



UNIVERSITÉ D'ORLÉANS



**ÉCOLE DOCTORALE
SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT**

CENTRE de BIOPHYSIQUE MOLECULAIRE d'ORLÉANS
Equipe « RMN des Biomolécules : Structure, dynamique et interactions »

THÈSE présentée par :
Violette SENILLE

Soutenue le : **23 Novembre 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Biologie

**Etude structurale et fonctionnelle
du fragment d'adressage mitochondrial de la mitogaligine**

THÈSE dirigée par :

Céline LANDON

Chargée de Recherche, CNRS Orléans

RAPPORTEURS :

Françoise GUERLESQUIN

Olivier LEQUIN

Directeur de Recherche, CNRS Marseille

Professeur, Université Pierre et Marie Curie Paris 6

JURY :

Alain LEGRAND

Professeur, Université d'Orléans

Président du jury

Françoise GUERLESQUIN

Directeur de Recherche, CNRS Marseille

Olivier LEQUIN

Professeur, Université Pierre et Marie Curie Paris 6

Marie-Christine AVERLANT-PETIT

Chargée de Recherche, CNRS Nancy

Céline LANDON

Chargée de Recherche, CNRS Orléans

Remerciements

Merci tout d'abord à Céline Landon, qui a accepté de me confier ce travail de thèse et a dirigé mes recherches. Toutes ces années n'ont pas toujours été un long fleuve tranquille, mais elles ont été riches en expériences et en belles rencontres, tant scientifiques que personnelles. Pour tout cela, merci encore.

Merci aux autres membres du jury, M. Lequin, Mme Averlant-Petit, M. Legrand et Mme Guerlesquin, pour avoir accepté de juger mon travail. Un merci particulier à Françoise Guerlesquin, car je ne serai pas venue à Orléans si je n'avais pas découvert et apprécié la RMN en passant par ton équipe.

Merci aux différents financeurs de ce projet : le CNRS et la Région Centre pour ma bourse de doctorat, la Ligue contre le cancer pour le projet Mitogaligine et le réseau TGIR pour les expériences de RMN à Bordeaux.

Merci à tous les collaborateurs du projet mitogaligine. Merci à Agnès Delmas et son équipe pour m'avoir initiée aux joies de la synthèse chimique et de la purification HPLC, et merci notamment à Dominique Lelièvre pour avoir répondu à toutes mes questions. Merci à toute l'équipe d'Alain Legrand qui m'a accueillie pour la production de la mitogaligine, et merci notamment à Martine Dubois pour avoir fait pousser tout pleins de bactéries et Thierry Normand pour avoir encadré mon travail de monitorat. Merci à Sandrine Villette pour m'avoir épaulée dans les expériences de Dichroïsme Circulaire et de Fluorescence. Merci à David Gosset pour avoir micro-injecté toutes ces cellules à toute heure de la journée. Merci à Guillaume Gabant pour avoir toujours accepté mes échantillons. Merci à Erick Dufourc et son équipe pour m'avoir fait découvrir la RMN solide, et merci notamment à Cécile Courrèges pour avoir rendu si agréables mes différents séjours à Bordeaux.

Merci à tous les membres de l'équipe de RMN des biomolécules du CBM pour les coups de mains au niveau scientifique, mais également pour avoir su créer une ambiance de travail très agréable. Merci à Hervé Meudal qui a gentiment partagé son bureau et m'a fait rechauffer les chaussons d'escalade. Merci à Françoise Keita-Paquet, notamment pour avoir pris le relais quand Céline n'étais pas là. Merci à Karine Loth pour les relectures et les parties de tennis. Merci à tous les autres membres de l'équipe, passés et présents, notamment Laurence Jouvensal, Fanny Meindre et Rémy Le Meur, pour les discussions autour des pauses café gourmandes.

Merci à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer au cours de ces années. Merci à Samia Aci-Sèche pour toutes nos discussions et nos sorties cinéma, jouer le taxi m'a permis de me faire une très bonne amie. Merci à Norbert Garnier, Bertrand Castaing et Franck Coste, pour avoir sonné quotidiennement le départ pour la cantine et faire des repas de midi de très bons moments. Merci aux doctorants, post-doctorants, stagiaires, que j'ai pu rencontrer et qui sont trop nombreux pour être tous cités.

Enfin, merci à toute ma famille pour m'avoir encouragée à écrire cette belle histoire.

Table des Matières

Liste des abréviations	9
Objectifs de thèse.....	13
PARTIE A. Introduction	15
A.1 Le phénomène d'apoptose.	15
A.1.1 La mort cellulaire programmée, nécessaire à la vie.....	15
A.1.2 Un équilibre fragile entre prolifération et mort cellulaire.	16
A.1.3 Différentes voies mènent à l'apoptose.	16
A.2 La voie intrinsèque des mitochondries.....	19
A.2.1 La mitochondrie, un organe bien particulier.	19
A.2.2 L'apoptose mitochondriale, un processus en deux étapes.....	25
A.2.3 Régulation de l'apoptose par la famille Bcl-2.....	30
A.3 La mitogaligine, une protéine pro-apoptotique originale.	35
A.3.1 Le gène humain galig.	35
A.3.2 La mitogaligine : une protéine de l'apoptose mitochondriale.	37
A.3.3 L'adressage des protéines mitochondriales.	41
PARTIE B. Matériel et Méthodes.....	49
B.1 Production de protéines par Synthèse Peptidique sur Phase Solide.	49
B.1.1 Principe de la synthèse récurrente de peptides.....	49
B.1.2 Protocole de synthèse de peptides.	51
B.1.3 Production de la mitogaligine.....	52
B.2 Production de la mitogaligine par bactéries recombinantes.	54
B.2.1 Expression dans les bactéries.	54
B.2.2 Extraction et purification de la protéine.	55
B.3 Etude de l'activité cytotoxique du fragment [31-53].	56
B.3.1 Incubation dans le milieu de culture.	56
B.3.2 Expériences de micro-injection.	56
B.4 Etude biophysique en présence d'un milieu membranaire.	57
B.4.1 Préparation des milieux membranaires utilisés.	57
B.4.2 Dichroïsme circulaire	59

B.4.3	Spectroscopie de fluorescence.....	60
B.4.4	RMN liquide	61
B.4.5	RMN solide.....	64
B.4.6	Spectroscopie de résonance plasmonique à ondes guidées (PWR).....	70
PARTIE C. Etude structurale et fonctionnelle du fragment d'adressage.....		73
C.1	Production de peptides par synthèse chimique.	73
C.1.1	Synthèse du fragment [31-53] de la mitogaligine.	73
C.1.2	Synthèse de mutants du fragment d'adressage mitochondrial.	74
C.1.3	Production d'un fragment de cytogaligine.....	75
C.1.4	Accrochage de la rhodamine.	76
C.2	Exploration de l'activité cytotoxique du fragment d'adressage.....	78
C.2.1	Cytotoxicité du fragment [31-53] de la mitogaligine.	78
C.2.2	Une activité dépendante de la localisation cellulaire.	79
C.2.3	Un peptide pro-apoptotique efficace ?	82
C.3	Etude biophysique de l'interaction peptide/membrane.....	83
C.3.1	Différents modèles d'environnements membranaires	83
C.3.2	Effet du milieu sur la structuration du peptide	88
C.3.3	Enfouissement du peptide dans les milieux membranaires	97
C.3.4	Effet du peptide sur une membrane de phospholipides	106
C.4	Conclusion sur l'étude du fragment d'adressage mitochondrial	124
C.4.1	Une activité cytotoxique confirmée.	124
C.4.2	Pas de structure canonique mais un repliement spécifique.	124
C.4.3	Enfouissement du peptide dans les membranes.	127
C.4.4	Effet du peptide sur la dynamique des lipides.	128
C.4.5	Un peptide cytotoxique humain, déstabilisateur de membranes.	129
PARTIE D. Etude de la Mitogaligine.....		131
D.1	Production d'une protéine marquée.	131
D.2	Expression de la mitogaligine par des bactéries.....	132
D.2.1	Le plasmide pSh-His-LS.	132
D.2.2	Protocole de production et purification.....	133
D.2.3	Application du protocole sur milieu minimum.....	134
D.3	Production par synthèse chimique.	135

D.3.1	Une production par ligation chimique.	135
D.3.2	Production du fragment [1-53]-SR.	136
D.3.3	Production du fragment [54-97].....	137
D.3.4	Ligation native des deux fragments de la mitogaligine.....	137
D.4	Le repliement oxydatif.	138
D.5	Le mécanisme d'action de la mitogaligine.....	138
PARTIE E. Conclusion générale et perspectives.....		139
Annexe 1 - Caractérisation des peptides synthétisés.....		141
Annexe 2 – Table des déplacements chimiques du fragment [31-53] dans le SDS.		145
Annexe 3 - Communications orales et écrites.....		146
Bibliographie.....		167

Liste des abréviations

ACN : *Acétonitrile*

ADP : *Adenosine Diphosphate*

AIF : *Apoptosis-Inducing Factor*

APD : *Antimicrobial Peptides Database*

ATP : *Adenosine Triphosphate*

BAD : *Bcl-X_L/Bcl-2 associated death*

Bak : *Bcl-2 antagonist killer*

Bax : *Bcl-2 antagonist X*

Bcl-2 : *B cell lymphoma 2*

Bcl-W : *Bcl2L2, Bcl2-like 2*

Bcl-X_L : *Bcl-2 homologue XLong*

BFK : *Bcl-2 family kin*

BH : *Bcl-2 Homology region*

Bid : *BH3 interacting domain death antagonist*

BIK : *Bcl-2 interactive killer*

BMF : *Bcl-2 modifying factor*

BOK : *Bcl2-related ovarian killer*

Caspase : *CysteinyI aspartate proteases*

CD : *Circular Dichroism*

CL : *cardiolipine*

COSY : *CORrelation SpectroscopY*

CSD : *Chemical Shift Deviation*

CTMP : *Carboxyl-terminal modulator protein*

DCM : *Dichlorométhane*

DHPC : *1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*

Diablo : *Direct IAP Binding Protein with LOw pI*

DIEA : *Diisopropyléthylamine*

DISC : *Death Inducing Signaling Complex*

DLS : *Dynamic light scattering*

DMF : *N,N-diméthylformamide*

DMPC : *1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*

DO : *Densité optique*

DPC : *Dodécyl-phosphocholine*

Drp1 : *Dynamin-related protein 1*

DTT : *Dithiothréitol*

EDTA : *Ethylene diamine tetra-acetate*

EGTA : *ethylene glycol tetraacetic acid*

Erv1 : *essential for respiration and vegetative growth 1*

Fis1 : *Mitochondrial fission protein 1*

galig : *Galectin-3 internal gene*

GdmHCl : *Guanidine hydrochloride*

GTP : *Guanosine Triphosphate*

GUV : *Giant Unilamellar vesicle*

HATU : *hexafluorophosphate de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthylammonium*

HBTU : *hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthylammonium*

HeLa : *Henrietta Lacks*

HOBT : *N-hydroxybenzotriazole*

HPLC : *High Performance Liquid Chromatography*

HRK : *harakiri*

Hsp : *Heat shock protein*

HSQC : *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

HtrA2 : *High-Temperature Requirement protein A2*

IAP : *Inhibitor of Apoptosis Protein*

IMS : *Intermembrane space*

IPTG : *isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*

LB : *Luria Bertani*

LUV : *Large Unilamellar Vesicle*

Mcl-1 : *Myeloid cell leukemia sequence 1*

Mfn : *Mitofusine*

Mia40 : *Mitochondrial IMS-assembly protein 40*

Mim1 : *Mitochondrial import protein 1*

MISS : *Mitochondria IMS-sorting signal*

mitoPLD : *Mitochondrial phospholipase D*

MLV : *Multilamellar vesicle*

MPAA : *4-carboxylméthyl-thiophénol*

mPTP : *mitochondrial Permeability Transition Pore*

NCL : *Native Chemical Ligation*

NMP : *N-méthylpyrrolidinone*

NOESY : *Nuclear Overhauser effect spectroscopy*

P/L : *Peptide/Lipide*

Pbf : *2,2,4,6,7-pentaméthyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl*

PBS : *Phosphate buffer saline*

PC : *Phosphatidylcholine*

PE : *Phosphatidyléthanolamine*

PEGA : *Poly[acryloyl-bis(aminopropyl)polyéthylène glycol]*

POPC-d31 : *1-palmitoyl(d31)-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*

PUMA : *p53 upregulated modulator of apoptosis*

PWR : *Résonance plasmonique à ondes guidées*

RMN : *Résonance Magnétique Nucléaire*

SAM : *Sorting and assembly machinery*
 SDS : *Sodium dodécyl sulfate*
 Smac : *Second Mitochondria-derived Activator of Caspases*
 SPPS : *synthèse peptidique sur phase solide*
 SPR : *Résonance Plasmonique de Surface*
 SUV : *Small unilamellar vesicles*

TAMRA : *5-(et-6)-carboxytétraméthylrhodamine*
 tBid : *truncated BH3 interacting domain death agonist*
 tBu : *tert-butyle*
 TCEP : *tris(2-carboxyethyl)-phosphine*
 TFA : *Acide trifluoroacétique*
 TFE : *Trifluoroéthanol*
 TIM : *Translocase of inner membrane*
 TIS : *triisopropylsilane*
 TNF : *Tumor Necrosis Factor*
 TOCSY : *TOTAL Correlation SpectroscopY*
 TOM : *Translocase of outer membrane*
 Tris : *tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane*
 Trt : *triphénylméthyle (trityle)*

UV : *Ultraviolet*

VDAC : *Voltage-Dependent Anion Channel*

Objectifs de thèse.

Mon travail de thèse porte sur l'étude d'une nouvelle protéine impliquée dans l'apoptose, la mitogaligine, et plus particulièrement sur son fragment d'adressage mitochondrial.

La mitogaligine est une protéine de 97 résidus qui déclenche l'apoptose par la voie intrinsèque mitochondriale. **L'objectif du projet est de comprendre au niveau atomique son mécanisme d'action sur la membrane des mitochondries.** La séquence tout à fait originale de la mitogaligine, et sa composition particulière en acides aminés (12 Arg et 12 Trp), rend infructueuse toute prédiction de structure 2D ou 3D, ce qui en fait un candidat idéal pour les études de biologie structurale.

Le fragment d'adressage de la mitogaligine à la membrane de la mitochondrie a pour particularité d'être interne à la protéine, il correspond au fragment [31-53]. Ce peptide présente à lui seul une fonction cytotoxique similaire à celle de la protéine entière. C'est pourquoi j'ai concentré mon travail de thèse sur l'étude de ce fragment d'adressage mitochondrial.

Les objectifs de cette thèse sont les suivants :

- **Obtenir les 1^{ères} données sur le mécanisme d'action du fragment d'adressage mitochondrial**
- **Mettre au point les différentes techniques biophysiques qui seront nécessaires à l'étude de la protéine entière**
- **Amorcer la production de la protéine entière**

Dans le chapitre « Introduction » je présenterai le phénomène d'apoptose, en détaillant plus particulièrement la voie intrinsèque des mitochondries et les données actuellement disponibles sur la mitogaligine et son fragment d'adressage mitochondrial.

Dans la partie « Matériel et méthode » je décrirai les différentes techniques avec lesquelles je me suis familiarisée au cours de ma thèse, pour produire des peptides et protéines par synthèse chimique sur support solide ou expression dans les bactéries, puis pour étudier le fragment d'adressage en milieu membranaire : Fluorescence, Dichroïsme circulaire, RMN liquide, RMN solide et Résonance Plasmonique à Ondes Guidées. Ces études structurales ont été complétées par des études fonctionnelles sur des cellules entières, que je décrirai également.

Dans la partie « Etude structurale et fonctionnelle du fragment d'adressage » je présenterai les résultats qui ont permis de lever certaines interrogations sur le fragment d'adressage, notamment sur son mode d'action et le rôle joué par la cardiolipine. Quel effet a le milieu sur la structuration du peptide ? Comment le fragment d'adressage interagit-il avec des milieux membranaires modèles de différentes compositions ? Comment est-il enfoui dans la membrane ? Mais aussi, quel est l'effet du peptide sur la dynamique et l'organisation lipidique de la membrane ?

En parallèle, l'activité du fragment [31-53] sur des cellules humaines a été testée, confirmant l'intérêt de ce peptide en tant qu'agent cytotoxique.

Le travail effectué sur le fragment d'adressage mitochondrial a permis d'ouvrir la voie pour le même type d'étude sur la mitogaligine entière. Cependant, la production de cette protéine présente de nombreuses difficultés. En parallèle de l'étude du fragment, j'ai donc participé à la mise au point du protocole de production de la mitogaligine entière que je présenterai dans le chapitre « Etude de la mitogaligine ».

Après la conclusion générale, des annexes sur la caractérisation des peptides synthétisés et la liste des communications orales et écrites liées à ce travail viendront compléter ce manuscrit.

PARTIE A. Introduction

A.1 Le phénomène d'apoptose.

A.1.1 La mort cellulaire programmée, nécessaire à la vie.

« Il y a un temps pour tout : un temps pour naître et un temps pour mourir. »

Ce proverbe peut tout à fait être appliqué à nos cellules. Sans cesse renouvelées, les cellules ont une durée de vie programmée, qui varie suivant leur fonction (Renehan et al., 2001) : 5 jours environ pour les cellules épithéliales de l'intestin, ou encore 6 mois pour les cellules des poumons (Blanpain et al., 2007). La mort cellulaire, également appelée apoptose, fait donc partie intégrante du cycle de vie des cellules. Ce mal nécessaire permet ainsi d'éliminer les cellules vieillissantes ou lésées, qui peuvent devenir dangereuses pour notre organisme (Norbury et al., 2001).

La mort cellulaire programmée est également un outil indispensable au développement d'un organisme (Figure 1). Par exemple, pendant le développement embryonnaire, l'apoptose est utilisée pour façonner notre corps. A l'origine, les mains et les pieds d'un embryon sont palmés : l'apoptose permet d'éliminer les cellules cartilagineuses interdigitales, aboutissant ainsi à la formation des doigts (Jacobson et al., 1997). Pendant la formation du cerveau, le réseau neuronal crée de nombreuses connections synaptiques : l'apoptose permet l'élimination des neurones n'ayant pas formé de connections utiles (Nijhawan et al., 2000). Il en va de même pour les cellules du système immunitaire qui n'ont pas développé d'antigènes spécifiques (Osborne, 1996).

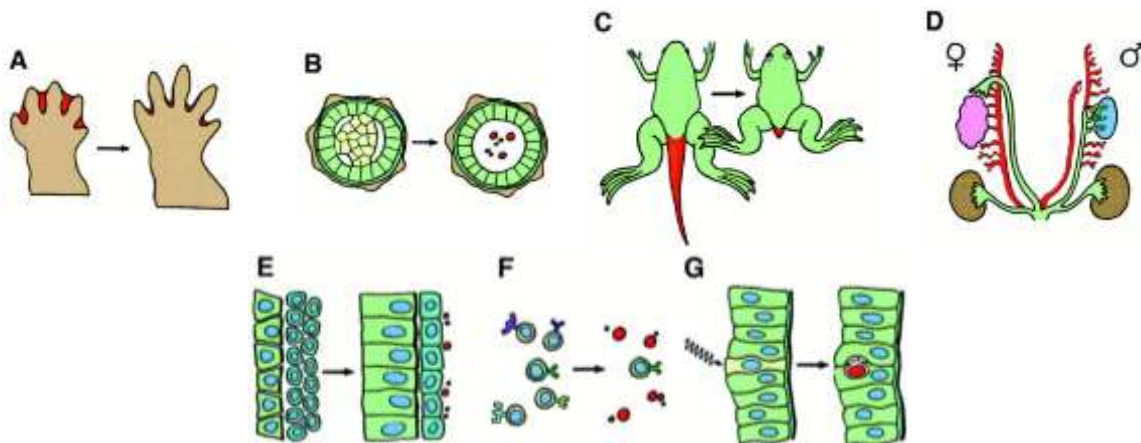


Figure 1 - Exemples d'implications de l'apoptose dans le développement d'un organisme (Jacobson et al., 1997). Formations (A et B) et disparitions (C et D) de structures. Elimination des cellules surnuméraires (E) ou anormales (F et G).

L'homéostasie cellulaire est maintenue grâce à un équilibre entre deux processus. Le premier processus, qui correspond à la multiplication cellulaire, est indispensable pour remplacer les cellules éliminées par le second processus, l'apoptose (Renehan et al., 2001). On ne pourra donc pas parler de mort cellulaire sans aborder son pendant qui est la prolifération des cellules.

A.1.2 Un équilibre fragile entre prolifération et mort cellulaire.

La prolifération et la mort programmée sont deux phénomènes que notre organisme régule en permanence en fonction de ses besoins et au moyen d'un contrôle génétique. Le développement des glandes mammaires, contrôlé par une centaine de gènes, en est un parfait exemple (Hennighausen et al., 2005).

La prolifération des cellules mammaires est déclenchée chez la femme enceinte, pour préparer l'allaitement du nouveau-né à venir ; mais lorsque la période d'allaitement avance, ces cellules devenues inutiles sont progressivement éliminées par apoptose.

Il existe donc un équilibre permanent et dynamique entre la prolifération et la mort programmée des cellules. Il arrive cependant que cet équilibre soit rompu, entraînant le développement de nombreuses pathologies, ayant bien souvent une issue fatale (Elmore, 2007).

Un déséquilibre en faveur de la mort cellulaire correspond à une sur-activation de l'apoptose. Ceci peut par exemple déclencher une dégénérescence des neurones dans les maladies d'Alzheimer ou Parkinson, ou la destruction des cellules du pancréas dans le diabète de Type I. Un dernier exemple avec le virus du SIDA qui cible les lymphocytes T4 : l'élimination accrue de ce type de cellules provoque un affaiblissement du système immunitaire du malade, facilitant l'apparition de maladies opportunistes.

Une sur-activation de la prolifération des cellules est également nocive pour l'organisme. Un système immunitaire hyperactif va produire de manière incontrôlée des cellules défectueuses, qui peuvent se retourner contre l'organisme : ce phénomène est ainsi à l'origine de maladies auto-immunes comme l'arthrite ou la sclérose en plaque. Un défaut d'apoptose peut également conduire à la formation de tumeurs : c'est le cas des cellules cancéreuses qui ont perdu la faculté de mourir et prolifèrent alors sous forme de tumeurs.

Une meilleure connaissance du déroulement de l'apoptose peut donc aider à comprendre toutes ces pathologies, mais également guider la mise au point de nouveaux outils pour les combattre (Fadeel et al., 2005).

A.1.3 Différentes voies mènent à l'apoptose.

A.1.3.1 Les différentes phases de l'apoptose.

La mort cellulaire peut être déclenchée par différents stimuli, internes ou externes à la cellule (Figure 2). Cette phase d'initiation est suivie d'une phase de décision, où la cellule intègre les différents signaux de morts. Les protéines de la famille Bcl-2 (B cell lymphoma 2) sont chargées de réguler cette phase, afin de décider si la cellule peut survivre ou si elle doit être éliminée (Duvall et al., 1986).

La dernière phase de l'apoptose, appelée phase d'exécution, démarre avec le clivage de la caspase-3, qui entraîne une cascade de modifications morphologiques et biochimiques : fragmentation de l'ADN, dégradation du cytosquelette et des protéines nucléaires, agrégation des protéines, formation de corps apoptotiques, et enfin expression de ligands qui attirent les phagocytes et ciblent les cellules mortes à éliminer (Elmore, 2007).

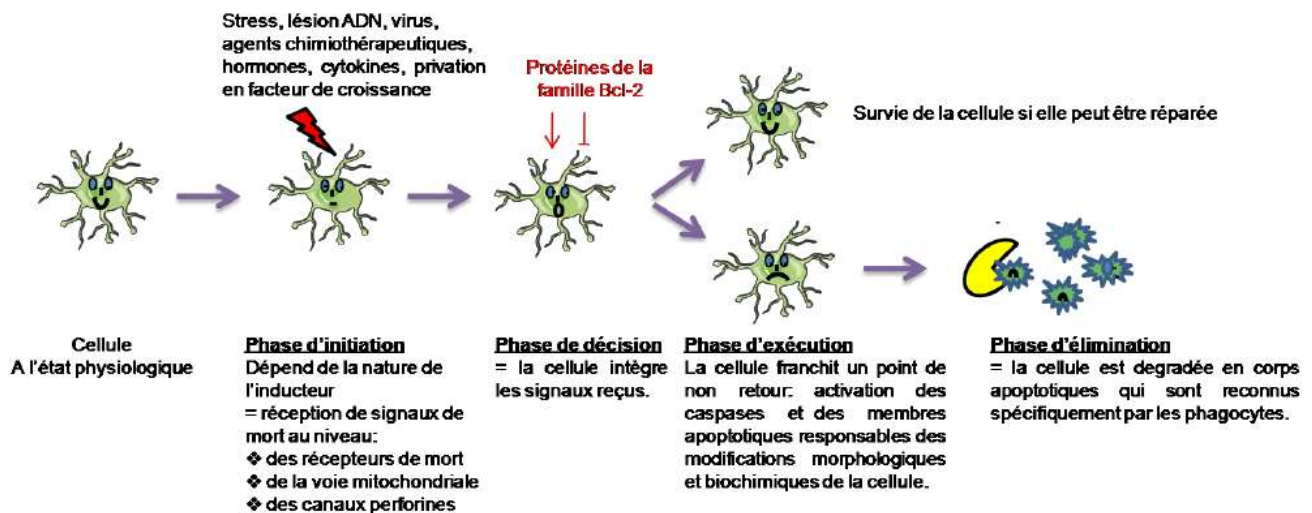


Figure 2 - Les différentes phases de l'apoptose (tiré de la thèse de Pauline Robinet, 2010)

A.1.3.2 L'induction de l'apoptose.

L'induction de l'apoptose peut emprunter trois voies différentes, mais pas totalement indépendantes (Figure 3) : une voie extrinsèque utilisant des récepteurs membranaires ou du Granzyme B, et une voie intrinsèque mitochondriale. Ces différentes voies aboutissent toutes au même point : l'activation des caspases (Taylor et al., 2008).

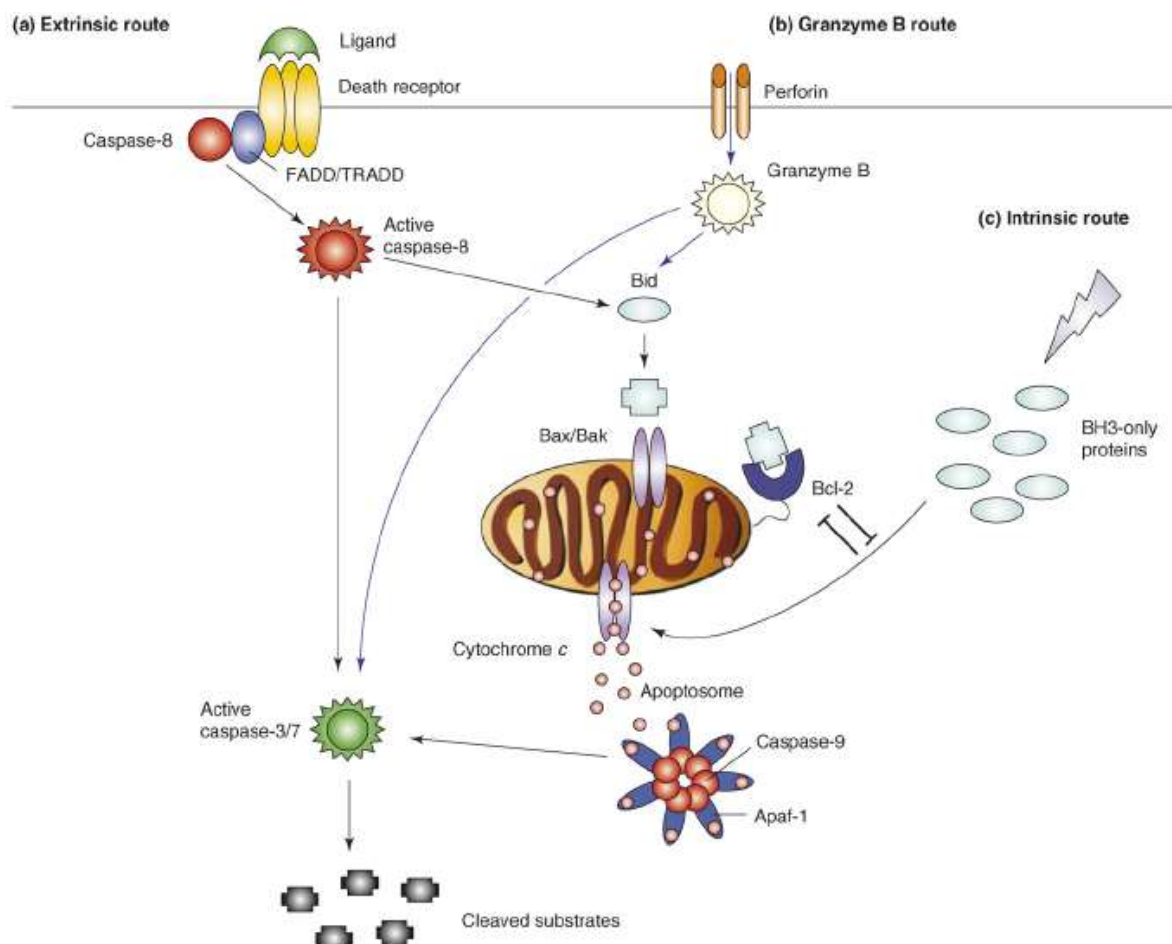


Figure 3 - Les différentes voies de déclenchement de l'apoptose (Sheridan et al., 2008).

La première voie extrinsèque est également appelée « voie des récepteurs de mort » (Figure 3). Des ligands vont activer les récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor) présents sur la membrane externe des cellules (Bhardwaj et al., 2003). Ces récepteurs de mort possèdent un domaine cytoplasmique (Death Domain) permettant de recruter d'autres protéines (Lavrik et al., 2005). Celles-ci peuvent notamment former deux types de complexes, le DISC et le TRADDOSOME, chargés ensuite d'activer la caspase-8.

L'activation de la caspase-8 peut entraîner l'activation de la caspase-3, conduisant directement à la phase d'exécution de l'apoptose ; afin d'amplifier le phénomène, elle peut également induire la voie intrinsèque mitochondriale, à travers l'activation de la protéine Bid (Elmore, 2007).

La seconde voie extrinsèque est déclenchée par les lymphocytes T cytotoxiques (Figure 3). Ces cellules du système immunitaires peuvent sécréter de la perforine. L'homodimérisation de cette protéine sous forme de canal transmembranaire, permet l'injection cytoplasmique de Granzyme B, également sécrétée par les lymphocytes (Trapani et al., 2002).

Une fois dans la cellule, le Granzyme B est capable d'activer directement la caspase-3, mais il peut également déclencher l'apoptose par la voie mitochondriale : il est donc capable de déclencher la mort cellulaire de manière directe et indirecte (Goping et al., 2003).

La troisième et dernière voie correspond à la voie intrinsèque mitochondriale, déclenchée et régulée par les protéines de la famille Bcl-2 (Cory et al., 2002; Chipuk et al., 2010). L'induction de l'apoptose via les mitochondries entraîne de nombreuses modifications au niveau des membranes mitochondriales, provoquant notamment la perméabilisation des membranes avec l'ouverture de pores (mPTP) et la perte du potentiel transmembranaire.

Toutes ces modifications entraînent le relargage de molécules pro-apoptotiques, normalement séquestrées dans l'espace inter-membranaire mitochondrial (Saelens et al., 2004). L'accumulation de ces molécules dans le cytoplasme peut entraîner la mort cellulaire suivant deux voies (Cregan et al., 2004), dépendante ou non de l'activation des caspases (Figure 4).

