Française contre les Myopathies”.

REFERENCES

- Kahana E, Marsh PJ, Henry AJ, Way M, & Gratzer WB (1994) Conformation and phasing of dystrophin structural repeats. *J Mol Biol* 235(4):1271-1277.
- Bhasin N, *et al.* (2005) Molecular Extensibility of Mini-dystrophins and a Dystrophin Rod Construct. *J Mol Biol* 352(4):795-806.
- Khurana TS, *et al.* (1991) Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle. *Neuromuscular Disorders* 1(3):185-194.
- Mokri B & Engel AG (1975) Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. *Neurology* 25(12):1111-1120.
- Rybakova IN, Patel JR, & Ervasti JM (2000) The Dystrophin Complex Forms a Mechanically Strong Link Between the Sarcolemma and Costameric Actin. *J Cell Biol* 150:1209-1214.
- Puttini S, *et al.* (2008) Gene-mediated Restoration of Normal Myofiber Elasticity in Dystrophic Muscles. *Mol Ther* 17(1):19-25.
- Cirak S, *et al.* (2011) Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *The Lancet* 378(9791):595-605.
- Fairclough R, Bareja A, & Davies K (2011) Progress in Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Experimental Physiology*.
- Hoffman EP, *et al.* (2011) Restoring Dystrophin Expression in Duchenne Muscular Dystrophy Muscle: Progress in Exon Skipping and Stop Codon Read Through. *The American journal of pathology* 179(1):12-22.
- Han R, *et al.* (2009) Basal lamina strengthens cell membrane integrity via the laminin G domain-binding motif of α -dystroglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(31):12573-12579.
- Le Rumeur E, Winder SJ, & Hubert JF (2010) Dystrophin: More than just the sum of its parts. *Biochim Biophys Acta*. 1804(9):1713-1722.
- Lai Y, *et al.* (2009) Dystrophins carrying spectrin-like repeats 16 and 17 anchor nNOS to the sarcolemma and enhance exercise performance in a mouse model of muscular dystrophy. *J Clin Invest* 119(3):624-635.
- Rybakova I, Amann K, & Ervasti J (1996) A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *J Cell Biol* 135:661-672.
- Amann KJ, Renley BA, & Ervasti JM (1998) A Cluster of Basic Repeats in the Dystrophin Rod Domain Binds F-actin through an Electrostatic Interaction. *J Biol Chem* 273:28419-28423.
- Legardinier S, *et al.* (2008) Sub-domains of the dystrophin rod domain display contrasting lipid-binding and stability properties. *Biochim Biophys Acta*. 1784:672-682.
- Legardinier S, *et al.* (2009) Mapping of the lipid-binding and stability properties of the central rod domain of human dystrophin. *J Mol Biol*. 389:546-558.
- Sarkis J, *et al.* (2011) Spectrin-like Repeats 11-15 of Human Dystrophin Show Adaptations to a Lipidic Environment. *J Biol Chem* 286(35):30481-30491.
- Vie V, *et al.* (2010) Specific anchoring modes of two distinct dystrophin rod sub-domains interacting in phospholipid Langmuir films studied by atomic force microscopy and PM-IRRAS. *Biochim Biophys Acta*. 1798(8):1503-1511.
- Sonnemann KJ, *et al.* (2006) Cytoplasmic gamma-actin is not required for skeletal muscle development but its absence leads to a progressive myopathy. *Dev Cell* 11(3):387-397.
- Hanft LM, Rybakova IN, Patel JR, Rafael-Fortney JA, & Ervasti JM (2006) Cytoplasmic gamma-actin contributes to a compensatory remodeling response in dystrophin-deficient muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(14):5385-5390.
- Levine BA, Moir AJG, Patchell VB, & Perry SV (1992) Binding sites involved in the interaction of actin with the N-terminal region of dystrophin. *FEBS Letters* 298:44-48.
- Norwood F, Sutherland-Smith A, Keep N, & Kendrick-Jones J (2000) The structure of the N-terminal actin-binding domain of human dystrophin and how mutations in this domain may cause Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Structure* 200 8:481-491.
- Lin AY, Prochniewicz E, James ZM, Svensson B, & Thomas DD (2011) Large-scale opening of utrophin's tandem calponin homology (CH) domains upon actin

- binding by an induced-fit mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
24. Keep NH (2000) Structural comparison of actin binding in utrophin and dystrophin. *Neurological Sciences* 21(0):S929-S937.
 25. Rybakova I & Ervasti J (1997) Dystrophin-Glycoprotein Complex Is Monomeric and Stabilizes Actin Filaments *inVitro* through a Lateral Association. *J Biol Chem* 272:28771-28778.
 26. Rybakova I, Humston J, Sonneman K, & Ervasti J (2006) Dystrophin and utrophin bind actin through distinct modes of contact. *J Biol Chem* 281:9996-10001.
 27. López-Hernández LB, et al. (2011) Genotype-phenotype discordance in a Duchenne muscular dystrophy patient due to a novel mutation: insights into the shock absorber function of dystrophin. *RevNeurol* 52(12):0720-0724.
 28. Flanigan KM, et al. (2009) Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort. *Hum Mutat* 30(12):1657-1666.
 29. Morandi L, et al. (1995) Dystrophin characterization in BMD patients: correlation of abnormal protein with clinical phenotype. *J Neurol Sci* 132(2):146-155.
 30. Beggs A, et al. (1991) Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies. *Am J Hum Genet* 49:54-67.
 31. Taylor PJ, et al. (2007) Measurement of the clinical utility of a combined mutation detection protocol in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *J Med Genet* 44(6):368-372.
 32. DeWolf C, et al. (1997) Interaction of dystrophin fragments with model membranes. *Biophys J* 72:2599-2604.
 33. Le Rumeur E, et al. (2003) Interaction of dystrophin rod domain with membrane phospholipids: evidence of a close proximity between tryptophan residues and lipids. *J Biol Chem* 278:5993-6001.
 34. Legrand B, Giudice E, Nicolas A, Delalande O, & Le Rumeur E (2011) Computational Study of the Human Dystrophin Repeats: Interaction Properties and Molecular Dynamics. *PLoS ONE* 6(8):e23819.
 35. Espinosa G, López-Montero I, Monroy F, & Langevin D (2011) Shear rheology of lipid monolayers and insights on membrane fluidity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(15):6008-6013.
 36. Winder S, et al. (1995) Utrophin actin binding domain: analysis of actin binding and cellular targeting. *J Cell Sci* 108:63-71.
 37. Brooks CF, Fuller GG, Frank CW, & Robertson CR (1999) An Interfacial Stress Rheometer To Study Rheological Transitions in Monolayers at the Air-Water Interface. *Langmuir* 15(7):2450-2459.
 38. Fischer P, et al. (1999) Phase Behavior and Flow Properties of "Hairy-Rod" Monolayers. *Langmuir* 16(2):726-734.
 39. Brent S M (Rheological properties of protein films. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 16(1):27-35.
 40. Ariola FS, Krishnan A, & Vogler EA (2006) Interfacial rheology of blood proteins adsorbed to the aqueous-buffer/air interface. *Biomaterials* 27(18):3404-3412.
 41. den Otter WK & Shkulipa SA (2007) Intermonolayer Friction and Surface Shear Viscosity of Lipid Bilayer Membranes. *Biophysical Journal* 93(2):423-433.
 42. Vénien-Bryan C, et al. (1998) Characterization of the Growth of 2D Protein Crystals on a Lipid Monolayer by Ellipsometry and Rigidity Measurements Coupled to Electron Microscopy. *Biophysical journal* 74(5):2649-2657.
 43. Erni P (2003) Stress- and strain-controlled measurements of interfacial shear viscosity and viscoelasticity at liquid/liquid and gas/liquid interfaces. *Rev. Sci. Instrum.* 74(11):4916.
 44. Lee H, Ferrer JM, Nakamura F, Lang MJ, & Kamm RD (2010) Passive and active microrheology for cross-linked F-actin networks in vitro. *Acta Biomaterialia* 6(4):1207-1218.
 45. Fiehn W, Peter JB, Mead JF, & Gan-Elepano M (1971) Lipids and fatty acids of sarcolemma, sarcoplasmic reticulum, and mitochondria from rat skeletal muscle. *J Biol Chem* . 246(18):5617-5620.
 46. Marsh D, Shanmugavadivu B, & Kleinschmidt JrH (2006) Membrane Elastic Fluctuations and the Insertion and Tilt of β -Barrel Proteins. *Biophys J*. 91(1):227-232.
 47. Roberts SA, Kellaway IW, Taylor KMG, Warburton B, & Peters K (2005) Combined surface pressure-interfacial shear rheology studies of the interaction of proteins with spread phospholipid monolayers at the air-water interface. *International Journal of Pharmaceutics* 300(1-2):48-55.
 48. Rubenstein PA (1990) The functional importance of multiple actin isoforms. *Bioessays* 12(7):309-315.
 49. Perrin BJ & Ervasti JM (2010) The actin gene family: Function follows isoform. *Cytoskeleton* 67(10):630-634.
 50. Renley BA, Rybakova IN, Amann KJ, & Ervasti JM (1998) Dystrophin binding to nonmuscle actin. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 41(3):264-270.
 51. Henderson DM, Belanto JJ, Li B, Heun-Johnson H, & Ervasti JM (2011) Internal deletion compromises the stability of dystrophin. *Hum. Mol. Genet*.

Une discussion de ces résultats, suivie d'une discussion générale de nos travaux sur la dystrophine et de notre conclusion seront présentées dans le chapitre 5 de cette partie.

Chapitre 5 – DISCUSSIONS ET CONCLUSION

La myopathie de Duchenne (DMD) est une maladie très invalidante pour laquelle il n'existe pas de traitement curatif. Les travaux de recherche en cours visent à clarifier les fonctions précises de la dystrophine, protéine dont l'absence est responsable de la myopathie de Duchenne, comprendre la physiopathologie de cette maladie et mettre au point de nouvelles thérapies.

Parmi les voies envisagées, la thérapie génique est la plus prometteuse. Elle requiert cependant encore beaucoup d'études et de mises au point. Dans ce contexte, ce sont les données fondamentales sur la protéine et ses propriétés qui sont aujourd'hui la cible de nos travaux. Notre objectif principal est la caractérisation et la compréhension des propriétés physico-chimiques des répétitions du domaine central de la dystrophine. Nous souhaitons que les connaissances issues de nos travaux contribuent au développement du ciblage des répétitions/domaines des micro/minidystrophines thérapeutiques les plus courtes et les plus efficaces. Un meilleur design de ces mini/microdystrophines permettra en effet l'optimisation des stratégies visant à restaurer l'expression d'une dystrophine fonctionnelle chez les patients DMD.

Jusqu'à la fin des années 1990, le domaine central de la dystrophine a été considéré comme un "*linker*" passif dans la molécule. Certaines études ont ensuite contredit cette hypothèse et ont montré notamment la capacité des répétitions 11 à 15 de se lier *in vitro* aux filaments d'actine (25), et de la répétition 2 d'interagir avec les lipides membranaires (134).

Par la suite, notre laboratoire s'est intéressé à cartographier l'interaction des différentes répétitions du domaine central de la dystrophine avec la membrane, en utilisant les SUVs comme modèle membranaire. Il a été montré la capacité des répétitions 1 à 19 d'interagir avec les SUVs anioniques, ce qui n'est pas le cas des répétitions 20 à 24. D'autre part, parmi les différentes parties du domaine central, seules les répétitions

11 à 15 ont été identifiées comme interagissant avec les SUVs anioniques et zwitterioniques (138, 139)

Pendant ces trois années de thèse, nous nous sommes consacrés à la caractérisation de ces interactions avec la membrane, en utilisant différentes approches, de la biochimie à la biophysique et la bioinformatique.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à deux régions situées aux extrémités du domaine central : la première contenant les répétitions 1 à 3 (DYS R1-3) et la seconde formée par les répétitions 20 à 24 (DYS R20-24). Le choix de ces deux régions est basé sur le fait qu'elles constituent des entités délimitées par des charnières ou "hinges" du domaine central. Ensuite, il apparaît que DYS R1-3 est proche de la partie N-terminale qui est capable de lier les filaments d'actine (ABD1), alors que DYS R20-24 est proche de la partie riche en cystéine et la partie C-terminale, une région qui se lie au complexe dystroglycane (DGC). Ces deux régions pourraient donc jouer un rôle important dans la constitution du point de liaison entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire.

Nous montrons que les propriétés interfaciales sont différentes, et que DYS R1-3 présente une activité interfaciale plus importante que DYS R20-24. Leurs structures hélicoïdales sont maintenues à l'interface air/eau.

Lorsqu'en contact avec les monocouches lipidiques, DYS R1-3 interagit en s'insérant fortement dans le film anionique stabilisant potentiellement ainsi la membrane, alors que DYS R20-24 interagit faiblement sur les monocouches ; ce sont dans ce cas uniquement quelques résidus de la protéine qui se lient par des forces électrostatiques à la membrane et le reste de la molécule flotte dans la sous phase. Cette étude met en évidence les différents modes d'ancrage lipidique de ces deux régions de la dystrophine.

Il a été rapporté que la présence du sous domaine DYS R1-3 dans les formes de dystrophine tronquées est nécessaire pour la restauration du phénotype normal chez des souris *mdx*(176, 238). Ainsi, il semble que la présence de DYS R1-3 est essentielle pour un fonctionnement normal de la dystrophine. Il a été montré par ailleurs que la spectrine est impliquée dans la modulation de la stabilité mécanique de la membrane des érythrocytes du fait de ses propriétés de liaison aux phospholipides (239). Dans le même

type de contexte cellulaire, l'observation des ruptures du sarcolemme dans les muscles déficients en dystrophine fournit des éléments en faveur de la participation de la dystrophine dans la résistance de la membrane musculaire au cours de la contraction (240). Compte-tenu de son homologie avec la spectrine et de nos résultats expérimentaux, nous proposons que l'interaction de la dystrophine avec les phospholipides *via* DYS R1-3 soit impliquée dans le maintien de la stabilité du sarcolemme.

D'autre part, DYS R20-24 n'interagit que faiblement avec les monocouches *via* seulement quelques résidus et n'interagit pas avec des SUVs. La signification physiologique précise de ces observations est à confirmer mais il peut être proposé que cette faible interaction, qui semble courbure dépendante, puisse contribuer à l'interaction du domaine WW voisin avec la protéine transmembranaire β -dystroglycane, en maintenant la dystrophine à proximité immédiate de la membrane. De plus, il a été montré que la répétition 24 et une partie du domaine WW sont capables de se lier aux microtubules (150). Ainsi, si seulement quelques résidus de DYS R 20-24 sont impliqués dans l'interaction avec des phospholipides anioniques, il est possible que les autres résidus interagissent avec d'autres partenaires du cytosquelette comme les microtubules. Il n'existe pas à ce jour de données dans la littérature sur ce sujet.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux répétitions 11 à 15 du domaine central de la dystrophine. Pourquoi ce choix ? Cette région est la seule du domaine central capable de lier les filaments d'actine (25) et la seule aussi à interagir avec des SUVs anioniques et zwitterioniques (139). Il nous a paru important de déterminer plus précisément les particularités de cette région et de mieux caractériser son comportement vis-à-vis de la membrane et de l'actine.

Jusqu'à aujourd'hui, aucune structure tridimensionnelle du domaine central de la dystrophine n'a été déterminée expérimentalement. D'une part, aucune répétition ou groupe de répétitions ne cristallise correctement pour permettre des études par cristallographie. D'autre part, les signaux de RMN des protéines en coiled-coil se chevauchent considérablement, rendant ainsi l'analyse résolutive des spectres improductive. Des données structurales sont cependant nécessaires pour une

compréhension plus complète des interactions protéine-lipide. Nous avons donc utilisé une approche de modélisation par homologie de séquence. Nous avons obtenu pour la première fois une structure tridimensionnelle du fragment DYS R 11-15 (**Fig II.5.1-A**). Chaque répétition est formée de trois hélices (HA, HB et HC) structurées en triple *coiled coil*. Les deux répétitions voisines sont liées par une hélice commune, (HC de la première répétition et la HA de la suivante). DYS R11-15 présente une forme filamentaire, légèrement courbée, de longueur ~ 25 nm. Cela est en accord avec nos observations de microscopie électronique, où DYS R11-15 apparaît en forme bâtonnet linéaire ou courbé, de 25-30 nm de longueur. (*Figure 1* dans l'article *Sarkis et al.* 2011 (193)) De récentes études par SAXS réalisées dans l'équipe confirment la nature filamenteuse et monomérique de la protéine DYS R11-15 en solution (**Fig II.5.1-B**).

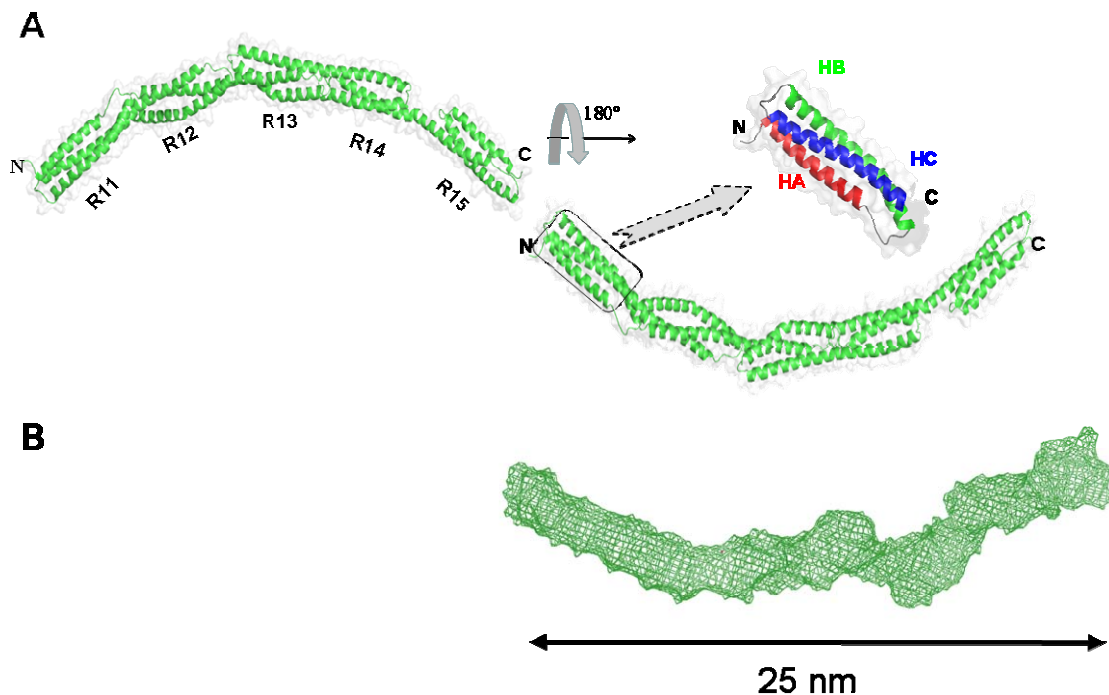


Fig II.5.1. Structure tridimensionnelle de DYS R11-15. (A) Représentation de DYS R11-15 obtenue par modélisation d'homologie de séquence. N et C représentent la partie N et C-terminale de la protéine. Le zoom montre les 3 hélices HA, HB et HC de chaque répétition structurée en coiled coil. (B) Représentation de l'enveloppe de surface de DYS R11-15 obtenue par SAXS. E. Le Rumeur and M. Cjekz (résultat non publié).

Lorsqu'elle est injectée dans la sous phase, DYS R11-15 est capable de s'adsorber rapidement à l'interface air/eau. Nous avons montré par PMIRRAS que sa structure en

hélice est maintenue même après plusieurs heures d'adsorption. Cela montre le fort caractère amphipathique et la stabilité de DYS R11-15 à l'interface air/eau

DYS R11-15 est le seul fragment de la dystrophine capable d'interagir avec les SUVs anioniques et zwitterioniques. Nous avons montré, en utilisant des liposomes de différentes tailles, que l'interaction est dépendante de la nature lipidique et plus fortement de la courbure membranaire. Dans tous les cas, DYS R11-15 interagit avec les lipides, mais de manière non homogène. En présence des SUVs anioniques, l'intensité de la fluorescence des tryptophanes de DYS R11-15 augmente significativement, indiquant que les résidus tryptophane de la protéine sont dans un environnement hydrophobe, probablement insérés dans la partie hydrophobe de la bicouche membranaire. Inversement, une diminution de l'intensité de fluorescence de tryptophane est observée avec les SUVs anioniques et zwitterioniques ainsi que les SUVs zwitterioniques, indiquant que la présence de lipides conduit à une modification de la conformation de DYS R11-15, de façon que les résidus de tryptophane soient exposés globalement à un milieu plus hydrophile. Cette dépendance d'interaction à la courbure membranaire observée *in vitro* peut être rapprochée du fait que lors des mouvements musculaires se forment des "blebs" ou des zones de plus ou moins forte courbure sur le sarcolemme. Les interactions membranaires de DYS R11-15 au sein du domaine central de la dystrophine pourraient ainsi être adaptées à l'état cellulaire ce qui permettrait de moduler l'intensité de leur rôle de soutien physique du sarcolemme.

En utilisant la spectrométrie de masse après trypsinolyse, nous avons cartographié les zones d'interaction de DYS R11-15 avec les SUVs. Ces interactions ont été montrées comme qualitativement différentes selon que les SUVs ont un caractère anionique ou zwitterionique. Nous mettons en évidence que l'hélice HB et HC de la répétition 12 et l'hélice HA de la répétition 13 résistent à la digestion protéique en présence des SUVs anioniques. Ceci est probablement la conséquence d'une proximité forte de cette région avec la membrane qui inhibe l'accessibilité à la trypsine. De plus, cette région contient 3 résidus tryptophane (sur un total de 7 dans DYS R11-15). L'insertion de ces résidus dans la bicouche de la SUV expliquerait l'augmentation de l'intensité de fluorescence du tryptophane observée spécifiquement sur les vésicules anioniques. Une deuxième région, constituée par HB, HC de la répétition R13 et HA, HB de la répétition R14 voit sa structure modifiée de la même manière en présence de liposomes anioniques et zwitterioniques. Une interface de liaison générale aux SUVs est donc identifiée.

En cuve de Langmuir, avec le modèle de monocouches, nous avons montré qu'à de faibles pressions de surface imposées, DYS R11-15 interagit préférentiellement avec le mélange lipidique zwitterionique plutôt qu'avec le mélange anionique, ceci par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes. A des pressions de surface élevées, DYS R11-15 interagit préférentiellement avec les lipides anioniques par des interactions électrostatiques. Ainsi, il apparaît que le *lipid packing* influe énormément sur la nature de l'interaction entre DYS R11-15 et la membrane. En plus de son influence sur l'interaction, la variation de la pression de surface module l'organisation de la protéine au sein de la membrane. A 20 mN/m, un réseau protéique est observé, celui-ci a cependant des caractéristiques différentes avec les monocouches anioniques ou zwitterioniques. Cela souligne la prédominance de l'influence du *lipid packing* sur la nature lipidique, en ce qui concerne l'organisation de DYS R11-15. DYS R11-15 est monomérique en solution, et la formation du réseau protéique au contact de la monocouche indique que la présence de lipides induit une interaction protéine-protéine. Malgré la formation du réseau, DYS R11-15 ne présente pas la même configuration en présence des lipides anioniques et zwitterioniques. DYS R 11-15 étant un fragment non natif de la dystrophine, il est vraisemblable que l'observation de réseau que nous avons réalisée ne reflète pas directement une réalité physiologique. Cependant, cette approche *in vitro* nous permet d'apporter des éléments de compréhension des propriétés d'interactions particulières de DYS R11-15 avec les membranes, et de leur potentiel rôle dans les cellules musculaires. Au niveau physiologique, le *packing* lipidique du sarcolemme ainsi que les courbures membranaires des « blebs » varient en fonction de la contraction (pression de surface élevée) ou relaxation (faible pression de surface) musculaire.

Dans cette étude, nous avons testé l'effet de ces variations physiques de la membrane sur l'interaction DYS R11-15/membrane. La variation de courbure membranaire a été mimée en utilisant des vésicules de différentes tailles et le *packing* lipidique a été mimé en utilisant la cuve de Langmuir et les monocouches de différentes pressions de surface. La synthèse de nos résultats permet de conclure à la capacité de DYS R11-15 à s'adapter aux modifications membranaires telles que variation de la courbure et *packing* lipidique. Cette partie du domaine central de la dystrophine joue

potentiellement *in vivo* un rôle de support important en maintenant la cohésion membranaire.

La deuxième question d'importance traitée lors de cette thèse est née du constat suivant : Seules les cinq répétitions R11 à R15 du domaine central de la dystrophine lient les filaments d'actine (ABD2) et les lipides. Cette région est de plus délimitée par deux "pseudo-hinges" et constitue une entité individuelle dans la dystrophine. DYS R11-15 est-elle capable de lier simultanément la membrane d'une part et les filaments d'actine d'autre part ? Et si tel le cas, comment ces interactions varient-elles lorsqu'une modification des propriétés physiques de la membrane sarcolemmale a lieu, causée par les cycles de contractions-relaxations musculaire ?

Plusieurs aspects de cette problématique sont discutés dans l'article du chapitre 4 de cette partie. Nous reprenons ci-dessous un certain nombre de points.

En utilisant une technologie de rhéométrie "*home made*" à l'Institut de physique de Rennes, nous mesurons la variation des propriétés rhéologiques de surface, notamment la constante de cisaillement élastique, d'une monocouche lipidique mimant le sarcolemme, seule ou en présence de DYS R11-15 et/ou de l'actine F.

La présence de DYS R11-15 et des filaments d'actine sous la monocouche lipidique augmente significativement la constante de cisaillement élastique (μ). Les propriétés rhéologiques de la monocouche ne varient pas si des filaments d'actine sont présents dans la sous-phase mais si DYS R11-15 ne s'y trouve pas. De même, un contrôle de la spécificité du phénomène observé avec DYS R 11-15 a été réalisé. La présence de DYS R1-3, qui n'est pas une protéine de liaison à l'actine, n'engendre pas de modifications significatives de μ lorsqu'elle est en sous-phase avec des filaments d'actine.

Nous avons donc conclu que DYS R11-15 constitue *in vitro* un pont de connexion entre une bicouche lipidique mimant le sarcolemme et des filaments d'actine mimant le cytosquelette.

La recherche de la signification biologique précise de cette découverte est un axe fondamental pour la poursuite de nos travaux.

Pour tester la résistance de cette interaction face à une contrainte mimant un stress sarcolemmal généré par la contraction-relaxation musculaire, nous avons modulé la pression de surface de la membrane lipidique. Nous montrons que l'interaction entre les trois partenaires (DYS R11-15/membrane/actine F) se met en place même à des pressions de surface initiales relativement élevées, dépendamment de la nature lipidique. En présence d'une membrane anionique, l'interaction reste présente jusqu'à une pression de 27 mN/m. A 30 mN/m, l'interaction entre les trois partenaires est perdue. Par contre, cette interaction résiste à 30 mN/m en présence d'une membrane zwitterionique et ne disparaît qu'à une pression de 32 mN/m. Comme mentionné auparavant, DYS R11-15 interagit différemment en fonction de la nature et du *packing* lipidique. μ est nulle à 30 mN/m en milieu anionique, indiquant l'absence d'une interaction entre les trois partenaires. Il est fort probable alors, qu'à des pressions de surfaces élevées, l'interaction forte de DYS R11-15 avec la monocouche anionique donne à la protéine une conformation qui n'est pas favorable pour son interaction avec les filaments d'actine. Par contre, et à la même pression de surface (30 mN/m), l'interaction faible de DYS R11-15 avec la membrane zwitterionique entraîne une conformation favorable pour son interaction avec les filaments d'actine, et ainsi une valeur de μ non nulle.

En conclusion de cette partie, au-delà du fait que nos résultats confirment que le domaine central de la dystrophine n'est pas un *linker* passif, nous avons déterminé *in vitro* plusieurs caractéristiques du sous-domaine constitué des répétitions 11 à 15 du domaine central de la dystrophine. Nos résultats montrent que cette partie de la dystrophine représenterait un point stratégique dans la fonction physiologique de cette protéine.

Dans une récente étude de mutations chez des patients, *López-Hernández et al.* ont montré que la présence des répétitions 11 à 15 est nécessaire pour un fonctionnement normal de la dystrophine et montrent ainsi que la perturbation du site de liaison de l'actine situé au centre du domaine central est impliquée dans un mauvais fonctionnement de la dystrophine et donc dans l'apparition de la maladie (146). Les résultats de nos

travaux permettent de suggérer que la perturbation d'un équilibre de la liaison membrane/DYS R11-15/ actine soit responsable du dysfonctionnement de la dystrophine. Ces interactions entre la DYS R11-15 et la membrane d'une part et les filaments d'actine d'autre part présentent vraisemblablement *in vivo* un caractère dynamique permettant des adaptations aux stress ; elles peuvent également conférer à la dystrophine une certaine malléabilité et moduler sa fonction d'amortisseur de choc en fonction de la situation cellulaire, contraction ou relaxation.

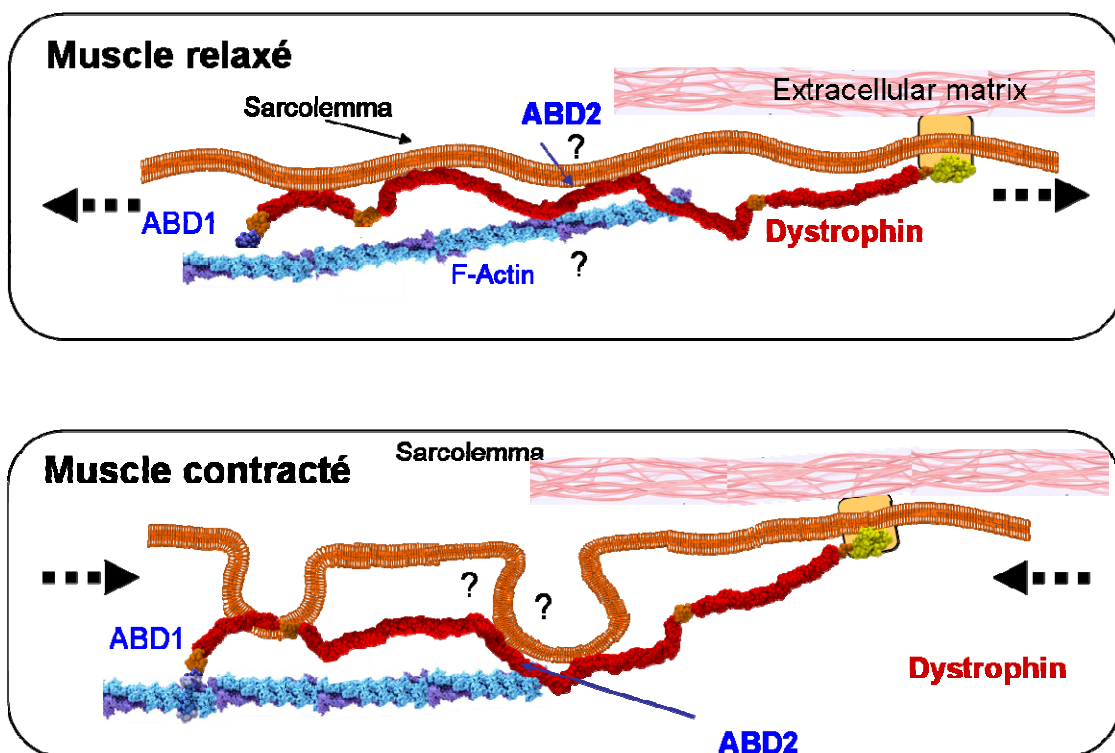


Fig II.5.2. Représentation schématique du rôle de la dystrophine dans les modifications membranaires au cours de la contraction-relaxation musculaire.

Nos résultats confirment qu'une partie du domaine central interagit avec les lipides les plus abondants sur la face interne du sarcolemme et que ces liaisons sont pour l'essentiel dépendantes de la courbure et du packing lipidique. Nous montrons de plus que la partie R11 à R15 ou Actin Binding Domain 2 est capable de lier simultanément la membrane et les filaments d'actine. Ces interactions spécifiques contribueraient à la résistance du sarcolemme aux stress mécaniques liés aux cycles de contraction-relaxation des fibres musculaires.

PERSPECTIVES

En perspectives de poursuite de ce travail, plusieurs axes de développement sont envisageables. Un axe biochimie-biophysique viserait à la caractérisation plus précise des interactions des répétitions du domaine central, et à terme de mini ou micro dystrophines avec les lipides. Un deuxième axe orienterait les investigations dans le domaine de la biologie cellulaire ; il est en effet fondamental de pouvoir replacer nos observations *in vitro* dans un contexte cellulaire, voire de tissu ou d'organisme.

La réalisation de cartographies détaillées des protéines constituées de fragments du domaine central en interaction avec les lipides est importante. Ces protéines sont de nature amphipatique et la détermination des domaines d'interface et des transconformations subies par les répétitions lors de leur association aux lipides constituerait une avancée significative. Les outils pour la réalisation de ce travail sont notamment la spectrométrie de masse et la modélisation moléculaire. Des études de modélisation et de dynamique moléculaire sont en phase de développement au laboratoire, dans le but de mieux caractériser l'interaction DYS R11-15 avec les filaments d'actine. L'objectif à terme est de modéliser l'ensemble du domaine central en présence d'une bicouche lipidique.

De manière plus ciblée au sujet des répétitions 11 à 15, il est important de suivre, notamment par AFM, la dynamique de son interaction et de son organisation avec les monocouches lipidiques sous l'effet de la compression ou en décompression du film DYS R11-15/monocouche lipidique. Le réseau de DYS R11-15 avec la monocouche lipidique de 20 mN/m résistera-t-il lorsqu'on comprime l'ensemble pour une pression de surface de 30 mN/m ?

Pour les études concernant les mini et micro dystrophines dont l'expression est recherchée chez les patients DMD, différents modèles membranaires peuvent être utilisés tels que les liposomes et les monocouches. Des mesures de micro-rhéologie du *trio* membrane/mini ou microdystrophine/actine-F seront envisageables dans le but de comparer la résistance de la membrane en présence ou en absence de

mini/microdystrophine et/ou filament d'actine. Ces mesures peuvent être réalisées en utilisant le même rhéomètre de surface, décrit dans le chapitre 4 de cette partie, ou bien en encapsulant les mini/microdystrophine avec ou sans les filaments d'actine dans des liposomes géants (GUVs). Sur ces GUVs, des mesures par exemple de module d'Young par AFM peuvent être entreprises et permettre des réponses aux questions posées. .

Pour le deuxième axe, les travaux du laboratoire viseront à relier nos observations *in vitro* avec les réalités cellulaires. Dans quelles circonstances cellulaires s'effectue l'interaction du domaine central avec le sarcolemme et la mise en place du pont de connexion actine/ABD2/sarcolemme? Quels lipides sont réellement associés aux répétitions? Quels sont les mécanismes de régulation? Quel lien précis avec les courbures membranaires des blebs?

Pour répondre à ces questions, il devra être envisagé l'utilisation de modèles cellulaires capables d'exprimer diverses formes de dystrophines et se prêtant notamment à des analyses de microrhéologie en lien avec la microscopie.

RÉFÉRENCES

1. Koenig, M., A. P. Monaco, and L. M. Kunkel. 1988. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53:219-226.
2. Tyler, K. L. 2003. Origins and early descriptions of "Duchenne muscular dystrophy". *Muscle & Nerve* 28:402-422.
3. Meyron E. 1852. On Granular and Fatty Degeneration of the Voluntary Muscles. *Med Chir Trans* 35:73-84.71.
4. Duchenne De Boulogne, G. B. A. 1965. 1 Recherches sur la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique, ou paralysie myosclerosique. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 39:3-5.
5. Francke U, O. H., de Martinville B, Giacalone J, Lindgren V, Distèche C, Pagon RA, Hofker MH, van Ommen GJ, Pearson PL, Wedgwood RJ. 1985. Minor Xp21 chromosome deletion in a male associated with expression of Duchenne muscular dystrophy, chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa, and McLeod syndrome. *Am J Hum Genet.* 37 (2):250-267.
6. Verellen-Dumoulin C, Freund M, De Meyer R, Laterre C, Frédéric J, Thompson MW, Markovic VD, and W. RG. 1984. Expression of an X-linked muscular dystrophy in a female due to translocation involving Xp21 and non-random inactivation of the normal X chromosome. *Hum Genet.* 67 (1):115-119.
7. Harper PS, O'Brien T, Murray JM, Davies KE, Pearson P, and W. R. 1983. The use of linked DNA polymorphisms for genotype prediction in families with Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet.* 20 (4):252-254.
8. Kunkel, L., G. Burns, J. Aldrige, and S. Latt. 1985. Genetic analysis of Duchenne dystrophy. *Adv Exp Med Biol* 182:287-294.
9. Monaco, A. P., R. L. Neve, C. Colletti-Feener, C. J. Bertelson, D. M. Kurnit, and L. M. Kunkel. 1986. Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 323:646-650.
10. Hoffman, E. P., L. M. Kunkel, and R. H. Brown, Jr. 1988. Proteolytic fragment or new gene product? *Nature* 336:210.
11. Hoffman, E. P., R. H. Brown, and L. M. Kunkel. 1987. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51:919-928.
12. Coffey, A. J., R. G. Roberts, E. D. Green, C. G. Cole, R. Butler, R. Anand, F. Giannelli, and D. R. Bentley. 1992. Construction of a 2.6-Mb contig in yeast artificial chromosomes spanning the human dystrophin gene using an STS-based approach. *Genomics* 12:474-484.
13. Franzini-Armstrong C, and Engel A G. 1994. *Myology: Basic and Clinical.* McGraw-Hill Medical Publishing.
14. Nobile, C., J. Marchi, V. Nigro, R. G. Roberts, and G. A. Danieli. 1997. Exon-intron organization of the human dystrophin gene. *Genomics* 45:421-424.
15. Monaco, A., C. Bertelson, S. Liechti-Gallati, H. Moser, and L. Kunkel. 1988. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 2:90-95.
16. Koenig, M., A. Beggs, M. Moyer, S. Scherpf, K. Heindrich, T. Bettecken, G. Meng, C. Muller, M. Lindlof, and H. Kaariainen. 1989. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* 45:498-506.
17. Ervasti, J., and K. Campbell. 1993. A Role for the Dystrophin-Glycoprotein Complex as a Transmembrane Linker between Laminin and Actin. *J Cell Biol* 122:809-823.
18. Davison, M. D., and D. R. Critchley. 1988. alpha-Actinins and the DMD protein contain spectrin-like repeats. *Cell* 52:159-160.
19. Orlova, A., I. N. Rybakova, E. Prochniewicz, D. D. Thomas, J. M. Ervasti, and E. H. Egelman. 2001. Binding of Dystrophin s Tandem Calponin Homology Domain to F-Actin Is Modulated by Actin s Structure. *Biophysical journal* 80:1926-1931.
20. Renley, B. A., I. N. Rybakova, K. J. Amann, and J. M. Ervasti. 1998. Dystrophin binding to nonmuscle actin. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 41:264-270.
21. Matsumura, K., F. Tome, V. Ionasescu, J. Ervasti, R. Anderson, N. Romero, D. Simon, D. Recan, J. Kaplan, and M. Fardeau. 1993. Deficiency of Dystrophin-associated Protein in Duchenne Muscular Dystrophy Patients Lacking COOH-terminal Domains of Dystrophin. *The American Society for Clinical Investigation, Inc* 92:866-871.
22. Koenig, M., and L. M. Kunkel. 1990. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem* 265:4560-4566.

23. Cross, R. A., M. Stewart, and J. Kendrick-Jones. 1990. Structural predictions for the central domain of dystrophin. *FEBS Lett* 262:87-92.
24. Bork, P., and M. Sudol. 1994. The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends in Biochemical Sciences* 19:531-533.
25. Amann, K. J., B. A. Renley, and J. M. Ervasti. 1998. A Cluster of Basic Repeats in the Dystrophin Rod Domain Binds F-actin through an Electrostatic Interaction. *J Biol Chem* 273:28419-28423.
26. Ponting, C. P., D. J. Blake, K. E. Davies, J. Kendrick-Jones, and S. J. Winder. 1996. ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins. *Trends Biochem. Sci.* 21 (1):11-13.
27. Rentschler, S., H. Linn, K. Deininger, M. T. Bedford, X. Espanel, and M. Sudol. 1999. The WW Domain of Dystrophin Requires EF-Hands Region to Interact with β^2 -Dystroglycan. *Biological Chemistry* 380:431-442.
28. Love, D., D. Hill, G. Dickson, N. Spurr, B. Byth, R. Marsden, F. Walsh, Y. Edwards, and K. Davies. 1989. An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Letters to Nature* 339:55-58.
29. Love, D. R., S. B. England, A. Speer, R. F. Marsden, J. F. Bloomfield, A. L. Roche, G. S. Cross, R. C. Mountford, T. J. Smith, and K. E. Davies. 1991. Sequences of junction fragments in the deletion-prone region of the dystrophin gene. *Genomics* 10:57-67.
30. Lapidos, K. A., R. Kakkar, and E. M. McNally. 2004. The Dystrophin Glycoprotein Complex. *Circulation Research* 94:1023-1031.
31. Ahn, A. H., and L. M. Kunkel. 1993. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet* 3:283-291.
32. Zubrzycka-Gaarn, E. E., D. E. Bulman, G. Karpati, A. H. Burghes, B. Belfall, H. J. Klamut, J. Talbot, R. S. Hodges, P. N. Ray, and R. G. Worton. 1988. The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature* 333:466-469.
33. Watkins, S. C., E. P. Hoffman, H. S. Slayter, and L. M. Kunkel. 1988. Immunoelectron microscopic localization of dystrophin in myofibres. *Nature* 333:863-866.
34. Arahata, K., S. Ishiura, T. Ishiguro, T. Tsukahara, Y. Suhara, C. Eguchi, T. Ishiharat, I. Nonaka, E. Ozawa, and H. Sugita. 1988. Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. *Nature* 333:861-863.
35. Bonilla, E., C. E. Samitt, A. F. Miranda, A. P. Hays, G. Salvati, S. DiMauro, L. M. Kunkel, E. P. Hoffman, and L. P. Rowland. 1988. Duchenne muscular dystrophy: Deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell* 54:447-452.
36. Byers, T., E. Brandin, R. Lue, E. Winograd, and D. Branton. 1992. The complete sequence of *Drosophila* β -spectrin reveals supra-motifs comprising eight 106-residue segments. *Proc. Natl. Acad. Sci* 89:6187-6191.
37. Sadoulet-Puccio, H., and L. Kunkel. 1996. Dystrophin and Its Isoforms. *Brain Pathology* 6:25-35.
38. Barnea, E., D. Zuk, R. Simantov, U. Nudel, and D. Yaffe. 1990. Specificity of expression of the muscle and brain dystrophin gene promoters in muscle and brain cells. *Neuron* 5:881-888.
39. Nishio, H., Y. Takeshima, N. Narita, H. Yanagawa, Y. Suzuki, Y. Ishikawa, Y. Ishikawa, R. Minami, H. Nakamura, and M. Matsuo. 1994. Identification of a novel first exon in the human dystrophin gene and of a new promoter located more than 500 kb upstream of the nearest known promoter. *The Journal of Clinical Investigation* 94:1037-1042.
40. Wheway, J. M., and R. G. Roberts. 2003. The dystrophin lymphocyte promoter revisited: 4.5-megabase intron, or artefact? *Neuromuscular disorders* : NMD 13:17-20.
41. Nudel, U., D. Zuk, P. Einat, E. Zeelon, Z. Levy, S. Neuman, and D. Yaffe. 1989. Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. *Nature* 337:76-78.
42. Boyce, F. M., A. H. Beggs, C. Feener, and L. M. Kunkel. 1991. Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88:1276-1280.
43. Górecki, D. C., A. P. Monaco, J. M. J. Derry, A. P. Walker, E. A. Barnard, and P. J. Barnard. 1992. Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Human Molecular Genetics* 1:505-510.
44. Holder, E., M. Maeda, and R. Bies. 1996. Expression and regulation of the dystrophin Purkinje promoter in human skeletal muscle, heart, and brain. *Human Genetics* 97:232-239.
45. D'Souza, V. N., N. t. Man, G. E. Morris, W. Karges, D.-A. M. Pillers, and P. N. Ray. 1995. A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Human Molecular Genetics* 4:837-842.
46. Pillers, D.-A. M., D. E. Bulman, R. G. Weleber, D. A. Sigesmund, M. A. Musarella, B. R. Powell, W. H. Murphey, C. Westall, C. Panton, L. E. Becker, R. G. Worton, and P. N. Ray. 1993.

- Dystrophin expression in the human retina is required for normal function as defined by electroretinography. *Nat Genet* 4:82-86.
47. Lidov, H. G. W., S. Selig, and L. M. Kunkel. 1995. Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Human Molecular Genetics* 4:329-335.
 48. Durbeej, M., D. Jung, T. Hjalt, K. P. Campbell, and P. Ekblom. 1997. Transient Expression of Dp140, a Product of the Duchenne Muscular Dystrophy Locus, during Kidney Tubulogenesis. *Developmental Biology* 181:156-167.
 49. Byers, T. J., H. G. W. Lidov, and L. M. Kunkel. 1993. An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat Genet* 4:77-81.
 50. Rapaport, D., D. Lederfein, J. T. den Dunnen, P. M. Grootsholten, G.-J. B. Van Ommen, O. Fuchs, U. Nudel, and D. Yaffe. 1992. Characterization and cell type distribution of a novel, major transcript of the Duchenne Muscular Dystrophy gene. *Differentiation* 49:187-193.
 51. Muntoni, F., S. Torelli, and A. Ferlini. 2003. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *The Lancet Neurology* 2:731-740.
 52. Feener, C. A., M. Koenig, and L. M. Kunkel. 1989. Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature* 338:509-511.
 53. Emery AEH. 1993. Duchenne muscular dystrophy. Oxford University Press:25-45.
 54. Emery, A. E. H. 1993. Duchenne muscular dystrophy--Meryon's disease. *Neuromuscular Disorders* 3:263-266.
 55. Barbujani, G., A. Russo, G. A. Danieli, A. W. J. Spiegler, J. Borkowska, and I. H. Petruszewicz. 1990. Segregation analysis of 1885 DMD families: significant departure from the expected proportion of sporadic cases. *Human Genetics* 84:522-526.
 56. De Recondo J, and D. R. AM. 2001. Pathologie du muscle strié., Paris.
 57. Polakoff, R. J., A. A. Morton, K. D. Koch, and C. M. Rios. 1998. The psychosocial and cognitive impact of Duchenne's muscular dystrophy. *Seminars in Pediatric Neurology* 5:116-123.
 58. Becker, P. E., and F. Kiener. 1955. Eine neue x-chromosomale Muskeldystrophie. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 193:427-448.
 59. Recondo.J., D., and D. Recondo.AM.;. 2001. Pathologie du muscle strié. Editions Flammarion Médecine Sciences., Paris.
 60. Karpati, G. 2002. Structural and molecular basis of skeletal muscle diseases. ISN Neuropath Press, Basel.
 61. Arikawa, E., T. Ishihara, I. Nonaka, H. Sugita, and K. Arahata. 1991. Immunocytochemical analysis of dystrophin in congenital muscular dystrophy. *Journal of the Neurological Sciences* 105:79-87.
 62. Prella, A., R. Medori, M. Moggio, H. W. Chan, A. Gallanti, G. Scarlato, and E. Bonilla. 1992. Dystrophin deficiency in a case of congenital myopathy. *Journal of Neurology* 239:76-78.
 63. Eiholzer, U., E. Boltshauser, D. Frey, L. Molinari, and M. Zachmann. 1988. Short stature: a common feature in Duchenne muscular dystrophy. *European Journal of Pediatrics* 147:602-605.
 64. Van Essen A, Verheij B, Reefhuis J, Fidler V, Begeer J, De Visser M, and Ten Kate P. 2004. The natural history of Duchenne muscular dystrophy: Analysis of data from a Dutch survey and review of age related event. *Leiden Muscular Dystrophy*.
 65. Firth, M., D. Gardner-Medwin, G. Hosking, and E. Wilkinson. 1983. Interviews with parents of boys suffering from Duchenne Muscular Dystrophy. *Developmental Medicine & Child Neurology* 25:466-471.
 66. Allsop, K. G., and F. A. Ziter. 1981. Loss of Strength and Functional Decline in Duchenne's Dystrophy. *Arch Neurol* 38:406-411.
 67. Cohen, L., J. Morgan, R. Babbs, Z. Gilula, T. Karrison, and P. Meier. 1982. A statistical analysis of the loss of muscle strength in Duchenne's muscular dystrophy. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 37:123-138.
 68. Brooke, M. H., R. C. Griggs, J. R. Mendell, G. M. Fenichel, and J. B. Shumate. 1981. The natural history of Duchenne muscular dystrophy: a caveat for therapeutic trials. *Trans Am Neurol Assoc* 106:195-199.
 69. Inkley, S. R., F. C. Oldenburg, and P. J. Vignos. 1974. Pulmonary function in Duchenne muscular dystrophy related to stage of disease. *The American journal of medicine* 56:297-306.
 70. Fukunaga, H., Y. Sonoda, H. Atsuchi, and M. Osame. 1991. [Respiratory failure and its care in Duchenne muscular dystrophy]. *Rinsho Shinkeigaku* 31:154-158.
 71. Mukoyama, M., K. Kondo, K. Hizawa, and H. Nishitani. 1987. Life spans of Duchenne muscular dystrophy patients in the hospital care program in Japan. *Journal of the Neurological Sciences* 81:155-158.