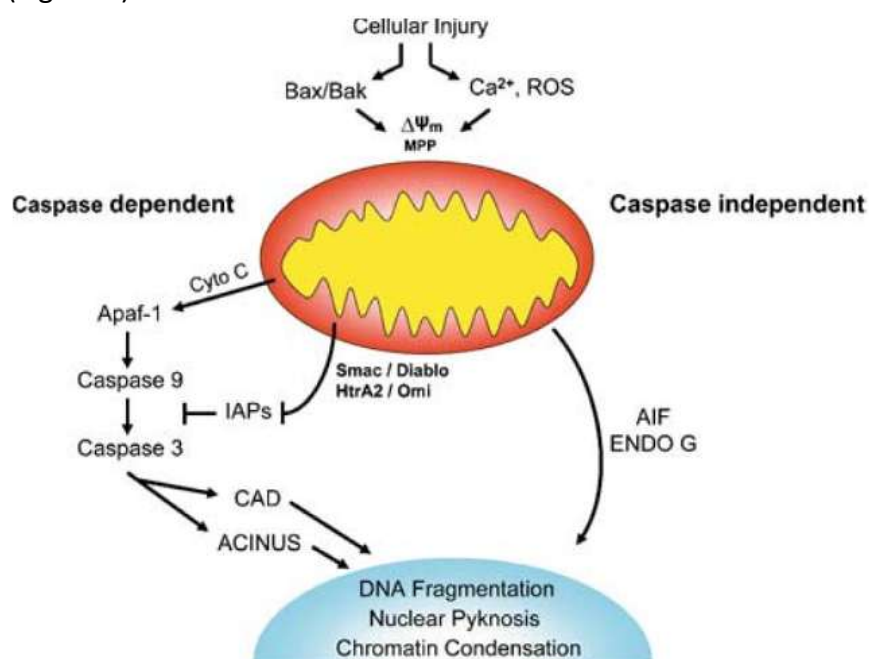


Figure 4 - Déclenchement de l'apoptose par la voie intrinsèque mitochondriale (Cregan et al., 2004).

La première voie correspond au déclenchement d'une cascade de caspases : elle démarre avec l'activation de la caspase-9, qui active à son tour la caspase-3. Cette cascade peut être déclenchée de manière directe, comme avec le cytochrome c qui interagit avec Apaf-1, recrutant à son tour une pro-caspase-9 : ces trois molécules forment un complexe, appelé « apoptosome », capable d'activer la caspase-9. Elle peut également être déclenchée de manière indirecte avec les protéines Smac/Diablo et Omi/HtrA2 qui inactivent les inhibiteurs d'apoptose (IAP), chargés de bloquer l'activation de la caspase-9.

D'autres molécules relarguées par la mitochondrie peuvent agir au niveau du noyau, et former ainsi la seconde voie d'apoptose mitochondriale, indépendante des caspases : arrivées au noyau, l'AIF et l'endonucléase G entraînent des fragmentations de l'ADN et une condensation de la chromatine.

Si les voies extrinsèques nécessitent des stimuli extérieurs à la cellule, la voie intrinsèque mitochondriale peut être déclenchée par la cellule elle-même mais également par les voies extrinsèques, afin d'amplifier le phénomène d'apoptose.

A.2 La voie intrinsèque des mitochondries.

Nous avons vu que la mitochondrie joue un rôle essentiel dans les phénomènes d'apoptose (Green et al., 2004; Orrenius, 2004). C'est pourquoi nous allons revenir sur certaines particularités de cet organe, avant de décrire plus précisément la régulation et le déclenchement de l'apoptose par la voie intrinsèque mitochondriale.

A.2.1 La mitochondrie, un organe bien particulier.

A.2.1.1 Une structure héritée des bactéries.

La mitochondrie est un organe spécifique des cellules eucaryotes. La théorie endosymbiotique (Margulis, 1970) suppose que la mitochondrie était initialement une bactérie, endocytée par une cellule eucaryote : vivant en symbiose, elle a fini par se rendre indispensable au fonctionnement de son hôte, devenant un organe à part entière.

Cette théorie est appuyée par différentes caractéristiques de la mitochondrie, la première étant que cet organe possède son propre ADN, différent de l'ADN nucléaire. Des études phylogénétiques ont montré que cet ADN mitochondrial est voisin de celui des alpha-protéobactéries (Andersson et al., 1998).

Un autre rapprochement avec les bactéries est établi en observant la structure des mitochondries. En effet, la microscopie électronique a montré la présence de deux membranes (Palade, 1953; Sjostrand, 1953) : la membrane interne peut correspondre à la membrane de la bactérie d'origine et la membrane externe à la membrane d'endocytose. Enfin, la présence de phospholipides étrangers aux membranes eucaryotes permet d'appuyer cette hypothèse.

Les premières descriptions de mitochondries datent des années 1950 (Figure 5). Cet organe possède deux membranes : une membrane externe, qui est perméable aux ions et petites molécules, et une membrane interne, qui forme une véritable barrière, ne laissant passer que des molécules couplées à des transporteurs. La membrane interne forme une structure complexe, en se repliant sous forme d'invaginations, appelées crêtes mitochondriales. Il existe deux compartiments liquides distincts : l'espace inter-membranaire, coincé entre les deux membranes, et la matrice mitochondriale, délimitée par la membrane interne.

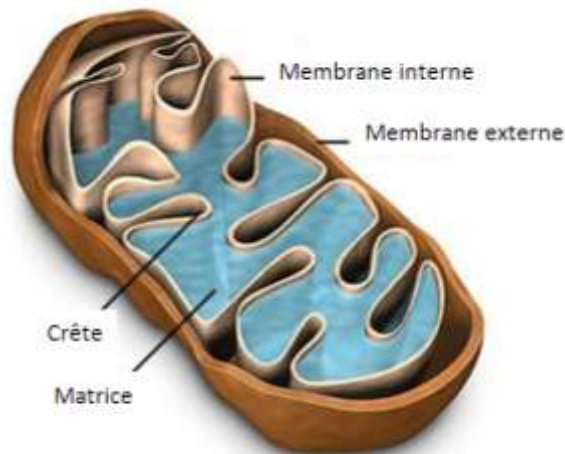


Figure 5 - Structure d'une mitochondrie (image adaptée de <http://micro.magnet.fsu.edu>).

Les progrès techniques en matière de microscopie électronique ont permis d'observer et mesurer des zones de rapprochement entre les membranes (Perkins et al., 1997). Ainsi, les membranes interne et externe sont parfois fusionnées au niveau de sites de contacts, et les crêtes mitochondriales peuvent être refermées par un site de jonction des crêtes (Figure 6).

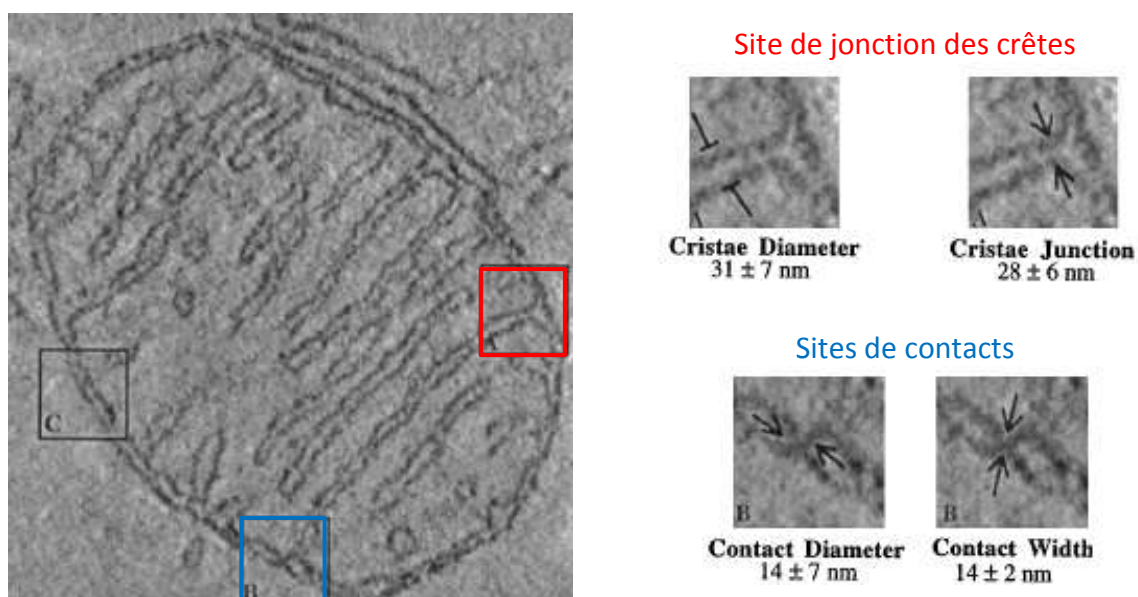


Figure 6 - Ultrastructure de la mitochondrie (Perkins et al., 1997).

Une des fonctions avancées des sites de contact entre les membranes est l'import de protéines mitochondriales (Van der Klei et al., 1994). Ces sites permettent également le passage de molécules plus petites, comme l'ADP/ATP ou le Calcium, et seraient impliqués dans l'activité de certaines enzymes, comme la créatine kinase, en créant un microenvironnement qui facilite l'accès à l'ATP, produit dans la matrice mitochondriale (Biermans et al., 1990).

La fonction des sites de jonction des crêtes mitochondriales reste plus obscure. Une augmentation de la surface de la membrane interne provoque une multiplication des crêtes et des sites de jonction : la fermeture de ces sites entraînerait une ségrégation des ions et des métabolites, ce qui peut modifier le potentiel membranaire et perturber le métabolisme mitochondrial (John et al., 2005). La fermeture de ces sites de jonction permet également de bloquer physiquement la diffusion de protéines (Frey et al., 2000).

A.2.1.2 La dynamique des mitochondries.

Les mitochondries sont des organites très dynamiques, qui se déplacent et adaptent leur morphologie suivant les besoins de la cellule (Detmer et al., 2007).

A.2.1.2.1 Des organites en mouvement.

L'imagerie « en live » a montré que les mitochondries sont capables de se déplacer à travers le cytoplasme, en utilisant le cytosquelette et les microtubules (Morris et al., 1995). Pour se déplacer, l'organe va s'accrocher aux microtubules et se faire tracter par les filaments d'actine, via des interactions avec des protéines ancrées dans sa membrane externe. Les mitochondries peuvent également s'étirer pour multiplier les possibilités d'ancrage au cytosquelette, augmentant ainsi l'efficacité des déplacements.

Ces mouvements à travers le cytoplasme de la cellule, permettent aux mitochondries de répondre aux besoins cellulaires, comme un apport d'énergie ou la régulation du flux de calcium (Hollenbeck et al., 2005; Frederick et al., 2007).

A.2.1.2.2 Une morphologie changeante.

Tour à tour ponctiformes ou allongées, les mitochondries sont capables de modifier leur morphologie à façon. Ces changements ne sont pas le fruit du hasard, mais répondent à des besoins cellulaires. Par exemple, lorsque la cellule a un besoin accru en énergie, les mitochondries sont capables de se multiplier et d'augmenter le nombre de crêtes mitochondriales (John et al., 2005) : l'augmentation de surface de la membrane interne lui permet d'intégrer plus de complexes respiratoires, augmentant ainsi sa capacité énergétique.

En plus de la production d'énergie, la dynamique des mitochondries est impliquée dans de nombreux phénomènes. En réponse à certains stress cellulaires, les mitochondries peuvent fusionner pour augmenter la production d'ATP (Tondera et al., 2009).

La fusion/fission est également cruciale pour maintenir une population de mitochondries homogène et fonctionnelle. Elle assure notamment la stabilité de l'ADN mitochondrial en évitant l'accumulation de mutations par le mélange des génomes de mitochondries (Chen et al., 2010). Elle participe aussi à la dégradation des mitochondries (Kim et al., 2007; Twig et al., 2008).

Enfin, la dynamique mitochondriale est également impliquée dans l'apoptose (Suen et al., 2008) : une fragmentation du réseau mitochondrial est concomitante avec le déclenchement de l'apoptose mitochondriale (Frank et al., 2001) et une perturbation des phénomènes de fusion/fission peut accélérer ou ralentir le phénomène (Lee et al., 2004).

A.2.1.2.3 Les phénomènes de fusion et fission.

Les changements morphologiques des mitochondries sont la conséquence de fusion et fission entre mitochondries, mais aussi entre membranes mitochondriales.

La multiplication des mitochondries est obtenue par fission (Figure 7). Ce phénomène démarre avec le recrutement de Drp1, une GTPase de la famille des dynamines. Cette protéine va s'oligomériser en formant une spirale à la surface de la mitochondrie. Grâce à l'hydrolyse du GTP, l'enroulement de la spirale va se resserrer, provoquant l'étranglement de la mitochondrie et sa division en deux nouvelles entités (Danino et al., 2004).

Cependant, le recrutement de Drp1 à la membrane mitochondriale reste obscur. En effet, la protéine Fis1, qui est impliquée dans le processus chez la levure, n'est pas indispensable chez les mammifères (Lee et al., 2004). Le cytosquelette et les filaments d'actine pourraient également y participer (Varadi et al., 2004; De Vos et al., 2005). Enfin la protéine MARCH5 pourrait réguler le processus de fission en jouant un rôle dans le désassemblage de Drp1 (Karbowski et al., 2007; Suen et al., 2008).

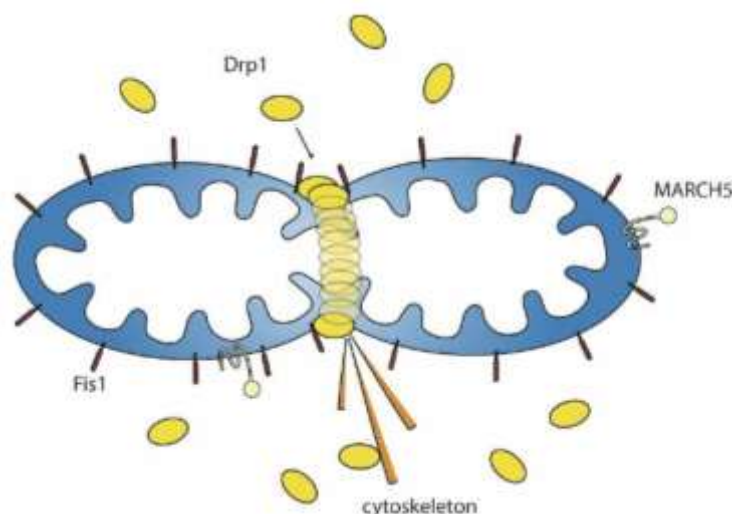


Figure 7 - Les protéines impliquées dans la fission des mitochondries (Suen et al., 2008).

La fusion de deux mitochondries se déroule en deux étapes : la fusion des membranes externes, puis des membranes internes (Figure 8).

Les mitofusines, Mfn1 et Mfn2, sont des dynamines situées sur les membranes externes. Leur interaction tête-bêche couplée à l'hydrolyse de GTP provoque le rapprochement des protéines, entraînant les membranes externes, qui peuvent alors fusionner (Chen et al., 2003; Koshiba et al., 2004). D'autres protéines seraient impliquées dans ce processus de fusion, comme l'enzyme dimérique mitoPLD. Son site catalytique tourné vers l'extérieur pourrait agir sur les lipides lorsque les membranes externes sont rapprochées par les mitofusines. Elle est capable d'hydrolyser la cardiolipine générant un acide phosphatidique, mais son rôle reste flou (Choi et al., 2006).

Enfin, c'est également une dynamine, OPA1, qui est à l'origine des fusions de membranes internes. Cependant, cette protéine existe sous plusieurs formes de longueurs différentes, résultat du clivage par des protéases (Ishihara et al., 2006). L'équivalent d'OPA1 existe également chez la levure, où les formes courte et longue de Mgm1 agissent de concert dans la fusion des membranes (Herlan et al., 2003).

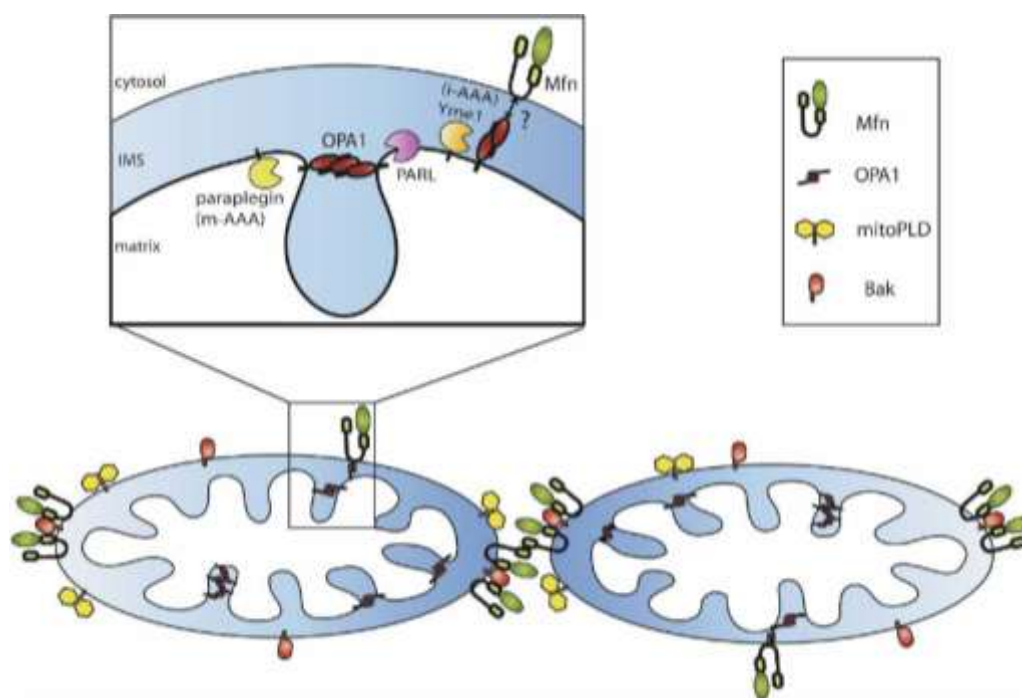


Figure 8 - Les protéines impliquées dans la fusion des mitochondries (Suen et al., 2008).

A.2.1.3 De multiples fonctions indispensables à la cellule.

A.2.1.3.1 La mitochondrie, principal fournisseur en énergie.

La mitochondrie est décrite comme la centrale énergétique des cellules eucaryotes. Grâce à sa chaîne respiratoire couplée à une ATP-synthase, elle est capable de générer un gradient de proton, utilisé pour former de l'ATP. Le cycle de Krebs, qui se déroule dans la matrice de la mitochondrie, permet de générer 36 à 38 molécules d'ATP à partir d'une seule molécule de glucose : ces performances font de la mitochondrie la principale source d'énergie de la cellule.

Les différents composants de la chaîne énergétique sont regroupés au niveau des crêtes mitochondriales, dont le nombre varie en fonction des besoins énergétiques : les mitochondries des cellules musculaires, par exemple, auront un nombre important d'invaginations, car ce type de cellule est énergivore (Vogel et al., 2006). La chaîne respiratoire mitochondriale est composée de 4 complexes protéiques membranaires et d'un transporteur mobile, le cytochrome c (Figure 9).

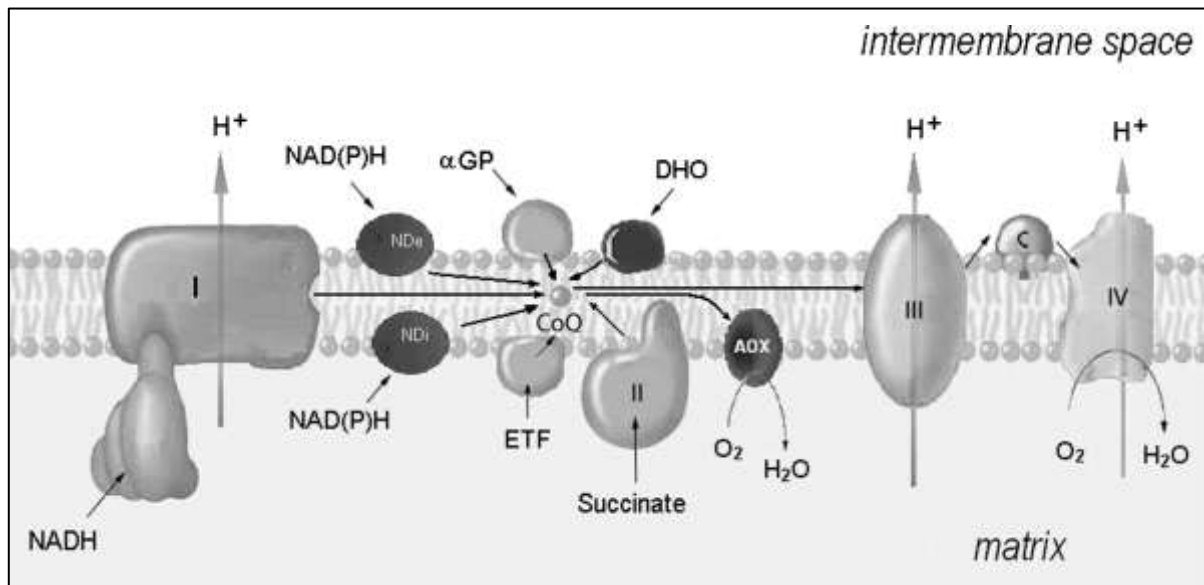


Figure 9 - Vue schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale. I, II, III et IV correspondent aux complexes NADH:ubiquinone oxidoreductase, succinate:ubiquinone oxidoreductase, ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase et cytochrome oxydase (tiré de Lenaz et al., 2009).

Le cytochrome c est une petite protéine très soluble de 15 kDa, qui possède un hème (Figure 10). Contenant un atome de Fer, cet hème est capable de subir une réaction d'oxydo-réduction réversible, passant d'un état Fe²⁺ à un état Fe³⁺. Cette capacité permet au cytochrome c de transporter des électrons entre les complexes III et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale (Lenaz et al., 2010).

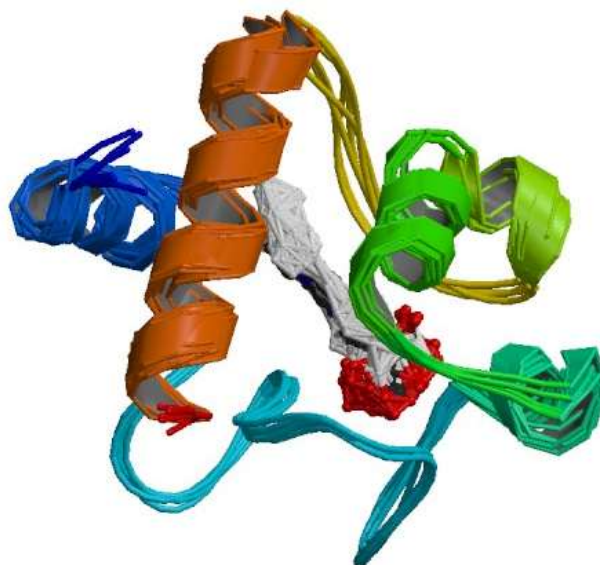


Figure 10 - Structure du cytochrome c (code PDB : 1J3S).

Même si cette protéine est totalement soluble, elle ne reste pas constamment dans cet état. En effet, la majorité du cytochrome c est relié à la membrane par des interactions électrostatiques, et 15% est en interaction plus forte avec la membrane, grâce à la formation d'un complexe avec la cardiolipine (Tuominen et al., 2002).

Il existe deux sites d'interaction au niveau du cytochrome c, donnant lieu à différents types d'interaction avec la cardiolipine (Gorbenko, 1999). Le site A permet une interaction électrostatique entre les lysines du cytochrome c et les phosphates de la cardiolipine. Le site C utilise les liaisons hydrogène et une interaction hydrophobe, qui déstructure en partie le cytochrome c, provoquant un enfouissement partiel de la molécule dans la membrane.

Cependant pour répondre aux besoins de la chaîne énergétique, l'interaction de cette protéine avec les lipides doit être dynamique et réversible. Cette interaction peut par exemple être inhibée par la présence d'ATP, qui modifie la structure du cytochrome c au niveau du site C, ou empêche simplement l'interaction électrostatique au niveau du site A.

A.2.1.3.2 Un réservoir à molécules pro-apoptotiques.

Outre ses fonctions indispensables à la survie de la cellule, comme la production d'énergie ou la régulation du flux de calcium, la mitochondrie est également impliquée dans l'induction de l'apoptose, avec le relargage de facteurs pro-apoptotiques initialement piégés dans l'espace inter-membranaire. Le facteur le plus fréquemment impliqué et étudié est le cytochrome c. Relargué en quantité suffisante dans le cytoplasme de la cellule, le cytochrome c est capable de recruter différentes protéines afin de former l'apoptosome, un complexe activateur de la caspase-3. Cependant, l'activation de caspases, déclenchée par le relargage de cytochrome c, ne conduit pas nécessairement à l'apoptose de la cellule.

En effet, l'activation des caspases est notamment impliquée dans plusieurs processus de maturations cellulaires, comme la différenciation des monocytes en macrophages (Sordet et al., 2002) ou la formation des plaquettes (De Botton et al., 2002). Dans ce dernier processus, les mégacaryocytes forment de longues extensions cytoplasmiques, appelées proplaquettes, qui sont ensuite fragmentées en plaquettes. Pendant la formation des proplaquettes, le relargage de cytochrome c et l'activation de caspases sont très localisés. Une fois la fragmentation terminée, le relargage du cytochrome c est diffus entraînant alors l'apoptose du mégacaryocyte sénescant.

Dans ces processus de différenciation cellulaire, l'activation de caspases résulte bien du relargage de cytochrome c, mais sa libération localisée et restreinte ne conduit pas au déclenchement de l'apoptose. L'induction de l'apoptose nécessite donc la mobilisation d'une quantité importante de molécules, comme le cytochrome c, et la perméabilisation de la membrane externe des mitochondries, permettant une libération massive des facteurs pro-apoptotiques.

A.2.2 L'apoptose mitochondriale, un processus en deux étapes.

Lorsque le signal de mort est donné, un certain nombre de mécanismes sont mis en place pour relarguer les facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux. En temps normal, ces molécules sont emprisonnées au niveau de l'espace entre les membranes interne et externe de la mitochondrie. Leur libération passe donc nécessairement par une perméabilisation de la membrane externe.

Pour certains facteurs, comme le cytochrome c, une concentration importante de protéine est nécessaire pour déclencher l'apoptose. Une étape préalable de mobilisation de facteurs pro-apoptotiques peut alors être nécessaire.

A.2.2.1 La mobilisation du cytochrome c.

En temps normal, la majorité du cytochrome c est en interaction avec la membrane interne des mitochondries et localisée dans les crêtes, siège de la respiration mitochondriale. Le cytochrome c étant séquestré à la surface de la membrane par la cardiolipine (Cortese et al., 1998), l'interaction avec ce phospholipide doit donc être déstabilisée pour permettre la solubilisation du facteur pro-apoptotique (Ott et al., 2002) (Figure 11).

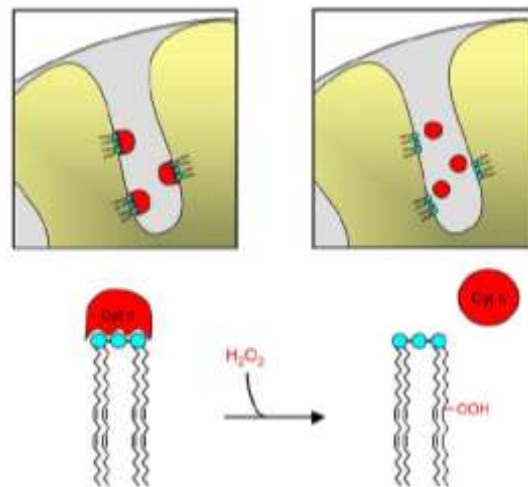


Figure 11 - Solubilisation du cytochrome c par déstabilisation de son interaction avec la cardiolipine (tiré de Gonzalvez et al., 2007).

Le relargage du cytochrome c mitochondrial se déroule donc en deux étapes (Figure 12) : la solubilisation d'une quantité importante de cytochrome c dans l'espace inter-membranaire mitochondrial, puis la perméabilisation de la membrane externe permettant la libération du cytochrome c dans le cytoplasme de la cellule.

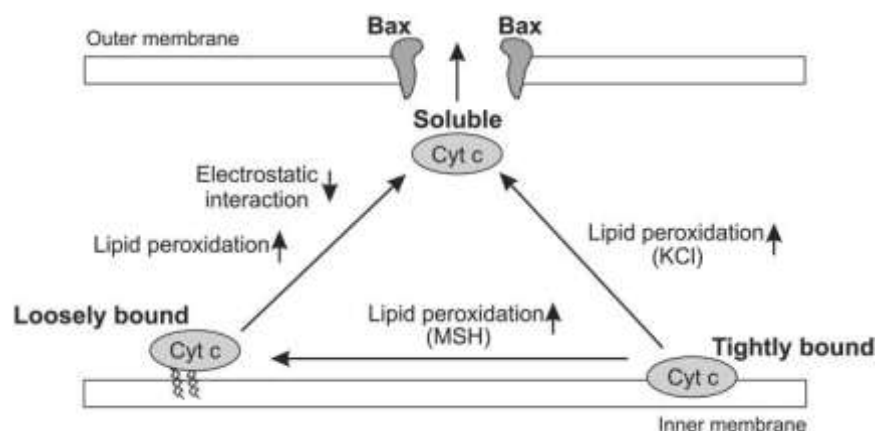


Figure 12 - Modèle de libération du cytochrome c mitochondrial en deux étapes (tiré de Ott et al., 2002).

L'interaction, faible ou forte, avec la membrane interne doit être brisée pour que le cytochrome c soit solubilisé. Dans ce modèle, la fuite vers le cytoplasme s'effectue après une perméabilisation de la membrane externe par la protéine Bax.

Cependant le cytochrome c est solubilisé au niveau des crêtes mitochondriales. Sa fuite vers le cytoplasme nécessite donc l'ouverture des crêtes pour pouvoir accéder à l'espace inter-membranaire, puis le cytoplasme. La forme et la composition des crêtes mitochondriales est dynamique et s'opère par réarrangement des lipides et protéines membranaires (Figure 13). En temps normal, la protéine OPA1 est sous forme d'hétérodimère et ferme les crêtes mitochondriales. Mais lorsque la cellule entre en apoptose, la protéine PARL provoque l'ouverture des crêtes en clivant la protéine OPA1 (Cipolat et al., 2006; Frezza et al., 2006).

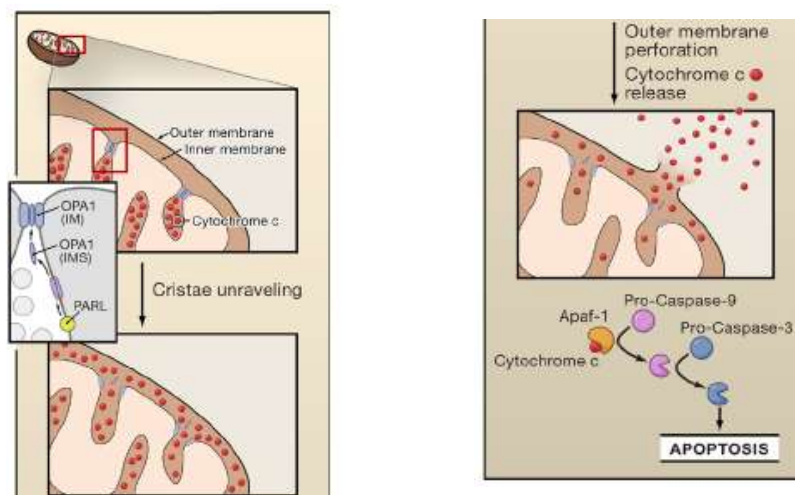


Figure 13 - Le réarrangement des crêtes mitochondriales, une étape indispensable avant le relargage du cytochrome c dans le cytoplasme (tiré de Gottlieb, 2006).

A.2.2.2 La perméabilisation de la membrane.

Trois types de perméabilisation de la mitochondrie sont actuellement avancés : l'utilisation de canaux existants, la formation de pores par les protéines de la famille Bcl-2, ou encore la fuite de molécules par fission mitochondriale (Tait et al., 2010) (Figure 14).

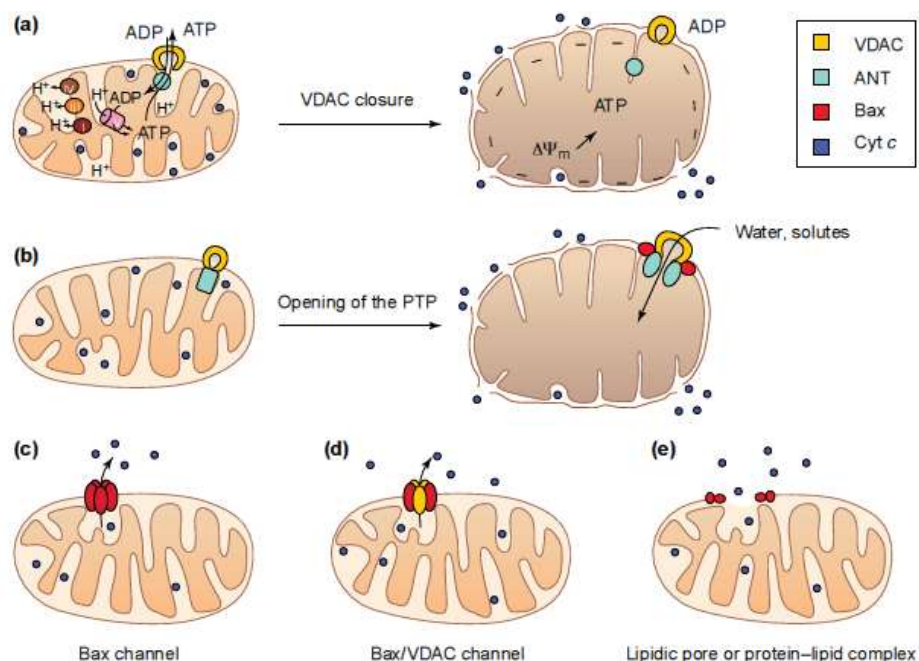


Figure 14 - Différents mécanismes de perméabilisation des mitochondries (tiré de Desagher et al., 2000).