72. Carpenter, S., and G. Karpati. 1979. Duchenne Muscular Dystrophy. *Brain* 102:147-161.
73. Lotz, B. P., and A. G. Engel. 1987. Are hypercontracted muscle fibers artifacts and do they cause rupture of the plasma membrane? *Neurology* 37:1466.
74. Skuk, D. 2004. Myoblast transplantation for inherited myopathies: a clinical approach. *Expert Opinion on Biological Therapy* 4:1871-1885.
75. Gilbert, R. K., and W. A. Hawk. 1963. The incidence of necrosis of muscle fibers in Duchenne type muscular dystrophy. *Am J Pathol* 43:107-122.
76. Pearce, G. W., and J. N. Walton. 1962. Progressive muscular dystrophy: The histopathological changes in skeletal muscle obtained by biopsy. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 83:535-550.
77. Brooke, M. H., G. M. Fenichel, R. C. Griggs, J. R. Mendell, R. Moxley, J. P. Miller, and M. A. Province. 1983. Clinical investigation in duchenne dystrophy: 2. Determination of the "power" of therapeutic trials based on the natural history. *Muscle & Nerve* 6:91-103.
78. Engel, A. G., and G. Biesecker. 1982. Complement activation in muscle fiber necrosis: Demonstration of the membrane attack complex of complement in necrotic fibers. *Annals of Neurology* 12:289-296.
79. Oberc, M. A., and W. K. Engel. 1977. Ultrastructural localization of calcium in normal and abnormal skeletal muscle. *Lab Invest* 36:566-577.
80. Arahata, K., and A. G. Engel. 1984. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. I: Quantitation of subsets according to diagnosis and sites of accumulation and demonstration and counts of muscle fibers invaded by T cells. *Annals of Neurology* 16:193-208.
81. Duchenne De Boulogne, G. B. A. 1868. Recherches sur la paralysiemusculaire pseudohypertrophique, un paralysie myosclerosique. *Arch Gen Med* 11:5-25, 179-209, 305-121, 421-143, 552-188.
82. Zubrzycka-Gaarn, E. E., D. E. Bulman, G. Karpati, A. H. M. Burghes, B. Belfall, H. J. Klamut, J. Talbot, R. S. Hodges, P. N. Ray, and R. G. Worton. 1988. The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature* 333:466-469.
83. Menke, A., and H. Jockusch. 1991. Decreased osmotic stability of dystrophin-less muscle cells from the mdx mouse. *Nature* 349:69-71.
84. Matsuda, R., A. Nishikawa, and H. Tanaka. 1995. Visualization of Dystrophic Muscle Fibers in Mdx Mouse by Vital Staining with Evans Blue: Evidence of Apoptosis in Dystrophin-Deficient Muscle. *Journal of Biochemistry* 118:959-963.
85. Cox, G. A., N. M. Cole, K. Matsumura, S. F. Phelps, S. D. Hauschka, K. P. Campbell, J. A. Faulkner, and J. S. Chamberlain. 1993. Overexpression of dystrophin in transgenic mdx mice eliminates dystrophic symptoms without toxicity. *Nature* 364:725-729.
86. Torres, L. F. B., and L. W. Duchen. 1987. The mutant *mdx*: Inherited myopathy in the mouse. *Brain* 110:269-299.
87. Ervasti, J. M. 2007. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1772:108-117.
88. Ibraghimov-Beskrovnaya, O., J. M. Ervasti, C. J. Leveille, C. A. Slaughter, S. W. Sernett, and K. P. Campbell. 1992. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355:696-702.
89. Ehmsen, J., E. Poon, and K. Davies. 2002. The dystrophin-associated protein complex. *J Cell Sci* 115:2801-2803.
90. Yoshida, M., A. Suzuki, H. Yamamoto, S. Noguchi, Y. Mizuno, and E. Ozawa. 1994. Dissociation of the complex of dystrophin and its associated proteins into several unique groups by n-octyl beta-D-glucoside. *Eur J Biochem* 222:1055-1061.
91. Winder, S. 2001. The complexities of dystroglycan. *Trends Biochem Sci* 26:118-124.
92. Gee, S. H., F. Montanaro, M. H. Lindenbaum, and S. Carbonetto. 1994. Dystroglycan - α , a Dystrophin-associated , Glycoprotein Is a Functional Agrin Recepto. *Cell* 77:675-686.
93. Michele, D., and K. Campbell. 2003. Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function. *J Biol Chem* 278:15457-15460.
94. Barresi, R., and K. P. Campbell. 2006. Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *Journal of Cell Science* 119:199-207.
95. Patton, B. L. 2000. Laminins of the neuromuscular system. *Microscopy Research and Technique* 51:247-261.
96. Sotgia, F., J. K. Lee, K. Das, M. Bedford, T. C. Petrucci, P. Macioce, M. Sargiacomo, F. D. Bricarelli, C. Minetti, M. Sudol, and M. P. Lisanti. 2000. Caveolin-3 Directly Interacts with the C-terminal Tail of Î²-Dystroglycan. *Journal of Biological Chemistry* 275:38048-38058.

97. Venema, V. J., H. Ju, R. Zou, and R. C. Venema. 1997. Interaction of Neuronal Nitric-oxide Synthase with Caveolin-3 in Skeletal Muscle. *Journal of Biological Chemistry* 272:28187-28190.
98. Williamson, R. A., M. D. Henry, K. J. Daniels, R. F. Hrstka, J. C. Lee, Y. Sunada, O. Ibraghimov-Beskrovnyaya, and K. P. Campbell. 1997. Dystroglycan Is Essential for Early Embryonic Development: Disruption of Reichert's Membrane in *Dag1*-Null Mice. *Human Molecular Genetics* 6:831-841.
99. Roberds, S. L., R. D. Anderson, O. Ibraghimov-Beskrovnyaya, and K. P. Campbell. 1993. Primary structure and muscle-specific expression of the 50-kDa dystrophin-associated glycoprotein (adhalin). *J Biol Chem* 268:23739-23742.
100. Nigro, V., G. Piluso, A. Belsito, L. Politano, A. A. Puca, S. Papparella, E. Rossi, G. Viglietto, M. G. Esposito, C. Abbondanza, N. Medici, A. M. Molinari, G. Nigro, and G. A. Puca. 1996. Identification of a Novel Sarcoglycan Gene at 5q33 Encoding a Sarcolemmal 35 kDa Glycoprotein. *Human Molecular Genetics* 5:1179-1186.
101. Ozawa, E., Y. Mizuno, Y. Hagiwara, T. Sasaoka, and M. Yoshida. 2005. Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex. *Muscle & Nerve* 32:563-576.
102. Ettinger, A. J., G. Feng, and J. R. Sanes. 1997. ϵ -Sarcoglycan, a Broadly Expressed Homologue of the Gene Mutated in Limb-Girdle Muscular Dystrophy 2D. *Journal of Biological Chemistry* 272:32534-32538.
103. Sakamoto, A., K. Ono, M. Abe, G. t. Jasmin, T. Eki, Y. Murakami, T. Masaki, T. Toyo-oka, and F. Hanaoka. 1997. Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, δ -sarcoglycan, in hamster: An animal model of disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:13873-13878.
104. Hack, A. A., C. T. Ly, F. Jiang, C. J. Clendenin, K. S. Sigrist, R. L. Wollmann, and E. M. McNally. 1998. γ -Sarcoglycan Deficiency Leads to Muscle Membrane Defects and Apoptosis Independent of Dystrophin. *The Journal of Cell Biology* 142:1279-1287.
105. Bushby, K. M. D. 1999. The Limb-Girdle Muscular Dystrophies- Multiple Genes, Multiple Mechanisms. *Human Molecular Genetics* 8:1875-1882.
106. Crosbie, R. H., J. Heighway, D. P. Venzke, J. C. Lee, and K. P. Campbell. 1997. Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem* 272:31221-31224.
107. Lebakken, C. S., D. P. Venzke, R. F. Hrstka, C. M. Consolino, J. A. Faulkner, R. A. Williamson, and K. P. Campbell. 2000. Sarcospan-Deficient Mice Maintain Normal Muscle Function. *Mol. Cell. Biol.* 20:1669-1677.
108. Newey, S., M. A. Benson, C. P. Ponting, K. E. Davies, and D. J. Blake. 2000. Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex. *Current Biology* 10:1295-1298.
109. Roberts, R. G. 2001. Dystrophins and dystrobrevins. *Genome Biol* 2:REVIEWS3006.
110. Yoshida, M., H. Hama, M. Ishikawa-Sakurai, M. Imamura, Y. Mizuno, K. Araishi, E. Wakabayashi-Takai, S. Noguchi, T. Sasaoka, and E. Ozawa. 2000. Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy. *Hum Mol Genet* 9:1033-1040.
111. Blake, D. J., and E. Martin-Rendon. 2002. Intermediate Filaments and the Function of the Dystrophin-Protein Complex. *Trends in Cardiovascular Medicine* 12:224-228.
112. Newey, S. E., E. V. Howman, C. P. Ponting, M. A. Benson, R. Nawrotzki, N. Y. Loh, K. E. Davies, and D. J. Blake. 2001. Syncoilin, a Novel Member of the Intermediate Filament Superfamily That Interacts with $\hat{I}\pm$ -Dystrobrevin in Skeletal Muscle. *Journal of Biological Chemistry* 276:6645-6655.
113. Mizuno, Y., T. G. Thompson, J. R. Guyon, H. G. W. Lidov, M. Brosius, M. Imamura, E. Ozawa, S. C. Watkins, and L. M. Kunkel. 2001. Desmuslin, an intermediate filament protein that interacts with $\hat{I}\pm$ -dystrobrevin and desmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:6156-6161.
114. Poon, E., E. V. Howman, S. E. Newey, and K. E. Davies. 2002. Association of Syncoilin and Desmin. *Journal of Biological Chemistry* 277:3433-3439.
115. Ichida, F., S. Tsubata, K. R. Bowles, N. Haneda, K. Uese, T. Miyawaki, W. J. Dreyer, J. Messina, H. Li, N. E. Bowles, and J. A. Towbin. 2001. Novel Gene Mutations in Patients With Left Ventricular Noncompaction or Barth Syndrome. *Circulation* 103:1256-1263.
116. Ahn, A. H., C. A. Freener, E. Gussoni, M. Yoshida, E. Ozawa, and L. M. Kunkel. 1996. The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives. *J Biol Chem* 271:2724-2730.

117. Cozier, G. E., J. Carlton, D. Bouyoucef, and P. J. Cullen. 2004. Membrane targeting by pleckstrin homology domains. *Curr Top Microbiol Immunol* 282:49-88.
118. Rando, T. 2001. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 24:1575-1594.
119. Adams, M. E., N. Kramarcy, S. P. Krall, S. G. Rossi, R. L. Rotundo, R. Sealock, and S. C. Froehner. 2000. Absence of α -Syntrophin Leads to Structurally Aberrant Neuromuscular Synapses Deficient in Utrophin. *The Journal of Cell Biology* 150:1385-1398.
120. Chao, D. S., J. R. Gorospe, J. E. Brenman, J. A. Rafael, M. F. Peters, S. C. Froehner, E. P. Hoffman, J. S. Chamberlain, and D. S. Brecht. 1996. Selective loss of sarcolemmal nitric oxide synthase in Becker muscular dystrophy. *J Exp Med* 184:609-618.
121. Crosbie, R. H., V. Straub, H.-Y. Yun, J. C. Lee, J. A. Rafael, J. S. Chamberlain, V. L. Dawson, T. M. Dawson, and K. P. Campbell. 1998. mdx Muscle Pathology is Independent of nNOS Perturbation. *Human Molecular Genetics* 7:823-829.
122. Ervasti, J., and K. Campbell. 1991. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 66:1121-1131.
123. Ervasti, J., and K. Campbell. 1993. Dystrophin and the membrane skeleton. *Curr Op Cell Biol* 5:82-87.
124. Matsumura, K., F. M. Tome, H. Collin, F. Leturcq, M. Jeanpierre, J. C. Kaplan, M. Fardeau, and K. P. Campbell. 1994. Expression of dystrophin-associated proteins in dystrophin-positive muscle fibers (revertants) in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 4:115-120.
125. Petrof, B. J., J. B. Shrager, H. H. Stedmann, A. M. Kelly, and H. L. Sweeney. 1993. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 90:3710-3714.
126. Oak, S., Y. Zhou, and H. Jarrett. 2003. Skeletal muscle signaling pathway through the dystrophin glycoprotein complex and Rac1. *J Biol Chem* 278:39287-39295.
127. Fong, P. Y., P. R. Turner, W. F. Denetclaw, and R. A. Steinhardt. 1990. Increased activity of calcium leak channels in myotubes of Duchenne human and mdx mouse origin. *Science* 250:673-676.
128. Winder, S., T. Gibson, and J. Kendrick-Jones. 1995. Dystrophin and utrophin: the missing links! *FEBS Letters* 369:27-33.
129. Pantazatos, D. P., and R. I. MacDonald. 1997. Site-directed Mutagenesis of Either the Highly Conserved Trp-22 or the Moderately Conserved Trp-95 to a Large, Hydrophobic Residue Reduces the Thermodynamic Stability of a Spectrin Repeating Unit. *Journal of Biological Chemistry* 272:21052-21059.
130. Legrand, B., E. Giudice, A. Nicolas, O. Delalande, and E. Le Rumeur. 2011. Computational Study of the Human Dystrophin Repeats: Interaction Properties and Molecular Dynamics. *Plos One in Press*.
131. Sikorski, A. F., K. Michalak, M. Bobrowska, and A. Kozubek. 1987. Interaction of spectrin with some amphipathic compounds. *Studia Biophys* 121:183-191.
132. Sikorski, A. F., J. Sangerman, S. R. Goodman, and S. D. Critz. 2000. Spectrin ([beta] SpII[Sigma]1) is an essential component of synaptic transmission. *Brain Research* 852:161-166.
133. Grzybek, M., A. Chorzalska, E. Bok, A. Hryniewicz-Jankowska, A. Czogalla, W. Diakowski, and A. F. Sikorski. 2006. Spectrin-phospholipid interactions. Existence of multiple kinds of binding sites? *Chemistry and Physics of Lipids* 141:133-141.
134. DeWolf, C., P. McCauley, A. F. Sikorski, C. P. Winlove, A. I. Bailey, E. Kahana, J. C. Pinder, and W. B. Gratzer. 1997. Interaction of dystrophin fragments with model membranes. *Biophys J* 72:2599-2604.
135. Le Rumeur, E., Y. Fichou, S. Pottier, F. Gaboriau, C. Rondeau-Mouro, M. Vincent, J. Gallay, and A. Bondon. 2003. Interaction of dystrophin rod domain with membrane phospholipids: evidence of a close proximity between tryptophan residues and lipids. *J Biol Chem* 278:5993-6001.
136. Le Rumeur, E., S. Pottier, G. Da Costa, L. Metzinger, L. Mouret, C. Rocher, M. Fourage, C. Rondeau-Mouro, and A. Bondon. 2007. Binding of the dystrophin second repeat to membrane di-oleyl phospholipids is dependent upon lipid packing. *Biochim Biophys Acta*. 1768:648-654.
137. Fiehn, W., J. B. Peter, J. F. Mead, and M. Gan-Elepano. 1971. Lipids and fatty acids of sarcolemma, sarcoplasmic reticulum, and mitochondria from rat skeletal muscle. *J Biol Chem* . 246:5617-5620.
138. Legardinier, S., J.-F. Hubert, O. Le Bihan, C. Tascon, C. Rocher, C. Raguénès-Nicol, A. Bondon, S. Hardy, and E. Le Rumeur. 2008. Sub-domains of the dystrophin rod domain display contrasting lipid-binding and stability properties. *Biochim Biophys Acta*. 1784:672-682.

139. Legardinier, S., C. Raguénès-Nicol, C. Tascon, C. Rocher, S. Hardy, J. F. Hubert, and E. Le Rumeur. 2009. Mapping of the lipid-binding and stability properties of the central rod domain of human dystrophin. *J Mol Biol.* 389:546-558.
140. An, X., X. Zhang, M. Salomao, X. Guo, Y. Yang, Y. Wu, W. Gratzer, A. J. Baines, and N. Mohandas. 2006. Thermal stabilities of brain spectrin and the constituent repeats of subunits. *Biochemistry* 45:13670-13676.
141. An, X., X. Guo, Y. Wu, and N. Mohandas. 2004. Phosphatidylserine binding sites in red cell spectrin. *Blood Cells Mol Dis* 32:430-432.
142. Le Rumeur, E., S. J. Winder, and J. F. Hubert. 2010. Dystrophin: More than just the sum of its parts. *Biochim Biophys Acta.* 1804:1713-1722.
143. Amann, K. J., A. W. XGuo, and J. M. Ervasti. 1999. Utrophin Lacks the Rod Domain Actin Binding Activity of Dystrophin. *J Biol Chem* 274:35375-35380.
144. Rybakova, I., J. Humston, K. Sonneman, and J. Ervasti. 2006. Dystrophin and utrophin bind actin through distinct modes of contact. *J Biol Chem* 281:9996-10001.
145. Oda, T., M. Iwasa, T. Aihara, Y. Maeda, and A. Narita. 2009. The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature* 461:550-550.
146. López-Hernández, L. B., D. van Heusden, M. A. Soriano-Ursúa, L. Figuera-Villanueva, N. A. Vázquez-Cárdenas, P. Canto, B. Gómez-Díaz, and R. M. Coral-Vázquez. 2011. Genotype-phenotype discordance in a Duchenne muscular dystrophy patient due to a novel mutation: insights into the shock absorber function of dystrophin. *RevNeurol* 52:0720-0724.
147. Bhosle, R. C., D. E. Michele, K. P. Campbell, Z. Li, and R. M. Robson. 2006. Interactions of intermediate filament protein synemin with dystrophin and utrophin. *Biochem Biophys Res Commun* 346:768-777.
148. Rezniczek, G. A., P. Konieczny, B. Nikolic, S. Reipert, D. Schneller, C. Abrahamsberg, K. E. Davies, S. J. Winder, and G. Wiche. 2007. Plectin 1f scaffolding at the sarcolemma of dystrophic (mdx) muscle fibers through multiple interactions with beta-dystroglycan. *J Cell Biol* 176:965-977.
149. Stone, M. R., A. O'Neill, D. Catino, and R. J. Bloch. 2005. Specific interaction of the actin-binding domain of dystrophin with intermediate filaments containing keratin 19. *Mol Biol Cell* 16:4280-4293.
150. Prins, K. W., J. L. Humston, A. Mehta, V. Tate, E. Ralston, and J. M. Ervasti. 2009. Dystrophin is a microtubule-associated protein. *J Cell Biol* 186:363-369.
151. Lai, Y., G. D. Thomas, Y. Yue, H. T. Yang, D. Li, C. Long, L. Judge, B. Bostick, J. S. Chamberlain, R. L. Terjung, and D. Duan. 2009. Dystrophins carrying spectrin-like repeats 16 and 17 anchor nNOS to the sarcolemma and enhance exercise performance in a mouse model of muscular dystrophy. *J Clin Invest* 119:624-635.
152. Yamashita, K., A. Suzuki, Y. Satoh, M. Ide, Y. Amano, M. Masuda-Hirata, Y. K. Hayashi, K. Hamada, K. Ogata, and S. Ohno. 2010. The 8th and 9th tandem spectrin-like repeats of utrophin cooperatively form a functional unit to interact with polarity-regulating kinase PAR-1b. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 391:812-817.
153. Rybakova, I., K. Amann, and J. Ervasti. 1996. A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *J Cell Biol* 135:661-672.
154. Nowak, K. J., and K. E. Davies. 2004. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO Rep* 5:872-876.
155. Gosselin, L. E., and K. M. McCormick. 2004. Targeting the Immune System to Improve Ventilatory Function in Muscular Dystrophy. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 36:44-51.
156. Anderson, J. E., L. M. McIntosh, and R. Poettcker. 1996. Deflazacort but not prednisone improves both muscle repair and fiber growth in diaphragm and limb muscle in vivo in the mdx dystrophic mouse. *Muscle Nerve* 19:1576-1585.
157. Campbell, C., and P. Jacob. 2003. Deflazacort for the treatment of Duchenne Dystrophy: A systematic review. *BMC Neurology* 3:7.
158. Arakawa, M., M. Shiozuka, Y. Nakayama, T. Hara, M. Hamada, S. i. Kondo, D. Ikeda, Y. Takahashi, R. Sawa, Y. Nonomura, K. Sheykholeslami, K. Kondo, K. Kaga, T. Kitamura, Y. Suzuki-Miyagoe, S. i. Takeda, and R. Matsuda. 2003. Negamycin Restores Dystrophin Expression in Skeletal and Cardiac Muscles of mdx Mice. *Journal of Biochemistry* 134:751-758.
159. Barton-Davis, E. R., L. Cordier, D. I. Shoturma, S. E. Leland, and H. L. Sweeney. 1999. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *The Journal of Clinical Investigation* 104:375-381.

160. Dunant, P., M. C. Walter, G. Karpati, and H. Lochmüller. 2003. Gentamicin fails to increase dystrophin expression in dystrophin-deficient muscle. *Muscle & Nerve* 27:624-627.
161. Fowler, E. G., M. C. Graves, G. T. Wetzel, and M. J. Spencer. 2004. Pilot trial of albuterol in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neurology* 62:1006-1008.
162. Tidball, J. G., and M. Wehling-Henricks. 2004. Evolving Therapeutic Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy: Targeting Downstream Events. *Pediatric Research* 56:831-841.
163. De Luca, A., S. Pierno, A. Liantonio, M. Cetrone, C. Camerino, B. Frayssse, M. Mirabella, S. Servidei, U. T. RÅ¼egg, and D. Conte Camerino. 2003. Enhanced Dystrophic Progression in mdx Mice by Exercise and Beneficial Effects of Taurine and Insulin-Like Growth Factor-1. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 304:453-463.
164. Gregorevic, P., D. R. Plant, K. S. Leeding, L. A. Bach, and G. S. Lynch. 2002. Improved Contractile Function of the mdx Dystrophic Mouse Diaphragm Muscle after Insulin-Like Growth Factor-I Administration. *The American Journal of Pathology* 161:2263-2272.
165. McPherron, A. C., A. M. Lawler, and S.-J. Lee. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature* 387:83-90.
166. Tinsley, J. M., A. C. Potter, S. R. Phelps, R. Fisher, J. I. Trickett, and K. E. Davies. 1996. Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene. *Nature* 384:349-353.
167. Acsadi, G., G. Dickson, D. R. Love, A. Jani, F. S. Walsh, A. Gurusinghe, J. A. Wolff, and K. E. Davies. 1991. Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature* 352:815-818.
168. Liang, K. W., M. Nishikawa, F. Liu, B. Sun, Q. Ye, and L. Huang. 2004. Restoration of dystrophin expression in mdx mice by intravascular injection of naked DNA containing full-length dystrophin cDNA. *Gene Ther* 11:901-908.
169. Liu, F., M. Nishikawa, P. R. Clemens, and L. Huang. 2001. Transfer of Full-Length Dmd to the Diaphragm Muscle of Dmdmdx/mdx Mice through Systemic Administration of Plasmid DNA. *Mol Ther* 4:45-51.
170. Zhang, G., J. J. Ludtke, C. Thioudellet, P. Kleinpeter, M. Antoniou, H. Herweijer, S. Braun, and J. A. Wolff. 2004. Intraarterial Delivery of Naked Plasmid DNA Expressing Full-Length Mouse Dystrophin in the mdx Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Human Gene Therapy* 15:770-782.
171. Romero, N. B., S. Braun, O. Benveniste, F. Leturcq, J.-Y. Hogrel, G. E. Morris, A. Barois, B. Eymard, C. Payan, V. r. Ortega, A.-L. Boch, L. Lejean, C. Thioudellet, B. Mourot, C. Escot, A. Choquel, D. Recan, J.-C. Kaplan, G. Dickson, D. Klatzmann, V. r. Molinier-Frenckel, J.-G. r. Guillet, P. Squiban, S. Herson, and M. Fardeau. 2004. Phase I Study of Dystrophin Plasmid-Based Gene Therapy in Duchenne/Becker Muscular Dystrophy. *Human Gene Therapy* 15:1065-1076.
172. DelloRusso, C., J. M. Scott, D. Hartigan-O'Connor, G. Salvatori, C. Barjot, A. S. Robinson, R. W. Crawford, S. V. Brooks, and J. S. Chamberlain. 2002. Functional correction of adult mdx mouse muscle using gutted adenoviral vectors expressing full-length dystrophin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:12979-12984.
173. Duncckley, M. G., D. J. Wells, F. S. Walsh, and G. Dickson. 1993. Direct retroviral-mediated transfer of a dystrophin minigene into mdx mouse muscle in vivo. *Human Molecular Genetics* 2:717-723.
174. Fisher, K. J., and J. M. Wilson. 1997. The transmembrane domain of diphtheria toxin improves molecular conjugate gene transfer. *Biochem J* 321 (Pt 1):49-58.
175. Vincent-Lacaze, N., R. O. Snyder, R. Gluzman, D. Bohl, C. Lagarde, and O. Danos. 1999. Structure of Adeno-Associated Virus Vector DNA following Transduction of the Skeletal Muscle. *J. Virol.* 73:1949-1955.
176. Harper, S. Q., M. A. Hauser, C. DelloRusso, D. Duan, R. W. Crawford, S. F. Phelps, H. A. Harper, A. S. Robinson, J. F. Engelhardt, S. V. Brooks, and J. S. Chamberlain. 2002. Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nature Med* 8:253-261.
177. Kapsa, R., A. Quigley, G. S. Lynch, K. Steeper, A. J. Kornberg, P. Gregorevic, L. Austin, and E. Byrne. 2001. In Vivo and in Vitro Correction of the mdx Dystrophin Gene Nonsense Mutation by Short-Fragment Homologous Replacement. *Human Gene Therapy* 12:629-642.
178. Bertoni, C., and T. A. Rando. 2002. Dystrophin Gene Repair in mdx Muscle Precursor Cells In Vitro and In Vivo Mediated by RNA-DNA Chimeric Oligonucleotides. *Human Gene Therapy* 13:707-718.