A.2.2.2.1 Ouverture du canal mPTP.

Le premier processus de perméabilisation de la mitochondrie passe par l'ouverture d'un canal de la membrane interne des mitochondries, le mPTP (Gogvadze et al., 2006). L'ouverture de ce canal autorise le passage de molécules de moins de 1,5 kDa, comme l'eau et différents solutés, vers la matrice mitochondriale.

Cette entrée massive de molécules entraîne un gonflement de la matrice mitochondriale et un étirement de la membrane interne. Or cette membrane possède de nombreuses invaginations et donc une surface plus importante que la membrane externe. Son extension entraîne donc une pression mécanique, qui fait éclater la membrane externe, provoquant ainsi la fuite vers le cytoplasme des molécules de l'espace inter-membranaire, comme les facteurs pro-apoptotiques (Feldmann et al., 2000).

Ce processus est principalement contrôlé par le pH de la matrice mitochondriale, dépendant des flux de Ca^{2+} . Le gonflement de la matrice n'étant pas systématique dans l'apoptose mitochondriale, il servirait à amplifier le phénomène, plutôt que l'initier (Desagher et al., 2000).

Une autre manière de disloquer la membrane externe des mitochondries est la fermeture du canal VDAC, initiée par la protéine Bcl-X_L par exemple (Shimizu et al., 1999).

Ce canal est situé sur la membrane externe des mitochondries et permet l'échange ATP-ADP. Le blocage de cet échange stoppe le flux de protons entre la matrice mitochondriale et le cytoplasme de la cellule. Ceci entraîne une hyperpolarisation de la membrane interne et une chute du potentiel membranaire mitochondrial, aboutissant également à un gonflement de la matrice d'origine osmotique (Heiden et al., 1999).

A.2.2.2.2 Formation de pores trans-membranaires.

Une seconde hypothèse pour la fuite des facteurs pro-apoptotiques inter-membranaires, est la formation de pores au niveau de la membrane externe. Plusieurs modèles impliquant des protéines de la famille Bcl-2 vont dans ce sens. Par différents mécanismes, les protéines Bax et Bak peuvent former des pores de taille suffisante pour laisser passer le cytochrome c (Tait et al., 2010).

Sous l'action de la protéine Bid activée, Bax et Bak s'oligomérisent, formant un pore dans la membrane externe des mitochondries. Ces protéines pro-apoptotiques peuvent également se complexer à d'autres protéines mitochondriales. En effet, en interagissant avec le canal VDAC, les protéines Bax et Bak peuvent modifier la conformation du canal, créant ainsi un pore capable de laisser passer des molécules de taille plus importante (Shimizu et al., 1999).

A.2.2.2.3 Fuites de molécules par fission de la membrane.

Enfin, des fuites transitoires au niveau de la membrane externe pourraient permettre le relargage des protéines mitochondriales. Ce processus peut être envisagé grâce à la dynamique des lipides constituant les membranes.

En effet, Bax et Bak seraient capables d'induire des modifications de la courbure de la membrane, formant ainsi des pores transitoires entre les lipides. Ces espaces permettraient la libération des molécules inter-membranaires (Gonzalvez et al., 2007). Une démonstration dans ce sens a montré que la protéine Bax est capable d'induire la fuite de liposomes *in vitro* (Schafer et al., 2009).

L'utilisation de protéines impliquées dans la machinerie de fusion/fission des mitochondries pourrait également amplifier le phénomène de fission observé pendant l'apoptose (Sheridan et al., 2010). Ainsi la protéine Drp1 peut être recrutée pour interagir avec les protéines Bax et Mfn2 au niveau des sites de fission (Karbowski et al., 2002) (Figure 15).

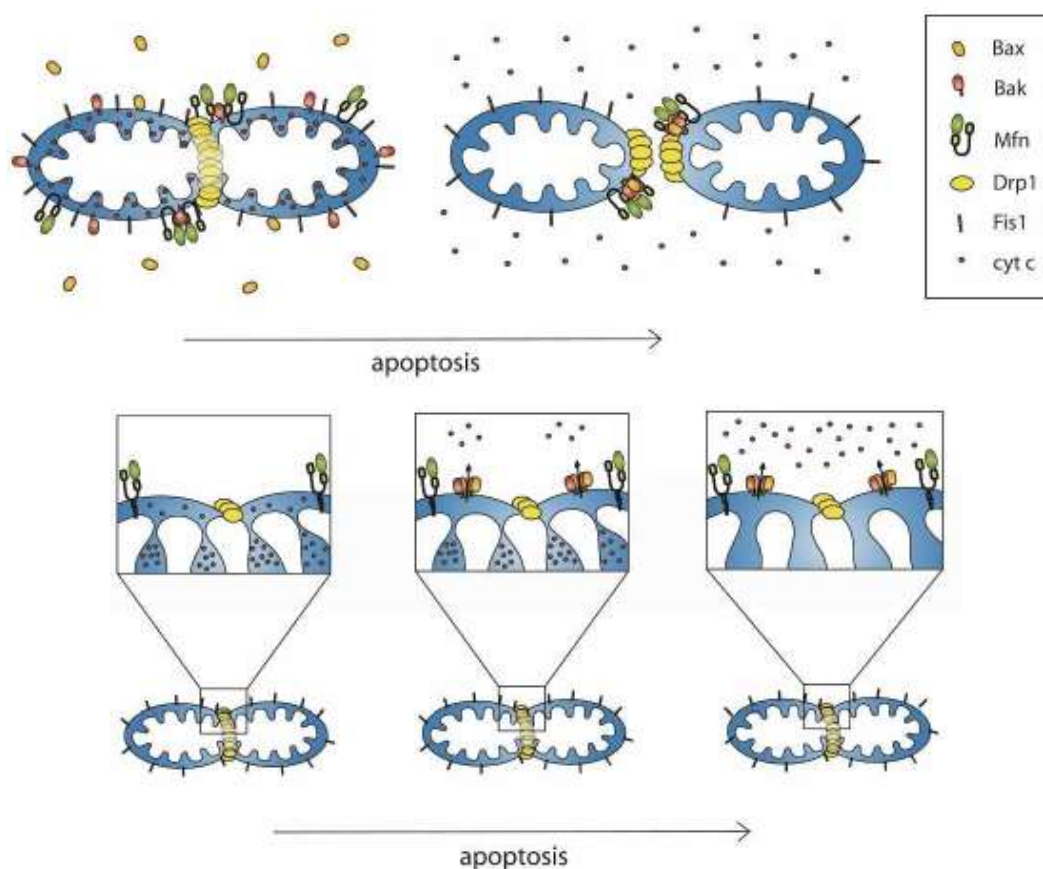


Figure 15 - Implication des phénomènes de fusion et fission des mitochondries dans l'apoptose (tiré de Suen et al., 2008).

A.2.2.3 Implication de la cardiolipine.

L'implication de la cardiolipine dans les phénomènes apoptotiques a été démontrée à plusieurs reprises (Gonzalvez et al., 2007). Ce phospholipide est principalement localisé dans la membrane interne des mitochondries, mais on en retrouve une fraction au niveau de la membrane externe, rassemblée au niveau des sites de jonction entre les membranes interne et externe (Ardail et al., 1990; Nicolay et al., 1990). Ces microdomaines riches en cardiolipine serviraient de plateforme pour faciliter l'induction de l'apoptose à différents niveaux (Figure 16).

La présence de cardiolipine pourrait par exemple attirer la caspase-8 au niveau de la mitochondrie (Gonzalvez et al., 2008). Cette caspase est capable d'induire la voie intrinsèque mitochondriale en activant la protéine Bid, qui devient tBid.

L'activation de Bid en tBid découvre trois hélices, formant une surface hydrophobe capable d'interagir avec des lipides (Kim et al., 2004). L'interaction de cette protéine avec la membrane mitochondriale est facilitée par la cardiolipine, car elle nécessite une organisation particulière des lipides (Lutter et al., 2000) : cette hypothèse est également appuyée par la localisation de tBid au niveau des sites de jonctions, riches en cardiolipine (Lutter et al., 2001).

tBid peut ensuite continuer l'induction de l'apoptose suivant deux voies. La première est décrite précédemment : tBid est capable de réguler les protéines Bax et Bak (Kuwana et al., 2002), déclenchant une fuite de cytochrome c. La seconde voie implique une interaction entre tBid et la cardiolipine, entraînant le remodelage des crêtes mitochondriales (Scorrano et al., 2002) et la perturbation des processus énergétiques par redistribution des phospholipides (Gonzalvez et al., 2005).

La présence de cardiolipine permettrait donc d'attirer les différents acteurs impliqués dans ce processus d'induction de l'apoptose, mais faciliterait également son exécution (Sorice et al., 2009).

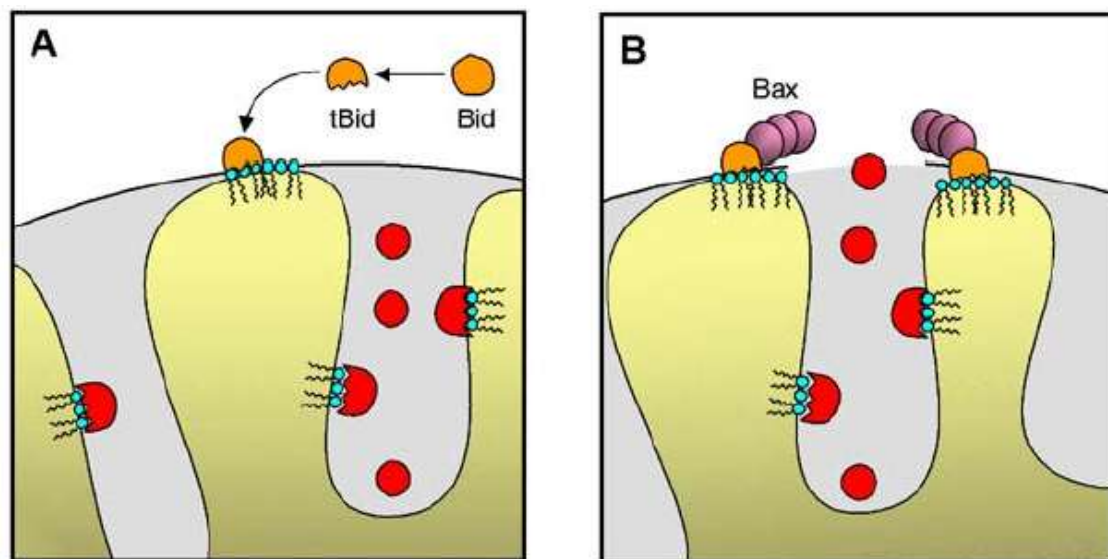


Figure 16 - Implication de la cardiolipine dans l'induction de l'apoptose par tBid (Gonzalvez et al., 2007).
La cardiolipine est colorée en bleu et le cytochrome c en rouge.

A.2.3 Régulation de l'apoptose par la famille Bcl-2.

Les protéines de la famille Bcl-2 sont les principaux régulateurs qui pèsent dans la balance entre prolifération et mort cellulaire. Cette famille regroupe des protéines pro- et anti-apoptotiques, impliquées principalement dans la voie intrinsèque mitochondriale.

A.2.3.1 Les protéines de la famille Bcl-2.

La première protéine, qui a donné son nom à cette famille, est une protéine anti-apoptotique capable de bloquer la mort des cellules B lorsqu'elle est surexprimée. Bcl-2 ne stimule pas la prolifération des cellules mais les protège de la mort (Vaux et al., 1988) : elle induit ainsi une survie pathologique, à l'origine de la formation de lymphomes folliculaires de type B (Tsujimoto et al., 1985). Depuis, cette protéine a été identifiée comme jouant un rôle dans de nombreuses voies régulatrices de l'apoptose (Cory et al., 2002).

Bcl-2 est composée de 4 domaines caractéristiques, nommés domaines BH1 à 4. D'autres protéines ont par la suite été rattachées à cette famille car elles possédaient une homologie de séquence avec un ou plusieurs de ces domaines (Youle et al., 2008). Cependant, seul le domaine BH3, composé du motif LXXXGD (Zha et al., 1996), est commun à tous les membres de la famille Bcl-2 (Aouacheria et al., 2005).

Des analogues de cette famille ont été retrouvés dans différentes espèces et la base de données <http://bcl2db.ibcp.fr> tente de rassembler toutes les informations relatives à ces protéines (Blaineau et al., 2009).

A.2.3.1.1 Classement des protéines de la famille Bcl-2.

Les membres de la famille Bcl-2 peuvent être classés dans différentes catégories, suivant leur séquence et leur fonction pro- ou anti-apoptotique (Youle et al., 2008) (Figure 17).

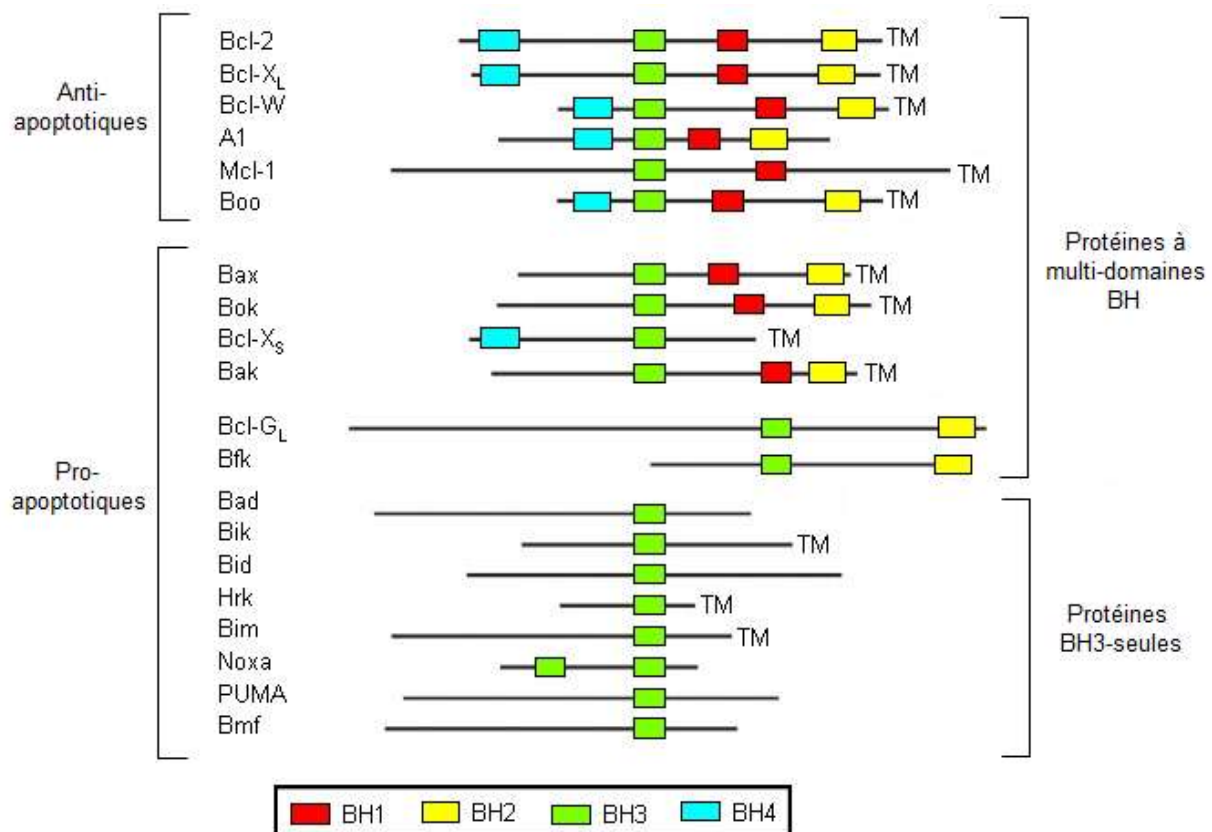


Figure 17 - Classement des protéines de la famille Bcl-2 suivant leur séquence et leur fonction (adapté de Strasser, 2005).

Si on observe la séquence des protéines de la famille Bcl-2, nous pouvons distinguer les protéines à multi-domaines BH, des protéines ne possédant que le domaine BH3 (protéines dites « BH3-only »). Si on observe leur fonction, toutes les protéines BH3-only sont des protéines pro-apoptotiques. Par contre, les protéines à multi-domaines peuvent être divisées en deux catégories : les protéines anti-apoptotiques qui possèdent les 4 domaines BH, et les pro-apoptotiques qui possèdent 2 ou 3 domaines BH et correspondent aux effecteurs de l'apoptose.

A.2.3.1.2 Structuration.

Toutes les protéines à multi-domaines, ainsi que la protéine Bid, possèdent une structure secondaire similaire, composée de plusieurs hélices α . Les protéines BH3-only quant-à-elles sont très hétérogènes, et correspondent principalement à des protéines intrinsèquement désordonnées.

Plusieurs structures de protéines de la famille Bcl-2 ont été déterminées par RMN ou cristallographie, et correspondent principalement aux protéines à multi-domaines (Table 1). Pour les protéines BH3-only, les structures connues correspondent en général à un fragment contenant le domaine BH3 complexé à une protéine à multi-domaines. En effet, la formation du complexe est souvent indispensable à la structuration du fragment (Hinds et al., 2007).

Fonction	Protéine	Constitution	Structure 3D
Anti-apoptotique	Bcl-2	Protéines à multi-domaines BH	1G5M, 1GJH (Petros et al., 2001)
	Bcl-X _L		1LXL 1MAZ (Muchmore et al., 1996)
	Bcl-W		1MK3 (Denisov et al., 2003)
	Mcl-1		1WSX : région [152-308] (Day et al., 2005)
	BCL2L10		2KUA (Rautureau et al., 2010)
	A1		2VOF, 2VOG, 2VOH, 2VOI : complexes avec des domaines BH3 (Smits et al., 2008)
Pro-apoptotique	Bax	Protéines BH3-only	1F16 (Suzuki et al., 2000)
	Bak		2IMT : homodimère (Moldoveanu et al., 2006)
	Bid		2BID (Chou et al., 1999)
	BAD		1G5J : fragment [140-164] en complexe avec Bcl-X _L (Petros et al., 2000)
	Bim		1PQ1 : fragment [83-115] en complexe avec Bcl-X _L (Liu et al., 2003)
	BMF		2VOG : fragment [126-152] en complexe avec A1 (Smits et al., 2008)
	Noxa		2ROD : fragment NoxaA [17-42] en complexe avec Mcl1 [152-308] 2JM6 : fragment NoxaB [68-93] en complexe avec Mcl1 [152-308] (Day et al., 2008) (Czabotar et al., 2007)
	PUMA		2ROC : fragment [130-155] en complexe avec Mcl1 [152-308] (Day et al., 2008)
	Beclin1		2PON : fragment [104-131] en complexe avec Bcl-X _L [1-44,85-196] 2P1L : fragment [107-127] en Complexe avec Bcl-X _L [2-26,83-198] (Feng et al., 2007) (Oberstein et al., 2007)
	Mule		2EKK : domaine UBA [1317-1356] (to be published) 3G1N : domaine HECT [4005-4374] (to be published)

Table 1 - Structures PDB des protéines de la famille Bcl-2. Les codes PDB en noir et bleu correspondent respectivement à une résolution par RMN et cristallographie.

La première structure de cette famille a été déterminée en 1996, avec la protéine Bcl-X_L (Muchmore et al., 1996). Elle est composée de 8 hélices α rassemblées autour d'une hélice centrale, donnant à la protéine une forme globulaire. Bcl-X_L possède également un domaine transmembranaire en position C-terminale, qui permet d'ancrer la protéine à la membrane. Les structures déterminées pour les autres protéines à multi-domaines montrent une organisation similaire.

Les domaines BH, caractéristiques de la famille Bcl-2, sont toujours localisés en surface et forment un sillon hydrophobe (Figure 18). Cependant, ces régions correspondent à des domaines d'homologie, qui n'ont pas une séquence strictement conservée. Ainsi, la composition en acides aminés des domaines BH permet de modifier les caractéristiques du sillon, notamment en termes de taille, de profondeur et d'hydrophobicité.

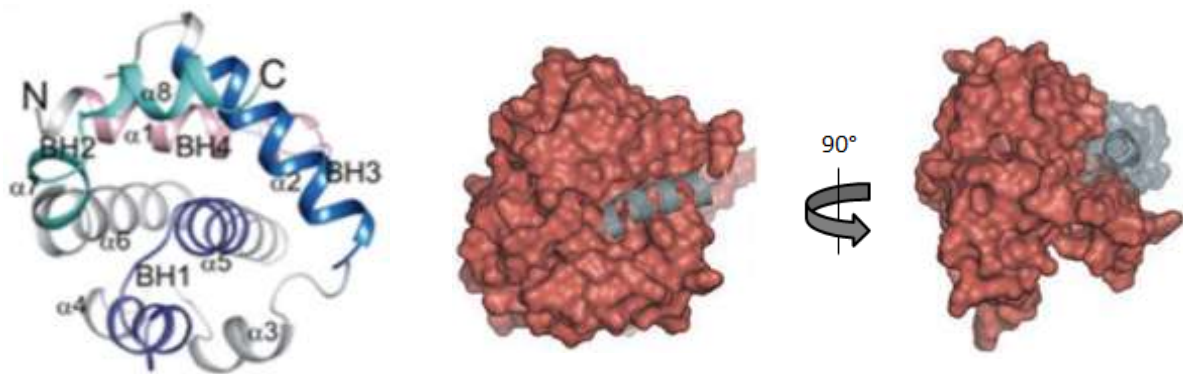


Figure 18 – Localisation des domaines BH sur la structure de Bcl-X_L et visualisation du sillon hydrophobe.

À gauche, représentation des structures secondaires de la protéine Bcl-X_L et mise en évidence de ses 4 domaines BH (Chipuk et al., 2010). Au milieu et à droite, structure de Bcl-X_L (rouge) avec l'enfouissement de son hélice C-terminale (gris) dans le sillon hydrophobe (Youle et al., 2008).

Le sillon hydrophobe présent dans toutes les protéines à multi-domaines peut accueillir différents peptides de forme hélicoïdale. Ce peptide hélicoïdal peut correspondre au propre domaine transmembranaire de la protéine. Son interaction avec le sillon va influencer la localisation de la protéine, comme c'est le cas pour la protéine Bcl-X_L. Quand le domaine transmembranaire est séquestré dans le sillon, la protéine est totalement soluble ; quand il est libéré du sillon, il permet un ancrage de la protéine dans une membrane.

Le sillon hydrophobe peut également interagir avec le domaine BH3 d'un autre membre de la famille Bcl-2 (Sattler et al., 1997). Ce phénomène peut conduire à la formation d'hétérodimères impliquant des protéines pro- et anti-apoptotique, ou d'homodimères entraînant l'oligomérisation des effecteurs (Bogner et al., 2010).

A.2.3.2 Régulation de l'apoptose par interaction protéines-protéines.

La régulation de l'apoptose passe par différentes interactions entre trois classes de protéines de la famille Bcl-2 : les anti-apoptotiques, les BH3-only et les effecteurs (pro-apoptotiques à multi-domaines BH).

A.2.3.2.1 Déclenchement par les protéines BH3-only.

Plusieurs modèles d'interactions ont été proposés, où l'action des protéines BH3-only permet de déclencher l'apoptose.

Le premier modèle est l'activation directe des effecteurs, qui peut être de deux types (Wei et al., 2000; Kuwana et al., 2002; Letai et al., 2002). Une interaction entre protéines pro- et anti-apoptotiques laisse le champ libre aux effecteurs, qui peuvent déclencher l'apoptose en réponse à un stress cellulaire : dans ce type d'activation, les protéines BH3-only sont appelées « senseurs ». L'interaction entre protéines pro- et anti-apoptotiques peut également entraîner la libération d'un activateur qui, par interaction directe avec un effecteur, va déclencher l'apoptose : dans ce cas-là les protéines BH3-only sont appelées « dérégresseurs ».

Un autre modèle d'interaction, appelé neutralisation, a été mis en avant (Uren et al., 2007; Willis et al., 2007). Dans ce modèle, les effecteurs sont séquestrés sous forme active par les protéines anti-apoptotiques : une interaction avec les protéines pro-apoptotiques permet la libération des effecteurs, qui peuvent déclencher l'apoptose.

A.2.3.2.2 Inhibition par les protéines anti-apoptotiques.

Plus récemment, les différents mécanismes de déclenchement de l'apoptose impliquant la famille Bcl-2, ont été rassemblés sous forme de deux « modes » (Figure 19). Dans ce modèle, les protéines anti-apoptotiques empêchent le déclenchement de l'apoptose en inhibant directement les protéines pro-apoptotiques et/ou en bloquant l'accès aux effecteurs (Llambi et al., 2011).

Le « mode 1 » correspond à une inhibition des protéines pro-apoptotiques par une interaction directe avec les protéines anti-apoptotiques. Dans le « mode 2 » les effecteurs, séquestrés par les protéines anti-apoptotiques, sont libérés par interaction avec les protéines pro-apoptotiques.

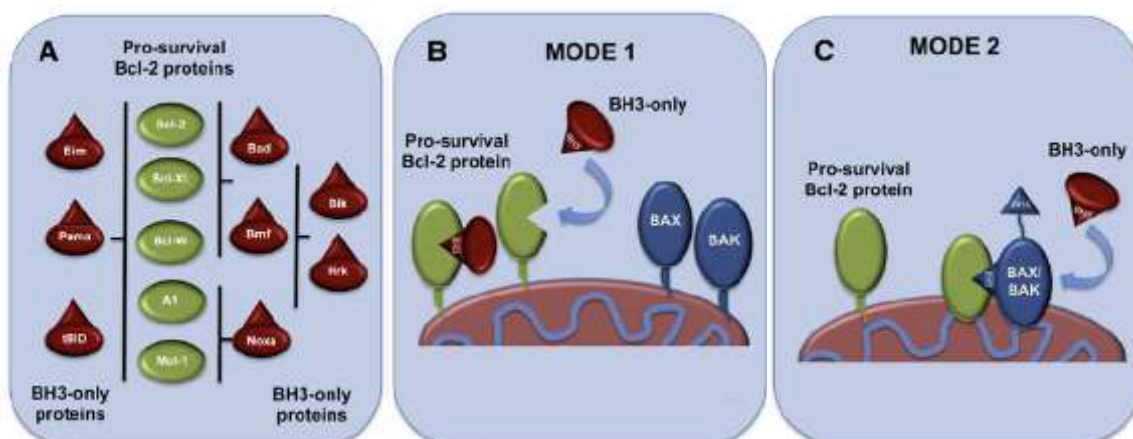


Figure 19 - Régulation de l'apoptose par les membres de la famille Bcl-2 (tiré de Cullen et al., 2011).

A : interactions entre les protéines anti-apoptotiques et les protéines pro-apoptotiques de type BH3-only.

B : régulation de type « mode 1 » par inhibition des protéines anti-apoptotiques.

C : régulation de type « mode 2 » par levée de l'inhibition des effecteurs de l'apoptose.

Ces deux modes peuvent tout à fait être complémentaires : en démarrant avec le mode 1 qui nécessite peu de protéines pro-apoptotiques, puis le mode 2 qui est engagé lorsque le ratio pro/anti-apoptotique est proche de 1 (Lovell et al., 2008).

A.2.3.3 Un espoir thérapeutique.

Les cellules cancéreuses sont des cellules présentant des dysfonctionnements de leurs processus apoptotiques. On observe de plus en plus de protéines de la famille Bcl2 impliquées dans le développement et la résistance des cellules cancéreuses, notamment à cause d'une dérégulation de la balance entre les protéines pro et anti-apoptotiques. Or les interactions entre ces protéines passent principalement par leur domaine BH3.

Plusieurs stratégies thérapeutiques ont donc été mises en place utilisant des molécules inspirées du domaine BH3 de certaines protéines de la famille Bcl-2 (Letai et al., 2002).

Des peptides basés sur les protéines Bid et Bim peuvent provoquer l'oligomérisation des protéines Bax et Bak, ainsi que la fuite de cytochrome c. Des peptides inspirés des protéines Bad et BIK, vont induire des désordres mitochondriaux par inhibition de protéines anti-apoptotiques. Enfin des peptides basés sur les protéines Bad et Bim, utilisés en synergie, sont capables de tuer des cellules leucémiques.

A.3 La mitogaligine, une protéine pro-apoptotique originale.

C'est dans le cadre de l'étude du phénomène d'apoptose que le gène codant la mitogaligine a été découvert.

A.3.1 Le gène humain galig.

A.3.1.1 Un gène particulier.

Le gène *galig*, mis au jour par l'équipe d'Alain Legrand (CBM, Orléans) présente quelques particularités pour un gène humain. Localisé au niveau du chromosome 14, ce gène est emboîté dans le gène codant la *galectine-3 (LGALS3)* (Guittaut et al., 2001).

Ce type de localisation interne est surtout présent chez les virus et les organismes procaryotes, car l'imbrication de gènes permet d'augmenter le nombre de gènes sans augmenter la taille du génome. Cependant, des gènes emboîtés ont également été identifiés chez les eucaryotes, pour qui la compaction du génome n'est pas une contrainte : la présence d'introns par contre facilite l'insertion de nouveaux promoteurs, voire de gènes entiers (Kumar, 2009).

Contrairement aux virus, environ 1/3 des gènes emboîtés eucaryotes correspondraient à des séquences codantes (158 gènes sur 373) et seulement 53 d'entre eux ont une séquence codante parallèle à la séquence du gène hôte (Yu et al., 2005) : le gène *galig* fait partie de cette dernière catégorie.

Enfin, une autre particularité de ce gène est qu'il possède deux cadres de lecture décalés (Figure 20) : il est capable de coder deux protéines différentes entre elles et différentes de la *galectine-3* (Guittaut et al., 2001).

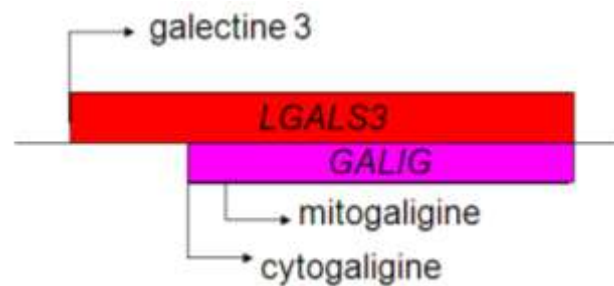


Figure 20 - Le gène humain *galig* est imbriqué dans le gène codant la *galectine-3*.

A.3.1.2 Les galigines : deux protéines bien distinctes.

Une fusion avec la protéine fluorescence EGFP a permis la localisation cellulaire des produits de *galig* (Guittaut et al., 2001): la mitogaligine se trouve au niveau des mitochondries, et la cytogaligine reste dans le cytoplasme et le noyau (Figure 21).

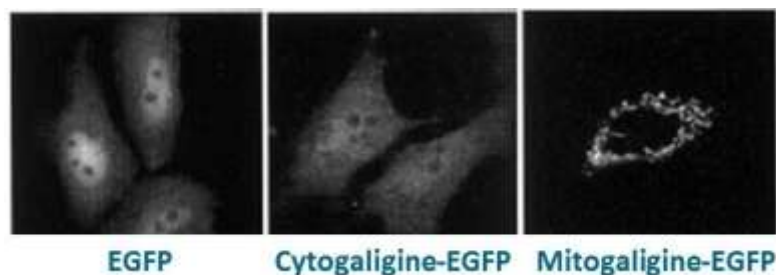


Figure 21 - Localisation cellulaire des produits du gène *galig* (tiré de Guittaut et al., 2001).
Localisation par fluorescence des produits de *galig* fusionnés à la protéine EGFP.

Avec deux cadres de lecture différents, les galigines comptent une centaine de résidus et des séquences totalement distinctes : la cytogaligine est composée d'une majorité de Leucine, Proline et Glycine (respectivement 20, 13 et 12 %), alors que la mitogaligine est très hydrophobe et cationique avec 12 % d'Arginines et un pI de 11,6 à pH physiologique.

Les propriétés de la mitogaligine correspondent à des protéines mitochondriales (Horwich, 1990), sa localisation cellulaire n'est donc pas étonnante.

A.3.1.3 Un gène pro-apoptotique.