179. Sicinski, P., Y. Geng, A. S. Ryder-Cook, E. A. Barnard, M. G. Darlison, and P. J. Barnard. 1989. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 244:1578-1580.
180. Wells, K. E., S. Fletcher, C. J. Mann, S. D. Wilton, and D. J. Wells. 2003. Enhanced in vivo delivery of antisense oligonucleotides to restore dystrophin expression in adult mdx mouse muscle. *FEBS Letters* 552:145-149.
181. van Deutekom, J. C., A. A. Janson, I. B. Ginjaar, W. S. Frankhuizen, A. Aartsma-Rus, M. Bremmer-Bout, J. T. den Dunnen, K. Koop, A. J. van der Kooi, N. M. Goemans, S. J. de Kimpe, P. F. Ekhardt, E. H. Venneker, G. J. Platenburg, J. J. Verschuuren, and G.-J. B. van Ommen. 2007. Local Dystrophin Restoration with Antisense Oligonucleotide PRO051. *New England Journal of Medicine* 357:2677-2686.
182. Goyenville, A. I., A. Vulin, F. o. Fougerousse, F. Leturcq, J.-C. Kaplan, L. Garcia, and O. Danos. 2004. Rescue of Dystrophic Muscle Through U7 snRNA-Mediated Exon Skipping. *Science* 306:1796-1799.
183. Cirak, S., V. Arechavala-Gomez, M. Guglieri, L. Feng, S. Torelli, K. Anthony, S. Abbs, M. E. Garralda, J. Bourke, D. J. Wells, G. Dickson, M. J. A. Wood, S. D. Wilton, V. Straub, R. Kole, S. B. Shrewsbury, C. Sewry, J. E. Morgan, K. Bushby, and F. Muntoni. 2011. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *The Lancet*.
184. Arechavala-Gomez, V., I. R. Graham, L. J. Popplewell, A. M. Adams, A. Aartsma-Rus, M. Kinali, J. E. Morgan, J. C. van Deutekom, S. D. Wilton, G. Dickson, and F. Muntoni. 2007. Comparative Analysis of Antisense Oligonucleotide Sequences for Targeted Skipping of Exon 51 During Dystrophin Pre-mRNA Splicing in Human Muscle. *Human Gene Therapy* 18:798-810.
185. Partridge, T. A., J. E. Morgan, G. R. Coulton, E. P. Hoffman, and L. M. Kunkel. 1989. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature* 337:176-179.
186. Mouly, V., A. Aamiri, S. Perie, K. Mamchaoui, A. Barani, A. Bigot, B. Bouazza, V. Francois, D. Furling, V. Jacquemin, E. Negroni, I. Riederer, A. Vignaud, J. L. St Guily, and G. S. Butler-Browne. 2005. Myoblast transfer therapy: is there any light at the end of the tunnel? *Acta Myol* 24:128-133.
187. Peng, H., and J. Huard. 2004. Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. *Transplant Immunology* 12:311-319.
188. Bachrach, E., S. Li, A. L. Perez, J. Schienda, K. Liadaki, J. Volinski, A. Flint, J. Chamberlain, and L. M. Kunkel. 2004. Systemic delivery of human microdystrophin to regenerating mouse dystrophic muscle by muscle progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:3581-3586.
189. Jönsson, U., M. Malmqvist, and I. Ronnberg. 1985. Adsorption of immunoglobulin G, protein A, and fibronectin in the submonolayer region evaluated by a combined study of ellipsometry and radiotracer techniques. *Journal of Colloid and Interface Science* 103:360-372.
190. DeFeijter, J. A., J. Benjamins, and F. A. Veer. 1978. Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air-water interfaces. *Biopolymers* 17:1759-1772.
191. Vié, V., J. Moreno, S. Beaufils, E. Lesniewska, J. Léonil, and A. Renault. 2002. Interfacial Behavior of Goat Kappa Casein: Ellipsometry and Atomic Force Microscopy Study. *Single Molecules* 3:127-133.
192. Gauthier, F., S. Bouhallab, and A. Renault. 2001. Modification of bovine [beta]-lactoglobulin by glycation in a powdered state or in aqueous solution: adsorption at the air-water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 21:37-45.
193. Sarkis, J., J.-F. Hubert, B. Legrand, E. Robert, A. Chéron, J. Jardin, E. Hitti, E. Le Rumeur, and V. Vié. 2011. Spectrin-like Repeats 11-15 of Human Dystrophin Show Adaptations to a Lipidic Environment. *J Biol Chem* 286:30481-30491.
194. Le Floch-Fouéré, C., S. Pezennec, M. Pézolet, J.-F. Rioux-Dubé, A. Renault, and S. Beaufils. 2011. Unexpected differences in the behavior of ovotransferrin at the air-water interface at pH 6.5 and 8.0. *Journal of Colloid and Interface Science* 356:614-623.
195. Ward, A. F. H., and L. Tordai. 1946. Time-Dependence of Boundary Tensions of Solutions I. The Role of Diffusion in Time-Effects. *The Journal of Chemical Physics* 14:453-461.
196. Damodaran, S., C. S. Rao, E. Dickinson, and R. Miller. 2001. Molecular basis of protein adsorption at fluid-fluid interfaces. In *Food Colloids Fundamentals of Formulation*. The Royal Society of Chemistry. 165-180.

197. Bottier, C., J. Gean, B. Desbat, A. Renault, D. Marion, and V. Vie. 2008. Structure and orientation of puroindolines into wheat galactolipid monolayers. *Langmuir* 24:10901-10909.
198. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, and W. P. 2002. *Molecular biology of the cell*, New York. US.
199. Raven, P. H., G. B. Johnson, K. A. Mason, J. B. Losos, and S. Singer. 2011. *BIOLOGY*. De Boeck. Ed. 9.
200. Straub, F. B. 1942. *Actin*. *Stud.Inst.Med.Chem.Univ.Szeged*. 2:3-16.
201. Kabsch, W., H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai, and K. C. Holmes. 1990. Atomic structure of the actin: DNase I complex. *Nature* 347:37-44.
202. Rould, M. A., Q. Wan, P. B. Joel, S. Lowey, and K. M. Trybus. 2006. Crystal Structures of Expressed Non-polymerizable Monomeric Actin in the ADP and ATP States. *Journal of Biological Chemistry* 281:31909-31919.
203. Valentin-Ranc, C., and M. F. Carlier. 1989. Evidence for the direct interaction between tightly bound divalent metal ion and ATP on actin. Binding of the lambda isomers of beta gamma-bidentate CrATP to actin. *Journal of Biological Chemistry* 264:20871-20880.
204. Janmey, P. A., S. Hvidt, G. F. Oster, J. Lamb, T. P. Stossel, and J. H. Hartwig. 1990. Effect of ATP on actin filament stiffness. *Nature* 347:95-99.
205. Otterbein, L. R., P. Graceffa, and R. Dominguez. 2001. The Crystal Structure of Uncomplexed Actin in the ADP State. *Science* 293:708-711.
206. Cooper, J. A., E. L. Buhle, S. B. Walker, T. Y. Tsong, and T. D. Pollard. 1983. Kinetic evidence for a monomer activation step in actin polymerization. *Biochemistry* 22:2193-2202.
207. Lodish, H., A. Berk, L. S. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. Darnell. 2000. *Molecular Cell Biology*, 4th edition. New York: W. H. Freeman:Section 18.11.
208. Pollard, T. D. 1986. Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *The Journal of Cell Biology* 103:2747-2754.
209. Carlier, M. F. 1991. Actin: protein structure and filament dynamics. *Journal of Biological Chemistry* 266:1-4.
210. Evangelista, M., S. Zigmond, and C. Boone. 2003. Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *Journal of Cell Science* 116:2603-2611.
211. Pring, M., M. Evangelista, C. Boone, C. Yang, and S. H. Zigmond. 2002. Mechanism of Formin-Induced Nucleation of Actin Filaments. *Biochemistry* 42:486-496.
212. Mullins, R. D., J. A. Heuser, and T. D. Pollard. 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:6181-6186.
213. Pollard, T. D., and G. G. Borisy. 2003. Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. *Cell* 112:453-465.
214. Blanchoin, L., and T. D. Pollard. 2001. Hydrolysis of ATP by Polymerized Actin Depends on the Bound Divalent Cation but Not Profilin. *Biochemistry* 41:597-602.
215. Carlier, M. F., D. Pantaloni, and E. D. Korn. 1987. The mechanisms of ATP hydrolysis accompanying the polymerization of Mg-actin and Ca-actin. *Journal of Biological Chemistry* 262:3052-3059.
216. Cooper, J. A., E. L. Buhle, Jr., S. B. Walker, T. Y. Tsong, and T. D. Pollard. 1983. Kinetic evidence for a monomer activation step in actin polymerization. *Biochemistry* 22:2193-2202.
217. Carlier, M. F., D. Pantaloni, and E. D. Korn. 1986. The effects of Mg²⁺ at the high-affinity and low-affinity sites on the polymerization of actin and associated ATP hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry* 261:10785-10792.
218. Laliberte, A., and C. Gicquaud. 1988. Polymerization of Actin by Positively Charged Liposomes. *J Cell Biol* 106:1221-1227.
219. Renault, A., P.-F. Lenne, C. Zakri, A. Aradian, C. Vénien-Bryan, and F. Amblard. 1999. Surface-Induced Polymerization of Actin. *Biophysical journal* 76:1580-1590.
220. Medalia, O., M. Beck, M. Ecke, I. Weber, R. Neujahr, W. Baumeister, and G. Gerisch. 2007. Organization of Actin Networks in Intact Filopodia. *Current biology : CB* 17:79-84.
221. Svitkina, T. M., A. B. Verkhovskiy, and G. G. Borisy. 1995. Improved Procedures for Electron Microscopic Visualization of the Cytoskeleton of Cultured Cells. *Journal of Structural Biology* 115:290-303.
222. Gouin, E., M. D. Welch, and P. Cossart. 2005. Actin-based motility of intracellular pathogens. *Current Opinion in Microbiology* 8:35-45.
223. Kaunas, R., S. Usami, and S. Chien. 2006. Regulation of stretch-induced JNK activation by stress fiber orientation. *Cellular Signalling* 18:1924-1931.

224. Perrin, B. J., and J. M. Ervasti. 2010. The actin gene family: Function follows isoform. *Cytoskeleton* 67:630-634.
225. Kee, A., P. Gunning, and E. Hardeman. 2009. Diverse roles of the actin cytoskeleton in striated muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 30:187-197.
226. Crawford, K., R. Flick, L. Close, D. Shelly, R. Paul, K. Bove, A. Kumar, and J. Lessard. 2002. Mice Lacking Skeletal Muscle Actin Show Reduced Muscle Strength and Growth Deficits and Die during the Neonatal Period. *Mol. Cell. Biol.* 22:5887-5896.
227. Nowak, K. J., G. Ravenscroft, C. Jackaman, A. Filipovska, S. M. Davies, E. M. Lim, S. E. Squire, A. C. Potter, E. Baker, S. Clément, C. A. Sewry, V. Fabian, K. Crawford, J. L. Lessard, L. M. Griffiths, J. M. Papadimitriou, Y. Shen, G. Morahan, A. J. Bakker, K. E. Davies, and N. G. Laing. 2009. Rescue of skeletal muscle α -actin-null mice by cardiac (fetal) α -actin. *The Journal of Cell Biology* 185:903-915.
228. Jaeger, M. A., K. J. Sonnemann, D. P. Fitzsimons, K. W. Prins, and J. M. Ervasti. 2009. Context-dependent functional substitution of α -skeletal actin by γ -cytoplasmic actin. *The FASEB Journal* 23:2205-2214.
229. Shawlot, W., J. M. Deng, L. E. Fohn, and R. R. Behringer. 1998. Restricted β -galactosidase expression of a hygromycin-lacZ gene targeted to the β -actin locus and embryonic lethality of β -actin mutant mice. *Transgenic Research* 7:95-103.
230. Shmerling, D., C.-P. Danzer, X. Mao, J. Boisclair, M. Haffner, M. Lemaistre, V. Schuler, E. Kaeslin, R. Korn, K. Bürki, B. Ledermann, B. Kinzel, and M. Müller. 2005. Strong and ubiquitous expression of transgenes targeted into the β -actin locus by Cre/lox cassette replacement. *genesis* 42:229-235.
231. Bunnell, T. M., and J. M. Ervasti. 2010. Delayed embryonic development and impaired cell growth and survival in Actg1 null mice. *Cytoskeleton* 67:564-572.
232. Belyantseva, I. A., B. J. Perrin, K. J. Sonnemann, M. Zhu, R. Stepanyan, J. McGee, G. I. Frolenkov, E. J. Walsh, K. H. Friderici, T. B. Friedman, and J. M. Ervasti. 2009. γ -Actin is required for cytoskeletal maintenance but not development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:9703-9708.
233. Sonnemann, K. J., D. P. Fitzsimons, J. R. Patel, Y. Liu, M. F. Schneider, R. L. Moss, and J. M. Ervasti. 2006. Cytoplasmic gamma-actin is not required for skeletal muscle development but its absence leads to a progressive myopathy. *Dev Cell* 11:387-397.
234. Lloyd, C. M., M. Berendse, D. G. Lloyd, G. Schevzov, and M. D. Grounds. 2004. A novel role for non-muscle [gamma]-actin in skeletal muscle sarcomere assembly. *Experimental Cell Research* 297:82-96.
235. Dos Remedios, C. G., D. Chhabra, M. Kekic, I. V. Dedova, M. Tsubakihara, D. A. Berry, and N. J. Nosworthy. 2003. Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments. *Physiological Reviews* 83:433-473.
236. Maciver, S. K. 2004. The Encyclopaedia of Actin-Binding Proteins. <http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/Encyclop/encycloABP.htm>.
237. Winder, S. J., and K. R. Ayscough. 2005. Actin-binding proteins. *Journal of Cell Science* 118:651-654.
238. Liu, M., Y. Yue, S. Harper, R. Grange, J. Chamberlain, and D. Duan. 2005. Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury. *Mol Ther.* 11:245-256.
239. Manno, S., Y. Takakuwa, and N. Mohandas. 2002. Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: phosphatidylserine - skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 99:1943-1948.
240. Deconinck, N., and B. Dan. 2007. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr Neurol* 36:1-7.

ANNEXE :

LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS

Cette annexe sera consacrée aux peptides antimicrobiens. Deux chapitres seront présentés.

Le Chapitre 1 est une brève introduction générale sur les peptides à activités antibactériennes et les mécanismes moléculaires impliqués dans la destruction de la membrane des bactéries.

Dans le Chapitre 2, nous présenterons les résultats obtenus sur un peptide “*de novo*”, nommé K4, et plus particulièrement son comportement en environnement hydrophobe modèle.

Si ces travaux ont constitué une partie du travail de thèse de Baptiste Legrand sous la direction d’Arnaud Bondon dans l’équipe RMN-ILP pour ce qui concerne les analyses structurales, et une partie de la thèse de Mathieu Laurencin dirigé par Mme Michèle Baudy-Floc’h (UMR 6226, Rennes) pour la synthèse peptidique, j’ai pour ma part, participé activement aux études du peptide K4 à l’interface, dans le but de caractériser l’effet de ce peptide sur les monocouches lipidiques. J’ai réalisé les analyses par mesure de pression de surface et par microscopie à force atomique.

Différentes collaborations ont été menées, principalement avec Véronique Vié de l’équipe Biophysique de l’Institut de Physique de Rennes (UMR CNRS 6250), l’équipe de Joël Henry de l’UMR IFREMER de l’Université de Caen Basse-Normandie, l’équipe de Yannick Fleury du LUMAQ de l’Université de Bretagne Ouest, et le groupe de Michèle Baudy Floc’h de l’équipe Ingénierie Chimique et Molécules pour le Vivant (ICMV) de l’UMR CNRS 6226 de l’Université de Rennes 1.

Chapitre 1 – Introduction

La première ligne de défense naturelle est l'immunité. En effet, l'Homme possède un système immunitaire (inné puis adaptatif) permettant de lutter contre ses envahisseurs: ce sont les macrophages, les lymphocytes, les anticorps, etc.

Cependant, l'adaptation au milieu pour se défendre face aux agressions des bactéries, champignons, virus ou autres parasites, s'est accompagnée du développement de molécules capables de "terrasser l'adversaire": ce sont les antibiotiques, antifongiques, antiviraux et antiparasitaires.

Mais les plantes et les insectes ne disposent pas de cet arsenal. Quels sont les mécanismes de défense? Comment une graine arrive-t-elle à germer dans un milieu infesté de bactéries ou de champignons ? C'est grandement en recherchant des réponses à ces questions que l'existence des peptides antimicrobiens (AMPs pour AntiMicrobial Peptides) a pu être mise en évidence. Les AMPs sont de petits peptides présents dans le règne animal (1, 2) et végétal (3), capables de défendre l'hôte face aux agressions des micro-organismes dangereux pour leur survie.

III.1.A- Historique

C'est à la fin du 19^{ème} siècle que des activités antimicrobiennes dans le sang, les sécrétions, les leucocytes et les tissus lymphatiques ont été découvertes (4). Dans les années 1920, *Fleming* découvre une substance dans le blanc d'œuf qui est capable en quelques minutes de tuer certaines bactéries. Cette substance sera nommée plus tard lysozyme (enzyme lysant les bactéries) (5). Ce peptide à propriétés enzymatiques a été retrouvé plus tard dans le mucus nasal et les sécrétions lacrymales. Son rôle est actuellement reconnu dans la destruction du peptidoglycane des bactéries à Gram positif. Entre 1920 et 1950, plusieurs composés antimicrobiens sont isolés dans les sécrétions bronchiques notamment, et présentent une activité contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Nous pouvons ainsi dire que des peptides antimicrobiens ont été découverts

au même moment que des molécules organiques antibiotiques. C'est en effet en 1928 que *Fleming* constate que des colonies blanches cotonneuses, qui se révèlent être constituées d'un champignon du genre *Penicillium*, ont envahi les boîtes de Pétri, sur lesquelles il cultivait des *Staphylocoques*. Il conclut que ce champignon inhibe la croissance de ces bactéries. Il publie ses recherches en 1929, en appelant le composant sécrété par le champignon la pénicilline. Cette redécouverte de la pénicilline (mise en évidence par E. Duchesne en 1897) n'intéressa pas de suite les scientifiques, et ce n'est qu'au cours de la seconde guerre mondiale que les recherches sur la pénicilline s'intensifient, permettant d'aboutir à sa synthèse pour soigner les infections des soldats blessés (6).

En 1942, *Okuda et al.* purifient et isolent deux molécules, la Gramicidine et la Tyrocidine issues de *Bacillus brevis* (7). Ces deux molécules sont composées d'acides aminés et possèdent bien une activité dirigée contre certaines bactéries, mais ne sont pas dépourvues de toxicité. A la fin de la seconde guerre, seuls les antibiotiques organiques, dont la pénicilline, sont exploités pour lutter contre les infections, et les peptides ne sont que très peu utilisés.

Le champ d'étude des peptides antimicrobiens s'amplifie dans les années 1950, avec la description de la présence d'une activité antimicrobienne à large spectre dans les cellules sanguines par *Skarnes* (4). Ce champ se développe surtout au début des années 1970, avec notamment les travaux d'*Erspamer* sur la peau des amphibiens, très riche en peptides ayant des activités biologiques diverses : antibactériennes, antivirales et antifongiques (8).

A partir des années 1990, devant les problèmes de résistance bactérienne aux antibiotiques classiques, la recherche sur les peptides antimicrobiens s'accélère : on découvre de plus en plus d'organismes producteurs dans le règne animal et végétal. A l'heure actuelle, plus de 1500 peptides antimicrobiens de différentes origines ont été identifiés [(9) et Antimicrobial Peptide Database: <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>].

III.1.B- Différentes classes d'AMPs

Au sein d'une même espèce, les peptides antimicrobiens peuvent avoir des structures très différentes tout en ayant une similarité importante avec ceux d'autres

organismes. La classification des AMPs est donc réalisée en fonction de leur composition en acides aminés et en fonction de leurs structures tridimensionnelles. Par la suite, je présenterai les différentes classes des AMPs de peptides d'origine naturels et de peptides *de novo*.

III.1.B-1. Les AMPs naturels

La base de données répertorie majoritairement des peptides antimicrobiens isolés d'organismes vivants. On distingue différentes familles :

- Les peptides cationiques linéaires composés d'une hélice α constituent la plus grande famille de peptides (2) (**Fig III.1.1**). Ces peptides, lorsqu'ils sont en contact avec la membrane, adoptent une structure en hélice amphipathique. Ils présentent un large spectre d'activité. Certains sont hémolytiques comme la bombinine isolée du crapaud (10, 11) ou cytotoxiques comme la mellitine extraite du venin de l'abeille (12, 13)

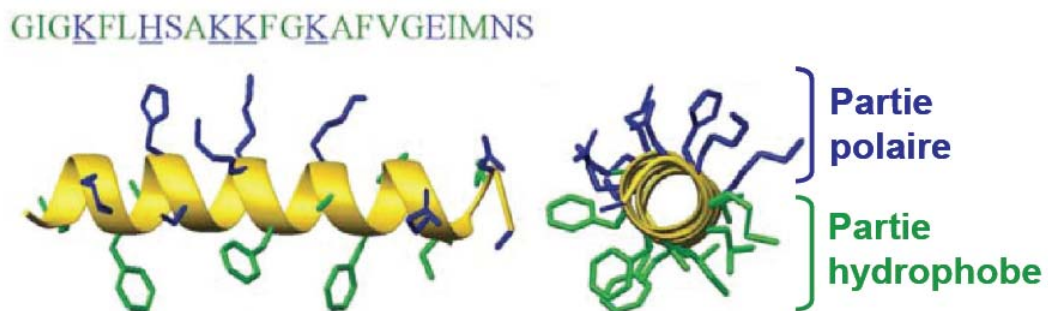


Fig III.1.1. Séquence et structure tridimensionnelle d'un peptide antimicrobien en hélice α (exemple: la magainine 2, PDB : 2MAG)

- La deuxième grande classe de peptides naturels est constituée de AMPs riches en cystéines, ayant des ponts disulfure. Les défensines en sont les principaux représentants. Ces peptides, plus longs que les peptides en hélice α , sont structurés en feuillets β disposés en épingle ou de structure mixte α/β . Le nombre de ponts

disulfure est utilisé comme critère pour définir des sous-classes au sein de la même famille (**Fig III.1.2**).

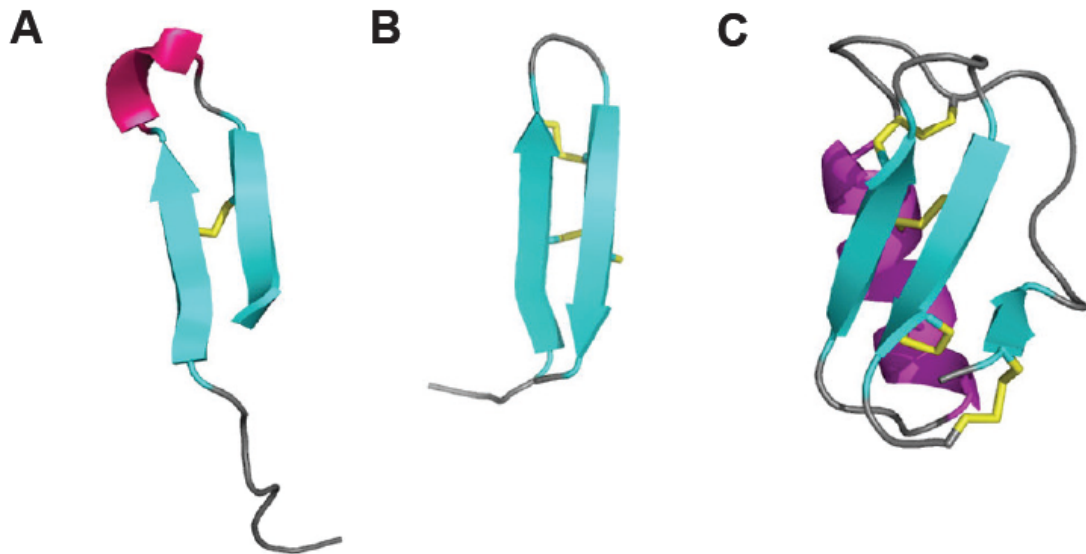


Fig III.1.2. Structure tridimensionnelle des AMPs ayant des ponts disulfures. (A) la thanatine de Podisus de la punaise (PDB: 8TFV), (B) de la protégrine 1 du porc (PDB: 1PG1) et (C) de la défensine de la drosophile (PDB: MYNG). En jaune sont présentés les ponts disulfure.

- Plusieurs autres familles existent, notamment une catégorie qui rassemble les peptides dont la composition est riche en un ou deux types d'acides aminés. Ces peptides sont relativement peu structurés et nous citons comme exemple la Prophénine 1 du porc constitué de 50% de proline et 19% de phénylalanine (14), et les Bacténécines Bac5 et Bac7 du Bœuf constituées de plus de 45% de proline et 20% d'arginine (15).
- Une autre catégorie rassemble les peptides ayant des acides aminés rares. Nous distinguons les "lantibiotiques" formé par des acides aminés D (16), et les "peptaïbols" composés des acides aminés non usuels tel que l'isovaline et l' α -méthyl/éthyl alanine (17).
- La dernière catégorie concerne les peptides atypiques, ne répondant à aucun des critères précédents. Ces peptides peuvent être anioniques, avec des chaînes alkyles

ou ayant des structures originales ou cycliques. Citons par exemple la surfactine qui est un peptide cyclique et composé d'une chaîne alkyle (18).

III.1.B-2. Les “*de novo*” peptides synthétiques

Avec le développement de la synthèse chimique, les chimistes ont réussi à produire des peptides antimicrobiens, similaires aux peptides naturels, mais avec des activités supérieures à celles observées avec des peptides extraits à partir d'organismes vivants (19). De plus, les quantités obtenues sont importantes ce qui permet de multiplier les expériences et ainsi de précisément caractériser et comprendre le mode d'action de ces peptides. L'avantage majeur de la synthèse de “*de novo*” peptides est la possibilité d'optimiser l'activité, la sélectivité et la résistance de ces peptides en modifiant la séquence de base ou en ajoutant des résidus non naturels.

Devant le grand nombre de peptides néosynthétisés, il est difficile de faire une liste exhaustive. Quelques exemples des “*de novo*” peptides les plus représentatifs seront discutés dans la suite.

Une bonne partie des peptides synthétisés ont subi des substitutions ou des modifications d'acides aminés. Par exemple, un analogue de la magainine 2, qui est un peptide naturel cationique à hélice α (présenté précédemment dans la [Fig III.1.1.](#)), a été synthétisé en remplaçant ses acides aminés de configuration L en acides aminés de configuration D. Cet énantiomère synthétique présente une activité antimicrobienne similaire à celle du peptide naturel, mais de plus, il est plus résistant aux peptidases (20). Cette même activité indépendante de la configuration des acides aminés met en évidence le caractère non chiral de la reconnaissance de la magainine 2 pour les microorganismes, démontrant ainsi que ce peptide interagit avec les lipides plutôt qu'avec les récepteurs membranaires protéiques sensibles à la chiralité de leurs partenaires.

Une autre synthèse de peptides ayant des séquences composées de motifs de sept résidus par exemple, $(KLGKKG)_n$ ou $(KLAKLAK)_n$ ($n \geq 1$ pour que ses peptides soient actifs) .. se structurent dans un environnement membranaire et forment des hélices α complètement amphiphiles (21). D'autres motifs peptidiques s'organisent en brin β (comme le peptide $(KIGAKI)_3-NH_2$) en présence de bicouches lipidiques anioniques (22).

Dans le but d'augmenter leurs affinités pour les membranes biologiques, des longues chaînes aliphatiques lipophiles peuvent être ajoutées sur des séquences de peptides naturels. Ainsi, même des peptides très courts (23) comme par exemple le dipeptide KK, associé à une chaîne palmitoyl possèdent des activités bactéricides sur les Gram positif (24).

Enfin, un dernier exemple de “*de novo*” peptide est une série de molécules résultant de la cyclisation de peptides linéaires, laquelle augmente sensiblement leurs activités antimicrobiennes. Cette activité définie par la concentration molaire inhibitrice (CMI), correspond à la concentration minimale de peptide nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne. Plusieurs expériences montrant l'effet de la cyclisation ont été réalisées sur différentes peptides (25), et on remarque par exemple la chute de la valeur de CMI pour *E.Coli* de 100 μ M pour le peptide RRWWRF-NH₂ linéaire à 10 μ M après cyclisation.

III.1.C- Mode d'action des AMPs

La majorité des AMPs agissent sur la membrane des microorganismes en déstabilisant la bicouche et entraînant l'exclusion des constituants intracellulaires et la mort cellulaire. Néanmoins, certains peptides traversent la membrane et agissent sur les composants intracellulaires des microorganismes (tels que ADN, ARN ou des protéines), conduisant également à la mort cellulaire (**Fig III.1.3**).

La composition lipidique des membranes semble jouer un rôle important dans la reconnaissance par les AMPs. C'est pour cela qu'une différence importante d'activité des peptides existe entre les cellules procaryotes et eucaryotes (26). En effet, la membrane des eucaryotes, notamment la couche externe, présente une charge globale neutre, en raison de sa richesse en phospholipides zwitterioniques (PC, PE, SM...). Par contre, la membrane des procaryotes présente une charge globale négative, étant riche en phospholipides hydroxylés (PS, PG et cardiolipine..). De plus, l'ancrage de lipopolysaccharides (LPS) chez les bactéries Gram négatives, et l'acide lipotéichoïque

chez les bactéries Gram positives, induit une asymétrie propre aux membranes bactériennes et contribue à la charge globale négative de la membrane bactérienne (27).

Les premières interactions entre le peptide et la membrane sont dues aux attractions électrostatiques à longue distance. Ensuite, ce sont les interactions hydrophobes qui rentrent en jeu et permettent au peptide d'interagir avec les queues lipophiles des phospholipides de la membrane. Or, ces fortes interactions hydrophobes aspécifiques sont souvent responsables de la cytotoxicité des AMPs (28).

L'activité et le mode d'action des AMPs dépend, en plus de la composition et de la fluidité membranaire, de plusieurs facteurs environnementaux comme la température, le pH, et aussi de la concentration du peptide lui-même. Or, la buforine II par exemple, ne lyse les bactéries que si sa concentration est bien supérieure à la CMI. Ce peptide traverse la membrane et se fixe sur l'ADN bactérien (**Fig III.1.3**), entraînant ainsi une inhibition du processus cellulaire (29).

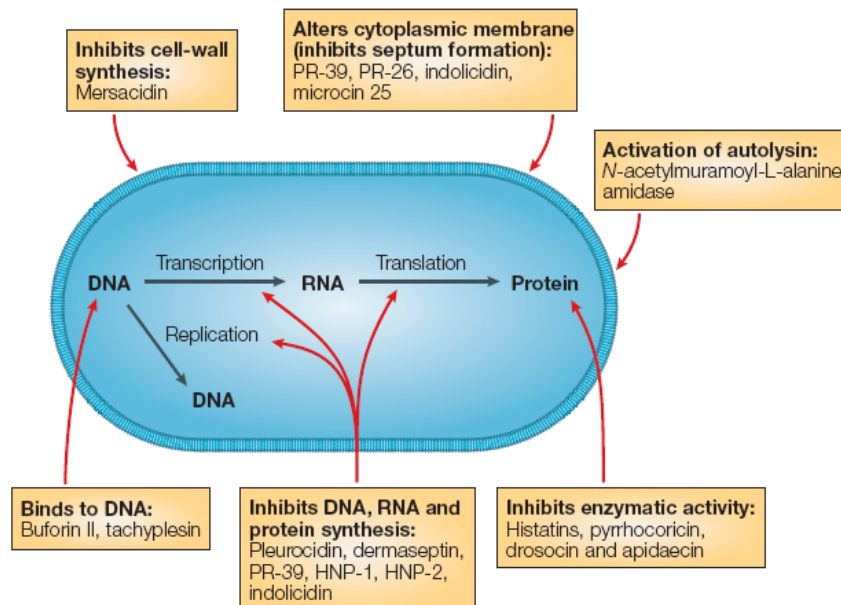


Fig III.1.3. Représentation schématique des différents mécanismes d'action des peptides présentant une activité antimicrobienne intracellulaire. Adapté de la référence (30).

Différents modèles d'interaction des AMPs avec les membranes ont été décrits dans la littérature (**Fig III.1.4**). On distingue le modèle en tapis (*carpet like model*), les

modèles de pores en douves de tonneaux (*barrel-stave model*) et de pores toroïdaux (*wormhole model*) et le modèle *detergent-like*.

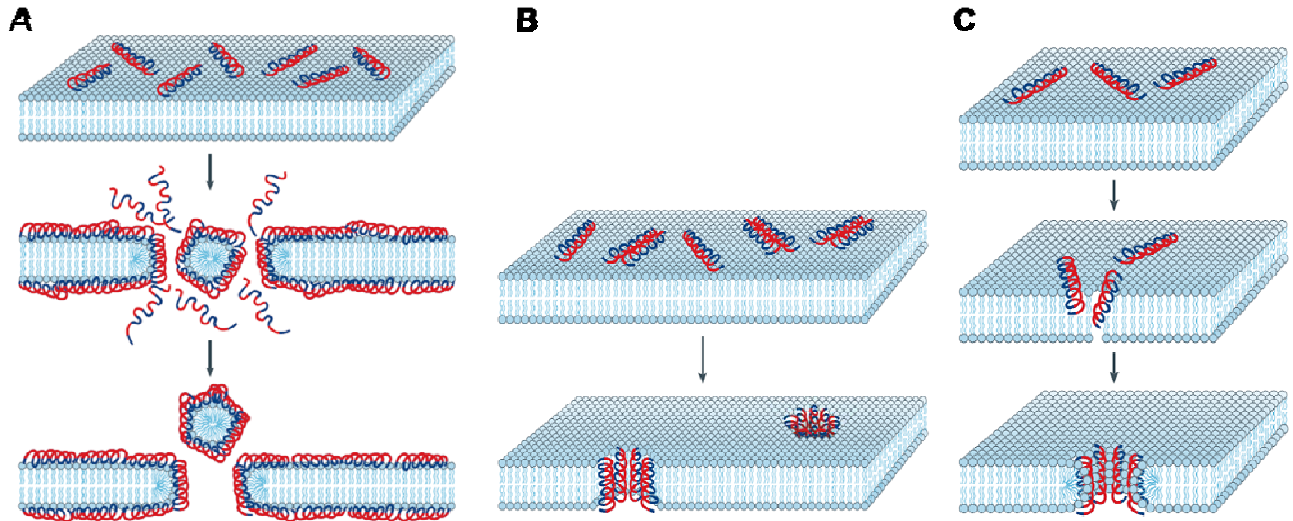


Fig III.1.4. Représentation schématique de différents mécanismes d'action des peptides antimicrobiens. (A) le modèle en tapis, (B) en douve de tonneaux et (C) en pores toroïdaux. En bleu sont présentés les résidus hydrophobes et en rouge les résidus hydrophiles. Adapté de la référence (30).

Dans le premier modèle (en tapis), les peptides se déposent parallèlement à la membrane et ne s'enfouissent que partiellement dans la bicouche. Lorsqu'une certaine concentration en peptide est atteinte, des amas peptidiques recouvrent la membrane cible comme un tapis et induisent une désorganisation locale et une rupture membranaire (**Fig III.1.4-A**) (31).

Dans le modèle pores en douves de tonneaux (**Fig III.1.4-B**), les parties hydrophobes du peptide s'insèrent plus profondément dans la membrane, repoussant ainsi les têtes polaires des phospholipides. Lorsqu'une certaine concentration en peptide est atteinte, ils s'orientent perpendiculairement à la membrane et s'internalisent comme les planches d'un tonneau en formant des pores dont la face interne est hydrophile (31). Pour que le peptide puisse traverser la membrane, 22 résidus sont nécessaires pour une hélice α tandis que 10 résidus sont suffisants pour un brin β .

Le troisième modèle (pores toroïdaux) est proche du modèle pores en douves de tonneaux, sauf que dans ce cas, les lipides font partie intégrante du pore (**Fig III.1.4-C**). Ce sont les têtes polaires des phospholipides qui s'orientent également lors du basculement des peptides perpendiculairement à la membrane. Ce modèle d'action est bien adapté à la magainine et les têtes polaires négatives des lipides viennent diminuer la répulsion électrostatique entre les peptides cationiques durant la formation du pore (32).

Les peptides antimicrobiens se comportent, suivant le modèle *detergent-like*, comme des molécules de détergent. Ce mécanisme d'action est dépendant de la concentration du peptide lui-même. A des faibles concentrations, le peptide forme des micelles, adsorbant des molécules de lipides et formant des pores transitoires. A des fortes concentrations, la membrane lipidique est complètement déstabilisée par le peptide, via l'un des modèles décrit précédemment (33).

Bien que certains peptides adoptent un mécanisme d'action bien spécifique plutôt qu'un autre, il est possible qu'un peptide utilise plusieurs de ces mécanismes pour conduire à la mort cellulaire.

Même si la majorité des membranes des microorganismes est négative, et que l'attraction électrostatique du peptide antimicrobien cationique avec la membrane constitue une étape cruciale pour le rapprochement des deux, certaines souches bactériennes sont naturellement résistantes à l'action des AMPs. Cette résistance est due à la complexité de la membrane de ces microorganismes, riche en phospholipides zwitterioniques ou non chargés. Ainsi, la force électrostatique entre les AMPs et la membrane est très variable selon la souche bactérienne (34). D'autres formes de résistance existent : certaines bactéries secrètent des composés anioniques et piègent ainsi les AMPs (35), ou secrètent des peptidases qui clivent les peptides au niveau des résidus cationiques (Lysine et Arginine) (36). Ces réponses constituent la résistance passive constitutive des microorganismes.

Chapitre 2 – Peptide K4 et membrane

Les peptides antimicrobiens sont des molécules actives, capable de se substituer aux antibiotiques classiques dans le cas des microorganismes multi-résistants. Ainsi, le développement de la synthèse chimique a permis de créer des nouveaux peptides (*de novo*), ayant des activités antimicrobiennes assez importantes et une faible cytotoxicité.

Néanmoins, le coût de la production de ces peptides thérapeutiques à grande échelle est bien plus élevé que celui des antibiotiques conventionnels. C'est pour cela que les AMPs sont encore très peu développés par des industries pharmaceutiques.

Dans une étude récente, *J. Henry* et son équipe ont créé un nouveau peptide cationique appelé « K4 ». Ce peptide de 14 acides aminés est organisé en deux domaines reliés par une proline. Le domaine N-terminal est composé de 4 lysines et la partie C-terminale est formée de résidus hydrophobes.

Après la synthèse et la production de K4, des dosages d'activités antibactériennes ont révélé une forte activité contre les bactéries gram positives et gram négatives, y compris les bactéries pathogènes humains tels que *Staphylococcus aureus*. Les tests de cytotoxicité contre les érythrocytes de lapin et de hamster ont révélé une absence d'hémolyse et une non toxicité de K4 pour les cellules de mammifère à des concentrations bactériolytiques (37).

Ainsi, le peptide K4 semble être un bon candidat pour de futures applications thérapeutiques, mais une compréhension plus profonde de son mécanisme d'action est nécessaire.

Dans le but de mieux comprendre comment ce peptide détruit les pathogènes, nous étudions les caractéristiques structurales de K4 et son comportement en présence des modèles membranaires. Durant sa thèse, *B. Legrand* a déterminé la structure du K4 par RMN, et a réalisé les études en présence des modèles lipidiques SUVs et micelles de détergents, en combinant différentes techniques telles que le dichroïsme circulaire (CD) et la diffusion de lumière (DLS).

En collaboration avec V. Vié, je me suis intéressé au comportement interfacial de ce peptide en absence ou en présence des lipides (interfaces air/eau ou lipide/eau), en utilisant la cuve de Langmuir et la microscopie à force atomique (AFM).



Structure and mechanism of action of a *de novo* antimicrobial detergent-like peptide

Baptiste Legrand^a, Mathieu Laurencin^b, Joe Sarkis^{a,d}, Emilie Duval^c, Liza Mouret^a, Jean-François Hubert^a, Murielle Collen^a, Véronique Vié^d, Céline Zatylny-Gaudin^c, Joël Henry^c, Michèle Baudy-Floc'h^b, Arnaud Bondon^{a,*}

^a RMN-ILP, UMR CNRS 6026, PRISM, Université de Rennes 1, CS 34317, Campus de Villejean, 35043 Rennes Cedex, France

^b ICMV, UMR CNRS 6226 Université de Rennes 1, 263 Avenue du Général Leclerc, 35042 Rennes Cedex, France

^c UMR 100 IFREMER PE2M, Université de Caen Basse Normandie, 14032, Caen Cedex, France

^d IPR, UMR CNRS 6251 Université de Rennes 1, 263 Avenue du Général Leclerc, 35042 Rennes Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 April 2010

Received in revised form 12 August 2010

Accepted 27 August 2010

Available online 15 September 2010

Keywords:

Antimicrobial peptide

Self-assembly

NMR

Circular dichroism

Detergent

Liposome

ABSTRACT

The K4 peptide (KKKKPLFGLFFGLF) was recently demonstrated to display good antimicrobial activities against various bacterial strains and thus represents a candidate for the treatment of multiple-drug resistant infections. In this study, we use various techniques to study K4 behaviour in different media: water, solutions of detergent micelles, phospholipid monolayers and suspension of phospholipid vesicles. First, self-assembly of the peptide in water is observed, leading to the formation of spherical objects around 10 nm in diameter. The addition of micelles induces partial peptide folding to an extent depending on the charge of the detergent headgroups. The NMR structure of the peptide in the presence of SDS displays a helical character of the hydrophobic moiety, whereas only partial folding is observed in DPC micelles. This peptide is able to destabilize the organization of monolayer membranes or bilayer liposomes composed of anionic lipids. When added on small unilamellar vesicles it generates larger objects attributed to mixed lipid–peptide vesicles and aggregated vesicles. The absence of calcein leakage from liposomes, when adding K4, underlines the original mechanism of this linear amphipathic peptide. Our results emphasize the importance of the electrostatic effect for K4 folding and lipid destabilization leading to the microorganisms' death with a high selectivity for the eukaryotic cells at the MIC. Interestingly, the micrographs obtained by electronic microscopy after addition of peptide on bacteria are also consistent with the formation of mixed lipid–peptide objects. Overall, this work supports a detergent-like mechanism for the antimicrobial activity of this peptide.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Antimicrobial peptides (AMPs) are essential components of the host innate defence of wide array of organisms and show potential as new therapeutic agents against multi-resistant bacterial pathogens [1–5]. Databases report over 1000 sequences for natural AMPs (<http://www.bbcm.univ.trieste.it> or <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), while several thousand other sequences have been designed *de novo* and produced synthetically to enhance biological activities and bioavailability [6]. Although they differ widely in terms of sequence, AMPs usually consists of 12–50 residues, of which around 50% are hydrophobic and several cationic (to target negatively charged bacterial surfaces), having the potential to adopt an amphipathic secondary structure when bound to cell membranes. Many AMPs kill bacteria by permeabilization of the cytoplasmic membrane whereas others penetrate into the cell and target additional anionic intracytoplasmic constituents (e.g., DNA, RNA, proteins, or cell wall

components) [7]. These modes of action require an interaction with the phospholipids within the cell membrane. The precise nature of AMP–membrane interactions remains controversial and actively debated. Numerous mechanisms have been proposed, including the barrel-stave pore [6], toroidal pore [8], aggregate [9], carpet-like [6] and detergent-like [10] models. All these models imply a first step corresponding to the interaction with the phospholipids of the membrane. This process has been shown to involve a highly dynamic association–dissociation mechanism for various peptides [11,12] inducing conformation changes of the bound peptides and possible self-association.

In a recent study, we described a particularly attractive *de novo* AMP that we called peptide K4 [13,14]. This 14 amino-acids peptide (KKKKPLFGLFFGLF) possesses a cationic polar head composed of four lysine residues and a lipophilic tail composed of ten hydrophobic residues. This linearly amphiphilic AMP exhibits a broad spectrum of antimicrobial activity on both Gram-positive and Gram-negative bacteria without hemolytic activity or cytotoxicity on eukaryotic cells at low minimum inhibitory concentration (MIC) levels. Moreover, we obtained images by scanning electron microscopy indicating that K4 kills bacteria by disrupting their cell membrane. We observed the

* Corresponding author. Tel.: +33 223236561; fax: +33 223234606.

E-mail address: arnaud.bondon@univ-rennes1.fr (A. Bondon).

presence of numerous spherical elements in the medium with a diameter ranging from 0.2 μm to 0.7 μm . We proposed that these spheres correspond to microsomes composed of lipids from bacterial membranes after cell lyses by K4.

To test this hypothesis and get a better understanding of how this peptide destroys the pathogen agents, K4 was studied in various media, using different techniques: circular dichroism (CD), turbidity measurements, fluorescence spectroscopy, transmission electron microscopy (TEM), atomic force microscopy (AFM) and NMR. In water solution, K4 exhibits self-assembly at high concentration, producing nanostructures that could be observed on TEM. The critical aggregation concentration (*cac*) of K4 was determined by pulsed-field gradient spin-echo NMR (PGSE-NMR). Then, we used SDS detergent, phospholipid monolayers and phospholipid liposomes to study K4 behaviour in membrane-mimetic media. The peptide folding, when added to either detergent or liposomes, was followed by CD. NMR was used to determine the solution structure of K4 in the presence of SDS micelles. From NMR data as well as from turbidity measurements and calcein leakage experiments, we obtain evidence that, in the presence of K4, the anionic SUVs self-aggregate without disruption until they precipitate at high peptide/lipid ratio. Using anionic films, AFM images revealed fast adsorption of K4 in the monolayer leading to its destabilization.

We propose that K4 may act as a surfactant in building mixed microsomes composed of peptides and lipids. This destabilization mechanism of the bacterial membrane supports the “detergent-like model” previously described [10].

2. Materials and methods

2.1. Sample preparation

The K4 peptide was synthesized as described elsewhere [14]. Sodium-dodecyl-sulfate (SDS) and dodecyl-phosphocholine (DPC) were purchased from Sigma Aldrich. For NMR experiments, deuterated SDS- d_{25} (Euriso-top) was used. The phospholipid small unilamellar vesicles (SUVs) were prepared by sonication of a multilamellar vesicle (MLV) solution, as previously described [15]. The MLV solution was obtained by evaporation of phospholipids in chloroform and then rehydrating the film of lipids thus obtained with water. The neutral SUVs contain 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) whereas anionic SUVs were prepared using DOPC and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-L-serine] (DOPS) (Avanti Polar Lipids). The large unilamellar vesicles (LUVs) used in turbidity measurements and calcein leakage experiments were obtained by extrusion through 1 μm and 80 nm pore membranes, respectively (Avanti Polar lipids).

2.2. Circular dichroism

Circular dichroism (CD) experiments were carried out using a JASCO J-815 spectropolarimeter (Easton, USA) equipped with a Peltier device for temperature control. The spectra were obtained in water using a 2 mm path length CD cuvette, at 20 °C, over a wavelength range of 195–260 nm. Continuous scanning mode was used, with a response of 0.5 s with 0.1 nm steps, a bandwidth of 1 nm, and a scan speed of 50 nm per min. The signal to noise ratio was improved by acquiring each spectrum over an average of two to twenty scans depending on the K4 concentration. Spectra were recorded at pH 5, at several peptide concentrations in different environments: water, SDS solution, SUVs of DOPC and SUVs of DOPC:DOPS 2:1 solutions. Finally, each peptide spectrum was corrected by subtracting the background (either water, SDS, DPC or liposome spectrum) from the sample spectrum.

2.3. Transmission electron microscopy

The sample of 10 mM K4 peptide was deposited on Formvar coated grids, negatively stained with uranyl acetate and observed with a Jeol (JSM 1011) transmission electron microscope equipped with a megaview III camera (SIS) at the Microscopy Centre of the University of Caen (CMABio).

2.4. Turbidity measurement

The absorbance of phospholipid vesicle suspensions upon additions of K4 was measured at 350 nm on a Jasco V-650 spectrophotometer. SUVs were used as well as 1 μm diameter LUVs with total lipid concentration from 0.1 to 2.4 mM. The influence of anionic polar lipid headgroups on the interaction with K4 was studied using SUVs composed of different DOPC:DOPS ratios. In all experiments water was used as reference.

2.5. Calcein leakage experiments

Calcein was encapsulated into DOPC:DOPS 2:1 liposomes by dissolving a 125 mM MLV preparation in a 20 mM TRIS-HCl buffer (pH 7.5) containing 4 mM calcein (Sigma Aldrich) to a final lipid concentration of 10 mM. Liposomes were obtained by extrusion 30 times through 80 nm pore membranes. Untrapped calcein molecules were then removed by size-exclusion chromatography using a Sephadex G75 column with TRIS-HCl 20 mM as elution buffer. Fluorescence measurements were carried out on a SPEX 112 spectrofluorometer (Jobin-Yvon) at 20 °C. Excitation wavelength was set to 495 nm and emission spectra were recorded from 500 to 600 nm, exhibiting a maximum intensity at 515 nm. The emission fluorescence spectrum of the calcein-loaded vesicles was first recorded as a baseline. We used a 0.3 mM liposome preparation, which provides a convenient fluorescence intensity level. Total amount of calcein release was determined by adding 1.5 mM Triton X-100 to this solution, dissolving the lipid membrane without interfering with the fluorescence signal. Several additions of K4 peptide were carried out on 0.3 mM liposome preparations. Each experiment was three times reproduced.

2.6. Atomic force microscopy

A monolayer experimental system was used to experimentally observe the assembly behaviour of K4 peptide with lipid, and the transferred film was observed by AFM to investigate its structure on the air/water or lipid/water interface [16,17]. AFM imaging of Langmuir–Blodgett films (LB films) was performed in contact mode using a Pico-plus atomic force microscope (Agilent Technologies, Phoenix, AZ) under ambient conditions with a scanner of $10 \times 10 \mu\text{m}^2$. Topographic images were acquired in constant force mode using silicon nitride tips on integral cantilevers with a nominal spring constant of 0.06 N/m. Samples for imaging were obtained using the Langmuir–Blodgett technique from Langmuir films.

2.6.1. Peptide on air/water interface

K4 solution was spread onto the interface, using a high-precision Hamilton microsyringe. The variation of surface pressure was measured using a Wilhelmy plate. After stabilization, the surface pressure was around 12 mN/m. The Langmuir film was transferred on freshly cleaved mica plates at constant surface pressure by raising (2 mm/min) the mica vertically through the air/water interface.

2.6.2. Peptide on lipid/water interface

A computer controlled system of user-programmable Langmuir troughs (Nima Technology, Cambridge, UK), equipped with two movable barriers, was used for the surface pressure measurements.

Lipid mixture of 1,2-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) and 1,2-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG) (1:1 in chloroform/methanol) was gently deposited at the air/water interface of mQ water subphase. These saturated lipids were chosen because the DOPC:DOPS monolayer was unstable on the air/water interface. After 10 min to allow for evaporation of the solvent, lipid films of DPPC–DPPG lipid mixture were compressed by moving barriers at a rate of 8 cm²/min and then equilibrated at the desired surface pressure of 29 mN/m. After stabilization, the K4 peptide was injected into the subphase using a microsyringe. The final concentration of the peptide in the trough was 60 μM. The surface pressure recording started at the same time as peptide injection into the subphase. The increase of surface pressure due to adsorption of the peptide onto the monolayer was recorded continuously as a function of time. The accuracy of surface pressure values was found to be better than 0.5 mN/m. After stabilization of the surface pressure (final surface pressure = 34.5 mN/m), the Langmuir film was transferred on freshly cleaved mica plates at constant surface pressure by raising (2 mm/min) the mica vertically through the lipid/water interface. Images were obtained from at least three samples prepared on different days with at least three macroscopically separated areas in each sample.

2.7. NMR spectroscopy

2.7.1. ¹H NMR

NMR samples for ¹H 1D spectra and 2D structural study spectra typically contain 1–2 mM K4 dissolved in H₂O:D₂O (90:10) or were prepared as micellar solutions containing 50 mM SDS d-25 (Euriso-top). To improve the signal visibility, the pH was adjusted to 5 and the temperature varied from 283 to 323 K, according to the media. Spectra were recorded on a Bruker Avance 500 spectrometer equipped with a 5 mm triple-resonance cryoprobe (¹H, ¹³C and ¹⁵N). Homonuclear 2D spectra DQF-COSY, TOCSY (MLEV) and NOESY were recorded in phase-sensitive mode using the States-TPPI method as data matrices consisting of 256–400 (*t*₁) × 2048 (*t*₂) complex data points; 48 scans were carried out per *t*₁ increment with 1.5 s recovery delay and spectral width of 6009 Hz in both dimensions. The mixing times were 100 ms for the TOCSY; 100, 150 and 200 ms for the NOESY experiments. Spectra were processed with Topspin (Bruker Biospin) or the NMRpipe/NMRdraw [18] software package and visualized with Topspin or NMRview [19] on a Linux station. The matrices were zero-filled to 1024 (*t*₁) × 2048 (*t*₂) points after apodization by shifted sine-square multiplication and linear prediction in the F1 domain. Chemical shifts were referenced with respect to the water chemical shift.