L'expression transitoire de *galig* dans des cellules transfectées provoque l'apparition de signes de cytotoxicité (Duneau et al., 2005) : une dégradation de l'ADN, la condensation des organites, une vésicularisation des cellules et la translocation de phosphatidylsérine vers la membrane externe, sont autant de phénomènes correspondants à une entrée en apoptose.

Contrairement à la cytogaligine, l'expression de la mitogaligine ralentit significativement la croissance des cellules (Duneau et al., 2005). L'effet pro-apoptotique de *galig* serait donc principalement provoqué par la production de mitogaligine. L'accumulation de cytochrome c dans le cytoplasme confirme l'induction d'une apoptose par la voie intrinsèque mitochondriale.

Galig est essentiellement exprimé dans les monocytes et granulocytes. Une meilleure compréhension du fonctionnement de ce gène permettrait de préciser la régulation du processus apoptotique dans ce type de cellules. L'activité pro-apoptotique de *galig* venant principalement de la mitogaligine, l'étude du gène *galig* a été focalisée sur cette protéine.

A.3.2 La mitogaligine : une protéine de l'apoptose mitochondriale.

A.3.2.1 Conservation de la séquence codant la mitogaligine.

Le gène humain *galig* présente une homologie de séquence avec des domaines du gène codant la galectine-3 d'autres espèces, avec un pourcentage d'identité variant de 64 à 98% (Table 2). Tous ces gènes possèdent une ORF pouvant coder une protéine apparentée à une mitogaligine, avec 46 à 97% d'identité.

Si l'on regroupe ces gènes et protéines sur la base de leur identité, on obtient quatre groupes, correspondants à la classification phylogénétique des espèces (Figure 22). Si la mitogaligine est parfaitement conservée parmi les primates, les mitogaligines putatives des autres espèces présentent une grande variété de taille : de 39 résidus pour le rat, à 135 pour le chien.

Certaines protéines présentent une délétion de la partie C-terminale de la mitogaligine. Or la substitution d'un nucléotide peut tout à fait expliquer l'apparition d'un codon stop, notamment chez l'éléphant, le cheval et le rat. Pour la souris, on peut remarquer que les neuf derniers résidus sont identiques aux neuf précédents. Au niveau du gène, la séquence est identique. Il y a donc probablement eu duplication d'une partie du gène, expliquant une longueur légèrement plus importante que chez le rat.

Le même phénomène de répétitions multiples peut expliquer l'insertion de segments plus ou moins longs au centre de la protéine. Ainsi des insertions peuvent être observées pour le cochon, le bœuf et le chien. Malgré ces différents événements, la séquence de la mitogaligine est relativement bien conservée, avec une identité un peu plus faible au niveau de la partie centrale, siège des différentes insertions.

A noter enfin que les tryptophanes peuvent aisément remplacer des Arginines, et vice-versa, par substitution d'un seul nucléotide. Ces deux acides aminés sont pointés, car mises à part les protéines murines, les mitogaligines putatives sont particulièrement riches en tryptophanes (10-17%) et en résidus chargés (8-20% dont 5-16% d'Arginines). Or cette composition en acide aminés n'est pas courante, notamment parmi les protéines humaines (10 fois plus de tryptophanes que la moyenne). La mitogaligine revêt donc un caractère particulier de par sa séquence peptidique.

Organisme	% d'identité ADN	% d'identité protéique	% Trp	% Arg	% Chargés	n° d'accension NCBI
Homme	100	100	12.4	12.4	16.5	AF266280.1
Chimpanzé	98	97	11.3	11.3	15.5	XM_003314336.1
Orang outan	98	96	12.4	12.4	16.5	XM_002824767.1
Gibbon	97	95	13.4	8.2	12.4	XM_003267721.1
Macaque	94	90	14.7	10.5	13.7	XM_002805084.1
Ouistiti	93	89	13.4	11.3	14.4	XM_002753970.1
Cochon	78	67	13.0	7.4	13.1	NM_001097501.1
Bœuf	72	53	16.8	8.4	12.0	NM_001102341.1
Cheval	70	49	12.0	16.0	20.0	XM_001495733.3
Eléphant	77	60	15.6	4.8	7.2	XM_003408661.1
Lapin	77	69	18.0	7.9	10.1	NM_001082338.1
Rat	90	51	10.5	13.1	15.8	NM_031832.1
Souris	75	46	4.6	16.3	18.6	NM_001145953.1
Panda	80	71	15.8	6.9	12.9	XM_002929247.1
Chien	64	47	14.2	10.4	15.7	NM_001197043.1

Table 2 - Statistiques de l'alignement des séquences de mitogaligine putatives.

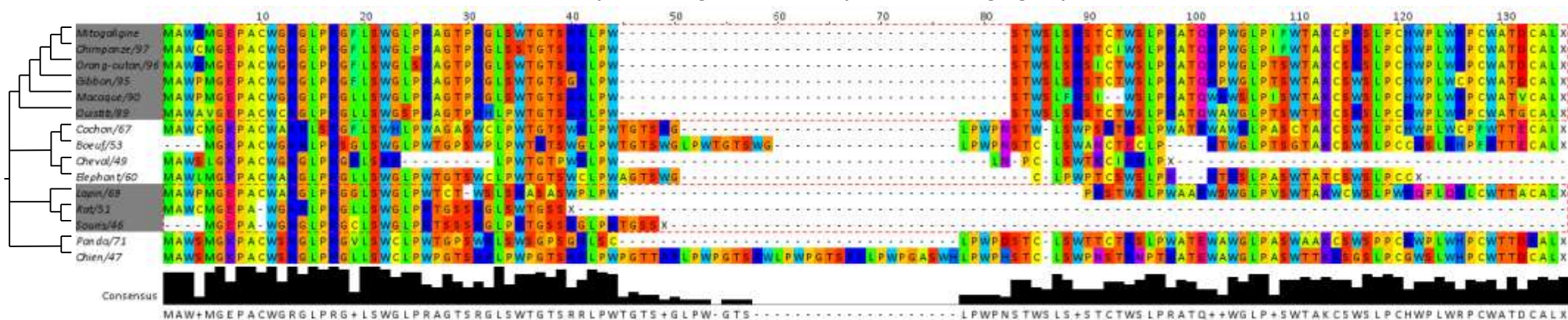


Figure 22 - Alignement des séquences de mitogaligine putatives. Le pourcentage d'identité avec la mitogaligine humaine est indiqué à droite du nom de chaque espèce. Les séquences ont été regroupées d'après le classement phylogénétique des espèces.

A.3.2.2 Une protéine pro-apoptotique originale.

Contrairement au gène, la mitogaligine ne présente pas d'homologie de séquences avec d'autres protéines connues à ce jour : la recherche par BLAST ne donne que des recouvrements partiels de la protéine, sans véritables régions similaires, seulement des résidus parsemés.

Contrairement aux autres protéines de la famille Bcl-2, la mitogaligine ne possède ni domaine BH, ni fragment transmembranaire. Elle ne peut donc pas être rattachée à cette famille de protéines. De plus, sa composition en acides aminés la rapproche plus des protéines antimicrobiennes, que des protéines de la famille Bcl-2. En effet, il existe différentes catégories de protéines antimicrobiennes et la mitogaligine peut faire partie de deux d'entre elles : les protéines cationiques et les protéines riches en un type d'acide aminé, dans notre cas le tryptophane (Brogden, 2005).

Un alignement de séquence avec les protéines antimicrobiennes de la base de données APD (Antimicrobial Peptides Database) montre des similarités avec la famille des cathélicidines (Figure 23). Seulement, les 29% d'identité obtenus pour le meilleur score, correspondent principalement à un alignement des Prolines et Arginines, mais pas des tryptophanes.

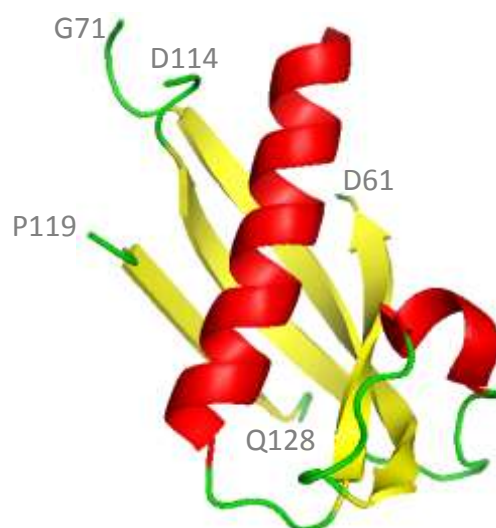


Figure 23 – Structure du motif cathélicidine de la protéine-3.

Code PDB : 1KWI (Sanchez et al., 2002).

Les différents algorithmes de prédiction de structures secondaires ne donnent pas de résultats cohérents. Les deux méthodes de prédiction de structures secondaires, utilisées par le programme SSCP (Eisenhaber et al., 1995, 1996a, 1996b), ne donnent pas des résultats concordants. La 1^{ère} méthode de calcul, basée uniquement sur la composition en acides aminés, indique 9.8 % d'hélice α , 1.0 % de feuillet β et 89.2% de non structuré. La 2^{nde} méthode, qui prend également en compte la composition en structures secondaires, indique 59.9 % de feuillet β de 40.1 % de non structuré.

D'autres algorithmes ont été utilisés, notamment jpred (Cole et al., 2008), PSIPRED (McGuffin et al., 2000) et SOPMA (Combet et al., 2000). Tous les résultats indiquent une mitogaligine majoritairement déstructurée et les quelques acides aminés prédits en hélice ou feuillet ne sont pas systématiquement les mêmes (Figure 24).

A.3.3 L'adressage des protéines mitochondriales.

L'adressage à la mitochondrie est essentiel à la fonction apoptotique de la mitogaligine, or il existe de multiples manières d'acheminer les protéines mitochondriales à destination.

A.3.3.1 Une production commune, mais une destination variable.

A.3.3.1.1 La production dans le cytosol cellulaire.

On dénombre environ 1500 protéines dans les mitochondries de cellules humaines, mais seulement 1% d'entre elles sont produites dans la matrice mitochondriale. La majorité des protéines mitochondriales est codée par l'ADN nucléaire et produite dans le cytosol sous forme de précurseurs.

Accompagnés ou non de chaperonnes, les précurseurs intègrent la mitochondrie via le complexe TOM, localisé au niveau de la membrane externe (Figure 26). Ce complexe est une translocase composée de différents modules, dont un canal, qui peut faire passer des macromolécules à travers la membrane externe.

Les protéines adressées à l'intérieur de la mitochondrie doivent traverser le canal, sous forme repliée ou non. Les protéines contenant une région cationique sont guidées à travers le complexe par des interactions électrostatiques et hydrophobes et traversent le canal sous forme linéaire (Komiya et al., 1998). Les protéines complexées à des chaperonnes peuvent se replier sous forme de boucle et traverser le canal, la boucle en premier et les extrémités en dernier (Wiedemann et al., 2001).

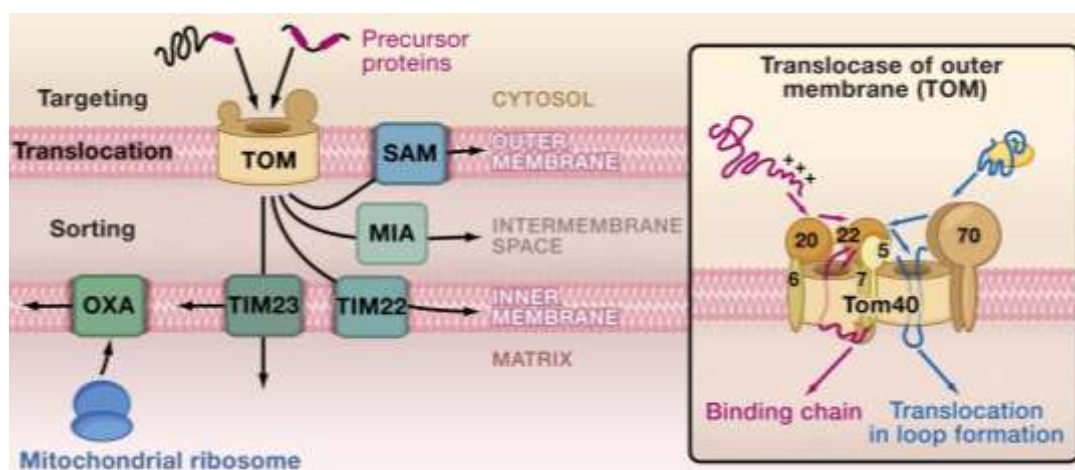


Figure 26 - Adressage des protéines mitochondriales via le complexe TOM (tiré de Chacinska et al., 2009).

Pendant longtemps, le complexe TOM était pointé comme indispensable à l'intégration des protéines mitochondriales. Cependant, cette idée ne pouvait expliquer la formation même du complexe, dont les éléments sont produits par la cellule. L'insertion de certaines protéines de la membrane externe pourrait donc se faire via des interactions avec d'autres complexes ou directement avec les lipides de la membrane (Ahting et al., 2005).

Toutes les protéines mitochondriales possèdent un signal d'adressage responsable de leur translocation vers les différents compartiments mitochondriaux (Chacinska et al., 2009). Malgré leur grande diversité, nous pouvons séparer ces signaux en trois catégories : les clivables, les non clivables et les signaux internes possédant une cystéine (Figure 27).

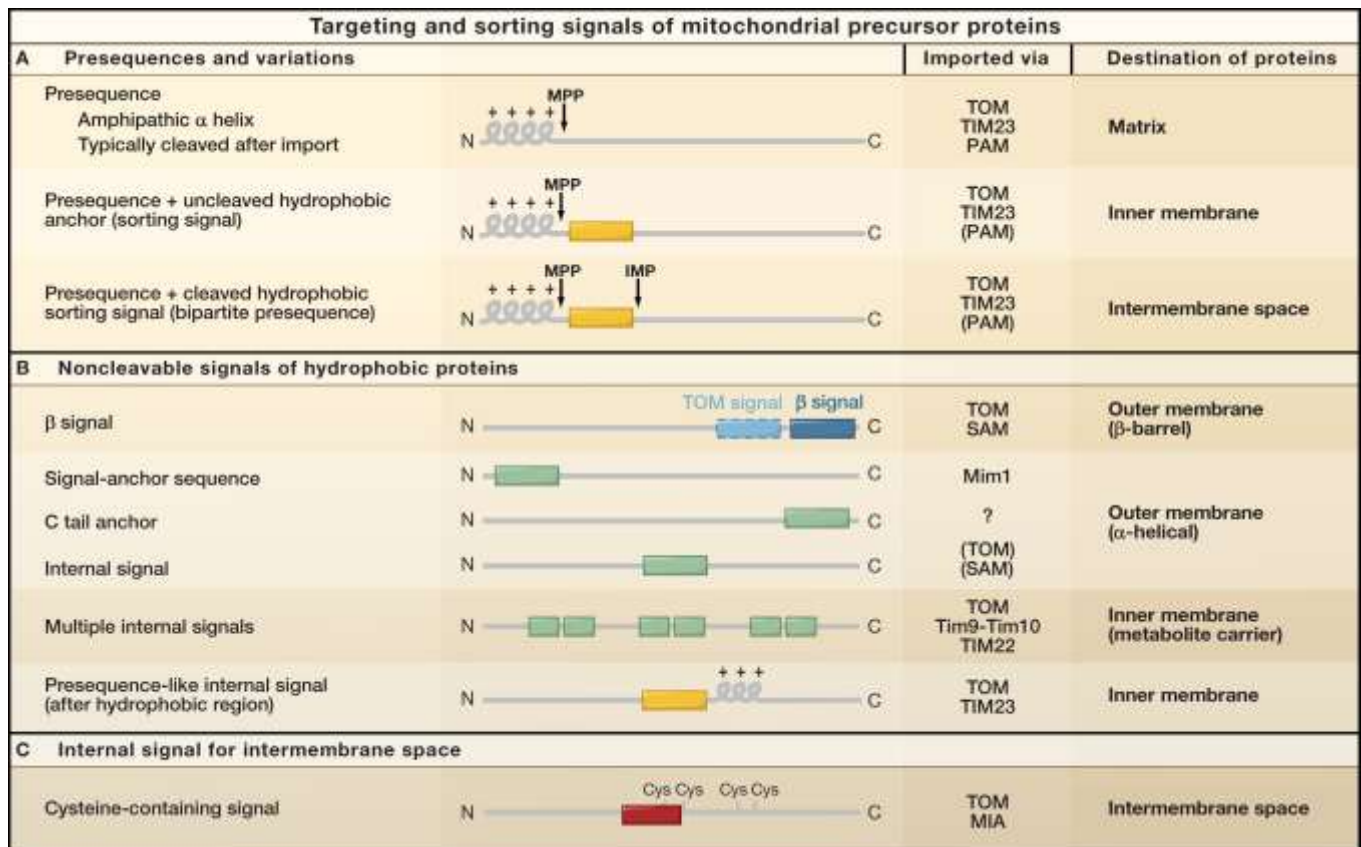


Figure 27 - Les différents signaux d'adressage mitochondrial (tiré de Chacinska et al., 2009).

A.3.3.1.2 Les signaux d'adressage clivables.

Les protéines possédant un signal d'adressage clivable sont localisées à l'intérieur de la mitochondrie : dans la matrice, la membrane interne et l'espace inter-membranaire. Ces signaux clivables sont localisés à l'extrémité N-terminale des protéines et forment une hélice cationique.

Une fois reconnue, la protéine est linéarisée pour passer à travers le complexe TOM, puis elle est prise en charge par le complexe TIM, situé dans la membrane interne. Le rapprochement des membranes au niveau des sites de contact, faciliterait le passage des protéines d'un complexe à l'autre.

La charge positive du signal d'adressage peut entraîner toute la protéine dans la matrice, où le signal est clivé par une peptidase mitochondriale (Gakh et al., 2002). Pour les protéines localisées dans la membrane interne ou l'espace inter-membranaire, l'interaction avec TIM permet de présenter le signal d'adressage dans la matrice où il est clivé, puis des interactions hydrophobes provoquent une insertion dans la membrane interne. Le segment hydrophobe peut à son tour être clivé, pour libérer la protéine dans l'espace inter-membranaire (Glick et al., 1992).

A.3.3.1.3 Les signaux d'adressage non clivables.

Ce type de signal d'adressage concerne toutes les protéines de la membrane externe (Merklinger et al., 2012), mais également certaines protéines de la membrane interne, comme les transporteurs. Les protéines de la membrane externe peuvent être entièrement membranaires, généralement sous forme de tonneau β , ou simplement ancrées à la membrane à travers une hélice α transmembranaire (Endo et al., 2010). Les protéines de la membrane interne en revanche sont totalement insérées dans la membrane.

Plusieurs protéines de la membrane externe adoptent un repliement en tonneau β , formant ainsi un pore transmembranaire : c'est le cas du canal VDAC ou du canal du complexe TOM, formé par la protéine TOM40 (Figure 28). La formation et l'insertion de ces protéines suivent un processus encore mal défini. Elles pourraient avoir deux signaux d'adressage en C-terminal, impliquant deux complexes (Kutik et al., 2008) : le premier signal, correspondant au dernier brin β du tonneau, est reconnu par le complexe SAM, le second signal serait reconnu par le complexe TOM. Outre ces complexes, d'autres protéines pourraient intervenir dans l'insertion et l'assemblage de ces tonneaux β .

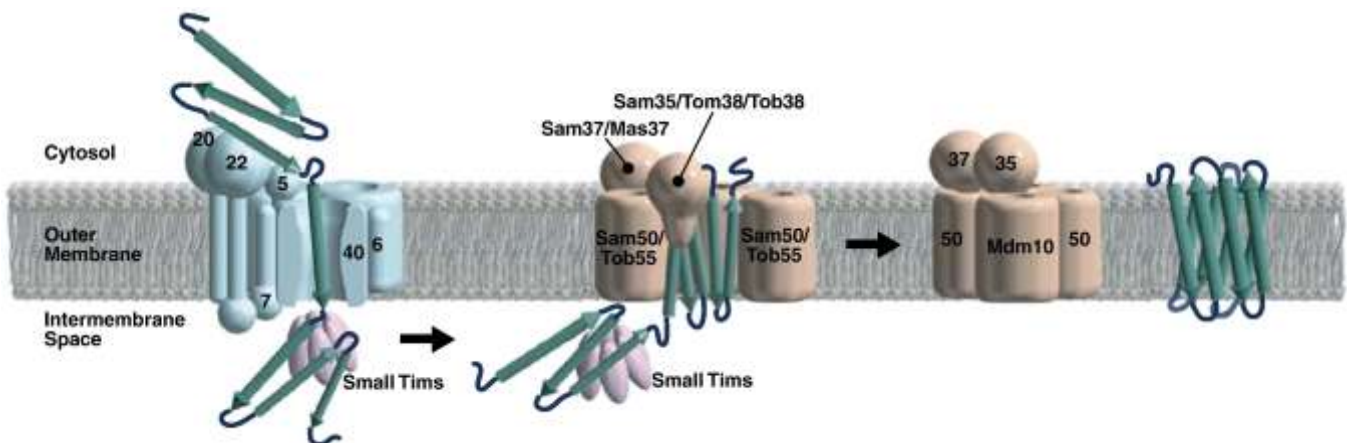


Figure 28 - Formation et insertion des protéines à tonneau β dans la membrane externe mitochondriale (tiré de Endo et al., 2010). Une protéine à tonneau β est reconnue par Tom20 et Tom22 et traverse la membrane externe à travers le canal TOM40 (gauche). Dans l'espace intermembranaire, cette protéine est prise en charge par Tim afin d'éviter la formation d'agrégats, puis elle est associée au complexe TOB (centre). Ce complexe assure l'insertion du tonneau β dans la membrane externe, puis il se dissocie en présence de Mdm10 (droite).

Les protéines de la membrane externe peuvent également adopter une structuration de type hélice α . L'ancrage de ces protéines à la membrane passe par un segment transmembranaire, constitué d'une hélice hydrophobe flanquée de résidus cationiques à ses extrémités pour la stabiliser (Figure 29). L'insertion de cette hélice, qui correspond au signal d'adressage, suit un processus différent selon sa localisation dans la protéine (Endo et al., 2010).

Lorsqu'il est en position N-terminale, le signal est reconnu et inséré dans la membrane par la protéine Mim1, éventuellement aidé par une interaction avec le complexe TOM, mais sans passer par le canal TOM40. Lorsqu'il est en position centrale, c'est le complexe SAM qui le prend en charge. Lorsqu'il est en position C-terminale, l'insertion peut se faire directement par interaction avec les lipides de la membrane (Kemper et al., 2008), mais là aussi le complexe TOM peut faciliter son insertion.

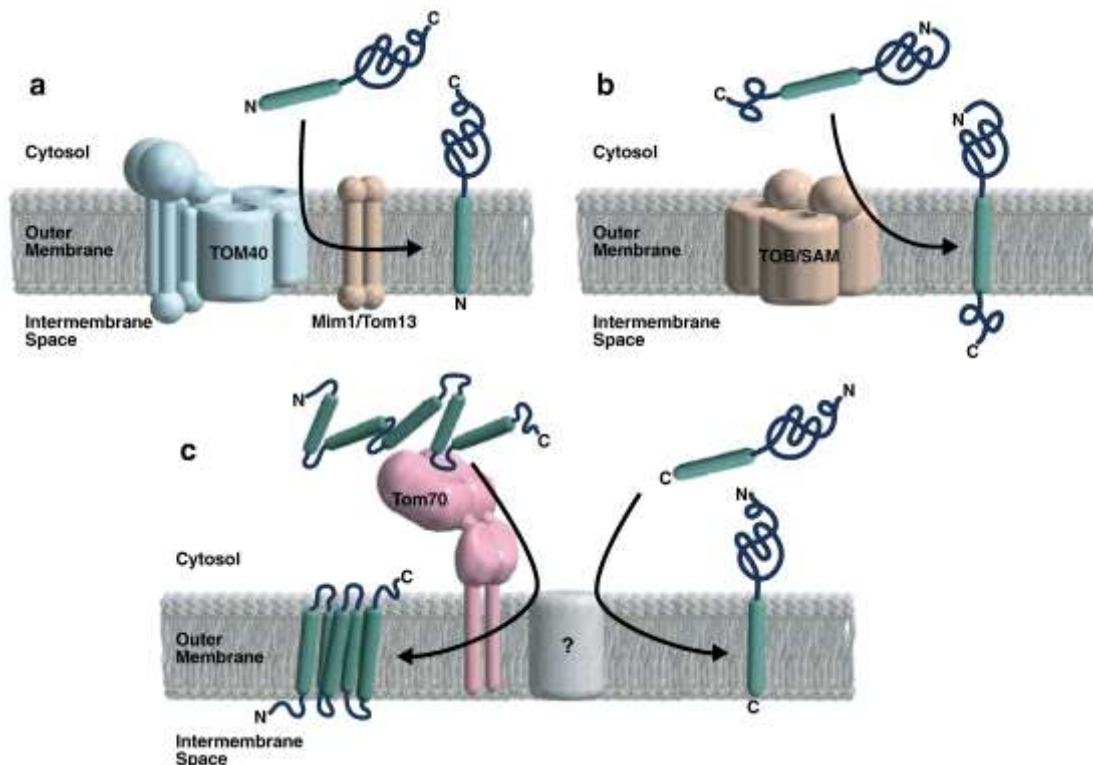


Figure 29 - Insertion des protéines à hélice α dans la membrane externe mitochondriale (tiré de Endo and Yamano, 2010). Cas des protéines ayant un segment transmembranaire en position N-terminale (a) : la plupart de ces protéines ont besoin de la présence du complexe TOM40 pour être insérées dans la membrane, mais certaines ont également besoin du complexe Mim1/Tom13. Cas des protéines ayant un segment transmembranaire en position centrale (b) : Tom22, par exemple, utilise le complexe TOB pour son insertion. Cas des protéines ayant un segment transmembranaire en position C-terminale ou fragmenté (c) : toutes ces protéines utilisent une méthode commune d'insertion, mais les protéines à signal fragmenté de mammifères peuvent également utiliser la sous-unité Tom70 du complexe TOM40.

Les protéines adressées à la membrane interne possèdent des signaux d'adressage en position interne. Ces signaux peuvent être composés de plusieurs régions hydrophobes réparties sur toute la protéine, ou d'une région hydrophobe et cationique ressemblant aux signaux clivables (Neupert et al., 2007).

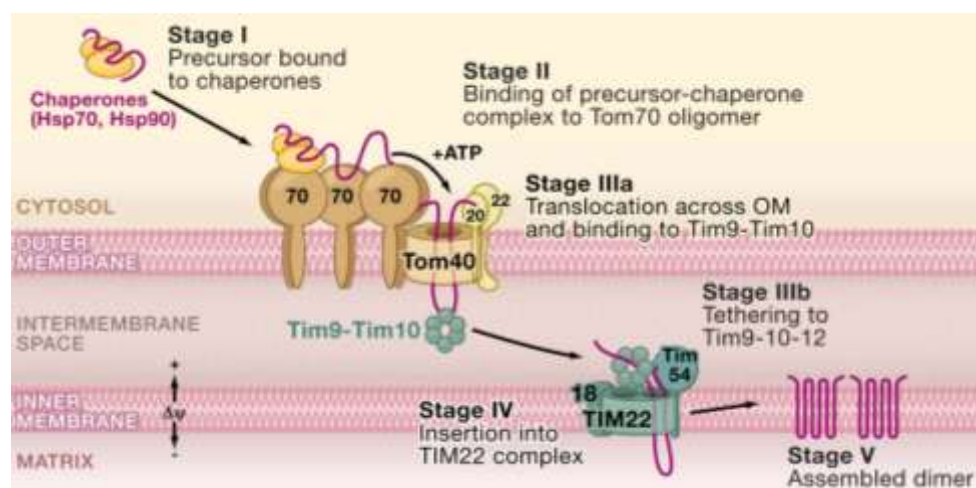


Figure 30 - Importation des protéines dans la membrane interne (tiré de Chacinska et al., 2009).

Des protéines chaperonnes, de la famille Hsp70 et Hsp90, prennent en charge les précurseurs en interagissant avec ces signaux internes, évitant également l'agrégation de ces protéines (Figure 30). Le précurseur et la chaperonne sont reconnus par le complexe TOM qui fait passer le précurseur à travers la membrane externe, sous forme de boucle. Cette boucle est reconnue par le complexe Tim9/Tim10, qui transfère le précurseur au complexe TIM. Situé dans la membrane interne, le complexe TIM est chargé de la maturation et du transfert de la protéine dans la membrane interne.

A.3.3.1.4 Les protéines à Cystéines.

Certaines protéines mitochondriales possèdent des cystéines, pouvant former des ponts disulfure : c'est le cas du complexe Tim9/Tim10, qui est stabilisé par deux ponts disulfure (Webb et al., 2006). La formation des ponts disulfure dans les protéines eucaryotes s'effectue normalement au niveau du réticulum endoplasmique, mais ce n'est pas le cas des protéines mitochondriales. Synthétisées sous forme réduite, les ponts disulfure sont formés au niveau de l'espace inter-membranaire mitochondrial (Figure 31).

Ces protéines mitochondriales possèdent un signal d'adressage interne (MISS) incluant une cystéine et une région hydrophobe. Le précurseur, maintenu sous forme réduite par interaction avec un atome de Zinc, est reconnu et pris en charge par le complexe TOM. Dès sa sortie du complexe TOM, le signal est reconnu par un récepteur situé dans l'espace inter-membranaire, la protéine Mia40. L'oxydation des cystéines est réalisée par le complexe Mia40-Erv1-précurseur, mais l'ordre d'intervention de Mia40 et Erv1 reste mal défini (Stojanovski et al., 2008).

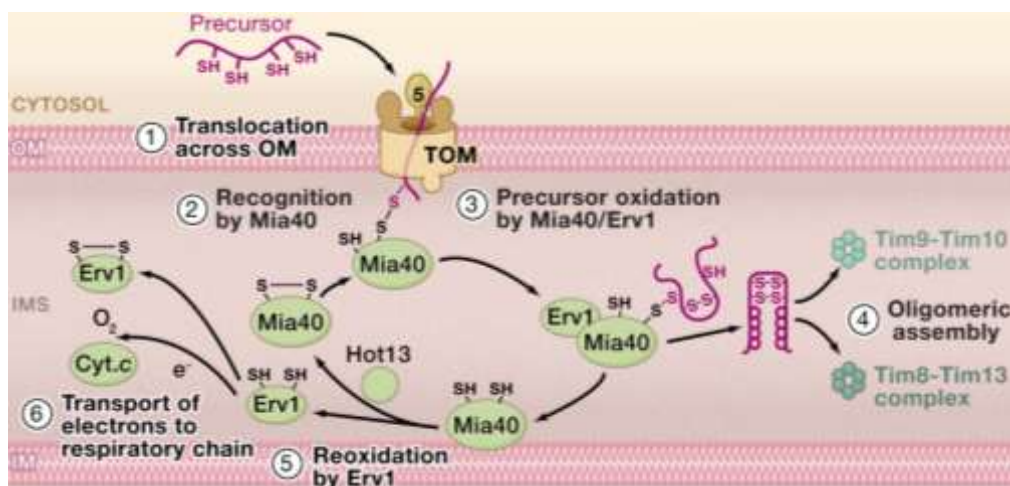


Figure 31 - Adressage et maturation des protéines à cystéines (tiré de Chacinska et al., 2009).

A.3.3.2 Le fragment d'adressage mitochondrial de la mitogaligine.

A.3.3.2.1 Localisation.

Le fragment d'adressage mitochondrial de la mitogaligine a été localisé en 2005 en délétant différents fragments de la protéine entière (Duneau et al., 2005) (Figure 32). Par la suite, ce fragment a été plus précisément délimité et il correspond au segment [31-53].

La position interne de ce fragment pointe une nouvelle différence par rapport aux protéines de la famille Bcl-2. En effet, certains membres de cette famille possèdent un segment transmembranaire permettant un ancrage dans la membrane mitochondriale. Or ce segment est toujours en position C-terminale, contrairement au fragment d'adressage de la mitogaligine, qui est en position interne.

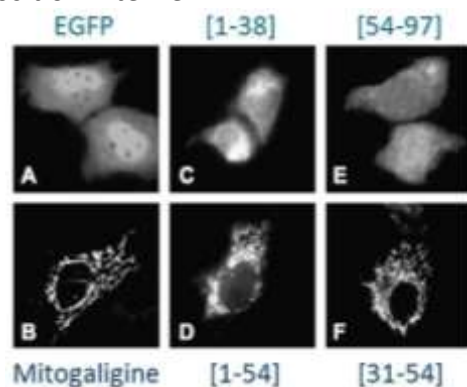


Figure 32 - Localisation du fragment d'adressage mitochondrial de la mitogaligine (tiré de Duneau et al., 2005).