2.7.2. Paramagnetic relaxation enhancement experiments

Titration experiments were carried out by stepwise additions of MnCl₂ from 1 and 10 mM stock solutions in water on a NMR sample containing 1 mM K4 and 50 mM SDS at pH 5. The relaxation enhancements were monitored by recording 1D spectra after each addition of the Mn²⁺ paramagnetic cations (concentrations of 0.02, 0.035, 0.06, 0.075, 0.11, and 0.17 mM). Two-dimensional TOCSY experiments were also collected as 256 (*t*₁) × 2048 (*t*₂) time-domain matrices over a spectral width of 4844 Hz, with 16 scans per *t*₁ increment and a mixing time of 80 ms.

2.7.3. ³¹P NMR

³¹P NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 500 spectrometer equipped with a 5 mm BBO probe. A solution of 20 mM of DOPC:DOPS (2:1) SUVs in H₂O:D₂O (90:10), at pH 5 was used and spectra were recorded at 313 K for different K4 concentrations corresponding to 1/40 and 1/20 peptide to lipid ratios. At ratio 1/10, no phosphorus peak could be detected due to severe broadening.

2.7.4. Pulsed-field gradient spin-echo experiments

The pulsed-field gradient spin-echo NMR (PGSE-NMR) method [20,21] was used to measure the self-diffusion of K4 at different concentrations in H₂O:D₂O (90:10). Experiments were carried at 303 K and 323 K on the latter spectrometer. NMR signals give rise to exponential decays in the diffusion spectra, and the apparent translational diffusion coefficients were obtained with Topspin (Bruker Biospin) by fitting the following equation to the NMR data:

$$\ln \frac{I}{I_0} = -D\gamma^2 g^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) \quad (1)$$

with *I* and *I*₀ representing the measured and maximum intensities, respectively, *D* the translational diffusion coefficient, γ the ¹H gyromagnetic ratio, *g* the gradient strength, δ the pulsed-field gradient duration and Δ the diffusion delay time [22]. The gradient strength was varied from 0.007 to 0.32 Tm⁻¹ in 16 steps, Δ was 50 ms in all experiments and values of 3.2 and 10 ms were used for δ when following respectively the water and the lipids signals, in this latter case water suppression with a watergate sequence was used. The K4 self-diffusion coefficients were obtained by calculating the mean values between coefficients measured from two groups of resonances, covering ¹H distributed along the whole peptide, the first group corresponding to the Leu6–Leu9–Leu13 CH₃ resonances and the second one to the four lysines ϵ CH₂ and Phe7–Phe10–Phe11–Phe14 β CH₂ protons.

In addition, the translational diffusion coefficients of the anionic SUVs in the presence of increasing K4 concentrations were also determined. For this purpose, K4 was added on a solution of 12.5 mM DOPC:DOPS (2:1) SUVs in H₂O:D₂O (90:10), with the pH adjusted to 5 and at 298 K. K4 to lipid ratios 1/100 and 1/50 were used, giving rise to an increasing turbidity of the solution. Above the 1/20 ratio, lipid precipitation was observed. In all experiments the gradient strength was varied 0.007 to 0.32 Tm⁻¹ in 16 steps. In order to follow the water and the lipids signals, Δ was set 50 and 100 ms, respectively, and δ was set to 3.2 and 20 ms, respectively. Again, to measure the lipids signals, a watergate sequence was used for water suppression. Data were treated as described previously to obtain the lipids self-diffusion coefficients through the analysis of the signals of the choline CH₃ headgroups, of the CH₂ acyl chains and of the CH₃ acyl chains.

2.8. Structure calculations

¹H chemical shifts were assigned according to classical procedures. NOE cross peaks were assigned and integrated within the NMRView software. Structure calculations were performed with the ARIA 2.2 software [23]. The calculations were initiated using the default parameters of ARIA and a set of manually assigned NOEs. The torsion angles φ were restrained to $-60 \pm 40^\circ$ for ³J_{HN-HA} lower than 6 Hz. At the end of each run, violations and proposed assignment by ARIA were checked before starting a new run. This process was repeated until all the NOEs were correctly assigned and no restraints were rejected. A last run of 100 structures was performed, in which the set comprising the 20 lowest energy structures without any distance restraint violation greater than 0.3 Å, was considered as representative of the peptide structure. Representation and quantitative analysis of the calculated structures were performed using MOLMOL [24] and PyMOL (Delano Scientific) softwares.

3. Results

The K4 peptide is studied here by using various technical approaches, in various media, namely pure water, water in the presence of neutral or negative micelles and water in the presence of lipidic monolayers or liposomes of different compositions. The data

are presented for each technical approach and the discussion is then divided in three parts: we first discuss the peptide self-assembling propensity, the structure obtained in micelles is then presented and the last part focuses on the peptide interactions with phospholipids.

3.1. Circular dichroism

CD spectroscopy was used to investigate the secondary structure of K4 in different media (Fig. 1). The CD spectrum of the peptide dissolved in water is characteristic of a random coil structure and no modification of the profile is observed upon addition of various salts up to 100 mM of NaCl, NaHCO₃ or Na₂HPO₄ (data not shown). By contrast, as shown in Fig. 1, the K4 structure is dependent on the SDS micelle concentration. In the presence of 3 mM SDS we can observe a weak negative band at 225 nm and a strong positive band around 201 nm. This shape is characteristic of a β -turn [25]. At higher concentration (50 mM SDS), K4 CD spectrum exhibits an α -helical trend, with minimal mean residue molar ellipticity values at 208 and 222 nm and a maximum close to 195 nm. In the presence of 50 mM DPC neutral micelles, the poorly defined spectrum displays a weaker α -helical character. The effect of SUVs addition is also sensitive to the charge of the phospholipids. When adding pure neutral DOPC SUVs, the CD spectrum remains characteristic of a random coil conformation as observed in water. In contrast, the addition of anionic SUVs composed of DOPC:DOPS mixture induces strong changes in the CD spectrum leading to a shape similar to that obtained by the addition of 3 mM SDS. Attempt to increase the SUV concentration was limited due to the strong absorption of phospholipids which imposes a maximum of 0.5 mM SUVs. At this concentration, a clear transition toward an α -helical profile cannot be observed.

3.2. Transmission electronic microscopy

Fig. 2 shows the micrograph of a water solution of K4 peptide at 10 mM. While few fibres can be observed, most of the peptide is present as spherical self-assembled structures with a mean diameter of around 10 nm.

3.3. Turbidity measurements

Absorbance measurements of several liposome suspensions were performed upon successive additions of K4, providing information on the vesicles behaviour as absorbance increase with the medium turbidity. First, the role of the anionic phospholipid in the K4 action on vesicles was studied using different liposome preparations. No absorbance increase is observed when adding K4 on neutral DOPC SUVs at 0.5 mM (Fig. 3A) and 1 mM (data not shown). This result demonstrates the weakness of the interaction of K4 with zwitterionic lipids. In contrast, addition of K4 on 0.5 mM SUVs made of several DOPC:DOPS ratios induces strong increases of the turbidity, as displayed in Fig. 3A. The extent of this increase is related both to the peptide concentration and the anionic phospholipid content. However, for each lipidic composition if enough peptide is added the solution becomes completely opaque and the absorbance saturates. This turbidity increase is attributed to vesicle aggregation induced by the peptide. At low K4 concentration the observed smooth turbidity increase can be attributed to an increase of the vesicle size due to peptide incorporation. The shapes of the curves, corresponding to the absorbance versus the peptide concentration, are strongly dependent on the DOPS content. At DOPS amounts of 10% and 20% of the total lipids, solutions turn abruptly opaque at very low K4 concentrations, 12.5 and 20 mM, respectively. The corresponding peptide to lipid ratio are 1/40 for 10% DOPS and 1/25 for 20% DOPS. But, for DOPS amounts

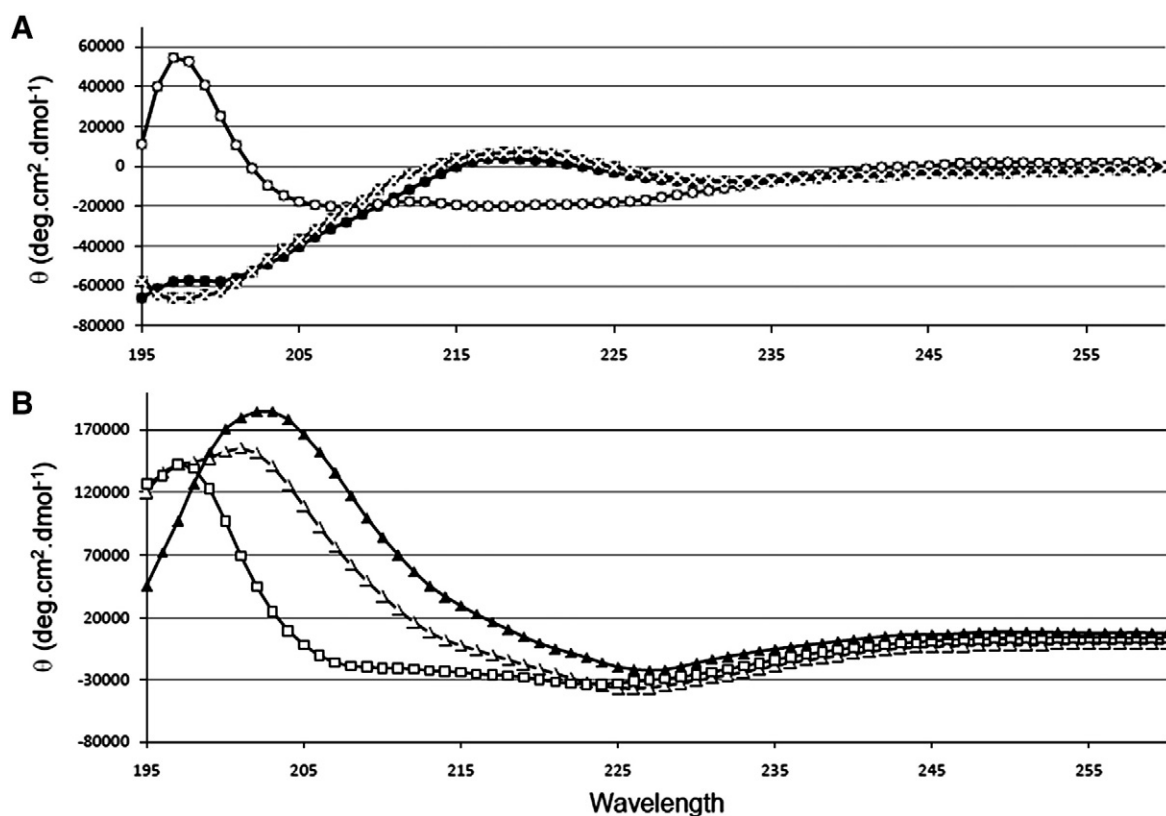


Fig. 1. 100 μM K4 peptide CD spectra in various media. (A) In water (open cross), in the presence of 0.5 mM neutral SUVs (black circles) and 50 mM DPC (open squares); (B) in the presence of 3 mM (open triangles) and 50 mM SDS (open squares) and 0.5 mM anionic SUVs (black triangles).

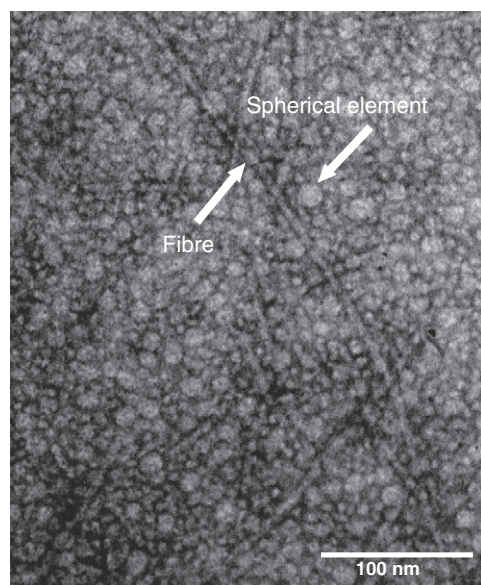


Fig. 2. Transmission electron micrograph of 10 mM K4 in water solution.

greater than 20% of total lipids, more K4 is needed for vesicle aggregation. Thus, anionic charges are required for the peptide to promote vesicle aggregation, but at high anionic phospholipid concentrations, electrostatic repulsion between vesicles probably interferes and competes with the peptide action. The high density of negative charges at the vesicle surface may also be responsible of the complete neutralisation of the K4 charges preventing aggregation.

Absorbance increase is also strongly related to the lipid concentration as shown in Fig. 3B, which displays the absorbance versus the peptide/lipid ratio. The experiment was performed using 0.5 mM DOPC:DOPS 70:30 SUVs. At this ratio, full absorbance saturation requires a peptide/lipid ratio of 0.09 (peptide at 45 μ M) and good sensitivity versus the total lipid concentration is observed. Indeed for SUVs with a concentration of 2.4 mM aggregation is observed for a ratio around 0.015 (peptide at 35 μ M) whereas lower SUV concentrations require a higher peptide/lipid ratio to start vesicle aggregation. This observation is consistent with a higher lipid concentration in favour of aggregation.

Experiments were also carried out on larger vesicles (LUVs of around 1 μ m diameter) giving the same conclusion (data not shown). A progressive absorbance increase is observed upon K4 additions and aggregation occurs at lower peptide/lipid ratio for high lipid concentration.

Overall these experiments strongly emphasize the role of lipid polar heads in the interaction with K4. It is also consistent with a former step of incorporation of peptide in the lipid bilayers followed with an aggregative process.

3.4. Calcein leakage experiments

All fluorescence spectra were recorded for 0.3 mM liposome preparations. An emission fluorescence intensity of 1.3 ± 0.2 rfu (relative fluorescence units, arbitrary) was obtained at 515 nm for the quenched calcein entrapped into the vesicles. Total amount of calcein release obtained by Triton X-100 addition gave rise to an increase of fluorescence emission up to 2.62 ± 0.1 rfu, as the self-quenching was relieved. Several additions of the K4 peptide were successively performed to obtain 1/100, 1/50, 1/12 and 1/4 peptide to lipid ratios, but did not give rise to any significant increase in the fluorescence intensities (lower than 0.2 rfu in all experiments) showing no calcein leakage upon peptide addition. Thus, the K4 peptide destabilizes the vesicles without perforating the membrane,

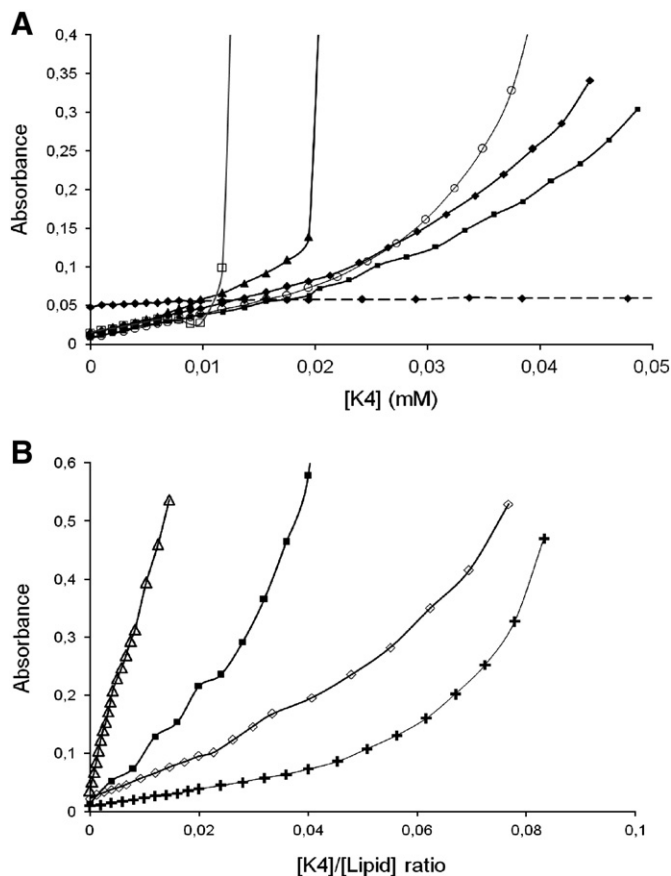


Fig. 3. Absorbance of liposome suspensions versus (A) K4 concentration or (B) peptide to lipid concentration ratios. For clarity, only the first steps of the absorbance increase are plotted. (A) DOPC SUVs at 0.5 mM (dashed line, black diamonds); DOPC:DOPS SUVs at 0.5 mM and 50:50 (black squares), 60:40 (black diamonds), 70:30 (open circles), 80:20 (open triangles) and 90:10 (open squares). (B) DOPC:DOPS 70:30 SUVs at 0.5 mM (cross symbols), 0.75 mM (open diamonds), 1 mM (black squares), and 2.4 mM (open triangles).

even at quite high concentrations. The absence of calcein leakage again points out that vesicle aggregation occurs upon peptide addition and suggests a specific mechanism of K4 which is not able to form pores in pure lipidic vesicles.

3.5. Atomic force microscopy

Atomic force microscopy was used to monitor the self-assembly of the peptide on the air–water interface, as well as the ordering of K4 with neutral (DPPC) and anionic lipid monolayer (DPPC:DPPG 80:20). The surface pressure of 29 mN/m was chosen from the literature as corresponding to a reasonable estimate of the surface pressure in biological membranes [26–29]. The data are presented in Fig. 4. On the air–water interface (Fig. 4A) the main information concerns the coarseness of the AFM image which is consistent with the presence of auto-assembled peptide structures. A few fibres can also be observed as previously encountered in the TEM micrograph. Such structures are also found in the AFM images obtained by allowing a K4 peptide solution to dry on mica surface (data not shown). When the peptide is injected under an anionic lipid monolayer (DPPC:DPPG), a high adsorption of the peptide to the monolayer can be observed through the increase of surface pressure recorded as a function of time (Fig. 1S, Supplementary data). With a high initial surface pressure ($\pi_i = 29$ mN/m), K4 penetrates easily into the monolayer and induces an increase of the surface pressure of 5.5 mN/m indicating that the peptide interacts with a high affinity for anionic membranes. AFM images (Fig. 4B–D) show a progressive

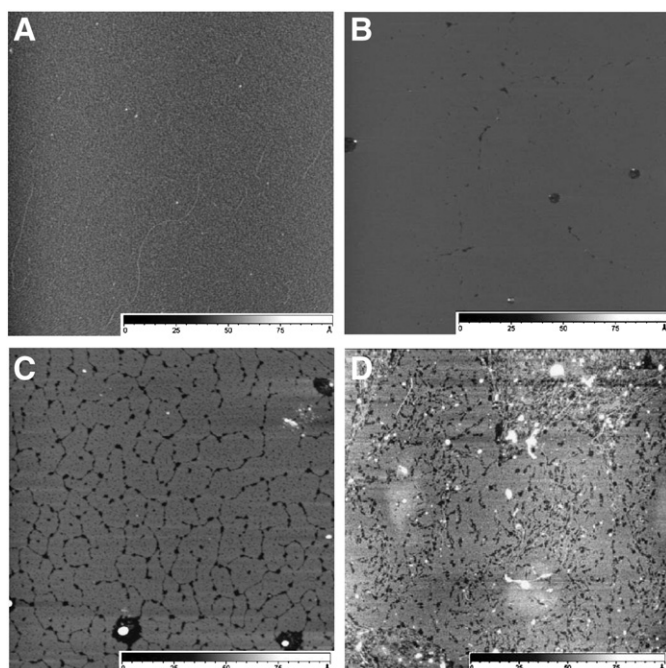


Fig. 4. AFM topographic images. (A) K4 peptide interfacial film transferred onto mica. (B) DPPC:DPPG (2:1) lipid monolayer at 29 mN/m. (C–D) Lipid/K4 monolayer at the end of adsorption of K4 at two different concentrations: (C) 60 μM and (D) 120 μM . For all images, scan size is $5 \times 5 \mu\text{m}^2$, and height scale is 10 nm.

destabilization of the lipid monolayer after K4 injection into the subphase. The higher the concentration of K4 injected, the more the monolayer is destabilized. Using zwitterionic DPPC monolayers at the same initial surface pressure, the adsorption of K4 is found to be lower ($\Delta\pi = 3.5 \text{ mN/m}$) than with previous anionic mixtures corresponding to a lower extent of penetration of the peptide (Fig. 2S, Supplementary data).

3.6. NMR spectroscopy and structure determination

We use proton 1D NMR to investigate the dependence of K4 structure on concentration in water, over a range of 2 to 20 mM (Fig. 5). Above 4 mM, we observe a severe broadening of all the peptide proton resonances. This broadening is associated with the ability of the K4 peptide to self-assemble at high concentration, while reversibility of the self-assembly is indicated by narrowing of the resonances obtained by dilution of the peptide. When looking in detail at the amide proton region, we note that this trend is more pronounced for the HN of residues localised in the hydrophobic tail. Hence, only the HN peaks of Lys3 and Lys4 are clearly observed for 20 mM K4 at 323 K. Further evidence for the self-assembly of K4 was obtained by measuring its diffusion coefficients (Fig. 6). The graphs exhibit a slope rupture around the concentration 5 mM. This behaviour appears to be quite similar as the one observed with surfactant molecules [30,31] and suggests a critical aggregation concentration (cac) above which the peptide is in a self-assembled form. Considering rapid exchange between free and self-assembled forms, the observed diffusion coefficient D is the mean value between that of free monomeric form D_{free} and aggregated form D_{agg} . This is usually described using the two-site exchange model [21].

$$D = \frac{C - cac}{C} D_{\text{agg}} + \left(1 - \frac{C - cac}{C}\right) D_{\text{free}} \quad (2)$$

with C the peptide concentration. The data obtained above 6 mM were fitted to this equation giving cac values of 5.3 mM and 5.5 mM and

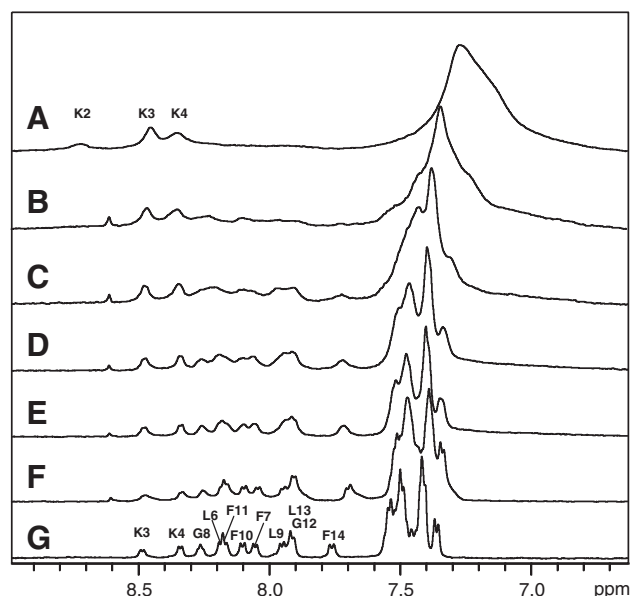


Fig. 5. Amide proton region of ^1H NMR spectra at 323 K, pH 5.0 ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$) of K4 at various concentrations. (A) 20 mM, (B) 12 mM, (C) 10 mM, (D) 8 mM, (E) 6 mM, (F) 4 mM and (G) 2 mM.

D_{agg} values of $0.8 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ and $0.9 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ at respectively 303 K and 323 K.

Given the Stokes–Einstein equation

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (3)$$

with D the diffusion coefficient of a particle, k_B the Boltzmann constant, T the temperature, η the viscosity and r the particle hydrodynamic radius, we then evaluated the aggregate size with

$$r_{\text{agg}} = r_{\text{H}_2\text{O}} \times \frac{D_{\text{H}_2\text{O}}}{D_{\text{agg}}} \quad (4)$$

with r_{agg} and $r_{\text{H}_2\text{O}}$ the hydrodynamic radii of the self-assembled peptide and the water, respectively. The $D_{\text{H}_2\text{O}}$ water diffusion coefficients at 303 K and 323 K were $2.89 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ and $4.57 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, respectively, and we used $r_{\text{H}_2\text{O}} = 0.11 \text{ nm}$. These values combined with the previous D_{agg} ones gave diameters of 8 and

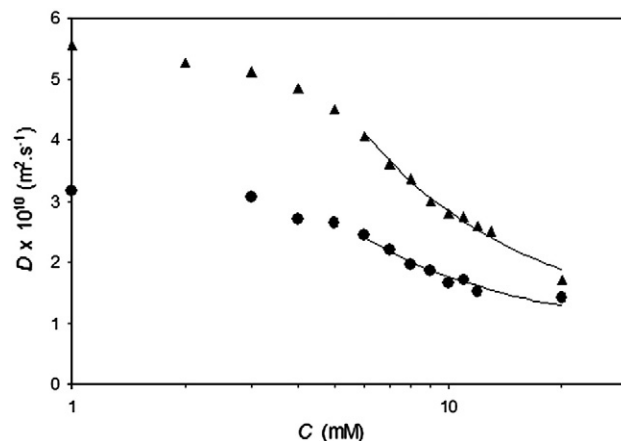


Fig. 6. Apparent diffusion translational coefficient (D) of the K4 peptide versus concentrations at 303 K (black circles) and 323 K (black diamond). Above 6 mM, the curves obtained by fitting Eq. (2) to experimental values are also shown (solid lines).

11 nm at 303 K and 323 K in good agreement with the TEM mean values of around 10 nm for the K4 self-assembled form.

1D spectra at a K4 concentration of 1 mM were recorded with increasing SDS concentrations (10, 20, 30, 50 and 200 mM, data not shown). No significant differences in terms of chemical shifts or line widths could be detected on the spectra with SDS at 50 and 200 mM. Thus the SDS concentration was set at 50 mM for the subsequent experiments corresponding to approximately 1.6:1 peptide to SDS micelle ratio assuming 60 SDS molecules by micelle [32]. The quality of the spectra is very good in water and SDS allowing us to assign nearly all the protons, despite the very close resonances of the methylene protons of the four lysines. The 2D spectra were acquired at 283 K in water, and at 293 K and 323 K in SDS detergent. The assignments, at 293 K and under the various studied conditions are presented in Tables 1S–3S in the Supplementary data.

In the presence of SDS micelles, most of the non-glycine residues in the hydrophobic tail, particularly Leu6, Phe7, Leu9, Phe10 and Phe11, exhibit $^3J_{\text{HN-HA}}$ coupling constants lower than 6 Hz. By contrast, in water, the amide proton $^3J_{\text{HN-HA}}$ coupling constants are all higher than 6 Hz. In agreement with the circular dichroism profiles, these results suggest that K4 does not adopt a characteristic structure in water, but is mainly helical in SDS detergent. The Pro5 appears to be in the *trans* conformation based on NOE patterns, since we can observe strong cross peaks between its H_{β} and the H_{α} and H_{β} of the Lys4, as well as very weak NOE between the proline H_{α} and the preceding H_{α} and H_{β} protons.

For the ARIA final run, the K4 peptide structures in the presence of SDS, are calculated using 213 distance restraints and 5 dihedral restraints (Table 4S, Supplementary data). The 20 lowest energy conformers, refined in a water shell, are represented in Fig. 7A. The global fold of the K4 peptide displays a well-ordered helical hydrophobic C-terminal moiety (6–14) and a disordered N-terminal region which contains the four lysines. The two parts are separated by the Pro5 residue which bends the peptide. Indeed, the backbone

RMSD on the whole structure is 2.40 Å and falls to 0.86 Å if the poorly defined N-terminal moiety is ignored. Table 4S, Supplementary data, reports the RMSD values of backbone and heavy atoms on different regions of the peptide. On the helical wheel projection (Fig. 7B), we can see that the residues are distributed side by side according to their type. *i.e.* one side of the helix is composed of the four phenylalanines, a second of the three leucines and another with the two glycines. Without being typically amphipathic this residue distribution generates a “hydrophobic gradient” around the helix. The Pro5 residue bends and projects the polar N-terminal head outside the helix normal at the opposite side of the Leu moiety (Fig. 7). The peptide size in SDS micelles is about 2 nm which is less than half that of the extended conformation (about 5–6 nm) as shown in Fig. 7C.

No major structures were obtained neither in water nor in DPC micelles. Calculations with ARIA did not converge due to the small number and the low intensities of the NOE cross peaks.

The ^{31}P spectra of the DOPC:DOPS (2:1) SUVs were recorded after addition of peptide. As shown in Fig. 8, a pronounced broadening of the resonances is observed suggesting a gradual increase of the vesicle size induced by addition of the peptide. This was further reinforced by the self-diffusion coefficients measurements of the anionic SUVs in the presence of increasing K4 concentrations. The lipid diffusion coefficients decrease from $4.4 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, without K4, to $3.0 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ at the 1/100 peptide to lipid ratio and then $2.7 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ at the 1/50 ratio, suggesting vesicle size increase. Above the 1/20 ratio, lipid precipitation was observed. These values are mean ones between the coefficients measured from the choline CH_3 headgroups, the CH_2 acyl chains and the CH_3 acyl chains resonances.

4. Discussion

Antimicrobial peptides offer an interesting way of developing new antibiotic molecules. Numerous parameters modulate both

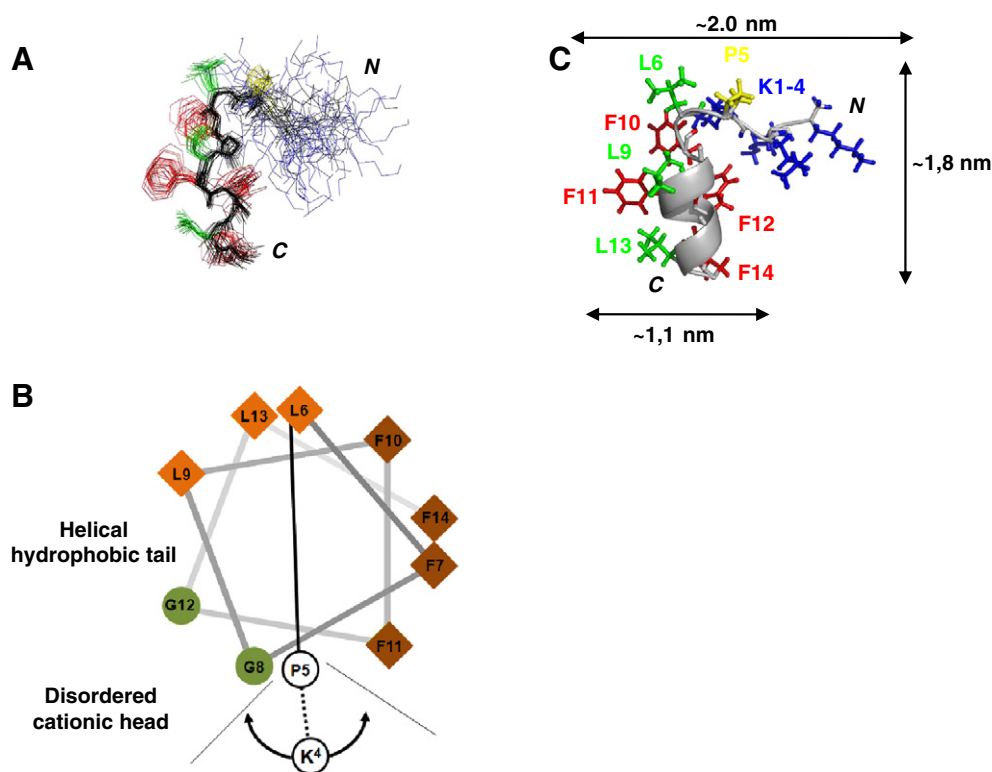


Fig. 7. Structures of K4 in the presence of 50 mM SDS micelles. (A) The 20 lowest energy structures of K4 derived from the 100 structures calculated in the final iteration of ARIA. The superposition was performed using the backbone atoms of residues 5–13. (B) Ribbon representation and sizes of the best structure of K4. The side chains are represented as stick (lysine in blue, proline in yellow, phenylalanine in red and leucine in green). (C) Helical wheel projection of the K4 peptide.

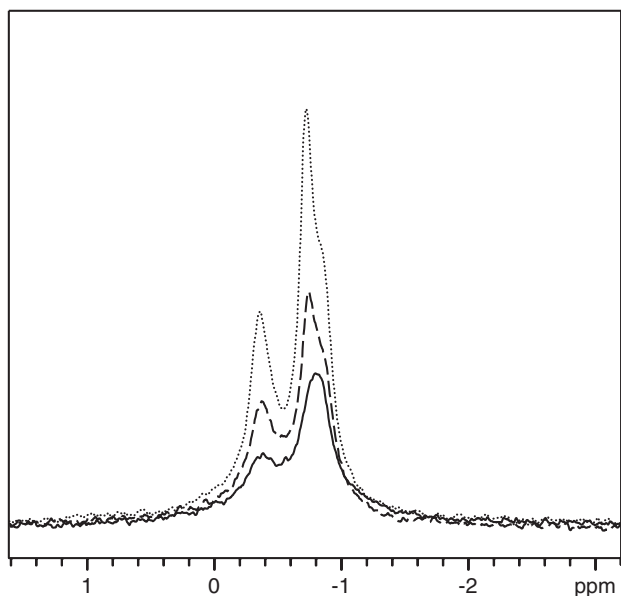


Fig. 8. ^{31}P NMR spectra of DOPC:DOPS (2:1) SUVs depending on the concentration of added K4 peptide: 20 mM SUVs alone (dotted line) and with a peptide/lipid ratio of 1:40 (dashed line) and 1:20 (continuous line).

antimicrobial and hemolytic activities including sequence, chain length, net positive charge, helical propensity, amphipathicity, hydrophobicity and hydrophobic moment [8,33–40]. Major improvements in the knowledge of the link between each of these variables and peptide activity allow us to the design *de novo* original active antimicrobial peptides. Thus, the peptide analysed in this study was constructed following several general rules using the Antimicrobial Peptide Database (APD: <http://aps.unmc.edu/AP/main.html>) [41]. The overall charge is cationic (+4), the C-terminal sequence is hydrophobic and comprises three leucine and four phenylalanine residues, and the hinge connecting the charged polar head and the hydrophobic segments is provided by a proline residue. This surfactant-like design is shown to be very efficient against several bacterial strains.

4.1. Self-assembling propensity

The K4 peptide is first studied in water by CD and NMR. At low concentration, no defined structure can be observed by CD, even in the presence of various salts which are able to induce a helical fold as encountered in the case of an amphipathic helix [42]. Proton NMR spectrum of K4 at low concentration is characteristic of the absence of any definite structure, whereas the increase of K4 concentration induces a severe broadening of all the peptide proton resonances in the NMR spectra. This broadening is associated with peptide aggregation; such an interpretation is further supported through the measurement of translational diffusion coefficients by pulsed-field gradient NMR experiments. We obtain a *cac* value of 5.3 mM at 303 K, while the estimated size of these auto-assembled objects is around 10 nm. In good agreement with the NMR data, we observe numerous spherical objects from 8 to 16 nm and few fibres on the TEM and AFM micrographs. K4 seems to promote the formation of micelles or vesicles. Unfortunately, the peptide concentration is too high to be studied by CD. Furthermore, NMR linewidths are too broad when the peptide is self-associated, preventing us from obtaining information on the K4 structure in this complex and on the self-assembly process. Based on the estimated size of the aggregate (10 nm), such large linewidths are consistent with slow dynamic behaviour between the monomeric and the aggregated peptide forms at the NMR chemical

shift timescale. This slow dynamic is probably due to a strong packing between the hydrophobic side chains of the hydrophobic tail. This hypothesis is further supported by the observation that the self-assembly line-broadening is less pronounced for the four lysine linewidths of the peptide polar head, which are probably less compact due to charge repulsion and their exposure to the solvent. Nevertheless, dilution of the aggregate leads to a well-defined proton spectrum that is characteristic of the monomeric form of the peptide, thus demonstrating the reversibility of the self-association.

Self-assembling properties have already been encountered for small cationic surfactant-like peptides [43–49]. Indeed, the molecular and chemical similarities between the detergents or lipids and these peptides may explain their ability to self-associate in micelles, vesicles or in more complex nanostructures such as nanotubes. Nevertheless, to our knowledge, no data are available on the interaction of these nano-objects with the phospholipids.

4.2. Structural studies in micelles

Then, to investigate the peptide behaviour in a hydrophobic environment, we performed structural studies using CD and NMR spectroscopy in the presence of detergents. SDS and DPC micelles are very suitable as anionic and neutral membrane models in NMR studies because of the small size of the micelles and their high dynamic behaviour [50]. The CD spectrum of K4 in the presence of anionic SDS micelles, at high concentration, exhibits a helical trend, showing that this peptide adopts a well-defined structure in this hydrophobic environment whereas it remains unfolded in water. In agreement with the CD profile, the NMR structure of K4 is mainly helical in the presence of SDS. Indeed, as shown by structure calculations the hydrophobic tail is a well-defined helix (6–14) starting at the proline in position 5, with a disordered poly-lysine polar head. When using a paramagnetic probe, this poly-K cationic head strongly influences the interaction between the MnCl_2 and the peptide preventing the complete location of the peptide in the micelle. However, the hydrophobic tail along the micelle surface is consistent with the observed relaxation enhancement. This C-terminal moiety is composed of strongly hydrophobic residues (four Phe and three Leu) with a residue-dependent distribution (Fig. 7B). Most of helical cationic AMPs such as magainin, cecropin, mellitin etc are composed of amphipathic helices. Hence, the mechanism of K4 cannot be related to many other helical peptides, whether natural or synthetic, which display amphipathicity along their helix structure.

Interestingly, in DPC micelles, the K4 CD profile exhibits a weaker helical pattern and ARIA structure calculations do not converge. This highlights the fact that the K4 conformation is less stable in the presence of zwitterionic micelles and shows the role of the charge to induce the folding of the hydrophobic tail. The presence of the proline and two glycines affects the helix stability. This result could explain the high selectivity and low hemolytic activity of the K4 peptide considering that most microorganisms possess an anionic membrane in contrast to the external leaflet of eukaryotic cells, which are mainly composed of zwitterionic lipids. Generally, if no relation between the degree of helicity and antimicrobial activity is observed, high helicity is often related with high hemolytic activity [51]. Proline has been demonstrated to contribute to the short helical AMPs selectivity since the substitution of a single proline residue can decrease its antimicrobial activity and significantly increase its hemolytic activity [40].

4.3. Interaction with phospholipids

Peptide–lipid membrane interaction is a critical step in the mode of action of antimicrobial peptides and, whether as monomer or oligomers, it is widely believed that a non-specific binding process is

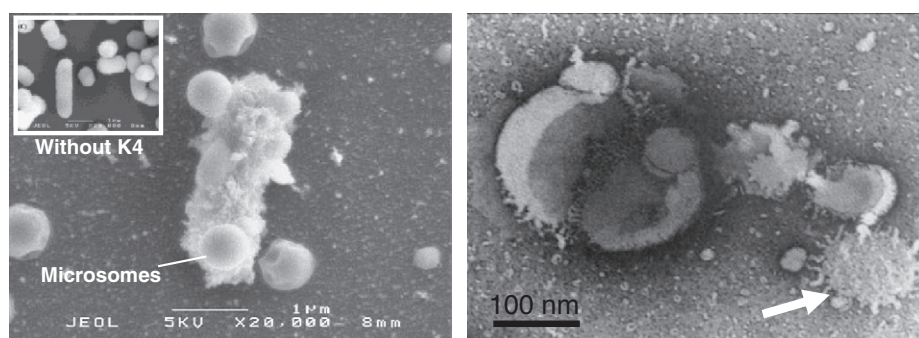


Fig. 9. Scanning electron micrographs of *E. coli* treated with K4. *E. coli* in mid-logarithmic growth was incubated with antibacterial peptide K4 for 2 h. Left: K4 was at a concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$, and the inset corresponds to untreated bacteria (adapted from [14]). Right: Phosphocholine liposomes with SDS detergent adapted from [57].

responsible for peptide antimicrobial activity. Because of its short helical tail composed of 9 residues, K4 is not long enough to span the membrane bilayers, thus preventing pore formation.

To mimic the membrane, we used phospholipidic monolayers and SUVs or LUVs of different phospholipid compositions at different zwitterionic to anionic phospholipid ratios. The CD profile of the K4 peptide in the presence of neutral SUVs (DOPC) indicates a random coil as observed in water solution. Interestingly, K4 spectra in the presence of anionic SUVs (DOPC:DOPS 2:1) have a quite different shape, with a minimum at 228 nm, which is typical of a β -turn CD profile [25]. According to the previous results obtained with detergents, this observation highlights the role of the anionic hydrophobic environment into stabilizing a particular K4 conformation. Nevertheless, the CD profile does not exhibit a typical α -helical structure as obtained in the presence of SDS micelles but is similar to the intermediary β -turn spectra recorded in the presence of SDS at concentrations lower than the *cac*. As pointed out previously, due to signal broadening, we were unable to carry out a proton NMR structural study of K4 in the presence of SUVs. However, information about the SUV-peptide interaction can be extracted from 1D ^{31}P NMR spectra. Thus, the addition of K4 peptide onto SUVs of negatively charged phospholipids induces progressive increase of the vesicle size as highlighted by ^{31}P NMR line-broadening and translational self-diffusion coefficients measured by NMR. This phenomenon was also observed by turbidity experiments as addition of small K4 amounts on anionic vesicles induces absorbance increase. Such a progressive increase of the vesicle size has already been observed when adding detergent on liposomes [52–54]. At higher concentration, depending both on the total lipid concentration and the anionic polar head content, K4 induces anionic vesicle aggregation as observed by absorbance measurements. No absorbance increase was observed with zwitterionic vesicles suggesting the absence or a very weak interaction with K4. The association of the peptide with phospholipids and membrane destabilization is also consistent with the AFM data, demonstrating a destabilization of the anionic phospholipid monolayer.

It cannot be excluded that those favourable electrostatic interactions with anionic phospholipids could induce a local increase of the peptide concentration and subsequent peptide aggregate formation. However, such a process is not necessary to account for the bilayer destruction. It has been demonstrated with SDS micelles that lipid-detergent association occurs with the detergent in a monomer form suggesting that micelle formation is not a prerequisite for the formation of mixed lipid-detergent microsomes. This monomeric mode of action of detergent is observed even when detergent concentration is higher than the *cac* value [55,56]. In the present case, the K4 peptide is active on bacteria at concentration below its *cac* value and interaction with the membrane should occur in the monomeric state.

About the precise mechanism of K4 action, the calcein leakage experiments permit to conclude on the absence of pores induced by K4. In such a case, a mechanism involving a bactericidal site of action located inside bacteria could be proposed. However, scanning electron micrographs of *E. coli* treated with K4 displayed particles presumably composed of lipids and peptides (Fig. 9). Such a behaviour is also observed when adding SDS on liposomes (Fig. 9). In both cases apparent mixed lipid-peptide and lipid-detergent microsomes are formed. The difference in the sizes of the observed mixed microsomes can be related to the sizes of the precursors; K4 was added on full sized bacteria [14] whereas SDS was added on liposomes [57]. Obviously, the formation of mixed lipids/peptides objects requires the disruption of the bacterial membrane and is not in agreement with the observed absence of calcein leakage in the present study. The simplest way to explain this is to take into account of the difference between pure lipid liposomes and more complex cellular membrane of bacteria.

Among the different mechanisms of action of antimicrobial peptides, we propose that K4 is associated with the membrane and follows a detergent-like mode of action which involves a first step closely related to the carpet-like mechanism when the peptide is interacting as a monomer. We suggest that this leads to the formation of mixed peptide/lipid microsomes.

5. Conclusion

This study deals with K4 peptide behaviour in various media, with the aim of getting more information on the mode of action of this *de novo* antimicrobial peptide. In random coil conformation at low concentration in water, we demonstrate the self-assembly propensity of this peptide in water solution. By contrast, in the presence of SDS micelles, K4 adopts a well-defined partially helical structure, involving the hydrophobic moiety, comprising the residues 6 to 14. The interaction of K4 with liposomes is highly sensitive to the lipid polar heads. Partial folding of the peptide and membrane destabilization only occurs with the presence of negatively charged lipids. This suggests that electrostatic interactions play a major role in the initial recognition and membrane binding of the peptide. The localisation of the charge on one side of the peptide, with a hydrophobic tail in the other region confers an overall shape of K4 closely related with the one of detergent such as SDS. This analogy is also consistent with the self-assembly propensity of the peptide in water solution. Furthermore, when added on liposomes, K4 behaves like a detergent by increasing the vesicle size. Finally, a model involving the formation of mixed peptide/lipid microsomes is consistent with the SEM micrographs observed when K4 is added on bacteria. This study represents a valuable addition to our understanding of the mechanism of action of detergent-like AMPs which are able to destabilize the bacterial membranes.

Acknowledgements

We thank the Région Bretagne and SERB pharmaceutical company for financial support. We also thank the IFR 140 for providing support to the research platforms Spectroscopies and PRISM, as well as the IFR ICORE 146 for its support of the Electron Microscopy Center at the University of Caen (CMABio) and Didier Goux for Electron Microscopy experiments. M.S.N. Carpenter post-edited the English style.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.bbamem.2010.08.020.

References

- [1] D. Andreu, L. Rivas, Animal antimicrobial peptides: an overview, *Biopolymers* 47 (1998) 415–433.
- [2] S. Buchoux, J. Lai-Kee-Him, M. Garnier, P. Tsan, F. Besson, A. Brisson, E.J. Dufourc, Surfactin-triggered small vesicle formation of negatively charged membranes: a novel membrane-lysis mechanism, *Biophys. J.* 95 (2008) 3840–3849.
- [3] R.M. Eppard, H.J. Vogel, Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action, *Biochim. Biophys. Acta* 1462 (1999) 11–28.
- [4] R.E. Hancock, D.S. Chapple, Peptide antibiotics, *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (1999) 1317–1323.
- [5] M. Zasloff, Innate immunity, antimicrobial peptides, and protection of the oral cavity, *Lancet* 360 (2002) 1116–1117.
- [6] Y. Shai, Mode of action of membrane active antimicrobial peptides, *Biopolymers* 66 (2002) 236–248.
- [7] K.A. Brogden, Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (2005) 238–250.
- [8] K. Matsuzaki, Y. Mitani, K.Y. Akada, O. Murase, S. Yoneyama, M. Zasloff, K. Miyajima, Mechanism of synergism between antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa, *Biochemistry* 37 (1998) 15144–15153.
- [9] M. Wu, E. Maier, R. Benz, R.E. Hancock, Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*, *Biochemistry* 38 (1999) 7235–7242.
- [10] B. Bechinger, K. Lohner, Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides, *Biochim. Biophys. Acta* 1758 (2006) 1529–1539.
- [11] P.F. Almeida, A. Pokorny, Mechanisms of antimicrobial, cytolytic, and cell-penetrating peptides: from kinetics to thermodynamics, *Biochemistry* 48 (2009) 8083–8093.
- [12] M.T. Lee, W.C. Hung, F.Y. Chen, H.W. Huang, Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphipathic peptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 5087–5092.
- [13] F.H.M. Baudy, G.C. Zatylny, J. Henry, E. Duval, M. Laurencin, Antimicrobial pseudopeptides, drug and pharmaceutical composition containing them, (Serb, Fr.; Centre National de la Recherche Scientifique Cnrs; Universite de Caen Basse Normandie), Application: FR, , 2009, 30 pp.
- [14] E. Duval, C. Zatylny, M. Laurencin, M. Baudy-Floc'h, J. Henry, KKKKPLFLFLFLFL: a cationic peptide designed to exert antibacterial activity, *Peptides* 30 (2009) 1608–1612.
- [15] G. Da Costa, S. Chevance, E. Le Rumeur, A. Bondon, Proton NMR detection of porphyrins and cytochrome c in small unilamellar vesicles: role of the dissociation kinetic constant, *Biophys. J.* 90 (2006) 55–57.
- [16] M. Eeman, A. Berquand, Y.F. Dufrene, M. Paquot, S. Dufour, M. Deleu, Penetration of surfactin into phospholipid monolayers: nanoscale interfacial organization, *Langmuir* 22 (2006) 11337–11345.
- [17] V. Vie, N. Van Mau, L. Chaloin, E. Lesniewska, C. Le Grimmelc, F. Heitz, Detection of peptide–lipid interactions in mixed monolayers, using isotherms, atomic force microscopy, and Fourier transform infrared analyses, *Biophys. J.* 78 (2000) 846–856.
- [18] F. Delaglio, S. Grzesiek, G.W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, A. Bax, NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes, *J. Biomol. NMR* 6 (1995) 277–293.
- [19] B.A. Johnson, R. Blevins, NMRVIEW: a computer program for the visualization and analysis of NMR data, *J. Biomol. NMR* 4 (1994) 603–614.
- [20] M.D. Pelta, H. Barjat, G.A. Morris, A.L. Davis, S.J. Hammond, Pulse sequences for high-resolution diffusion-ordered spectroscopy (HR-DOSY), *Magn. Reson. Chem.* 36 (1998) 706–714.
- [21] P. Stilbs, Fourier transform pulsed-gradient spin-echo studies of molecular diffusion, *Prog. NMR Spectrosc.* 19 (1987) 1–45.
- [22] C.S. Johnson, Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles, applications, *Prog. NMR Spectrosc.* (1999) 203–256.
- [23] J.P. Linge, S.I. O'Donoghue, M. Nilges, Automated assignment of ambiguous nuclear overhauser effects with ARIA, *Methods Enzymol.* 339 (2001) 71–90.
- [24] R. Koradi, M. Billeter, K. Wuthrich, MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures, *J. Mol. Graph.* 14 (1996) 51–55 29–32.
- [25] M. Crisma, G.D. Fasman, H. Balaran, P. Balaran, Peptide models for beta-turns. A circular dichroism study, *Int. J. Pept. Protein Res.* 23 (1984) 411–419.
- [26] A. Blume, A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers, *Biochim. Biophys. Acta* 557 (1979) 32–44.
- [27] R.A. Demel, W.S. Geurts van Kessel, R.F. Zwaal, B. Roelofsens, L.L. van Deenen, Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers, *Biochim. Biophys. Acta* 406 (1975) 97–107.
- [28] J.F. Nagle, Theory of lipid monolayer and bilayer phase transitions: effect of headgroup interactions, *J. Membr. Biol.* 27 (1976) 233–250.
- [29] M.C. Phillips, R.M. Williams, D. Chapman, On the nature of hydrocarbon chain motions in lipid liquid crystals, *Chem. Phys. Lipids* 3 (1969) 234–244.
- [30] V. Molinier, B. Fenet, J. Fitremann, A. Bouchu, Y. Queneau, PFGSE-NMR study of the self-diffusion of sucrose fatty acid monoesters in water, *J. Colloid Interface Sci.* 286 (2005) 360–368.
- [31] L. Perez, A. Pinazo, M. Teresa Garcia, M. Lozano, A. Manresa, M. Angelet, M. Pilar Vinardell, M. Mitjans, R. Pons, M. Rosa Infante, Cationic surfactants from lysine: synthesis, micellization and biological evaluation, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 1884–1892.
- [32] S. Balayssac, F. Burlina, O. Convert, G. Bolbach, G. Chassaing, O. Lequin, Comparison of penetratin and other homeodomain-derived cell-penetrating peptides: interaction in a membrane-mimicking environment and cellular uptake efficiency, *Biochemistry* 45 (2006) 1408–1420.
- [33] E. Glukhov, L.L. Burrows, C.M. Deber, Membrane interactions of designed cationic antimicrobial peptides: the two thresholds, *Biopolymers* 89 (2008) 360–371.
- [34] E. Glukhov, M. Stark, L.L. Burrows, C.M. Deber, Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 33960–33967.
- [35] M. Dathe, J. Meyer, M. Beyermann, B. Maul, C. Hoischen, M. Bienert, General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides, *Biochim. Biophys. Acta* 1558 (2002) 171–186.
- [36] M. Dathe, T. Wieprecht, Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1462 (1999) 71–87.
- [37] M. Dathe, T. Wieprecht, H. Nikolenko, L. Handel, W.L. Maloy, D.L. MacDonald, M. Beyermann, M. Bienert, Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides, *FEBS Lett.* 403 (1997) 208–212.
- [38] P.M. Hwang, H.J. Vogel, Structure–function relationships of antimicrobial peptides, *Biochem. Cell Biol.* 76 (1998) 235–246.
- [39] A. Tossi, C. Tarantino, D. Romeo, Design of synthetic antimicrobial peptides based on sequence analogy and amphipathicity, *Eur. J. Biochem.* 250 (1997) 549–558.
- [40] S.T. Yang, J.Y. Lee, H.J. Kim, Y.J. Eu, S.Y. Shin, K.S. Hahm, J.I. Kim, Contribution of a central proline in model amphipathic alpha-helical peptides to self-association, interaction with phospholipids, and antimicrobial mode of action, *FEBS J.* 273 (2006) 4040–4054.
- [41] Z. Wang, G. Wang, APD: the antimicrobial peptide database, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 590–592.
- [42] J. Johansson, G.H. Gudmundsson, M.E. Rottenberg, K.D. Berndt, B. Agerberth, Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 3718–3724.
- [43] S. Tsonchev, K.L. Niece, G.C. Schatz, M.A. Ratner, S.I. Stupp, Phase diagram for assembly of biologically-active peptide amphiphiles, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 441–447.
- [44] S. Vauthey, S. Santoso, H. Gong, N. Watson, S. Zhang, Molecular self-assembly of surfactant-like peptides to form nanotubes and nanovesicles, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 5355–5360.
- [45] A.J. van Hell, C.I. Costa, F.M. Flesch, M. Sutter, W. Jiskoot, D.J. Crommelin, W.E. Hennink, E. Mastrobattista, Self-assembly of recombinant amphiphilic oligopeptides into vesicles, *Biomacromolecules* 8 (2007) 2753–2761.
- [46] X. Yan, Y. Cui, Q. He, K. Wang, J. Li, W. Mu, B. Wang, Z.C. Ou-Yang, Reversible transitions between peptide nanotubes and vesicle-like structures including theoretical modeling studies, *Chem. Eur. J.* 14 (2008) 5974–5980.
- [47] G. von Maltzahn, S. Vauthey, S. Santoso, S. Zhang, Positively charged surfactant-like peptides self-assemble into nanostructures, *Langmuir* 19 (2003) 4332–4337.
- [48] R.V. Ulijn, A.M. Smith, Designing peptide based nanomaterials, *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 664–675.
- [49] H. Xu, J. Wang, S. Han, J. Wang, D. Yu, H. Zhang, D. Xia, X. Zhao, T.A. Waigh, J.R. Lu, Hydrophobic-region-induced transitions in self-assembled peptide nanostructures, *Langmuir* 25 (2009) 4115–4123.
- [50] E. Strandberg, S.A. Ulrich, NMR methods for studying membrane-active antimicrobial peptides, *Concepts Magn. Res.* 23A (1994) 89–120.
- [51] Z. Oren, Y. Shai, Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin: structure–function study, *Biochemistry* 36 (1997) 1826–1835.
- [52] M. Cocera, O. Lopez, R. Pons, H. Amenitsch, A. de la Maza, Effect of the electrostatic charge on the mechanism inducing liposome solubilization: a kinetic study by synchrotron radiation SAXS, *Langmuir* 20 (2004) 3074–3079.
- [53] M.A. Parrearroyo, M.A. Urbaneja, F.M. Gofñi, Effective detergent/lipid ratios in the solubilization of phosphatidylcholine vesicles by Triton X-100, *FEBS Lett.* 302 (1992) 138–140.