Différents fragments de la mitogaligine ont été fusionnés à l'EGFP puis localisés par fluorescence, afin de déterminer la région indispensable à l'adressage mitochondrial.

A.3.3.2.2 Un fragment cytotoxique.

Différents fragments de mitogaligine ont été injectés dans des cellules humaines afin de délimiter un segment indispensable à l'activité cytotoxique de la protéine (Duneau et al., 2005). L'activité la plus importante a été obtenue avec la micro-injection du fragment central [35-53] qui provoque une agrégation massive des organelles de la cellule et un relargage de cytochrome c dans le cytoplasme (Figure 33). Le fragment d'adressage mitochondrial contenant le fragment [35-53], il serait donc également capable de déclencher une entrée en apoptose de la cellule, probablement par la voie mitochondriale.

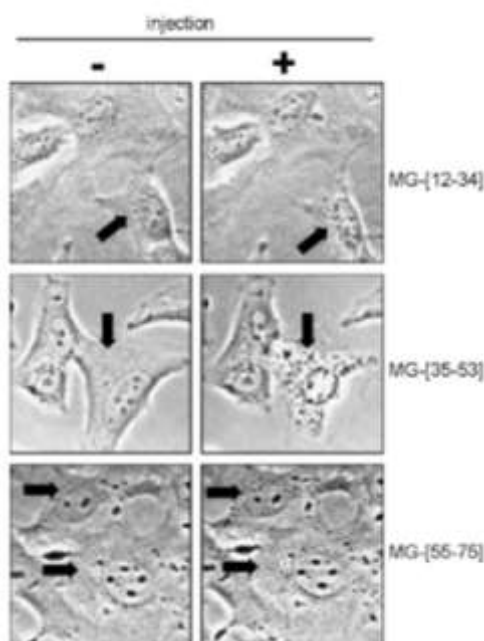


Figure 33 – Effets de la micro-injection de fragments de mitogaligine (tiré de Duneau et al., 2005). Visualisation par microscopie optique de fibroblastes, avant (gauche) et après (droite) la microinjection de fragments de mitogaligine à une concentration de 200µM (de haut en bas : fragments [12-34], [35-53] et [55-75]).

A.3.3.2.3 Interaction avec la cardiolipine.

La fuite de cytochrome c et l'apoptose mitochondriale étant étroitement liées à la présence de cardiolipine, l'influence de ce phospholipide sur l'action du fragment d'adressage mitochondrial a été explorée.

Notamment, la capacité du fragment d'adressage mitochondrial à interagir avec des membranes et induire la fuite du contenu de liposomes a été testée sur des vésicules de différentes compositions lipidiques (Gonzalez et al., 2007). Cette étude a montré que l'affinité du fragment [35-53] est plus importante pour des membranes contenant de la cardiolipine et la fuite du contenu de liposome est plus efficace en présence de lipides anioniques. L'importance des charges dans cette interaction a été vérifiée en observant l'interaction de peptides mutés au niveau des arginines. La suppression des charges du doublet d'arginines au centre du fragment [31-53] entraîne une inhibition importante de l'interaction du peptide avec les liposomes, malgré la présence de cardiolipine (Gonzalez et al., 2007).

L'interaction du fragment d'adressage mitochondrial avec la membrane des mitochondries pourrait donc être à l'origine du déclenchement de l'apoptose, notamment à travers des interactions électrostatiques avec la cardiolipine.

PARTIE B. Matériel et Méthodes.

B.1 Production de protéines par Synthèse Peptidique sur Phase Solide.

B.1.1 Principe de la synthèse récurrente de peptides.

Le principe de la SPPS (Figure 34) a été proposé puis appliqué pour la première fois par Merrifield (Merrifield, 1963) et a révolutionné la production de peptides. Le peptide est immobilisé sur un support insoluble polymérique, appelé « résine », et allongé de manière récurrente et itérative à partir de son extrémité C-terminale. L'utilisation de différents groupements protecteurs, permet d'obtenir un couplage régio-sélectif entre les acides aminés.

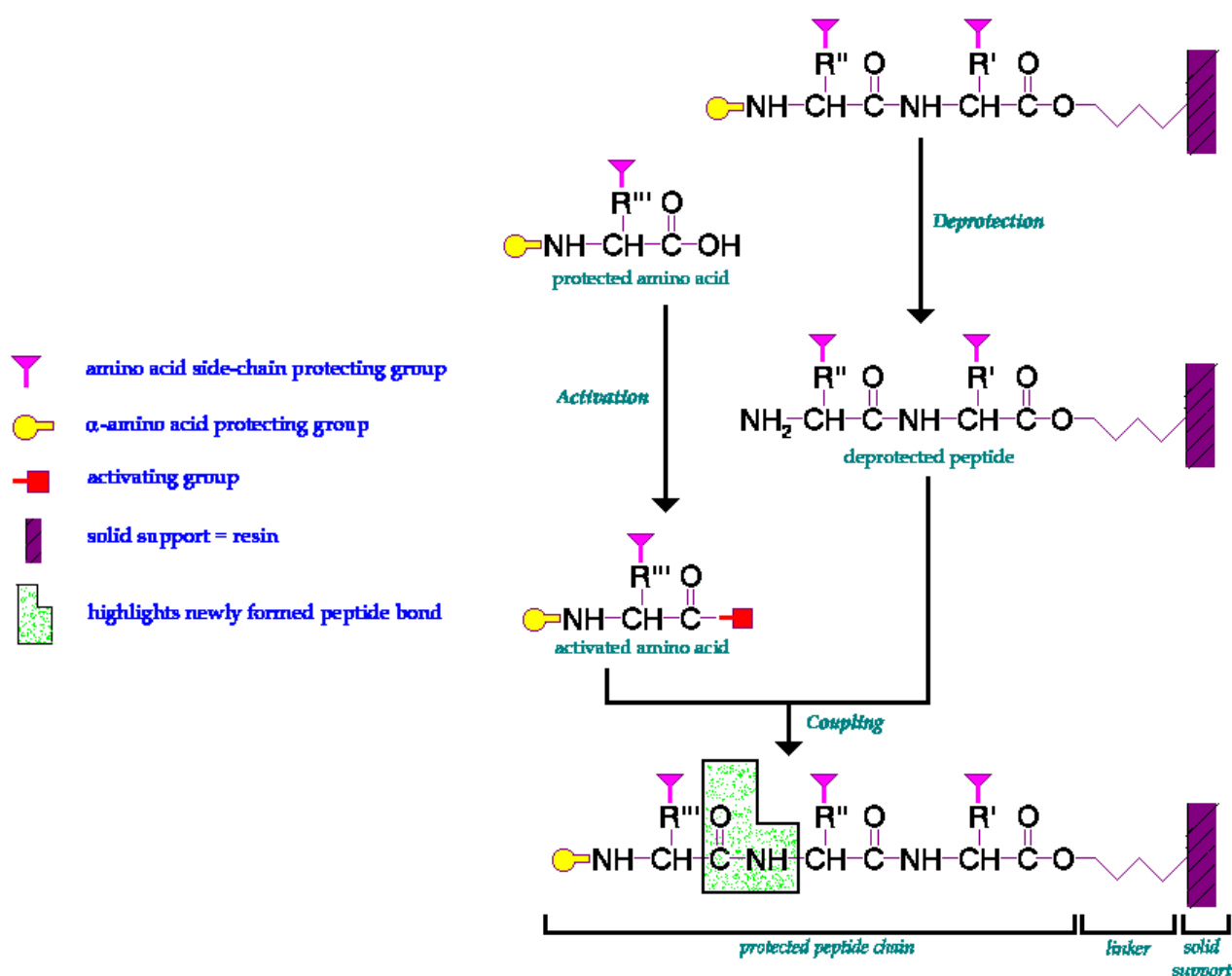


Figure 34 - Principe schématique de la synthèse peptidique sur phase solide.

L'immobilisation du peptide en croissance entraîne une séparation des co-produits de couplage ou de déprotection par simple filtration, accélérant considérablement la synthèse du peptide. Ce système de filtration permet également une utilisation en larges excès d'acides aminés à coupler et d'agents activateurs, aboutissant ainsi à des rendements de couplage quasi-quantitatifs.

Les groupements protecteurs les plus couramment utilisés sont les protections Boc (t-Butoxycarbonyl) ou Fmoc (9-Fluorenylmethyloxycarbonyl). Pour la synthèse de nos peptides, nous avons choisi la protection Fmoc. Clivé en milieu basique, ce groupement présente également l'avantage d'être un chromophore : la réaction d'élongation peut alors être suivie à l'aide d'un détecteur UV. Au début de chaque nouveau couplage, le groupement Fmoc situé sur l'amine du dernier résidu immobilisé est clivé : son dosage à 301 nm permet de quantifier le rendement d'élongation du peptide.

$$\text{Rendement d'élongation (en \%)} = \frac{DO_{\text{finale}}}{DO_{\text{initiale}}} \times 100$$

La DO_{initiale} correspond à la libération du Fmoc situé sur le bras Rink et la DO_{finale} à celui situé sur le dernier aminoacide couplé (le résidu N-terminal).

Chaque cycle d'élongation (Figure 35) démarre avec le clivage du groupement Fmoc du dernier résidu immobilisé, afin d'activer sa fonction amine. Celle-ci réagit avec le groupement carboxyle, couplant ainsi l'acide aminé suivant, lui-même protégé par un groupement Fmoc. La réaction de couplage n'étant jamais totale, les amines libres qui n'ont pas réagi sont acétylées, générant ainsi des peptides tronqués : ces derniers seront éliminés lors de l'étape de purification finale. Quand l'élongation est terminée, les groupements protecteurs situés sur les chaînes latérales des aminoacides sont éliminés et le peptide est clivé de la résine.

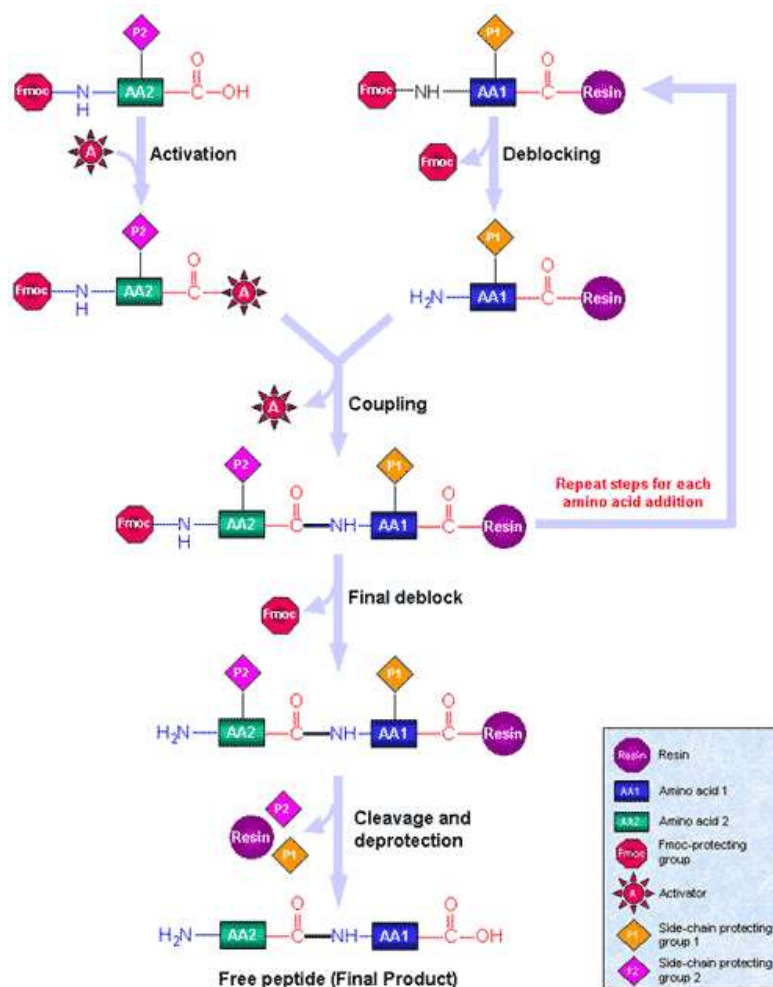


Figure 35 – Cycle d'élongation d'un peptide utilisant la stratégie Fmoc.

B.1.2 Protocole de synthèse de peptides.

B.1.2.1 Couplage du bras Rink sur la résine.

La première étape est le couplage manuel du bras Rink à la résine Chem-Matrix. Dans une seringue frittée, la résine (0.12 mmoles, 182 mg, taux de substitution : 0.66 mmoles/g) est mise en condition en la passant successivement dans du DCM (x3), DCM - 1% TFA (x2), DCM (x5), DCM – 5% DIEA (x2), DMF (x5), DMF ultra propre « sans amine » (x2).

Ensuite, un mélange de Fmoc-Rink (194.25 mg, 0.36 mmoles, 3 équiv.), HATU (137 mg, 0.36 mmoles, 3 équiv.) et DIEA (125 µl, 0.72 mmoles, 6 équiv.) est solubilisé dans du DMF. La solution est aspirée dans la seringue contenant la résine et mise sous agitation pendant 3h. Enfin, la résine est lavée avec du DMF (x5) puis du DCM (x5) et un test de Kaiser permet de vérifier le couplage. Si la réaction n'est pas totale, une acétylation à l'anhydride acétique permet d'éviter une élongation à partir de résine n'ayant pas couplé de bras Rink.

B.1.2.2 Elongation du peptide sur synthétiseur automatique.

L'élongation du peptide se fait ensuite de manière automatisée sur un synthétiseur Applied Biosystem 433A. La chimie utilisée est de type Fmoc/tBu et elle est basée sur 0,1 mmole de peptide : les réactions de couplage utilisent 10 équivalents d'acides aminés protégés et 10 équivalents d'agents de couplage HBTU. Pour obtenir un meilleur rendement, des aminoacides peuvent subir une seconde réaction de couplage identique après un bref lavage, ce processus est appelé « double couplage ».

Certains résidus nécessitent des groupements protecteurs sur leur chaîne latérale, pour que le couplage de l'acide aminé ne se fasse qu'au niveau du squelette peptidique. Les protections utilisées sont de type Pbf pour les Arginines, tBu pour les Sérines et Thréonines, Boc pour les tryptophanes, OtBu pour les Acides aspartiques et glutamiques, Trt pour les Glutamines et Histidines (tous les acides aminés utilisés sont commercialisés par NovaBiochem).

Pour évaluer la qualité de la synthèse, une aliquote de peptide-résine est prélevée et transférée dans une seringue frittée. Les groupements protecteurs des chaînes latérales sont supprimés et le peptide est clivé de la résine, grâce à un traitement de 4h avec une solution de TFA/H₂O/TIS/Phénol/Dodécane-thiol (84:5:1:5:5). Après précipitation et lavage à l'éther, le composé obtenu est analysé par HPLC et spectrométrie de masse.

B.1.2.3 Ajout de groupements à l'extrémité N-terminale.

L'élongation terminée, il est possible d'ajouter un groupement à l'extrémité N-terminale du peptide. Pour obtenir une réaction régio-sélective, cet ajout doit se faire avant la déprotection et le clivage du peptide. Dans notre étude, tous les peptides synthétisés ont été acétylés.

La réaction d'acétylation se fait sous agitation pendant 15min environ, grâce à un mélange d'anhydride acétique, HOBt et DIEA, solubilisé dans la NMP. Un test de Kaiser permet de vérifier la réussite de la réaction.

Pour l'étude fonctionnelle, les fragments natifs de mitogaligine et cytogaligine ont également été couplés à un fluorophore : la rhodamine, appelée aussi 5-(et-6)-carboxytétraméthylrhodamine ou TAMRA (commercialisée par Invitrogen). Comme pour le bras Rink, le couplage de la rhodamine est réalisé de manière manuelle.

La résine-peptide est mise en condition en la passant successivement dans du DCM (x3), DCM – 5% DIEA (x2), DCM (x5), DMF ultra propre « sans amine » (x2). 3 équivalents de Rhodamine, 3 équivalents de HATU et 6 équivalents de DIEA sont solubilisés dans un mélange de DMF/NMP (1:1), puis la solution est aspirée dans la seringue contenant la résine-peptide et mise sous agitation pendant 4h.

La résine est ensuite lavée avec de la NMP (x5) puis du DCM (x5) et un test de Kaiser permet de vérifier le couplage. Si la réaction n'est pas totale, le couplage est réalisé une seconde fois, de manière identique.

B.1.2.4 Déprotection et clivage du produit brut de la synthèse.

La déprotection et le clivage du peptide se font en même temps. La résine-peptide est placée dans une seringue frittée, où elle est mise en présence d'un faible volume d'une solution de TFA/H₂O/TIS/Phénol/Dodécane-thiol (84:5:1:5:5), puis placée sous agitation pendant 4h.

La récupération du produit brut de synthèse se fait par précipitation dans un grand volume d'éther diéthylique refroidi, additionné d'éther de pétrole. Le dépôt est lavé par centrifugation (3x5 min à 3500 tours/min). Toute trace d'éther est éliminée par séchage à l'air libre pendant une nuit, ou par évaporation sous vide. Le produit brut peut ensuite être stocké à -20°C en attendant d'être purifié.

B.1.2.5 Purification du peptide d'intérêt.

La purification est faite manuellement en utilisant une HPLC semi-préparative. Le produit brut est solubilisé dans un mélange de solutions A et B (solution A : H₂O, 0,1% TFA ; solution B : ACN, 0,1% TFA). Le gradient d'acétonitrile est ajusté pour obtenir le peptide d'intérêt dans un faible volume et un minimum de temps, et le produit est récupéré manuellement en sortie d'HPLC.

Pour terminer, le TFA et l'ACN sont évaporés de la solution de peptide pur en utilisant un évaporateur rotatif, puis le peptide est lyophilisé sous vide et stocké à -20°C. Le produit final est caractérisé par HPLC analytique et spectrométrie de masse.

B.1.3 Production de la mitogaligine.

La mitogaligine entière est produite par SPPS sous forme de deux fragments, reliés ensuite par ligation chimique native (Figure 36). La synthèse du fragment [1-53]-SR a été réalisée par Dominique Lelièvre (équipe d'Agnès Delmas, CBM) en utilisant une stratégie qu'il a précédemment développée (Lelièvre et al., 2008), et j'ai participé à la production du fragment [54-97].

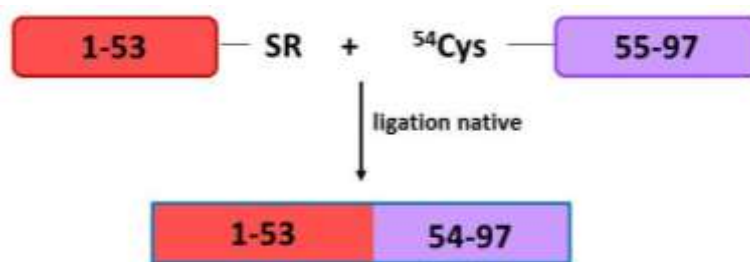


Figure 36 - Production de la mitogaligine par synthèse chimique. Les fragments [1-53] et [54-97] sont produits par SPPS. Pour réaliser la réaction de ligation, le fragment [31-53] est fonctionnalisé avec l'ajout d'un groupement thioester (SR).

B.1.3.1 Production du fragment [54-97].

Le fragment [54-97] est produit par SPPS, en utilisant la stratégie Fmoc et une résine PEGA. Les acides aminés 95 à 97 sont couplés manuellement, puis le reste de l'élongation se déroule de manière automatisée, suivant un protocole identique à celui utilisé pour les fragments de mitogaligine et cytogaligine. Les protections des chaînes latérales utilisées sont de type : tBu pour les Sérines et Thréonines, Boc pour les Lysines et tryptophanes, Pbf pour les Arginines, Trt pour les Cystéines, Glutamines et Histidines.

Dans une seringue frittée, la résine PEGA (0.1 mmoles, 1.74 g, taux de substitution : 0.66 mmoles/g) est mise en condition en la passant successivement dans du DCM (x3), DCM - 1% TFA (x2), DCM (x5), DCM – 5% DIEA (x2), DMF (x5), DMF ultra propre (x2).

Pour le couplage du premier acide aminé (Leu97), un mélange de Fmoc-Leu-Mppa (106.32 mg, 0.2 mmoles, 2 équiv.), HATU (76.04 mg, 0.2 mmoles, 2 équiv.) et DIEA (70 µl, 0.4 mmoles, 4 équiv.) est solubilisé dans du DMF. La solution est aspirée dans la seringue contenant la résine, puis mise sous agitation pendant 2h.

La résine est ensuite lavée avec du DMF (x5) puis du DCM (x5) et un test de Kaiser permet de vérifier le couplage. Si la réaction n'est pas totale, un second couplage est fait de manière identique.

Pour les acides aminés 96 et 95, le couplage est réalisé de la même manière que sur le synthétiseur automatique. Le groupement Fmoc de l'acide aminé immobilisé sur la résine est clivé avec de la pipéridine : une solution de pipéridine à 20% est aspirée dans la seringue et mise sous agitation pendant 5 min. Ce clivage est répété 3 fois au total, et la DO à 301nm de la solution récupérée permet de doser la quantité de Fmoc libérée. La résine est ensuite lavée avec du DCM (x5) puis de la NMP (x5).

Un mélange d'une solution d'HBTU/HOBt (2 mL, 10 équiv.), de DIEA (400 µl, 1 mmole, 10 équiv.) et d'acide aminé à coupler (1 mmole, 10 équiv.) est solubilisé dans de la NMP. La solution est aspirée dans la seringue, puis mise sous agitation pendant 2h. La résine est ensuite lavée avec de la NMP (x5) puis du DCM (x5).

Le couplage de l'Asp94 démarre également avec une déprotection à la pipéridine : aspiration d'une solution de pipéridine à 20% et agitation pendant 5 min (x3). La résine est ensuite lavée avec du DCM (x5) puis du DMF (x5), DMF ultra propre (x2).

Un mélange de Fmoc-Asp(Mpe)-OH (131.85 mg, 0.3 mmoles, 3 équiv.), HATU (114.06 mg, 0.3 mmoles, 3 équiv.) et DIEA (105 µl, 0.6 mmoles, 6 équiv.) est solubilisé dans du DMF. La solution est aspirée dans la seringue, puis mise sous agitation pendant 2h. La résine est ensuite lavée avec du DMF (x5) puis du DCM (x5) et un test de Kaiser permet de vérifier le couplage.

La suite de l'élongation du peptide est réalisée sur le synthétiseur automatique, en démarrant par une acétylation. Pour éviter une chute du rendement d'élongation, causée par un encombrement de la résine, un quart de la résine est retirée du réacteur avant le couplage de l'Ala76.

Une fois la synthèse terminée, le protocole est le même que celui utilisé pour la synthèse des fragments de cytogaligine et mitogaligine, concernant la déprotection et le clivage du peptide, ainsi que la purification par HPLC.

B.1.3.2 Ligation native des fragments.

La ligation native des deux fragments de la mitogaligine a également été réalisée par Dominique Lelièvre. Les peptides sont mis en solution dans un tampon phosphate à pH 7,5 (6 M de GdmHCl, 0.2 M de phosphate, 20 mM de TCEP) et un catalyseur de thiol (100mM de MPPA) permet d'amorcer la réaction de ligation. Le mélange est ensuite placé sous agitation.

Le fragment [54-97] étant moins coûteux à réaliser et produit en plus grande quantité, il est mis en excès par rapport au fragment [1-53]. La réaction de ligation est suivie par HPLC et se termine lorsque le fragment [1-53] a été consommé. Une ligation réalisée sur un aliquote de peptides montre une réaction quasi-totale au bout de 26h.

B.2 Production de la mitogaligine par bactéries recombinantes.

La mitogaligine forme des corps d'inclusion quand elle est produite par des bactéries. Après avoir extrait les protéines de ces corps d'inclusion, la purification de la mitogaligine se fait sur colonne de nickel grâce à un Tag de 6 Histidines placé à l'extrémité N-terminale.

B.2.1 Expression dans les bactéries.

Le gène codant la mitogaligine est amplifié par PCR puis inséré dans un vecteur commercial (vecteur « pTrcHis A, B & C », Invitrogen). Le vecteur recombinant ainsi construit est ensuite intégré dans des bactéries de type *E. Coli* (souche DH5α, Invitrogen). La production de la mitogaligine démarre ensuite avec une pré-culture, réalisée à partir d'un clone contenant le plasmide : les bactéries DH5α sont placées pendant une nuit dans 50 mL de milieu complet (LB) additionné d'ampicilline à 100 µg/mL.

Pour la production de protéine non marquée, la croissance des bactéries se fait sous agitation à 37°C, en utilisant un milieu complet (LB) additionné d'ampicilline à 100 µg/mL. L'induction, par ajout d'IPTG 1mM, est réalisée au bout de 4h environ ($DO_{600nm} = 0,6$).

Pour la production de protéine marquée, la croissance des bactéries est initiée sur un milieu complet (LB) additionné d'ampicilline à 100 µg/mL. Lorsque la DO_{600nm} est égale à 0.5 (3h30 environ) les bactéries sont centrifugées pendant 25 min à 8000 rpm, puis les culots sont lavés 2 fois avec du milieu minimum (M9) non marqué (suspension des culots et centrifugation pendant 25 min à 8000 rpm). Les bactéries sont ensuite transférées en milieu minimum marqué additionné d'ampicilline à 100 µg/mL. La croissance continue et l'induction à l'IPTG est réalisée environ 1h après ($DO_{600nm} = 0,65$).

La mitogaligine est produite pendant 3h30 à 4h, puis les culots de bactéries sont lavés avec une centrifugation à 4000 rpm pendant 25 min. Les culots sont pesés et suspendus dans du tampon de lyse à pH 8 (Tris 50mM, NaCl 100mM, EDTA 1 mM, TCEP 1mM) à hauteur de 3mL pour 1 g de culot. Les culots bactériens peuvent être conservés à -20°C en attendant d'être traités. La surexpression de la mitogaligine est vérifiée par électrophorèse de type SDS-PAGE Tris Tricine avec un gel à 14,5 % d'Acrylamide : la migration est réalisée à 400 mA et 160-180 V, pendant environ 2h.

B.2.2 Extraction et purification de la protéine.

La mitogaligine est exprimée dans les corps d'inclusion bactériens. Pour les récupérer, les bactéries sont lysées par sonication (pulsations 6 sec, amplitude 100, 10x1 min avec agitation de l'échantillon toutes les 2 min) puis centrifugées 30 min à 6000 rpm. Le culot est ensuite suspendu dans 10mL de tampon de lyse à pH 8 (Tris 50mM, NaCl 100mM, EDTA 1 mM, TCEP 1mM) et centrifugé 20 min à 6000 rpm.

Les corps d'inclusion sont ensuite solubilisés dans du tampon de solubilisation à pH 7 (NaCl 500 mM, NaH_2PO_4 20 mM, Tris 50 mM, urée 8M, TCEP 1mM : 40mL par tube) et mis sous agitation en utilisant un agitateur rotatif pendant 2h à t° ambiante ou 1 nuit à 4°C. La solution est ensuite centrifugée 20 min à 6000 rpm, puis passée dans des tubes Corex en verre et centrifugée 20 min à 10 000 rpm : la mitogaligine se trouve dans le surnageant. Toutes les étapes de l'extraction sont vérifiées par électrophorèse.

La purification est réalisée par affinité du Tag Histidine avec une colonne de Nickel. 2mL de résine ProbondTM (Invitrogen 46-0019) sont placés dans une colonne de chromatographie Poly-Prep[®] (Biorad). Le passage de solvant est réalisé à l'aide d'une pompe péristaltique à une vitesse de 0,5 mL/min.

La résine est lavée à l'eau ultra pure, puis le surnageant, contenant la protéine, est passé 2 fois sur la colonne. Les protéines qui ne se sont pas accrochées sont éliminées par lavage avec un tampon à pH 6 (NaCl 500 mM, NaH_2PO_4 20 mM, urée 8M). L'élution de la mitogaligine est réalisée par diminution de pH, en utilisant un tampon à pH 3,9 (NaCl 500 mM, NaH_2PO_4 20 mM, urée 8M, TCEP 1mM).

Des fractions de 1mL sont récupérées manuellement en sortie de colonne, pendant toute l'étape de lavage et d'élution. Le suivi de ces étapes est réalisé avec une mesure de la DO de toutes les fractions et une migration de quelques-unes d'entre elles par électrophorèse de type SDS-PAGE Tris Tricine avec un gel à 14,5 % d'Acrylamide.

Les fractions d'élution contenant la mitogaligine sont rassemblées et le pH de la solution est remonté au-dessus de 6, à l'aide de quelques µL de solution NaOH 10N. 10mM de TCEP sont ajoutés pour prévenir la formation de ponts disulfure.

La dernière étape correspond à un tamisage moléculaire qui permet d'enlever les derniers contaminants. Ce processus utilise une colonne de filtration (Amicon®, Millipore) et une centrifugation à 5000g. Pour la mitogaligine, un 1^{er} filtre à 50 kDa laisse passer la protéine, puis le filtrat passe par un 2nd filtre à 3 kDa qui retient et concentre la protéine pure. Le suivi de cette étape est également réalisé à l'aide d'une électrophorèse de type SDS-PAGE Tris Tricine avec un gel à 14,5 % d'Acrylamide. Comme pour la synthèse chimique, le produit final est vérifié par HPLC et spectrométrie de masse.

B.3 Etude de l'activité cytotoxique du fragment [31-53].

B.3.1 Incubation dans le milieu de culture.

Nous avons voulu vérifier l'activité du peptide, lorsqu'il est placé à l'extérieur des cellules. Pour cela, nous avons utilisé des cellules HeLa mises en culture sur une plaque de 96 puits : chaque puits contient environ 10 000 cellules pour un volume de 100 µL de milieu de culture (milieu complet).

L'incubation en présence du peptide est réalisée en ajoutant directement dans le milieu de culture une solution concentrée de peptide (6mM dans du PBS) pour obtenir une concentration finale variant de 200 à 600 µM. Les cellules sont ensuite placées dans un microscope Zeiss AxioVert à température ambiante et des photos sont réalisées à intervalles réguliers pour observer leur évolution.

B.3.2 Expériences de micro-injection.

B.3.2.1 Essais préliminaires sur des cellules HeLa.

Pour visualiser l'effet cytotoxique du peptide sur des cellules humaines, le fragment [31-53] de la mitogaligine a été microinjecté dans des cellules HeLa, à l'aide d'un micro-injecteur automatique. Ces expériences ont été réalisées par David Gosset (CBM, Orléans).

Les cellules HeLa sont adhérentes sur des plaques en plastique quadrillées, facilitant leur repérage (30 000 à 50 000 cellules par plaques) et la micro-injection est réalisée avec une pression d'injection de 30 hPa, pendant 0,2 sec (Duneau et al., 2005).

Pour certaines cellules, les mitochondries ont été marquées à l'aide d'un marqueur fluorescent spécifique de la membrane mitochondriale, le MitoTracker Red. Le marquage s'effectue par incubation des cellules dans une solution de MitoTracker à 200nM à 37°C pendant 45min.

Le peptide microinjecté est solubilisé dans un tampon de transport (Hepes 20mM, acétate de potassium 110mM, acétate de sodium 5mM, acétate de magnésium 2mM, DTT 2mM, EGTA 1 mM, à pH7.3, filtré à 0,22µm) puis dilué jusqu'à la concentration voulue. Pour chaque série de micro-injection, l'innocuité du tampon et du geste mécanique a été vérifiée en injectant du tampon seul.

B.3.2.2 Evaluation de la cytotoxicité du fragment [31-53].

La cytotoxicité du fragment [31-53] de la mitogaligine a été évaluée dans une seconde série d'expériences, menée en collaboration avec Ned Lamb (Montpellier) spécialisé dans la micro-injection de cellules. Pour valider l'activité du fragment de mitogaligine, nous avons également testé l'activité du fragment [70-89] de la cytogaligine, déjà utilisé dans de précédentes études comme peptide-témoin négatif (Duneau et al., 2005).

Les peptides sont solubilisés dans un tampon KCl 40mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 5mM, NaCl 2 mM, à pH 7.2 (Wiegant et al., 2010). La micro-injection est réalisée manuellement sur différents types de cellules humaines transformées (U2OS) ou non (fibroblastes et myoblastes). Le nombre de cellules mortes est déterminé après incubation des cellules pendant une nuit à l'étuve à 37°C. En plus des fragments de mitogaligine et cytogaligine acétylés, nous avons micro-injecté les fragments couplés à la rhodamine, pour essayer de localiser par fluorescence le peptide microinjecté.

Le noyau des cellules est visualisé grâce à du Bleu de Hoechst, qui est un intercalant de l'ADN. De l'immunoglobuline de lapin est également co-injectée avec le peptide : cette protéine, neutre vis-à-vis de la cellule, peut être visualisée par des anticorps fluorescents rouge ou vert. Cette co-injection permet de vérifier la bonne injection dans les cellules, et d'estimer la quantité de peptide injectée (micro-injection manuelle).

Enfin, pour déterminer l'impact du fragment [31-53] de la mitogaligine sur l'intégrité des membranes mitochondriales, nous avons observé la distribution de la CTMP, une protéine située dans les membranes plasmique et mitochondriale.

Des fibroblastes humains ont été transfectés pendant 24 heures avec de la N-terminale-mCherry CTMP (Lipofectamine 2000, Invitrogen). Les cellules marquées sont ensuite microinjectées avec une solution de fragment [31-53] à 40 nM et de l'immunoglobuline de lapin. Après différents temps d'incubation, les cellules sont fixées et l'immunoglobuline est visualisée grâce à l'ajout d'un anticorps marqué.

B.4 Etude biophysique en présence d'un milieu membranaire.

L'étude du fragment [31-53] a été réalisée en présence de différents types de milieux membranaires. La structuration du peptide et son interaction avec les membranes ont été explorées en utilisant différentes techniques d'analyse structurale.

B.4.1 Préparation des milieux membranaires utilisés.

B.4.1.1 Milieux simples : TFE et micelles de SDS ou DPC.

Le TFE (Trifluoroéthanol) est une petite molécule soluble souvent utilisée dans les études biophysiques pour mimer le milieu membranaire, car elle facilite la formation de structures secondaires en stabilisant les liaisons hydrogène. Pour former les micelles, les molécules de lipides (DPC) ou de détergent (SDS) sont solubilisées dans le solvant et la solution est vortexée.

B.4.1.2 Bicouches de phospholipides : bicelles, MLV et SUV.

B.4.1.2.1 Préparation des lipides.

Toutes les bicelles et vésicules sont constituées de phospholipides synthétiques, et éventuellement de cardiolipine naturelle (extraite du cœur de bœuf), commercialisés par Avanti Polar Lipids. Le cholestérol provient de chez Sigma.

Pour éviter leur dégradation, les phospholipides sont stockés en solution dans du chloroforme, à -20°C. Le chloroforme s'évaporant facilement, il faut donc contrôler la quantité de lipides avant de démarrer la préparation des bicouches. Pour chaque lipide, une partie de la solution-stock est prélevée et le chloroforme est évaporé sous flux d'azote. Les lipides sont solubilisés dans un faible volume d'eau, puis vortexés plusieurs minutes, lyophilisés et pesés.

Dans le cas de mélanges de plusieurs lipides, chaque lipide est ensuite solubilisé dans un volume précis d'une solution de chloroforme/méthanol (2:1). Le mélange est réalisé, puis vortexé. Comme précédemment, le solvant est évaporé sous flux d'azote et le mélange de lipides est lyophilisé, puis pesé (Dufourc et al., 1984; Grélard et al., 2010).

B.4.1.2.2 Formation des bicouches lipidiques.

Les lipides étant des molécules amphiphiles, ils ont une tendance naturelle à s'agréger lorsqu'ils sont plongés dans un solvant aqueux. L'utilisation de cycles chaud/froid va les forcer à s'organiser en un mélange homogène, généralement sous forme de bicouches (Dufourc et al., 1984; Grélard et al., 2010).

Pour éviter les agrégats trop importants, les lipides sont solubilisés dans un petit volume de solvant, puis on démarre les cycles chaud/froid : la solution est vortexée pendant 3 min, puis congelée à l'azote liquide pendant 1 à 2 min, et enfin plongée dans un bain à 50°C pendant 10 min. Ce cycle est répété jusqu'à l'obtention d'une solution homogène (absence d'agrégats visibles), puis le volume de solvant est complété pour obtenir la bonne concentration en lipides.

Pour former les vésicules multilamellaires (MLV), il suffit de répéter ce cycle plusieurs fois (au minimum 3 fois). Pour former des vésicules plus petites (SUV), la solution est soniquée après les cycles, et la taille des vésicules peut être contrôlée par DLS. La sonication utilise une sonde à ultrasons. Pour éviter une surchauffe des lipides, qui peut être source de dégradation, le mélange est plongé dans la glace.

Pour les bicelles, une étape de centrifugation douce est ajoutée pendant les cycles, avant l'étape de congélation (Glover et al., 2001). Chaque cycle chaud/froid est alors composé de : vortex pendant 3 min, centrifugation pendant 2 min à 3 rpm, congélation à l'azote liquide pendant 1 à 2 min, bain à 50°C pendant 10 min (3 cycles minimum). Comme pour les SUV, la taille du système peut être contrôlée par DLS.

B.4.2 Dichroïsme circulaire

B.4.2.1 Evaluation de la structuration d'un peptide.

Le dichroïsme circulaire (CD) est une technique couramment utilisée pour évaluer la composition en structures secondaires d'une protéine (Bulheller et al., 2007). En effet, les protéines sont des molécules chirales qui absorbent différemment les ondes polarisées circulairement droite et gauche, et le dichroïsme circulaire permet de mesurer cette différence.

Lorsqu'une protéine adopte une structure secondaire (hélice α ou feuillet β) les liaisons peptidiques s'enchaînent avec une orientation bien précise, ce qui donne un spectre CD caractéristique et différent pour chaque type de structure secondaire. Cependant, les feuillets β ont une géométrie plus variable que les hélices α , la prédiction des feuillets par le dichroïsme circulaire est donc toujours plus délicate que celle des hélices. Une protéine pouvant combiner plusieurs éléments de structures secondaires, une déconvolution des spectres CD est nécessaire pour quantifier la contribution de chacun de ces éléments.

B.4.2.2 Acquisition des données expérimentales.

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés à température ambiante sur un spectro-polarimètre Jasco J-810 avec une cuve en quartz de 1mm, contenant 300 μ L de solution. Le signal est enregistré de 180 à 260nm, avec une incrémentation de 1nm et une vitesse de 100nm/min : 3 acquisitions ont été réalisées et moyennées.

Pour obtenir le spectre final, le spectre du solvant seul a été soustrait au spectre du peptide. La quantité de photons détectée a également été suivie, évitant ainsi de prendre en compte le signal lorsque le détecteur est saturé en photons (haute tension > 500V).

Chaque échantillon est constitué de 240 μ L de milieu et 60 μ L d'une solution concentrée de peptide (0,5 mg/mL dans l'eau), ou 60 μ L d'eau pour les échantillons de solvant seul. La concentration finale en peptide a été fixée à 0,1mg/mL (soit 36.7 μ M pour le fragment [31-53] natif et 37.8 μ M pour les peptides mutants).

Une gamme de concentration croissante de TFE a été testée sur le fragment [31-53] natif (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 et 80% de TFE) mais aussi sur les peptides mutants (0, 20, 50 et 80% de TFE). La structuration des peptides mutants a également été suivie dans les autres milieux, pour vérifier d'éventuelles modifications dues à l'introduction des mutations.

L'ajout de micelles ou de bicelles provoquant une saturation du détecteur, la quantité de lipides ou de détergent a dû être adaptée, donnant des rapports Peptide/Lipides (P/L) différents suivants les milieux utilisés.

Nous avons testé deux types de micelles de charges différentes (zwitterionique et anionique). Pour les micelles zwitterioniques, nous avons travaillé à 20mM de DPC, donnant un rapport P/L de 1/100. Ce rapport P/L n'a pu être conservé pour les micelles anioniques, car la concentration de SDS correspondante était alors inférieure à sa concentration micellaire critique (respectivement 3 et 8 mM) : nous avons donc travaillé à 10mM de SDS, correspondant à un rapport P/L de 1/270 environ.

Nous avons également utilisé des bicelles de composition différente, DMPC/DHPC et DMPC/DHPC/CL, pour évaluer l'effet de la cardiolipine. Le rapport entre lipides à chaîne courte (DHPC) et à chaîne longue (DMPC et CL) égal à 1/3, a été choisi pour avoir une surface plane suffisamment importante pour pouvoir intégrer la cardiolipine (Parker et al., 2001). La composition finale de ces bicelles, en pourcentages molaires, est de 75/25 pour le mélange DMPC/DHPC, et de 65/25/10 pour le mélange DMPC/DHPC/CL, avec un rapport P/L de 1/50.

B.4.2.3 La déconvolution des spectres CD.

La déconvolution des spectres a été réalisée avec le logiciel CDPro (Sreerama et al., 1999). Ce programme distingue 6 catégories d'éléments structuraux : hélices α régulières et déformées, feuillet β réguliers et déformés, turns et « non structuré ».

Les catégories « déformés » correspondent aux acides aminés situés aux extrémités des hélices ou des brins. Leur position limite et un nombre réduit de liaisons hydrogène avec les autres résidus de l'hélice ou du feuillet, donnent une orientation de la liaison peptidique différente de celle attendue pour ce type de structure, et donc un spectre CD différent du spectre caractéristique d'une hélice ou d'un feuillet.

B.4.3 Spectroscopie de fluorescence.

Une molécule fluorescente est capable d'absorber l'énergie d'un photon pour la réémettre de manière spontanée, sous la forme d'une lumière fluorescente. En effet, lorsque ce type de molécule est frappé par un photon, ses électrons passent de leur état fondamental à un état excité. Le retour rapide à leur état fondamental est accompagné de l'émission d'un photon.

Chaque fluorophore est caractérisé par des spectres d'excitation et d'émission. Si le spectre d'excitation est toujours identique, le spectre d'émission est très sensible à différents facteurs environnementaux, comme la température, le pH, la pression, la viscosité, la polarité, mais aussi la présence d'ions, de liaisons hydrogène ou d'inhibiteurs. Ces caractéristiques font des fluorophores d'excellents senseurs de modifications environnementales.

B.4.3.1 Le tryptophane, un fluorophore naturel.

La majorité des fluorophores sont des molécules aromatiques. Les aminoacides Tryptophane, Phénylalanine et Tyrosine ne dérogent pas à cette règle et possèdent des capacités de fluorescence, grâce à la présence d'un cycle aromatique dans leur chaîne latérale. Chacun de ces acides aminés possède ses propres caractéristiques d'excitation et d'émission, le tryptophane par exemple possède un maximum d'excitation à 280nm et un maximum d'émission autour de 348nm, dans l'eau à pH 7.

Les capacités d'émission d'un fluorophore étant très sensibles à son environnement, les tryptophanes sont souvent utilisés comme sondes pour suivre des modifications d'environnement (Lakowicz, 1999).

B.4.3.2 Enregistrement et analyse des données.

Le fragment [31-53] de la mitogaligine possède trois tryptophanes répartis le long du peptide (positions 5, 14 et 17). L'étude de leur fluorescence va nous renseigner sur l'enfouissement du peptide dans les milieux membranaires. Les échantillons sont identiques à ceux utilisés pour les expériences de dichroïsme circulaire. Cependant, seuls les peptides mutants ont été utilisés afin d'éviter des quenchings dus à la proximité des trois tryptophanes dans le peptide natif.

Le spectromètre JOBIN-YVON Fluoro-Max-2 est utilisé avec une cuve en quartz de 3mm, contenant 100µL de solution. L'échantillon est excité à 280 nm et la fluorescence émise est enregistrée de 285 à 500 nm, avec une incrémentation de 1nm. L'intégration est de 1 sec et les fentes de 2mm. L'enregistrement des données est réalisé à température ambiante. Le maximum de fluorescence est déterminé après lissage des spectres, à l'aide du logiciel Origin v8.0 (Microcal, Northampton, MA).

B.4.4 RMN liquide

La spectroscopie RMN est une technique qui utilise les propriétés magnétiques du noyau des atomes de spin nucléaire non nul.

B.4.4.1 Les séquences d'impulsions utilisées.

Dans notre étude, nous avons utilisé 4 types d'expérience RMN : des expériences homonucléaires (COSY, TOCSY, NOESY) qui n'utilisent qu'un seul type d'atome, ici l'hydrogène, et des expériences hétéronucléaires qui utilisent au moins deux types d'atomes (^{15}N et H pour le ^{15}N -HSQC, enregistré ici en abondance naturelle).

Ces séquences d'impulsions permettent d'observer certains couplages entre atomes, qui correspondent à des transferts d'aimantation : le couplage scalaire qui est transmis à travers les liaisons covalentes, et le couplage dipolaire qui se transmet à travers l'espace. Les signaux qui correspondent à ces couplages sont appelés pics de corrélation et sont identifiés par les fréquences de résonance de chacun des atomes impliqués dans le couplage :

- l'expérience COSY utilise le couplage scalaire, faisant apparaître des pics de corrélation entre deux atomes d'hydrogène reliés par moins de 3 liaisons covalentes.
- l'expérience TOCSY utilise les mêmes couplages, mais le transfert d'aimantation est relayé, permettant d'observer des couplages entre tous les atomes d'hydrogènes d'un même système de spin.
- l'expérience hétéronucléaire ^{15}N -HSQC utilise également un couplage scalaire entre les deux atomes d'une liaison N-H.
- l'expérience NOESY utilise le couplage dipolaire, faisant apparaître un pic de corrélation entre deux atomes d'hydrogène proches dans l'espace, jusqu'à 5Å.

Tous les spectres de RMN liquide ont été enregistrés sur un spectromètre VARIAN Inova 600 MHz et traités avec NMRPipe (Delaglio et al., 1995). L'attribution et l'analyse des spectres ont été réalisées avec le logiciel NMRViewJ (Johnson et al., 1994). Nous avons choisi une température de 308K car les spectres enregistrés à 298K étaient moins bien résolus.

B.4.4.2 Attribution des déplacements chimiques du peptide.

En théorie, tous les spins nucléaires de même nature devraient avoir une fréquence de résonance identique. Cependant il existe un champ magnétique local, formé par les électrons circulant à proximité des noyaux, qui va s'ajouter au champ magnétique appliqué. L'environnement chimique local de chaque atome va donc lui donner une fréquence de résonance légèrement différente de celle de son voisin. C'est cette différence, appelée déplacement chimique, que l'on va étudier pour obtenir des informations sur l'environnement des atomes. La première étape de l'analyse RMN consiste à attribuer le déplacement chimique de chaque atome du peptide.

L'analyse du spectre TOCSY permet d'identifier les systèmes de spins : c'est-à-dire relier les signaux qui appartiennent à un même acide aminé. Or il existe plusieurs types de systèmes de spins correspondant à un ou plusieurs acides aminés. L'attribution d'un système de spin à un aminoacide dans la séquence est réalisée de proche en proche, grâce à l'analyse conjointe des spectres TOCSY et NOESY, permettant de relier des systèmes de spins voisins. L'attribution de la protéine est terminée quand un déplacement chimique est attribué à chaque atome.

L'attribution des déplacements chimiques du fragment [31-53], dans l'eau et en présence de micelles de SDS, a été faite à partir de spectres TOCSY (120 ms) et NOESY (120ms). Un temps de mélange de 80ms pour le TOCSY ne permettait pas de visualiser les corrélations relayées, d'où une acquisition des données à 120ms. Pour le peptide dans l'eau, un échantillon a été réalisé avec 0,6mM de peptide à pH 5,5. L'échantillon contenant les micelles de SDS, est composé de 1mM de peptide et 100mM de SDS deutéré, à pH 5,5.

La valeur des déplacements chimiques des atomes du squelette peptidique peut donner des indices sur la structuration du peptide. Le calcul du CSD (Chemical Shift Deviation) compare les déplacements chimiques du peptide, à ceux obtenus dans des petits peptides non structurés (Wishart et al., 1995). Les CSDs du peptide dans le SDS ont été calculés par le logiciel NMRViewJ à partir des atomes HN, H α et N.

La variation des déplacements chimiques (Δ CS) entre l'eau et le SDS a été calculée à partir des spectres ^{15}N -HSQC, enregistrés en abondance naturelle. La largeur spectrale étant différente pour les atomes d'Hydrogène et d'Azote, une pondération a été appliquée suivant la formule indiquée ci-dessous (Krzeminski et al., 2010) :

$$\Delta CS_{H_2O-SDS} = \sqrt{(HN_{H_2O} - HN_{SDS})^2 + \left(\frac{N_{H_2O} - N_{SDS}}{6}\right)^2}$$

B.4.4.3 Calcul de la structure tridimensionnelle

La structure tridimensionnelle du peptide a été déterminée avec ARIA2 (Linge et al., 2001) uniquement à partir de contraintes de distances inter-protons. Ces contraintes de distances sont obtenues par intégration des pics de corrélation nOe : l'intensité de ces pics est inversement proportionnelle à la distance qui sépare les deux protons (en $1/r^6$). Le logiciel de calcul de structure procède ensuite par itération afin de proposer un jeu de structures satisfaisant au mieux l'ensemble de ces contraintes de distances.

Pour la structure du fragment [31-53], chaque calcul est composé de 8 itérations, avec 1000 structures initiales. Les 500 meilleures structures, en termes d'énergie de contraintes, sont conservées pour l'itération suivante. A la 8^{ème} itération, les 100 meilleures structures sont affinées dans l'eau, ce qui minimise les énergies et diminue les éventuels chocs stériques.

Les pics de corrélation nOe ont été attribués manuellement et leur intégration, pour obtenir les contraintes de distances, a été réalisée directement par ARIA. Les premiers calculs ont été réalisés à partir de contraintes intra-résiduelles et séquentielles essentiellement, puis les contraintes moyenne et longue distance ont été introduites graduellement dans les runs suivants. Les contraintes violées ont été systématiquement vérifiées et certaines ambiguïtés d'attribution ont pu être levées, aboutissant à l'attribution de la totalité du spectre NOESY.

Parmi les meilleures structures, classées par ARIA en termes d'énergie de contraintes, un jeu de 10 structures finales a été sélectionné selon les violations de contraintes résiduelles et la qualité du diagramme de Ramachandran. L'analyse et la représentation de ces structures ont été réalisées avec ProcheckNMR (Laskowski et al., 1993), MolMol (Koradi et al., 1996), SYBYL (TRIPOS Inc., St. Louis, MO) et des logiciels « maisons ».

B.4.4.4 Enfouissement du peptide dans les micelles de SDS

Pour évaluer l'enfouissement du fragment d'adressage dans les micelles de SDS, nous avons utilisé un agent paramagnétique, le manganèse (Mn^{2+}), qui reste en solution et affecte les signaux RMN des atomes les plus accessibles au solvant (Damberg et al., 2001; Balayssac et al., 2006).

Des spectres TOCSY (120 ms) sont enregistrés en présence d'une quantité croissante de Mn^{2+} , obtenue par ajout d'une solution concentrée de $MnCl_2$. Cette solution est préparée par dissolution de 0,75 mg de $MnCl_2$ dans 100 μ L d'eau : l'ajout d'1 μ L de solution directement dans le tube RMN augmente la concentration de Mn^{2+} de 0,1 mM.

Nous avons titré les signaux du peptide, à partir de l'échantillon précédemment utilisé pour déterminer la structure tridimensionnelle du peptide (gamme de concentration de Mn^{2+} : 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 1.0 et 1.5 mM).

Nous avons également suivi les signaux des molécules de SDS, avec un échantillon de SDS à 100mM dans l'eau (gamme de concentration de Mn^{2+} : 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 et 0.5 mM). Pour chaque pic de corrélation, l'intensité du signal est tracée en fonction de la concentration de Mn^{2+} .

Le même type d'expérience a été réalisé par Françoise Paquet (équipe de Céline Landon, CBM) avec un agent paramagnétique neutre, le gadodiamide, qui reste également en solution (gamme de concentration de gadodiamide : 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.2, 2.4 et 2.6 mM).

B.4.5 RMN solide

Les expériences de RMN solide ont été utilisées pour étudier l'influence du peptide sur la dynamique des lipides constituant les membranes.

B.4.5.1 Les membranes modèles.

B.4.5.1.1 Composition lipidique.

Pour accéder à la dynamique des lipides à la surface et au milieu de la bicouche membranaire, deux atomes sont suivis : le phosphore, présent naturellement dans la tête des phospholipides, et le deutérium, qui remplace les hydrogènes le long des chaînes carbonées. Pour simplifier le spectre Deutérium, une seule chaîne carbonée du POPC a été deutérée (POPC-d31). Les phospholipides proviennent de chez Avanti Polar Lipids et le Cholestérol de chez Sigma (Table 3).

Lipides	Nom complet	Réf.	Masse molaire	Pureté
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	850457	760,076	>99%
POPC-d31	1-palmitoyl(d31)-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	860399	791,267	>99%
POPE	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine	850757	717,996	>99%
Cardiolipine synthétique	1',3'-bis[1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho]- <i>sn</i> -glycerol (sodium salt)	750332	1285,597	>99%
Cardiolipine Naturelle*	Cardiolipin (Heart, Bovine) (sodium salt)	840012	~1494,319	>97%
Cholestérol	Cholesterol	C3045	386,65	>99%

Table 3 - Référence des lipides utilisés pour les expériences de RMN solide. Nous avons utilisé deux types de cardiolipine car le spectre Phosphore de la cardiolipine naturelle, utilisée initialement, était composé de signaux supplémentaires. Suite à notre signalement, la société Avanti a précisé que la référence contenait moins de 3% de triphosphoinositol.

Pour notre étude, nous avons utilisé 3 types de mélanges de phospholipides, de complexité croissante (Table 4). Les atomes de Deutérium ayant une faible abondance naturelle ils sont incorporés dans les phospholipides par substitution des atomes d'Hydrogène : dans notre cas, la sonde Deutérium utilisée est du POPC deutéré sur une seule de ses chaînes carbonée. Cependant, pour limiter l'ajout de phospholipides modifiés, seule la moitié du POPC utilisé correspond à du POPC deutéré.

Lipides	Composition des mélanges (% molaire)		
	Type 1	Type 2	Type 3
POPC	27	22	20
POPC-d31	27	21	20
POPE	46	36	31
Cardiolipine	-	21 *	20
Cholestérol	-	-	9

Table 4 - Composition des mélanges de lipides, utilisés en RMN solide.* correspond au mélange contenant de la cardiolipine naturelle.

B.4.5.1.2 Préparation des échantillons.

Pour chaque composition de lipides, deux échantillons sont réalisés : le premier ne contient que des lipides, le second est additionné de peptide, avec un rapport Peptide/Lipide de 1/100. Chaque échantillon est composé d'environ 10mg de lipides.

Pour obtenir un mélange des lipides et du peptide, le peptide est solubilisé dans du méthanol et ajouté au mélange de lipides, solubilisé dans un faible volume de Chloroforme/méthanol (2:1). Le solvant est ensuite évaporé sous flux d'azote, puis le mélange lipides/peptide est solubilisé dans un faible volume d'eau et lyophilisé.

Les échantillons de RMN solide sont composés de MLV faiblement hydratées. Cette hydratation comprise entre 80 et 95% (Grélard et al., 2010) permet d'obtenir un échantillon semi-liquide, possédant les caractéristiques requises pour enregistrer un signal de RMN « solide ».

Les MLVs sont formées après 5 à 8 cycles chaud/froid (voir p58), puis transférées dans un rotor en céramique d'une contenance de 100µL. Pour éviter toute trace de deutérium naturellement présent dans l'eau, susceptible de provoquer du bruit de fond, les échantillons sont hydratés à 90% en utilisant de l'eau dépourvue de deutérium (Deuterium-depleted water, $^1\text{H}_2\text{O}$, de chez Isotec-Sigma-Aldrich). La quantité de solvant à ajouter est donnée par l'équation suivante :

$$m_{\text{solvant}} = \frac{h}{1-h} * m_{\text{échantillon}}$$

h correspond au taux d'hydratation

B.4.5.2 Etude de la dynamique des bicouches lipidiques.

La RMN dite « solide » va dépendre de l'orientation des molécules dans le champ magnétique, contrairement à la RMN en solution où le signal est moyenné grâce aux mouvements rapides des molécules. Cette dépendance orientationnelle entraîne l'enregistrement d'un signal anisotrope, différent du spectre de RMN « liquide » constitué de raies isotropes. Les spectres RMN des systèmes membranaires ont des caractéristiques particulières à cause de leur organisation et des mouvements des lipides autorisés au sein des membranes.

B.4.5.2.1 Dépendance orientationnelle des spectres RMN.

Les échantillons utilisés dans nos expériences sont constitués de vésicules multilamellaires (MLV), où les lipides se retrouvent à la surface d'une sphère. Toutes les orientations par rapport au champ magnétique sont donc représentées. Cependant, la probabilité d'existence de chaque orientation n'est pas la même en tout point de la sphère, elle est donnée par l'équation suivante :

$$P(\beta) = \frac{1}{2} \sin \beta \cdot d\beta$$

β correspond à l'orientation (angle) par rapport au champ magnétique.

En effet, si l'on compare une vésicule à la terre avec l'axe des pôles parallèle au champ magnétique : les points situés aux pôles sont moins nombreux que ceux placés au niveau de l'équateur. L'orientation la moins représentée correspond alors à une orientation du lipide parallèle au champ magnétique, et la plus représentée est l'orientation perpendiculaire.

Les interactions de RMN solide dépendant de l'orientation des molécules dans le champ magnétique, cette distribution inégale a des répercussions sur la forme du spectre RMN (Figure 37).

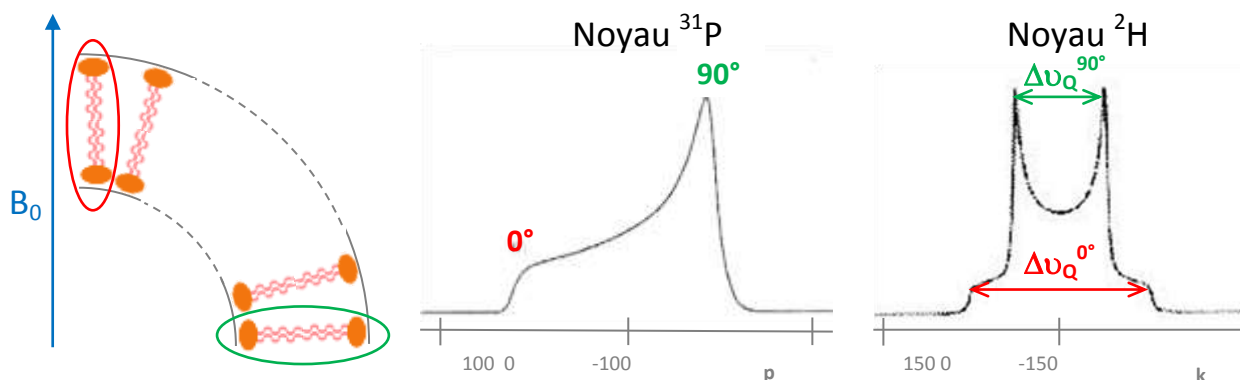


Figure 37 - Orientation des lipides par rapport au champ magnétique et spectres RMN résultants.

Disposition des lipides dans les liposomes (gauche). Spectres RMN d'un noyau ^{31}P (centre) et ^2H (droite) : les composantes perpendiculaire et parallèle sont indiquées en vert et rouge (adapté de Dufourc, 1986).

Le noyau ^{31}P étant de spin nucléaire $\frac{1}{2}$, son spectre RMN est dominé par le déplacement chimique. Cependant, contrairement à la RMN liquide, le signal de RMN solide dépend de l'orientation par rapport au champ magnétique : le déplacement chimique est anisotrope et prend la forme d'un tenseur, constitué de toutes les orientations par rapport au champ magnétique. Du fait de la répartition inégale des orientations, la composante du tenseur perpendiculaire au champ magnétique correspond à la raie la plus intense, et la composante parallèle à la raie la moins intense.

Le noyau ^2H possède quant à lui un spin nucléaire égal à 1, son spectre RMN correspond à la combinaison entre le déplacement chimique et l'interaction quadripolaire. Là encore, le spectre RMN est composé de toutes les orientations, avec la composante du tenseur perpendiculaire au champ magnétique correspondant au pic le plus intense, et la composante parallèle formant la base du spectre. Cependant, l'interaction quadripolaire entraîne un dédoublement du signal : chaque composante correspond alors à un doublet, dont l'écartement est appelé éclatement quadripolaire ($\Delta\nu_Q$) (Douliez, 2004).

B.4.5.2.2 Déformation des vésicules dans le champ magnétique.

Les vésicules utilisées pour l'acquisition des spectres RMN sont rarement des sphères parfaites. En effet, la géométrie des phospholipides leur confèrent une légère anisotropie de susceptibilité diamagnétique (Helfrich, 1973) qui les poussent à s'orienter légèrement dans un champ magnétique.

Les membranes phospholipidiques étant élastiques et déformables, une orientation des lipides peut entraîner une déformation des vésicules (Loudet et al., 2010). Celles-ci peuvent alors être modélisées par des ellipsoïdes avec un axe principal parallèle au champ magnétique (axe c) et un axe secondaire perpendiculaire (axe a).

Il est possible d'observer la déformation des vésicules sur le spectre RMN, si elles sont orientées par rapport au champ magnétique. En effet, une orientation des vésicules déformées dans le champ magnétique placent la majorité des lipides avec une orientation similaire : perpendiculaire au champ magnétique dans le cas des prolates, et parallèle dans le cas des oblates (Figure 38). Cette orientation similaire des lipides favorise la composante à 90° ou 0°, suivant le type d'orientation.

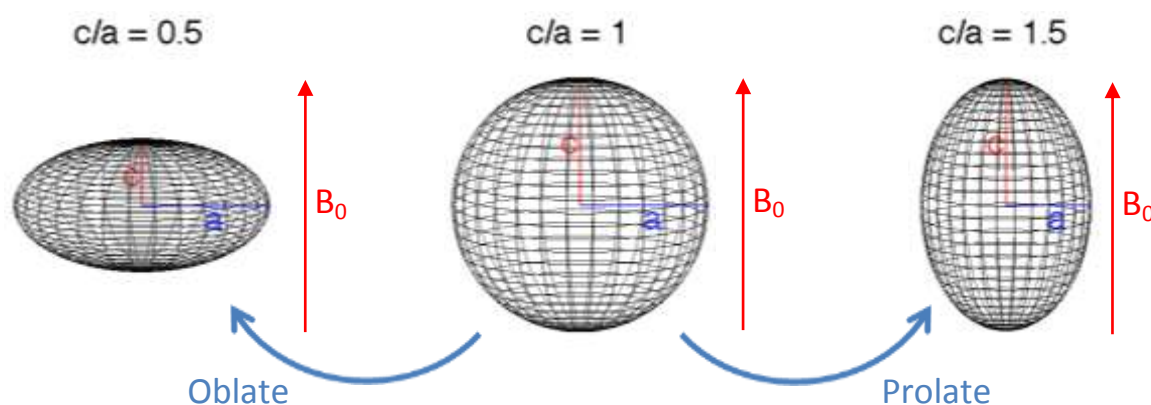


Figure 38 - Déformation et orientation des vésicules par rapport au champ magnétique.

Les vésicules sont modélisées avec le logiciel MatLab 7.9.

Dans le cas d'une déformation en prolates (Figure 39), les lipides sont en majorité perpendiculaires au champ magnétique favorisant ainsi la composante à 90°. Pour le spectre deutérium l'intensité est augmentée par rapport à un spectre non orienté, affinant ainsi les différentes raies : Le signal enregistré est de même largeur qu'une vésicule non déformée, mais les rapports d'intensité entre les raies au centre du spectre et aux extrémités sont modifiés.