- [54] U. Kragh-Hansen, M. le Maire, J.V. Moller, The mechanism of detergent solubilization of liposomes and protein-containing membranes, *Biophys. J.* 75 (1998) 2932–2946.
- [55] M. Cocera, O. Lopez, J. Estelrich, J.L. Parra, A. de la Maza, Kinetic and structural aspects of the adsorption of sodium dodecyl sulfate on phosphatidylcholine liposomes, *Langmuir* 16 (2000) 4068–4071.
- [56] M. Cocera, O. Lopez, J. Estelrich, J.L. Parra, A. de la Maza, Use of a fluorescence spectroscopy technique to study the adsorption of sodium dodecylsulfonate on liposomes, *Chem. Phys. Lipids* 109 (2001) 29–36.
- [57] A. de la Maza, J.L. Parra, Vesicle–micelle structural transitions of phospholipid bilayers and sodium dodecyl sulfate, *Langmuir* 11 (1995) 2435–2441.

Supplementary data to:

“Structure and Mechanism of Action of a *de novo* Antimicrobial Detergent-like Peptide”

Baptiste Legrand^a, Mathieu Laurencin^b, Joe Sarkis^{a, c}, Emilie Duval[§], Liza Mouret^a, Jean-François Hubert^a, Murielle Collen^a, Véronique Vié^c, Céline Zatylny-Gaudin^d, Joël Henry^d, Michèle Baudy-Floc'h^b, Arnaud Bondon^{a*}

FIGURE 1S: Surface pressure variation after K4 injection under the lipidic monolayer (29 mN/m)

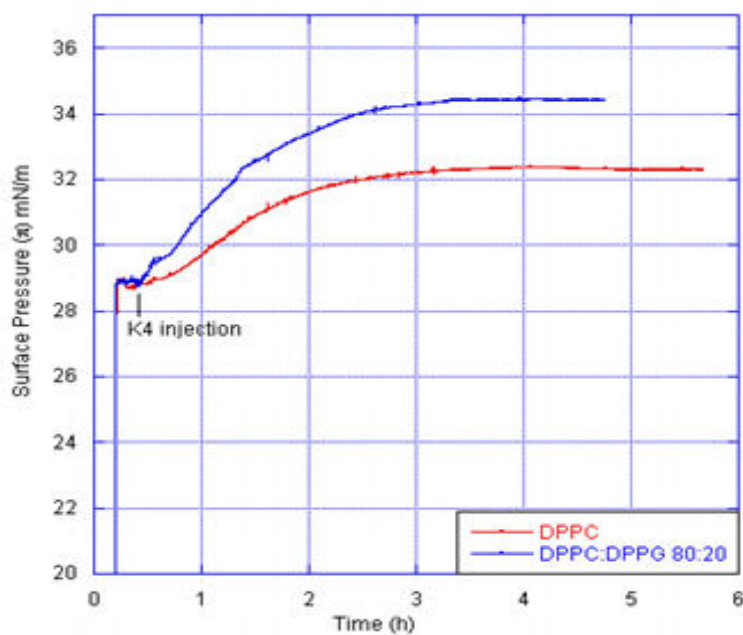


FIGURE 2S: Residual volumes of TOCSY cross-peaks of K4 after addition of 0.035 mM (in grey) and 0.075 mM (in black) MnCl₂. For each residue, the volume of residual HN-Ha cross-peaks were measured and compared to corresponding correlations on a reference TOCSY spectrum recorded with the same acquisition parameters in absence of paramagnetic probes.

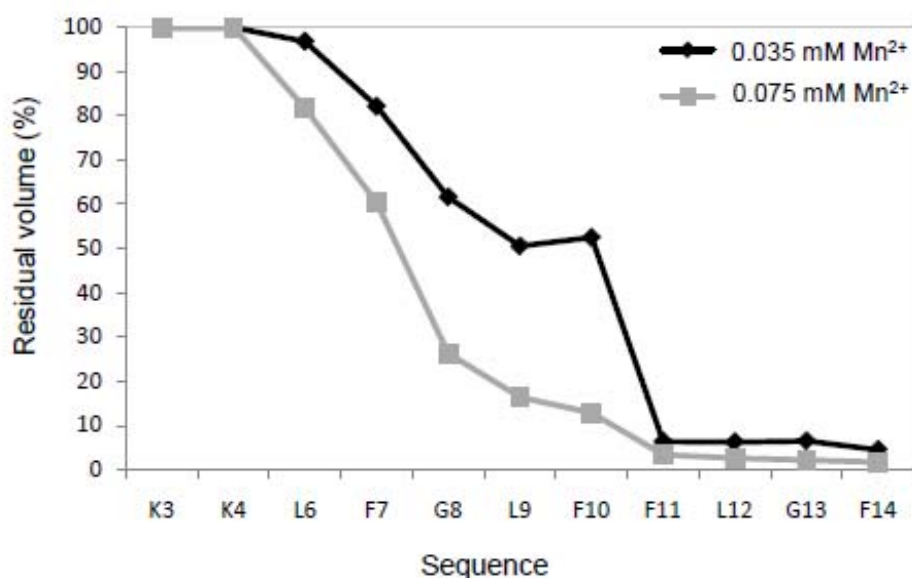


Table 1S: Chemical shifts of K4 peptide ¹H resonance in water.

AA	H ^N	H α	H β	Others
K1	no	3.73	1.17	γ CH ₂ 1.41; δ CH ₂ 1.62; ϵ CH ₂ 2.72; ζ NH ₂ no
K2	8.54	4.04	1.47	γ CH ₂ 1.17; δ CH ₂ 1.40; ϵ CH ₂ 2.69; ζ NH ₂ no
K3	8.37	4.00	1.37	γ CH ₂ 1.37; δ CH ₂ 1.44; ϵ CH ₂ 2.68; ζ NH ₂ no
K4	8.25	4.22	1.41	γ CH ₂ 1.15; δ CH ₂ 1.49; ϵ CH ₂ 2.68; ζ NH ₂ no
P5	-	4.05	1.88, 1.48	γ CH ₂ 1.25; δ CH ₂ 3.52, 3.28; ϵ CH ₂
L6	8.08	3.95	1.25, 1.13	γ CH 1.25; δ CH ₃ 0.59, 0.55
F7	7.87	4.34	2.85, 2.73	δ CH 6.94; ϵ CH 7.05; ζ CH nd
G8	8.08	3.61, 3.45		
L9	7.79	3.94	1.17, 1.04	γ CH 1.17; δ CH ₃ 0.59, 0.52
F10	7.97	4.29	2.76, 2.63	δ CH 6.86; ϵ CH 7.01; ζ CH nd
F11	8.00	4.24	2.84, 2.66	δ CH 6.95; ϵ CH 6.95; ζ CH 6.95
G12	7.63	3.55, 3.44		
L13	7.74	4.04	1.24, 1.18	γ CH 1.18; δ CH ₃ 0.61, 0.54
F14	7.49	4.15	2.88, 2.65	δ CH nd; ϵ CH nd; ζ CH nd

K4 peptide in H₂O:D₂O (90:10) at 283K and pH 5.

Table 2S: Chemical shifts of K4 peptide ¹H resonance 50 mM SDS.

AA	H ^N	H α	H β	Others
K1	no	3.98	1.800	γ CH ₂ 1.320; δ CH ₂ 1.600; ϵ CH ₂ 2.895; ζ NH ₂ no
K2	8.414	4.204	1.681	γ CH ₂ 1.355; δ CH ₂ 1.565; ϵ CH ₂ 2.855; ζ NH ₂ no
K3	8.060	4.160	1.658	γ CH ₂ 1.309; δ CH ₂ 1.549; ϵ CH ₂ 2.855; ζ NH ₂ no
K4	7.950	4.500	1.740, 1.600	γ CH ₂ 1.355; δ CH ₂ 1.565; ϵ CH ₂ 2.855; ζ NH ₂ no
P5	-	4.254	2.132	γ CH ₂ 1.840, 1.658; δ CH ₂ 3.587
L6	8.010	4.020	1.584, 1.300	γ CH 1.435; δ CH ₃ 0.758, 0.680
F7	7.730	4.220	3.060	δ CH 7.145 ; ϵ CH 7.080; ζ CH nd
G8	8.130	3.790, 3.710		
L9	7.660	3.990	1.557, 1.250	γ CH 1.420 ; δ CH ₃ 0.736, 0.650
F10	7.747	4.170	2.840	δ CH 6.810; ϵ CH 6.980; ζ CH nd
F11	7.940	4.260	2.850, 3.070	δ CH 7.187, 7.090; ϵ CH ; ζ CH
G12	7.790	3.840, 3.740		
L13	7.496	3.965	1.300, 0.965	γ CH 1.480; δ CH ₃ 0.683, 0.612
F14	7.226	4.287	2.655, 3.038	δ CH 7.050; ϵ CH 6.910; ζ CH nd

K4 peptide with 50mM SDS, (H₂O:D₂O 90:10) at 293K and pH 5.

Table 3S: Chemical shifts of K4 peptide ¹H resonance in 50 mM DPC.

AA	H ^N	H α	H β	Others
K1	no	3.953	1.842	γ CH ₂ 1.394; δ CH ₂ 1.648; ϵ CH ₂ 2.946; ζ NH ₂ no
K2	no	4.285	1.725	γ CH ₂ 1.392; δ CH ₂ 1.602; ϵ CH ₂ 2.909; ζ NH ₂ no
K3	8.482	4.239	1.717	γ CH ₂ 1.388; δ CH ₂ 1.648; ϵ CH ₂ 2.946; ζ NH ₂ no
K4	8.393	4.514	1.613	γ CH ₂ 1.415; δ CH ₂ 1.732; ϵ CH ₂ 2.886; ζ NH ₂ no
P5	-	4.360	2.146, 1.741	γ CH ₂ 1.925; δ CH ₂ 3.583, 3.749; ϵ CH ₂
L6	8.708	4.015	1.436, 1.615	γ CH 1.436; δ CH ₃ 0.834, 0.779
F7	8.409	4.361	3.115, 3.187	δ CH 7.208; ϵ CH 7.208; ζ CH 7.208
G8	8.188	3.861, 3.698		
L9	7.870	4.092	1.277, 1.522	γ CH 1.578; δ CH ₃ 0.810, 0.757
F10	7.871	4.317	3.045, 2.876	δ CH 7.027; ϵ CH 7.027; ζ CH 7.027
F11	7.996	4.316	2.972, 3.174	δ CH 7.208; ϵ CH 7,208; ζ CH 7.208
G12	8.077	3.870		
L13	7.697	4.068	1.561, 1.441	γ CH 1.171; δ CH ₃ 0.801, 0.748
F14	7.308	4.353	3.161, 2.813	δ CH 7.170; ϵ CH 7.170; ζ CH 7.170

K4 peptide with 50mM DPC, (H₂O:D₂O 90:10) at 293K and pH 5.

Table 4S: Structural statistics for the 20 best models of K4 bound to SDS micelles.

<u>Conformational restraints</u>		
Total:	213	
Non ambiguous:	104	
Ambiguous:	109	
Dihedrals restraints ($^3J_{\text{HNHA}}$)	5	
<u>Restraints violations</u>		
Distance restraints > 0,3 Å	0	
Dihedrals angle restraints > 5 Å	0	
<u>Energetic statistics (kcal.mol⁻¹)</u>		
E _{tot}	-322.90	
E _{vdw}	-108.20	
E _{elec}	-358.18	
E _{noe}	34.26	
<u>Ramachandran maps*</u>		
Residues in most favoured regions	82.2%	
Residues in additional allowed regions	16.1%	
Residues in generously allowed regions	1.7%	
Residues in disallowed regions	0%	
<u>Average RMSD (pairwise, Å)</u>		
	Backbone	All heavy atoms
Whole (1-14)	1.23	2.28
Helix (6-14)	0.42	0.82

* Ramachandran plots calculated using Procheck.

En conclusion, K4 est capable d'interagir avec les lipides membranaires. Cette interaction est sensible à la nature des têtes polaires des phospholipides ; la présence des lipides chargés négativement augmente l'interaction, grâce à des forces électrostatiques. Cela engendre un changement de conformation du peptide et une organisation de sa partie C-terminale en hélice.

La localisation de la charge sur une seule face du peptide (la partie N-terminale formée de 4 lysines) avec une queue hydrophobe de l'autre coté confère à K4 une forme relativement semblable à celle de détergents, tel que les molécules de SDS. Cette analogie est aussi compatible avec le potentiel d'auto-assemblage du peptide dans une solution aqueuse. De plus, lorsque des liposomes sont ajoutés au milieu, K4 se comporte exactement comme un détergent en augmentant la taille des vésicules. Enfin, le modèle impliquant la formation de peptide/microsomes lipidique est compatible avec les observations de microscopie électronique, lorsque K4 est ajouté sur les bactéries.

Cette étude représente un ajout précieux à notre compréhension du mécanisme d'action *detergent-like* des AMPs, capable de déstabiliser la membrane bactérienne.

RÉFÉRENCES

1. Andreu, D., and L. Rivas. 1998. Animal antimicrobial peptides: An overview. *Peptide Science* 47:415-433.
2. Hancock, R. E. W., and G. Diamond. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Microbiology* 8:402-410.
3. García-Olmedo, F., A. Molina, J. M. Alamillo, and P. Rodríguez-Palenzuela. 1998. Plant defense peptides. *Peptide Science* 47:479-491.
4. Skarnes, R. C., and D. W. Watson. 1957. Antimicrobial Factors of Normal Tissues and Fluids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 21:273-294.
5. Manwaring, W. H. 1942. Fleming's "Lysozyme". *Cal West Med* 56:5.
6. Rob, C. G. 1990. Use of penicillin for venereal disease in World War II. *Sex Transm Dis* 17:156-157.
7. Okuda, K., G. C. Edwards, and T. Winnick. 1963. Biosynthesis of Gramicidin and Tyrocidine in the Dubos strain of *Bacillus Brevis I*: Experiments with Growing Cultures. *J. Bacteriol.* 85:329-338.
8. Erspamer, G. F., and J. M. Cei. 1970. Biogenic amines and active polypeptides in the skin of *Leptodactylus vilarsi melin*. *Biochem Pharmacol* 19:321-325.
9. Lai, Y., and R. L. Gallo. 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in immunology* 30:131-141.
10. Kiss, G., and H. Michi. 1962. On the venomous skin secretion of the orange-speckled frog *Bombina variegata*. *Toxicon* 1:33-37.
11. Csordas, A., and H. Michl. 1969. Primary structure of two oligopeptides of the toxin of *Bombina variegata* L. *Toxicon* 7:103-108.
12. Habermann, E., and J. Jentsch. 1967. [Sequence analysis of melittin from tryptic and peptic degradation products]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 348:37-50.
13. Knoppel, E., D. Eisenberg, and W. Wickner. 1979. Interactions of melittin, a preprotein model, with detergents. *Biochemistry* 18:4177-4181.
14. Harwig, S. S. L., V. N. Kokryakov, K. M. Swiderek, G. M. Aleshina, C. Zhao, and R. I. Lehrer. 1995. Prophenin-1, an exceptionally proline-rich antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *FEBS Letters* 362:65-69.
15. Frank, R. W., R. Gennaro, K. Schneider, M. Przybylski, and D. Romeo. 1990. Amino acid sequences of two proline-rich batenecins. Antimicrobial peptides of bovine neutrophils. *Journal of Biological Chemistry* 265:18871-18874.
16. Willey, J. M., and W. A. van der Donk. 2007. Lantibiotics: Peptides of Diverse Structure and Function. *Annual Review of Microbiology* 61:477-501.
17. Kirschbaum, J., C. Krause, R. K. Winzheimer, and H. Brückner. 2003. Sequences of alamethicins F30 and F50 reconsidered and reconciled. *Journal of Peptide Science* 9:799-809.
18. Tsan, P., L. Volpon, F. o. Besson, and J.-M. Lancelin. 2007. Structure and Dynamics of Surfactin Studied by NMR in Micellar Media. *Journal of the American Chemical Society* 129:1968-1977.
19. Wieland, T. 1995. Peptides: synthesis, structures, and applications. Chapter 1: The History of Peptide Chemistry. (Gutte B,ed). Academic Press:1-38.
20. Wade, D., A. Boman, B. WÅyhlín, C. M. Drain, D. Andreu, H. G. Boman, and R. B. Merrifield. 1990. All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87:4761-4765.
21. Javadpour, M. M., M. M. Juban, W.-C. J. Lo, S. M. Bishop, J. B. Albery, S. M. Cowell, C. L. Becker, and M. L. McLaughlin. 1996. De Novo Antimicrobial Peptides with Low Mammalian Cell Toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry* 39:3107-3113.
22. Horne, W. S., C. M. Wiethoff, C. Cui, K. M. Wilcoxon, M. Amorin, M. R. Ghadiri, and G. R. Nemerow. 2005. Antiviral cyclic d,l-[alpha]-peptides: Targeting a general biochemical pathway in virus infections. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13:5145-5153.
23. Makovitzki, A., D. Avrahami, and Y. Shai. 2006. Ultrashort antibacterial and antifungal lipopeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:15997-16002.
24. Kamysz, E., O. Simonetti, O. Cirioni, D. Arzeni, G. Ganzetti, A. Campanati, A. Giacometti, E. Gabrielli, C. Silvestri, W. Kamysz, A. Offidani, and F. Barchiesi. In vitro activity of the lipopeptide PAL-Lys-Lys-NH₂, alone and in combination with antifungal agents, against clinical isolates of *Candida* spp. *Peptides* 32:99-103.

ANNEXE : LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

25. Strom, M. B., B. E. Haug, M. L. Skar, W. Stensen, T. Stiberg, and J. S. Svendsen. 2003. The Pharmacophore of Short Cationic Antibacterial Peptides. *Journal of Medicinal Chemistry* 46:1567-1570.
26. Odds, F. C., A. J. P. Brown, and N. A. R. Gow. 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in Microbiology* 11:272-279.
27. Yeaman, M. R., and N. Y. Yount. 2003. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews* 55:27-55.
28. Matsuzaki, K. 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1462:1-10.
29. Park, C. B., H. S. Kim, and S. C. Kim. 1998. Mechanism of Action of the Antimicrobial Peptide Buforin II: Buforin II Kills Microorganisms by Penetrating the Cell Membrane and Inhibiting Cellular Functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244:253-257.
30. Brogden, K. A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Micro* 3:238-250.
31. Shai, Y. 2002. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 66:236-248.
32. Murzyn, K., and M. Pasenkiewicz-Gierula. 2003. Construction of a toroidal model for the magainin pore. *Journal of Molecular Modeling* 9:217-224.
33. Bechinger, B., and K. Lohner. 2006. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1758:1529-1539.
34. Sahly, H., S. Schubert, J. Harder, P. Rautenberg, U. Ullmann, J. Schroder, and R. Podschun. 2003. Burkholderia Is Highly Resistant to Human Beta-Defensin 3. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1739-1741.
35. Nichols, W. W., S. M. Dorrington, M. P. Slack, and H. L. Walmsley. 1988. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:518-523.
36. Bachrach, G., H. Altman, P. E. Kolenbrander, N. I. Chalmers, M. Gabai-Gutner, A. Mor, M. Friedman, and D. Steinberg. 2008. Resistance of Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 to Direct Killing by Antimicrobial Peptides Is Protease Independent. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:638-642.
37. Duval, E., C. Zatylny, M. Laurencin, M. Baudy-Floc'h, and J. Henry. 2009. KKKKPLFGLFFGLF: A cationic peptide designed to exert antibacterial activity. *Peptides* 30:1608-1612.

RÉSUMÉ

La caractérisation de l'interaction de différentes biomolécules avec les lipides constitue une étape cruciale pour la compréhension du comportement et du mode d'action de ces molécules avec les membranes cellulaires. Nous présentons ici des études biomimétiques d'une protéine musculaire. Des modèles membranaires et des méthodes biophysiques ont été utilisées.

La dystrophine est une protéine filamenteuse essentielle pour le fonctionnement musculaire. Son absence ou sa modification suite à des mutations sont responsables de myopathies. Dans cette étude, nous avons analysé les propriétés de certaines répétitions homologues à la spectrine du domaine central de la dystrophine. Nous caractérisons les interactions spécifiques de deux sous domaines constitués des répétitions 1 à 3 et 20 à 24 avec les lipides. Nous montrons d'autre part, que l'interaction et l'organisation des répétitions 11 à 15 avec des membranes anioniques et zwitterioniques sont modulées par la courbure membranaire et le *packing* lipidique.

L'analyse de propriétés rhéologiques de surface montre que les répétitions 11 à 15 forment un lien fonctionnel entre la membrane et les filaments d'actine du cytosquelette. Cette liaison mécanique contribuerait *in vivo* au rôle d'amortisseur de chocs attribué à la dystrophine lors des cycles de contractions-relaxations musculaires.

Dans une dernière partie de ce travail, nous avons étudié la relation structure-activité d'un "de novo" peptide antimicrobien, K4. Nous identifions un mécanisme d'action de type *detergent-like*, conférant l'activité antimicrobienne.

Mots-clés: Dystrophine, répétitions homologues à la spectrine, modèles membranaire, actine, interaction lipide-protéine, peptide antimicrobiens.

ABSTRACT

The characterization of the interactions of different biomolecules such as proteins and peptides with lipids, constitute a crucial step for better understanding the behavior and mechanisms of action of such molecules with cell membranes. We present here biomimetic studies of a muscular protein by using different membrane models and biophysical methods.

Dystrophin is a long filamentous protein essential to skeletal muscle function. Its deficiency or mutated forms are responsible of muscular dystrophies. In the present study, we analyzed the properties of different spectrin like repeats from the dystrophin central domain. We characterized the specific interactions of two different subdomains constituted by the repeats 1 to 3 and 20 to 24 with lipids. We further show that the interaction and the organization of the repeats 11 to 15 with both anionic and zwitterionic membranes are modulated by lipid curvature as well as by lipid packing.

Surface rheology measurements show that repeats 11 to 15 constitute a functional link between the membrane and cytoskeletal actin filaments. This mechanical bridge could contribute *in vivo* to the shock absorber function of dystrophin during contraction-relaxation cycles in muscle cells.

In the last part of this work, we studied the structure-activity relationship of a "de novo" antimicrobial peptides K4. We identify a detergent-like mechanism for the antimicrobial activity of this peptide.

Keywords: Dystrophin, spectrin-like repeats, membrane models, actin, lipid-protein interaction, antimicrobial peptides.