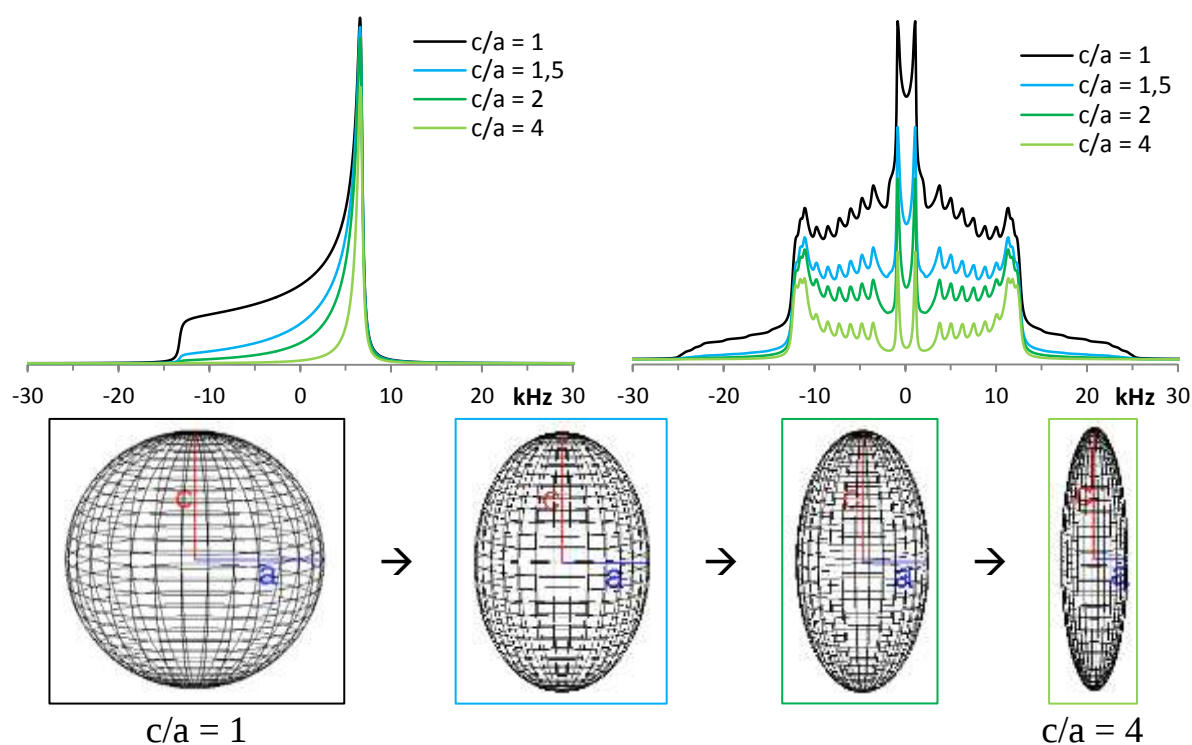


Figure 39 - Déformation et orientation des vésicules en prolates. Spectres ^{31}P et ^2H simulés avec différents ratios c/a (haut) et déformation des vésicules (bas).

A l'inverse, une déformation en oblate (Figure 40) entraîne une augmentation de la raie à 0°. Pour le spectre ^2H , le signal enregistré sera de plus en plus large par rapport à celui d'une vésicule non déformée. Cependant, la composante à 90° restant la plus favorable, elle sera toujours visible : provoquant un dédoublement des signaux.

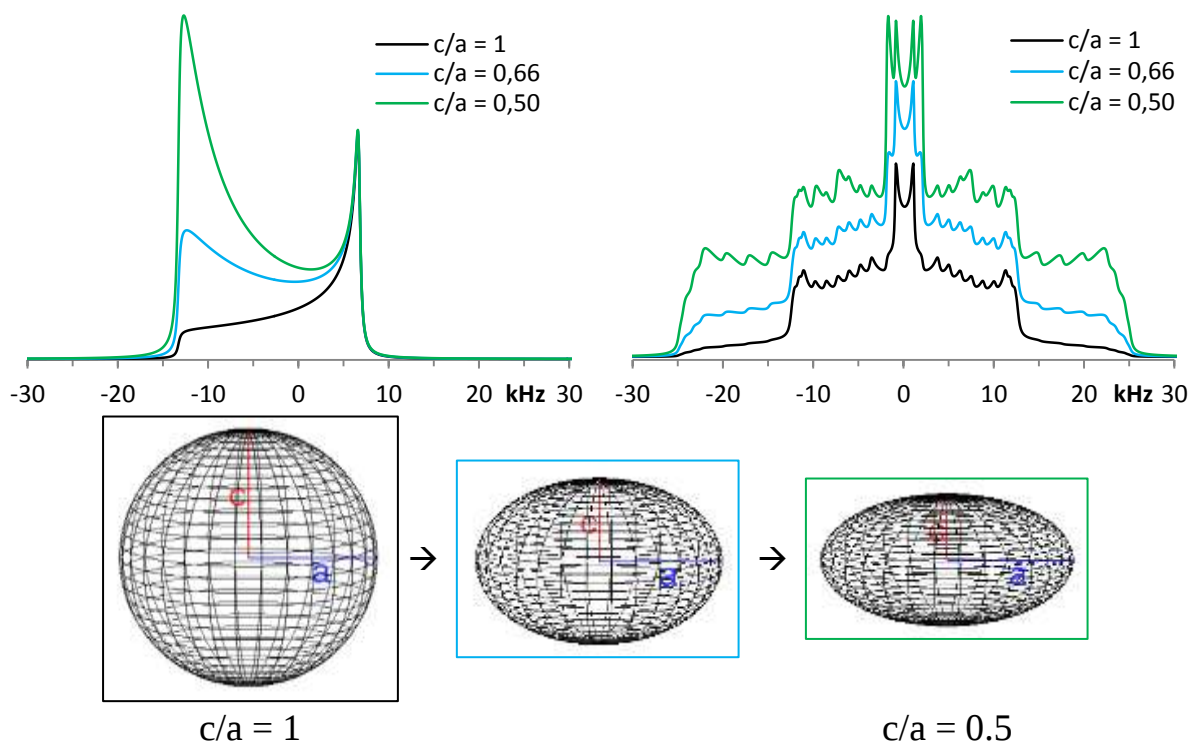


Figure 40 - Déformation et orientation des vésicules en oblates. Spectres ^{31}P et ^2H simulés avec différents ratios c/a (haut) et déformation des vésicules (bas).

B.4.5.3 Acquisition et analyse des spectres.

Les expériences de RMN solide ont été réalisées avec l'aide de Cécile Courrèges (IECB, Bordeaux) par l'intermédiaire du réseau national TGIR-RMN, en collaboration avec Erick Dufourc (CBMN, Bordeaux).

B.4.5.3.1 Paramètres d'acquisition.

Toutes les acquisitions ont été réalisées sur un spectromètre RMN Bruker 800 MHz et les spectres traités avec le logiciel TopSpin (Bruker, Wissembourg, France). Pour chaque échantillon, une série d'expériences en RMN statique est acquise à différentes températures. Nous avons travaillé sur une gamme de 15 à 50°C, avec des pas de 5 ou 10°C suivant les échantillons, et un temps d'équilibration de 20min entre deux températures pour stabiliser le système avant l'acquisition du spectre.

Les mêmes échantillons ont été utilisés pour les expériences RMN ^{31}P et ^2H . Pour démarrer les expériences à partir d'un même état initial, les échantillons ont été lyophilisés et réhydratés (avec le même taux d'hydratation) entre les spectres ^{31}P et ^2H .

L'acquisition du spectre ^{31}P est faite avec une sonde de type MAS Dual $1\text{H}/\text{X}$ Broad Band, DVT, et un rotor de 4mm. Les expériences RMN utilisent une séquence de type écho de Hahn (Rance and Byrd, 1983) avec les paramètres suivants : une largeur spectrale de 200 kHz, et une accumulation de 1500 scans (~3h par expérience). L'acquisition du spectre ^2H utilise une séquence de type écho quadripolaire (Davis et al., 1976), avec une largeur spectrale de 500 kHz et une accumulation de 5120 scans (~3h par expérience).

B.4.5.3.2 Analyse des spectres ^2H et ^{31}P .

L'analyse des spectres RMN ^2H et ^{31}P (largeur du signal et forme du spectre) va nous permettre de déterminer le type d'organisation des lipides et la mobilité des atomes. Pour les spectres ^2H , on peut également évaluer la mobilité des atomes le long de la chaîne carbonée en déterminant le paramètre d'ordre, calculé à partir de l'éclatement quadripolaire. Le logiciel NMR Depeaker (<https://launchpad.net/nmrdepaker>), développé par Sébastien Buchoux au sein de l'équipe d'Erick Dufourc, permet de lire les spectres RMN et mesurer la largeur spectrale et les éclatements quadripolaires (Batchelor et al., 2010). Ce logiciel permet également d'appliquer une technique de déconvolution spectrale appelée « de-Pake-ing » (Bloom et al., 1981). Ce traitement reconstitue un spectre orienté à 90° à partir du spectre expérimental, et permet d'améliorer la résolution des éclatements quadripolaires.

La reconstruction du spectre expérimental par simulation permet d'évaluer la déformation des vésicules et d'affiner la valeur de l'éclatement quadripolaire, notamment pour les atomes proches de la tête des lipides qui forment le plateau. Le logiciel-maison de simulation développé par Erick Dufourc prend en compte trois paramètres (Pott et al., 1995) : la valeur de l'éclatement quadripolaire, la largeur des raies et la déformation des vésicules (rapport c/a entre l'axe court et l'axe long d'une ellipsoïde). Seul l'éclatement quadripolaire peut être mesuré avec précision, le rapport c/a et la largeur des raies sont ajustés manuellement jusqu'à l'obtention d'un spectre simulé correspondant au spectre expérimental.

Sur les spectres ^{31}P , à chaque phospholipide correspond un noyau phosphore particulier et donc une composante. Pour chaque composante, on mesure la largeur du signal sur le spectre expérimental. On applique également une largeur de raie, un poids (proportion par rapport à la totalité des noyaux ^{31}P que compte l'échantillon) et un rapport c/a , qui rend compte de la déformation des vésicules et qui est donc identique pour toutes les composantes de l'échantillon.

Pour les spectres ^2H , à chaque position le long de la chaîne carbonée correspond un signal deutérium. A chaque signal correspond un éclatement quadripolaire (mesuré sur le spectre expérimental), une largeur de raie, un poids (égal à 3 pour le CD_3 en dernière position et 2 pour tous les autres) et un rapport c/a .

B.4.5.4 RMN du Phosphore en rotation.

Lorsque l'échantillon subit une rotation rapide à l'angle magique, le tenseur de CSA est moyenné, donnant un pic fin pour chaque phospholipide présent dans le mélange (Pinheiro et al., 1994). Ce type d'expérience est utile dans l'étude d'interaction avec des lipides, car elle permet de déceler d'éventuelles interactions entre un peptide et un lipide spécifique (Marius et al., 2012).

L'acquisition est également réalisée sur un spectromètre RMN Bruker 800 MHz : la séquence d'impulsion est un écho de Hahn, avec une rotation de l'échantillon à 8 kHz, une largeur spectrale de 200 MHz et une accumulation de 2048 scans. Ce type d'expérience a été réalisé sur les mélanges POPC/POPE et POPC/POPE/CL/Chol à une température unique de 35°C. Les échantillons utilisés sont les mêmes que pour les expériences de RMN statiques.

B.4.6 Spectroscopie de résonance plasmonique à ondes guidées (PWR).

La spectroscopie de résonance plasmonique à ondes guidées (PWR) est une technique résultant du couplage de la SPR (Résonance Plasmonique de Surface) avec des ondes guidées (Salamon et al., 1997; Salamon et al., 2004).

B.4.6.1 Les techniques de SPR et PWR.

La SPR utilise un laser et un prisme de verre à base triangulaire, ayant une de ses faces recouverte d'une fine couche de métal. Une onde incidente est créée par le laser et vient frapper la couche de métal en passant à travers le prisme : au moment de l'impact un photon traverse le métal et la lumière réfléchiée est enregistrée par un détecteur. Pour un angle d'incidence précis, une onde évanescente entre en résonance avec les électrons du métal : un maximum d'énergie est absorbé et la lumière détectée est minimale.

Toute molécule ajoutée à la surface du métal va modifier les caractéristiques de résonance. Cette propriété est utilisée pour évaluer l'interaction entre deux molécules, la première étant immobilisée à la surface du métal et la seconde en solution.

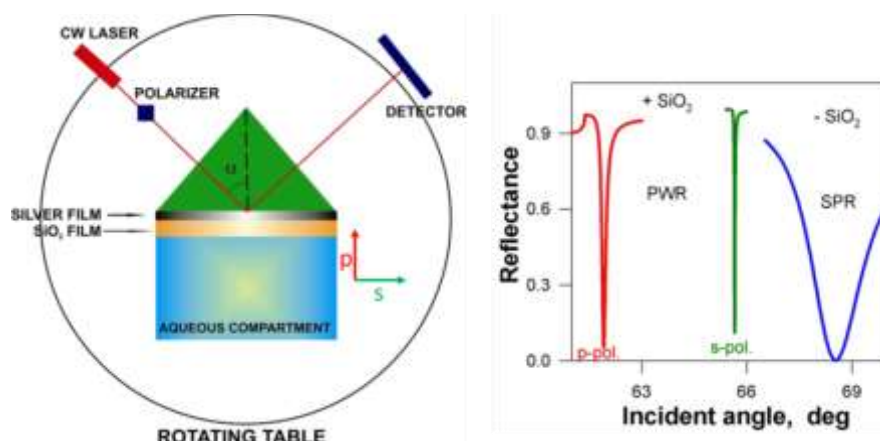
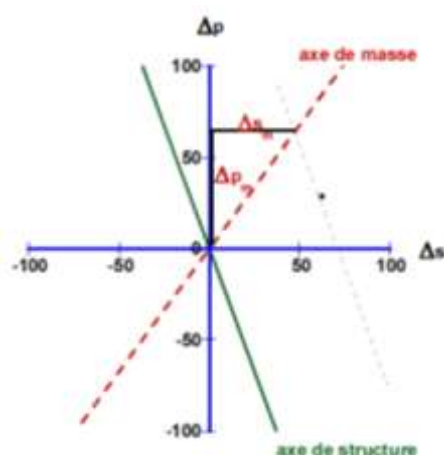


Figure 41 - Montage d'un spectrophotomètre PWR et comparaison de spectres PWR et SPR (Hruby et al., 2010).

En PWR, l'ajout d'une couche de silice à la surface du métal (Figure 41) permet de guider les ondes, améliorant nettement la sensibilité et la résolution du signal, par rapport à la SPR. Cela permet également de détecter des modifications sur une épaisseur de quelques nm au-delà de la surface du métal, ouvrant la voie à l'étude d'interaction avec de nouveaux partenaires, comme une bicouche de lipides en suspension.

Une autre évolution est l'utilisation d'une lumière « s-polarisée » et « p-polarisée ». La polarisation permet d'obtenir des informations dans deux dimensions, parallèle (p) et perpendiculaire (s) au plan d'incidence, permettant la détection de changements d'anisotropie. Ceci permet par exemple de déterminer l'orientation d'une molécule par rapport à une bicouche de lipides (Salamon et al., 2001).

L'utilisation des deux types de lumière polarisée permet également une analyse graphique des données (Salamon et al., 2004). Cette analyse (Figure 42) permet la distinction des contributions dues à un changement de masse (accumulation de molécules) de celles causées par un changement de structure (organisation du système).



$$Masse = \sqrt{(\Delta p_m)^2 + (\Delta s_m)^2}$$

$$Structure = \sqrt{(\Delta p_s)^2 + (\Delta s_s)^2}$$

Figure 42 - Analyse graphique des données de PWR et calcul des contributions de masse et de structure (Salamon et al., 2004).

B.4.6.2 Formation de la bicouche de lipides en suspension.

Pour les interactions lipides/peptide ou lipides/protéine, le partenaire « immobilisé » à la surface de la Silice correspond à la bicouche de lipides. Cette bicouche est formée spontanément à travers l'orifice d'un cylindre de Teflon (Figure 43 gauche), suivant la procédure de Mueller et Rudin (Mueller et al., 1962).

Une petite quantité de lipides en solution organique est injectée dans l'orifice du bloc de téflon et tapisse la surface du prisme. Le remplissage de la cellule avec du tampon entraîne la formation spontanée d'une bicouche (Salamon et al., 1997).

Cette bicouche est maintenue en suspension grâce à la bordure de Gibbs, qui est composée des lipides à la jonction entre la bicouche et le cylindre de Teflon. La bordure de Gibbs constitue également un réservoir de lipides permettant à ceux qui constituent la bicouche d'évoluer librement.

La formation de la bicouche est suivie par acquisition de spectres PWR (Figure 43 droite). Lorsque la cellule est uniquement remplie de tampon, le milieu à la surface de la silice est considéré comme infini, donnant un signal avec une amplitude importante (spectre de couleur noire).

Lorsque la bicouche de lipides est formée, le milieu à la surface de la silice possède une épaisseur « finie » d'où une diminution de l'amplitude du signal. De plus l'accumulation de molécules, les lipides en l'occurrence, provoque une modification de la masse du système entraînant un décalage du signal vers une valeur d'angle d'incidence supérieure (spectre de couleur rouge).

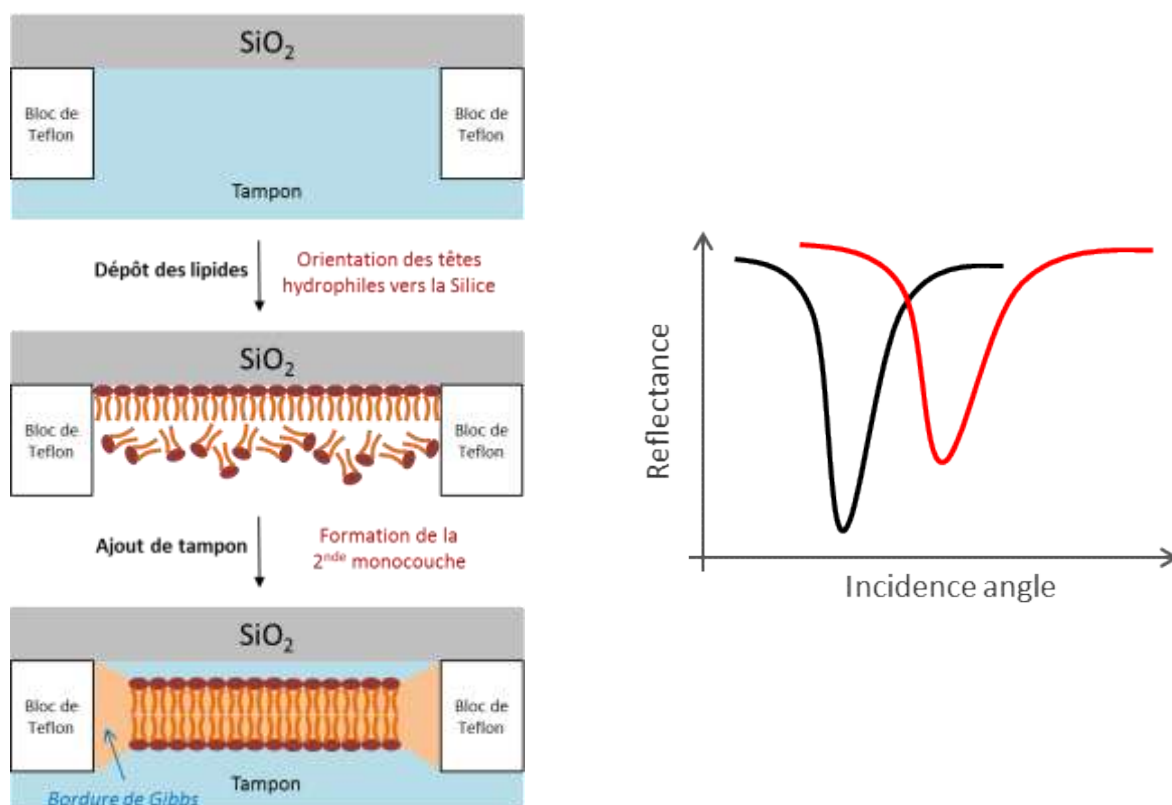


Figure 43 - Formation d'une bicouche de lipides à la surface du prisme et vérification par acquisition de spectres PWR. A gauche, les étapes de formation de la bicouche à travers l'orifice du bloc de Teflon. A droite, les spectres schématisés correspondant à ces étapes : le spectre noir correspond à la cellule remplie de tampon, le spectre rouge est enregistré après l'ajout des lipides.

B.4.6.3 Acquisition et analyse des spectres PWR.

La lumière polarisée est produite par un laser CW (à émission continue) de type He-Ne, à longueurs d'onde de 632.8 et 543.5 nm. Le prisme de verre utilisé est recouvert d'une fine couche d'Argent et d'une couche de Silice (SiO_2). L'appareillage PWR est une version beta produite par Proterion Corp. (Piscataway, NJ) qui a une résolution angulaire spectrale de 1 mdeg.

Deux compositions de membranes ont été testées : un mélange de POPC/POPE (ratio molaire de 1:1) et un mélange de POPC/POPE/Cardiolipine/Cholestérol (ratio molaire de 40:31:20:9). Les lipides sont solubilisés à une concentration de 10 mg/mL, dans un mélange de butanol/squalène (ratio volumique de 93:7), puis déposés à la surface du prisme. La concentration de peptide est augmentée graduellement par injection dans la cellule, tant que le système n'est pas à l'équilibre.

Pour chaque type de lumière polarisée, le décalage du signal est tracé en fonction de la concentration en peptide. La courbe obtenue suit une hyperbole, et la constante de dissociation est déterminée à l'aide du logiciel GraphPad Prism (Microsoft Corp.).

PARTIE C. Etude structurale et fonctionnelle du fragment d'adressage.

C.1 Production de peptides par synthèse chimique.

L'étude du fragment d'adressage mitochondrial de la mitogaligine a nécessité la synthèse de plusieurs peptides (Table 5). Le fragment [31-53] de la mitogaligine en version native, mais également trois versions mutées ne conservant qu'un seul tryptophane, pour les mesures de fluorescence. Pour l'étude fonctionnelle du peptide, j'ai également synthétisé le fragment [70-89] de la cytogaligine, car il a été utilisé précédemment comme peptide témoin non toxique (Duneau et al., 2005).

	Peptides	Séquence
Mitogaligine [31-53]	Natif	RGLSWGTSRRLPWSTWLSRST
	Mutant W5F-W14F	RGLSFTGTSRRLPFSTWLSRST
	Mutant W5F-W17F	RGLSFTGTSRRLPWSTFSLSRST
	Mutant W14F-W17F	RGLSWGTSRRLPFSTFSLSRST
Cytogaligine [70-89]		ESTQGHPAALGPTHLLDSQV

Table 5 - Séquence des peptides synthétisés.

Pour la production de ces peptides d'une vingtaine de résidus, nous avons choisi la synthèse peptidique sur phase solide (SPPS) qui est une méthode couramment utilisée pour obtenir des peptides et petites protéines (collaboration avec l'équipe d'Agnès Delmas, CBM).

Les fragments de mitogaligine et cytogaligine étant en position interne, nous avons voulu éviter la présence de charges aux extrémités du peptide et respecter au mieux la géométrie du squelette peptidique, en mimant un engagement dans une liaison peptidique. Pour cela, une acétylation en fin de synthèse et l'utilisation d'un bras Rink entre le peptide et la résine, permettent d'ajouter respectivement un groupement acétyle et une amine, aux extrémités N et C-terminale des peptides.

Une fois la synthèse terminée, le peptide est clivé de la résine et purifié par HPLC. Le produit final est caractérisé par une analyse de sa masse par MALDI-TOF. L'ensemble des profils HPLC et spectres de masse des produits de synthèses sont groupés dans l'Annexe 1.

C.1.1 Synthèse du fragment [31-53] de la mitogaligine.

Afin d'obtenir une quantité suffisante de fragment [31-53] de mitogaligine, j'ai réalisé trois synthèses visant à obtenir à chaque fois 1 mmole de peptide. Des modifications ont été introduites dans le protocole entre chaque synthèse pour améliorer le rendement d'élongation.

L'analyse du produit brut de la première synthèse (mélange du peptide d'intérêt et des peptides tronqués) a permis d'identifier des acides aminés qui avaient du mal à être couplés, provoquant ainsi l'apparition de peptides tronqués.

Au cours de la seconde synthèse, les acides aminés R1, G2, L3, S4, R10 et R11 ont donc subi un double couplage, qui est une réaction de couplage supplémentaire permettant à davantage de peptide de réagir : le rendement d'élongation est alors passé de 34,2 à 73%.

La troisième synthèse, quant à elle, a vu son rendement d'élongation amélioré jusqu'à 98,9% grâce à la modification des séquences du synthétiseur automatique, effectuée par Dominique Lelièvre.

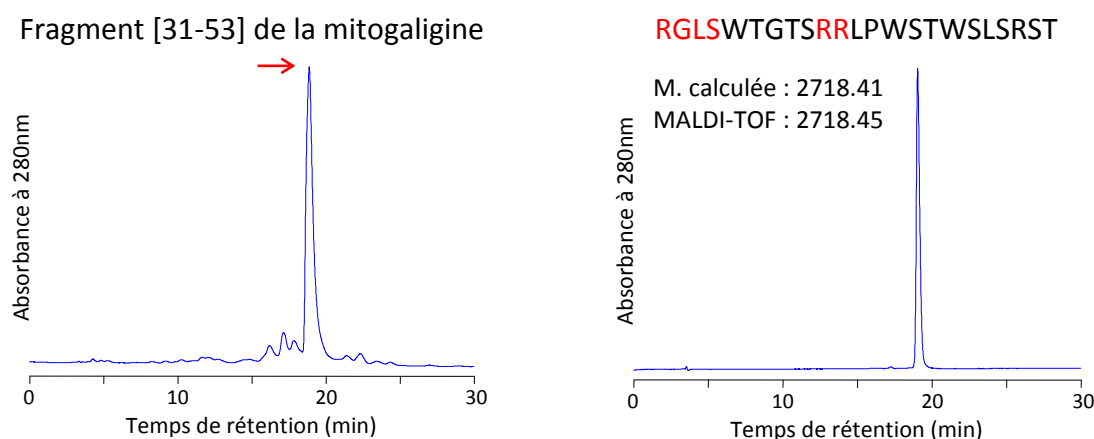


Figure 44 - Chromatogrammes HPLC du fragment [31-53] de la mitogaligine. Chromatogrammes HPLC du produit brut (gauche) et purifié (droite) de la 3^{ème} synthèse : colonne C18 et gradient de 25 à 35% d'acétonitrile en 30 min. Les acides aminés en rouge ont subi un double couplage.

Les rendements de purification sont passés de 10 et 55% environ au cours des trois synthèses, correspondant à un rendement de synthèse de 31 à 52%. Le traitement des différentes synthèses a conduit à la production d'environ 46 mg de peptide acétylé (Figure 44).

A noter que pour la dernière synthèse, seulement 2/3 de la résine a été traitée pour obtenir 35,5 mg de peptide acétylé. On peut donc estimer que 17 mg supplémentaires de peptide seraient rapidement disponibles si nécessaire.

C.1.2 Synthèse de mutants du fragment d'adressage mitochondrial.

Le fragment [31-53] possède trois tryptophanes en position 5, 14 et 17. Pour étudier la fluorescence de ces tryptophanes, en évitant une extinction de fluorescence due à leur proximité, nous avons synthétisé trois peptides mutants ne conservant qu'un seul tryptophane à chaque fois.

Les échantillons pour les analyses de fluorescence nécessitant peu de peptide, une seule synthèse a été nécessaire pour obtenir la quantité suffisante de peptides mutants et seulement la moitié de la résine a été traitée et purifiée (Figure 45).

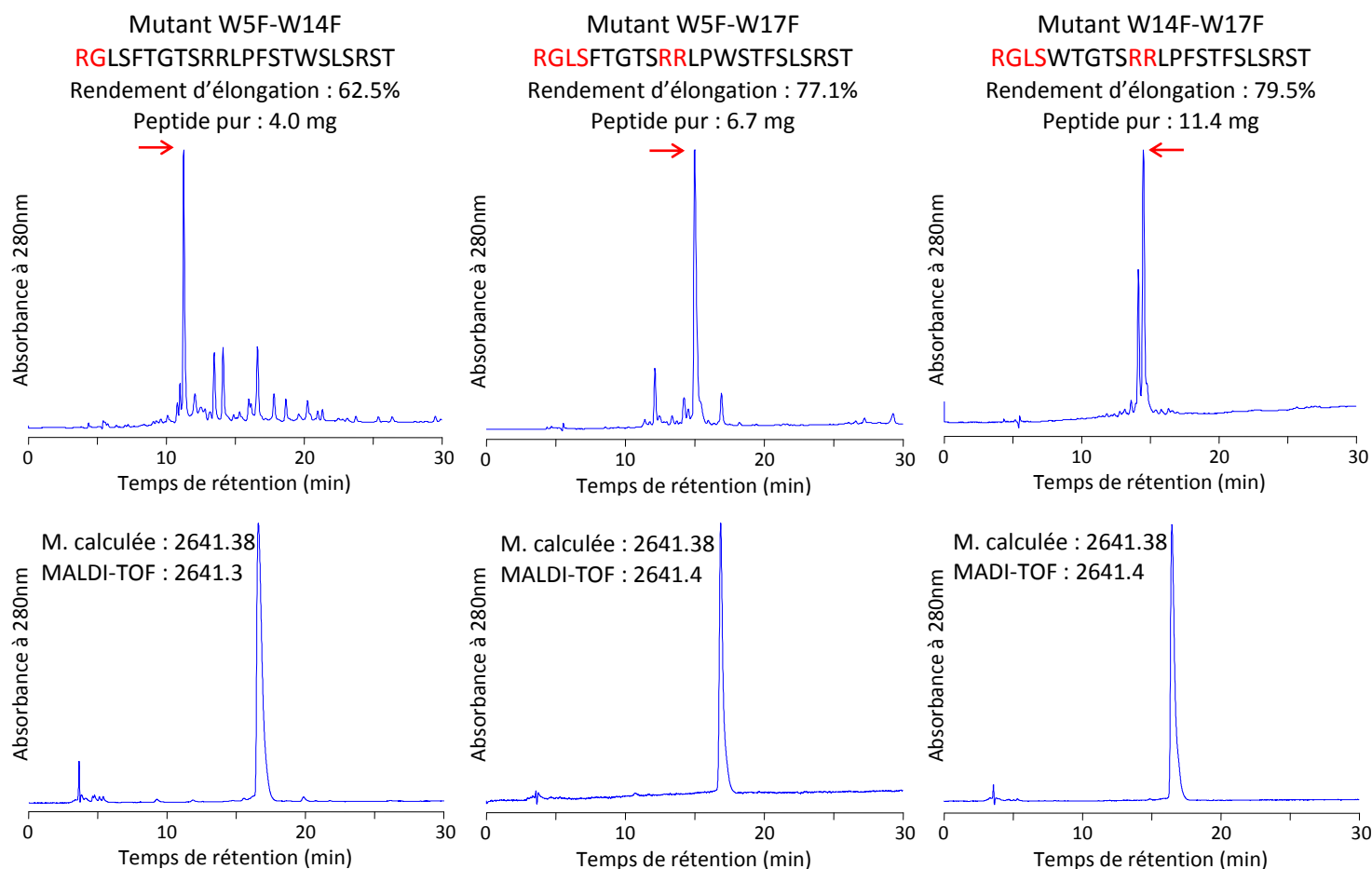


Figure 45 - Chromatogrammes HPLC correspondants aux peptides mutants. Chromatogrammes HPLC sur colonne C18. Produit brut (haut) : gradient de 25 à 45% d'acétonitrile en 30 min. Produit purifié (bas) : gradient de 25 à 35% d'acétonitrile en 30 min. Les acides aminés en rouge ont subi un double couplage au moment de la synthèse.

C.1.3 Production d'un fragment de cytocaligine.

Le fragment [70-89] de la cytocaligine est produit de la même manière que les fragments de mitocaligine, mais aucun acide aminé n'a subi de double couplage (Figure 46).

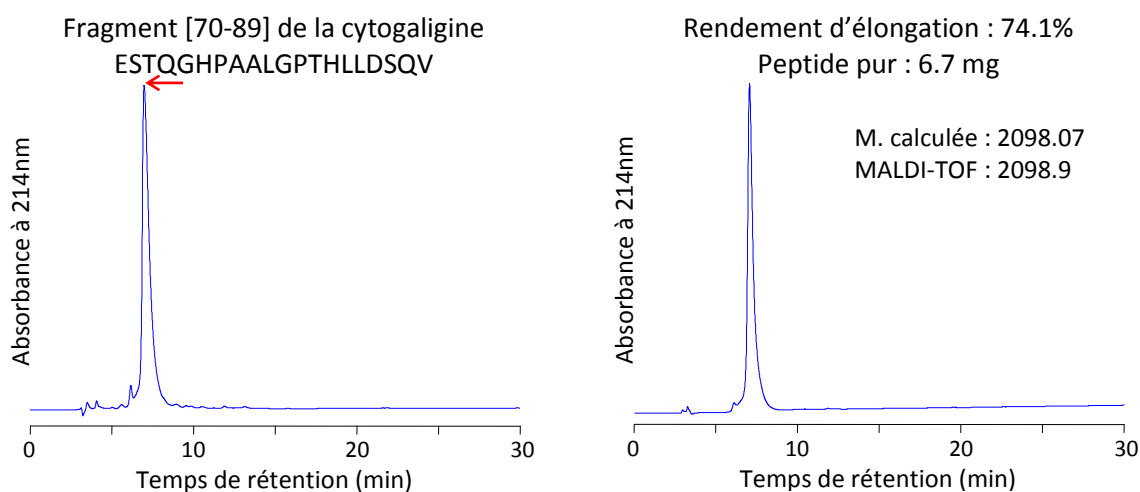


Figure 46 - Chromatogrammes HPLC du fragment [70-89] de la cytocaligine. Chromatogrammes HPLC du produit brut (gauche) et purifié (droite) : colonne C18 et gradient de 15 à 40% d'acétonitrile en 40 min.

Ce peptide étant synthétisé essentiellement pour des expériences de micro-injection, seulement la moitié de la résine a été traitée pour obtenir du peptide acétylé et le rendement de purification est d'environ 52%.

C.1.4 Accrochage de la rhodamine.

La synthèse récurrente sur phase solide est une méthode permettant d'accrocher des molécules spécifiques à l'extrémité N-terminale du peptide synthétisé. Nous avons donc saisi cette opportunité pour accrocher une molécule fluorescente à l'extrémité des peptides, afin de suivre leur cheminement par microscopie de fluorescence, pendant les tests d'activité biologique.

Pour observer l'effet du peptide sur les membranes de mitochondries, celles-ci peuvent être également marquées de manière fluorescente. Les études précédentes sur la mitogaligine utilisaient un marqueur spécifique des membranes mitochondriales, le MitoTracker®, qui peut être de couleur rouge ou verte (Keij et al., 2000). Pour pouvoir colocaliser le peptide et les mitochondries, le fluorophore choisi pour le peptide pouvait également être de couleur rouge ou verte. Le choix du fluorophore s'est porté sur la 5-(et-6)-carboxytétraméthylrhodamine (TAMRA) qui est de couleur rouge (Figure 47).

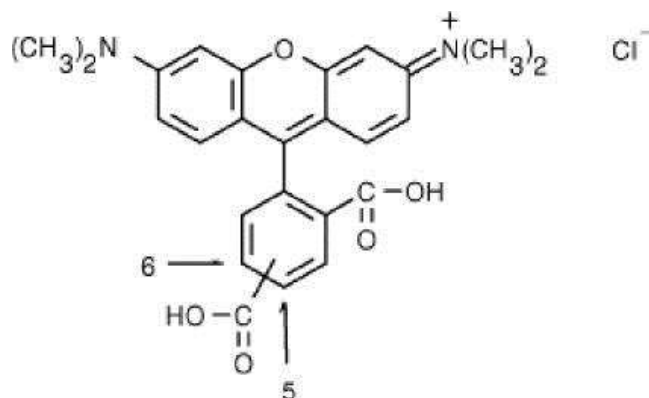


Figure 47 - Molécule de TAMRA utilisée comme fluorophore pour le marquage des peptides.

Pour pouvoir être couplée au peptide, la molécule de TAMRA est fonctionnalisée grâce au groupement carboxyle, mais celui-ci présente une isomérisation de position. Les deux isomères ayant un temps de rétention différents sur la colonne HPLC, nous avons effectué le couplage sans purification préalable des isomères.

La réaction de couplage de la rhodamine est identique à celle utilisée précédemment avec les acides aminés. Nous avons simplement réalisé le couplage de manière manuelle pour limiter la quantité de réactifs utilisés. La longueur d'onde du maximum d'absorption de la rhodamine se situe à 558 nm. Or les fragments de mitogaligine et cytogaligine n'absorbent pas à cette longueur d'onde. Nous avons donc réalisé le suivi HPLC à 558 nm.

Les deux isomères du fluorophore réagissant de manière identique, nous avons obtenu deux peptides isomères. Ces produits étant retenus différemment sur la colonne HPLC, nous avons pu les séparer au moment de la purification (Figure 48).

Nous avons effectué le couplage de la rhodamine sur le fragment [31-53] de la mitogaligine, mais aussi sur le fragment [70-89] de la cytogaligine, afin d'obtenir un témoin négatif portant également le fluorophore. Ces peptides servant essentiellement pour des expériences de micro-injection, moins de 1/10^{ème} de la résine a été traitée, donnant moins de 2 mg de peptide-rhodamine (pic A et B confondus).

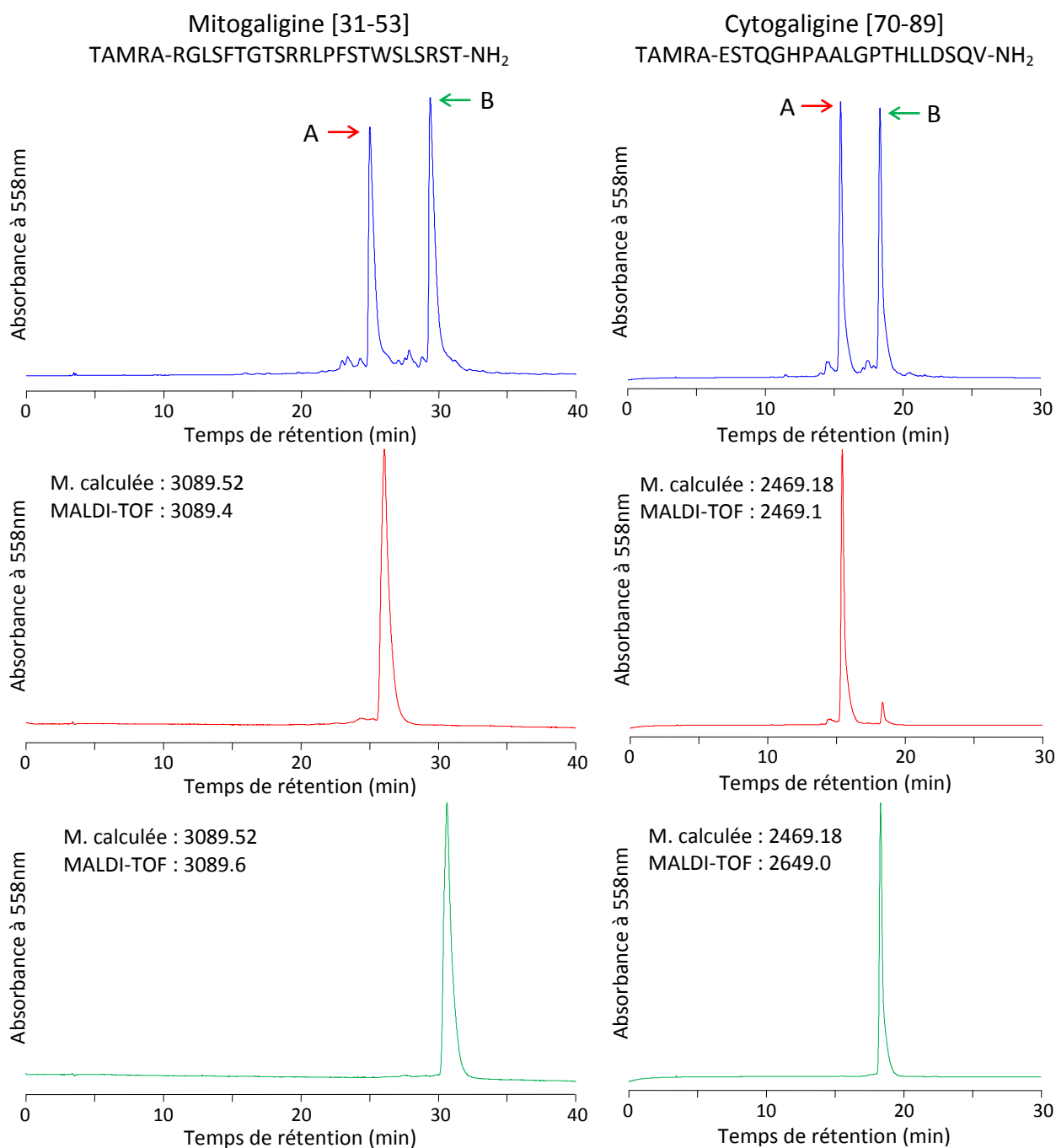


Figure 48 - Fragments de mitogaligine et cytogaligine couplés à la rhodamine. Chromatogrammes HPLC du produit brut pour le fragment de mitogaligine (gauche) et cytogaligine (droite), les flèches correspondent aux deux isomères d'intérêt, appelés A et B. Produit brut (haut) : colonne C18 et gradient de 15 à 40% d'acétonitrile en 40 min. Produits purs, pic A (milieu) et pic B (bas) : colonne C18 et gradient de 24 à 40% d'acétonitrile en 26 min.

C.2 Exploration de l'activité cytotoxique du fragment d'adressage.

La première partie de l'étude du fragment d'adressage mitochondrial de la mitogaligine correspond à une étude fonctionnelle du peptide.

C.2.1 Cytotoxicité du fragment [31-53] de la mitogaligine.

C.2.1.1 Un peptide pro-apoptotique.

Les études précédentes sur la mitogaligine ont montré que le fragment [35-53] est capable d'induire l'apoptose lorsqu'il est microinjecté dans des cellules (Duneau et al., 2005). Ce fragment faisant partie du fragment d'adressage mitochondrial, nous avons voulu vérifier la cytotoxicité de ce dernier par le même procédé.

L'activité du fragment [35-53] a été testée à 200 μM , ce qui correspond à une concentration élevée pour une cellule. En effet, une étude portant sur l'interaction entre membres de la famille Bcl-2 utilise des solutions de peptides à 100 μM , en indiquant que cette concentration est suffisante pour couvrir les interactions avec les partenaires cellulaires (Shroff et al., 2009). Dans cette étude les peptides sont couplés à un tag de 8 Arginines qui leur permet d'être incorporés par la cellule : la concentration annoncée correspond donc à la concentration dans le milieu. La concentration intracellulaire est probablement encore plus faible.

Pour tester l'activité du fragment [31-53] de la mitogaligine, nous avons réalisé des micro-injections couvrant une large gamme de concentrations : de 100 μM à quelques nM. La micro-injection du fragment d'adressage entraîne de manière systématique l'apparition des signes d'une entrée en apoptose des cellules (Elmore, 2007) : les cellules prennent un aspect granuleux et se rétractent, et plusieurs vésicules se forment au niveau de la membrane externe (Figure 49). Cette entrée en apoptose est visible dans les minutes qui suivent la micro-injection du peptide, à des concentrations sub-micromolaires.

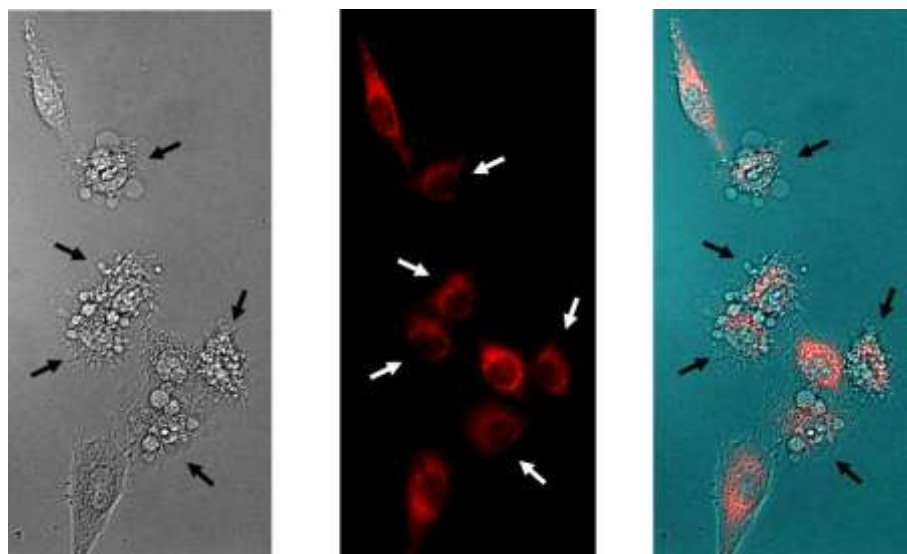


Figure 49 - Micro-injection du fragment [31-53] dans des cellules HeLa. Les photos ont été réalisées 10 min après la micro-injection de 10nM de peptide dans les cellules indiquées par une flèche : observation des cellules en lumière visible (gauche), visualisation des mitochondries marquées au MitoTracker® rouge (milieu) et superposition des deux images (droite).

C.2.1.2 Une apoptose mitochondriale ?

Lorsque les membranes mitochondriales sont marquées avec du MitoTracker®, certaines cellules micro-injectées montrent une diminution de la fluorescence émise par ce fluorophore, par rapport aux cellules non injectées (Figure 49).

L'accumulation et la fluorescence du MitoTracker® dépendent de la différence de potentiel membranaire (Keij et al., 2000). La diminution de fluorescence, observée en présence du peptide, pourrait être due à une affectation de l'intégrité des mitochondries. A l'image de la mitogaligine entière, le fragment d'adressage pourrait donc déclencher l'apoptose en activant la voie intrinsèque mitochondriale.

Pour vérifier que le fragment d'adressage a besoin d'être au contact des mitochondries pour être actif, nous avons incubé des cellules HeLa dans un milieu contenant 200 à 400 μ M de peptide (Figure 50).

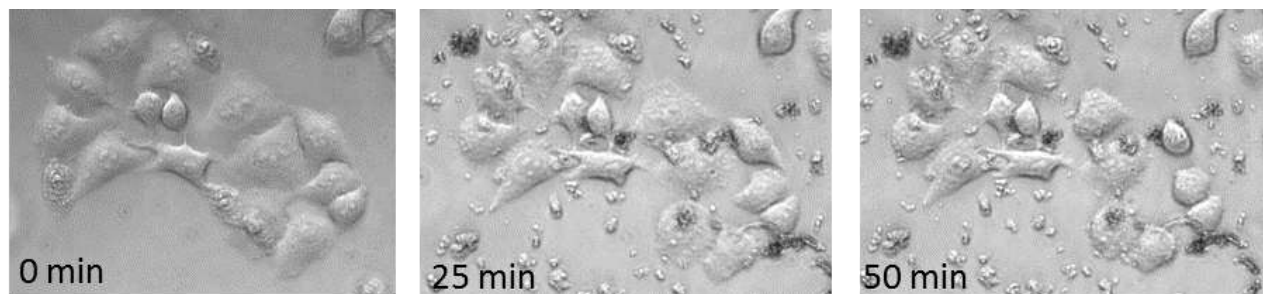


Figure 50 - Cellules HeLa incubées en présence de fragment [31-53]. L'incubation des cellules est réalisée à température ambiante, en présence de 400 μ M de peptide.

Quelques cellules commencent à se rétracter lorsque la concentration en peptide dépasse 250 μ M, mais ce résultat n'est visible que sur quelques cellules et après plusieurs dizaines de minutes. Le fragment d'adressage n'est donc pas capable de déclencher l'apoptose lorsqu'il est placé à l'extérieur de la cellule.

C.2.2 Une activité dépendante de la localisation cellulaire.

Le fragment [31-53] que nous avons produit est bien toxique lorsqu'il est microinjecté à l'intérieur de la cellule. Cependant, de nouvelles séries de micro-injections, réalisées par Ned Lamb (Montpellier), ont été nécessaires pour quantifier l'activité cytotoxique du peptide et préciser son action sur les mitochondries.

C.2.2.1 Un peptide actif sur différents types cellulaires.

Nous avons testé l'activité cytotoxique du peptide sur trois types de cellules humaines : des fibroblastes (cellules du tissu conjonctif), des myoblastes (cellules souches qui conduisent à la formation des muscles) et des cellules de type U2OS (cellules humaines d'ostéosarcome). A noter que les fibroblastes et myoblastes viennent de tissus sains, contrairement aux cellules de type U2OS qui sont des cellules d'ostéosarcomes.

En parallèle du fragment [31-53] de la mitogaligine, nous avons également microinjecté le fragment [70-89] de la cytogaligine, qui sert de témoin négatif non toxique.

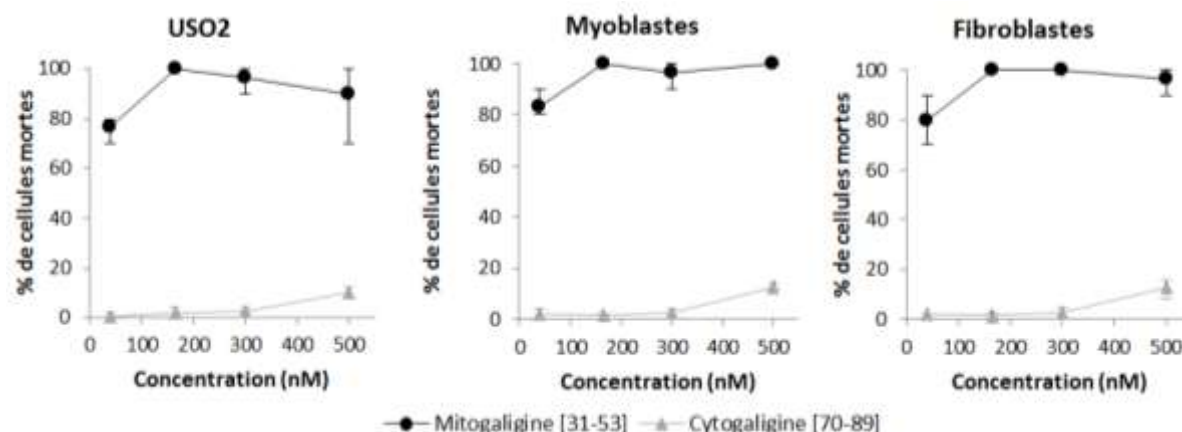


Figure 51 - Micro-injection des fragments de mitogaligine et cytogaligine à différentes concentrations. Les expériences ont été réalisées en triplicates, sur chaque type de cellules : U2OS (gauche), myoblastes (milieu) et fibroblastes (droite). Le peptide est microinjecté dans 10 cellules pour le fragment de mitogaligine et 50 cellules pour le fragment de cytogaligine, puis les cellules mortes sont comptées après une nuit passée à 37°C.

Quel que soit le type cellulaire, le fragment d'adressage de la mitogaligine est déjà très actif à 40 nM. A cette concentration, son effet est immédiatement visible sur certaines cellules et on dénombre, 2 heures après l'injection, 50 à 60% de cellules mortes. Contrairement au fragment de mitogaligine, le fragment de cytogaligine est très peu actif : il n'est pas toxique jusqu'à 300 nM (Figure 51).

C.2.2.2 Un peptide cytotoxique dans le cytoplasme.

Nous avons comparé la toxicité du peptide lorsqu'il est microinjecté dans le noyau et dans le cytoplasme (Figure 52). Pour vérifier et visualiser la micro-injection, de l'immunoglobuline de lapin est injectée en même temps que le peptide : cette protéine est inoffensive pour les cellules testées et peut être facilement visualisée à travers un marquage par des anticorps fluorescents.

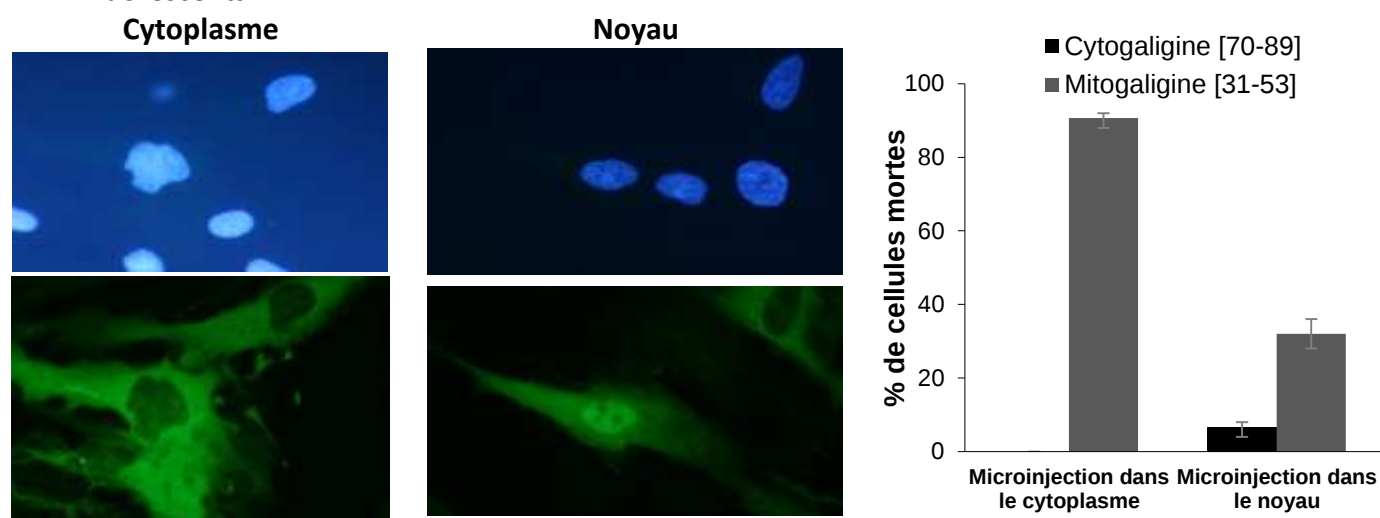


Figure 52 - Micro-injection des fragments de mitogaligine et cytogaligine dans le cytoplasme ou le noyau. Visualisation des cellules 60 min après la micro-injection du fragment [31-53] de mitogaligine : dans le cytoplasme (gauche) ou dans le noyau (droite). Les noyaux sont colorés par du bleu de Hoechst (haut) et l'immunoglobuline injectée avec le peptide est marquée par un anticorps vert (bas). Chaque peptide est microinjecté à 40nM dans 3x25 fibroblastes, puis les cellules mortes sont comptées après une nuit passée à 37°C.

Le fragment de cytogaligine ne présente pas de toxicité quel que soit le compartiment cellulaire microinjecté. Le fragment de mitogaligine par contre entraîne significativement moins d'apoptose lorsqu'il est microinjecté dans le noyau. Le fragment d'adressage de la mitogaligine doit donc être localisé dans le cytoplasme pour avoir une activité optimale.

C.2.2.3 Intégrité de la membrane mitochondriale.

Comme le fragment [35-53] (Duneau et al., 2005), le fragment d'adressage mitochondrial [31-53] est capable de déclencher l'apoptose cellulaire, probablement en provoquant le relargage de molécules pro-apoptotiques situées dans les mitochondries.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons suivi le relargage d'une autre protéine contenue dans les mitochondries, la CTMP (Carboxyl-Terminal Modulator Protein). Normalement localisée dans l'espace inter-membranaire et au niveau de la membrane interne de la mitochondrie, la CTMP est relarguée dans le cytoplasme lors du déclenchement de l'apoptose mitochondriale (Parcellier et al., 2009).

Le marquage de la CTMP nous permet de vérifier l'intégrité de la mitochondrie avant et après la micro-injection du fragment [31-53] (Figure 53). Avant la micro-injection, la CTMP est localisée dans le cytoplasme de la cellule et au niveau des mitochondries. Si la micro-injection du fragment [70-89] de la cytogaligine ne modifie pas cette répartition, le fragment [31-53] de la mitogaligine en revanche entraîne une perte de signal au niveau des mitochondries.

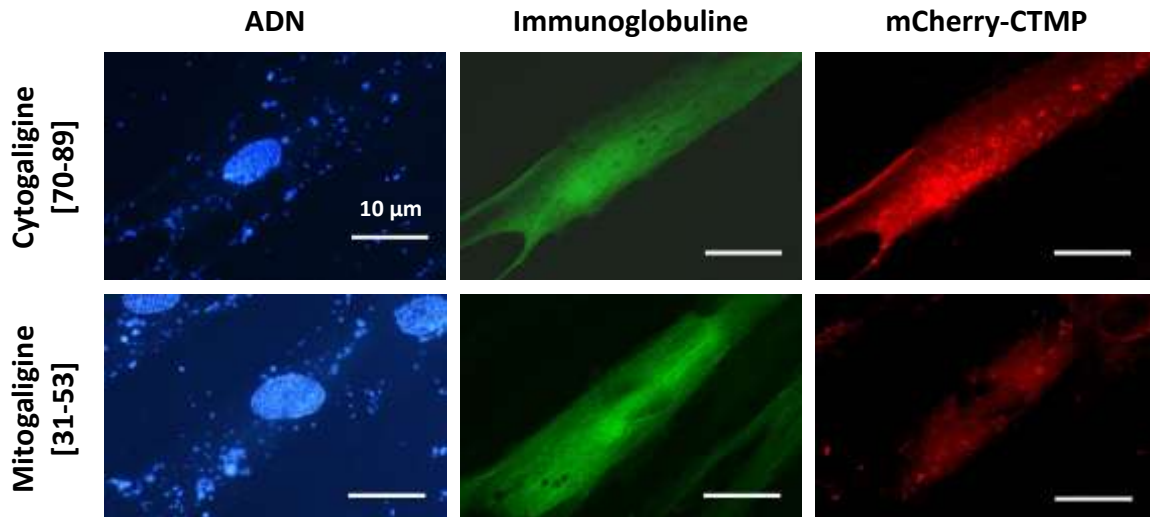


Figure 53 – Intégrité de la membrane mitochondriale après la microinjection des fragments de mitogaligine et cytogaligine dans le cytoplasme. Visualisation des cellules 40 min après la micro-injection du fragment [70-89] de cytogaligine (haut) ou du fragment [31-53] de mitogaligine (bas). Les noyaux sont colorés par du bleu de Hoechst (gauche), l'immunoglobuline injectée avec le peptide est marquée par un anticorps vert (milieu) et la mCherry-CTMP est colorée en rouge (droite).

Cette observation indique que la présence du fragment de mitogaligine provoque le relargage de la CTMP mitochondriale : le fragment [31-53] entraîne bien une perte d'intégrité de la membrane des mitochondries.

C.2.2.4 Suivi du peptide par un marquage à la rhodamine.

Pour pouvoir visualiser le cheminement du peptide, nous l'avons marqué à l'aide d'un fluorophore placé en position N-terminale. Malheureusement la rhodamine que nous avons utilisée pour le marquage a tendance à entraîner le peptide vers le noyau, que ce soit le fragment de mitogaline ou celui de cytogaline.

Il faudra donc se tourner vers un autre type de fluorophore pour pouvoir suivre le peptide microinjecté et visualiser de manière directe sa colocalisation avec les mitochondries.

C.2.3 Un peptide pro-apoptotique efficace ?

Les expériences de micro-injection du fragment [31-53] de la mitogaline ont montré que ce peptide est capable de déclencher l'apoptose des cellules, principalement par la voie mitochondriale. Pour estimer l'efficacité de ce peptide, nous avons comparé nos résultats avec ceux obtenus lors de micro-injection de protéines et peptides impliqués dans l'apoptose mitochondriale.

On peut par exemple citer une étude réalisée sur des peptides issus de la protéine Fis1, une protéine mitochondriale impliquée dans la fission des mitochondries. Ces peptides anti-apoptotiques ont été micro-injectés dans des cellules à des concentrations allant de 1 mM à 100 μ M et deux d'entre eux ont montré une protection efficace contre le relargage de cytochrome c (Serasinghe et al., 2010).

D'autres études ont porté sur les protéines pro-apoptotiques, notamment la protéine Bid. Après activation cette protéine est délocalisée à la mitochondrie et induit l'apoptose : la forme activée de Bid, appelée tBid, correspond au fragment C-terminal de la protéine et contient le domaine BH3.

L'électroporation de Bid et tBid a montré que cette protéine est capable de déclencher l'apoptose à des concentrations nanomolaires : à partir de 50nM pour la protéine entière et 0,5 nM pour tBid (Madesh et al., 2002). Il est important de noter que l'électroporation est une technique qui ne permet pas de contrôler précisément la quantité de molécules se trouvant à l'intérieur de la cellule, car elle utilise un courant électrique pour faire entrer des molécules en perméabilisant momentanément la membrane.

Cependant, une autre étude a montré que la micro-injection de tBid à la même concentration (0,5 nM) entraîne une mortalité d'environ 30% des cellules au bout de 4h (Moreau et al., 2003). Cette étude a également testé l'activité d'un fragment de la protéine Bax contenant son domaine BH3 : la micro-injection de ce peptide à 0,5 nM induit également la mortalité d'environ 30% des cellules (fibroblastes de rat) au bout de 4h.

Une étude plus récente a été menée sur l'hélice α H6 de Bid, qui est responsable de son interaction avec la cardiolipine et indispensable pour l'induction de l'apoptose (Gonzalvez et al., 2010). Cette fois-ci, le peptide α H6 et la protéine tBid ont été micro-injectés dans des cellules de Jurkat à des concentrations respectives de 2,5 μ M et 5nM : la cinétique d'induction de l'apoptose est similaire pour les deux peptides, avec 35 à 40% des cellules en apoptose 6h après l'injection. On peut comparer les résultats de cette dernière étude avec ceux que nous avons obtenus pour le fragment [31-53] de la mitogaline : nous avons observé, 2h après l'injection, 50 à 60% de mortalité avec 40nM de peptide, contre moins de 10% avec 5nM de tBid ou 2,5 μ M de α H6. L'induction de l'apoptose par le fragment de mitogaline serait donc du même ordre que celle induite par la protéine tBid.

C.3 Etude biophysique de l'interaction peptide/membrane.

La seconde partie de l'étude du fragment d'adressage mitochondrial de la mitogaligine est une étude structurale du peptide en présence de milieux membrano-mimétiques, afin de mieux comprendre l'interaction du peptide avec la membrane des mitochondries et notamment l'implication de la cardiolipine dans ce processus.

C.3.1 Différents modèles d'environnements membranaires

C.3.1.1 De l'organisation naturelle des molécules amphiphiles.

Les molécules utilisées dans les modèles d'environnements membranaires sont des molécules amphipathiques. Les plus courantes sont des détergents ou des lipides, qui sont constitués de deux parties : une « tête » polaire et une « queue » hydrophobe. Dans un solvant polaire comme l'eau, ces molécules vont s'organiser naturellement en exposant leur partie polaire au solvant et en enfouissant leur « queue » dans un cœur hydrophobe.

Différents types d'organisation existent, suivant la nature, la taille et la forme des molécules utilisées. Pour savoir quel type d'agrégat une molécule amphiphile va former, on peut estimer la valeur du « packing parameter » p (Rupp et al., 2010). Ce paramètre dépend du volume V et de la longueur de la partie hydrophobe l_c , ainsi que de la surface de la partie polaire à l'interface avec le solvant A_0 (Figure 54).

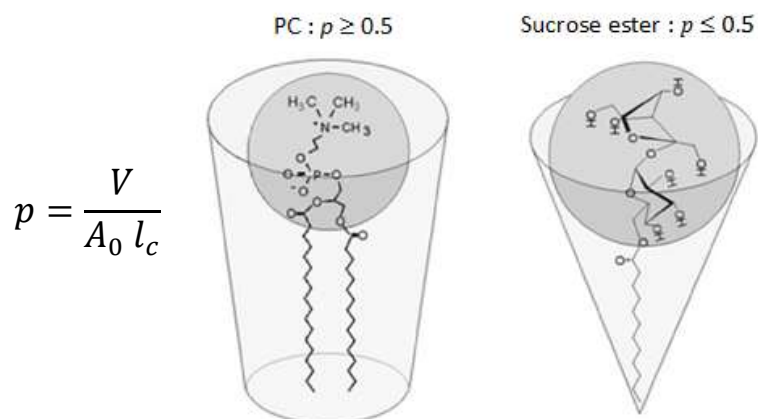


Figure 54 - Le « packing parameter » p . Définition de p et représentation schématique de deux molécules ayant un paramètre p différent (tiré de Rupp et al., 2010).

Avec $p \leq 0.5$ la molécule s'inscrit dans un cône et s'organise naturellement sous forme de micelles. Plus p est petit, plus la micelle sera sphérique. On trouve dans cette catégorie notamment des détergents et des lipides à une chaîne carbonée. Pour certaines molécules, l'encombrement est tel que les formes coniques vont s'organiser sous forme de tube et non de sphères. Ces tubes vont s'empiler et former une phase dite hexagonale. Lorsque la partie hydrophile est à l'extérieur des tubes, on parle de phase hexagonale micellaire (H_I).

Si on a $0.5 \leq p \leq 1$ la molécule devient cylindrique et s'organise en bicouche. Plus on s'approche de 1, plus la bicouche sera plane : on parle de phase lamellaire (L_α). Beaucoup de phospholipides naturels, principaux constituants des membranes, font partie de cette catégorie. Suivant le degré de courbure, la bicouche est capable de se refermer en vésicules unilamellaires de tailles croissantes : les SUVs (Small Unilamellar Vesicles) sont les plus petites vésicules avec un diamètre entre 10 et 100 nm, suivent ensuite les LUVs (Large Unilamellar Vesicles) de 100 à 1000 nm, puis les GUVs (Giant Unilamellar Vesicles) de plus de 1 μm . Ces vésicules peuvent également comporter plusieurs couches concentriques : on parle alors de vésicules multilamellaires, ou MLVs.

Enfin si $p \geq 1$ l'organisation est inversée : les parties hydrophobes se trouvent en périphérie et les parties hydrophiles au centre des structures. Les petites structures forment des micelles inverses, les structures plus encombrantes se placent en phase hexagonale inverse (H_{II}).

La valeur du « packing parameter » nous permet de prédire le type d'agrégat qu'une molécule va former (Table 6). Par contre, le mélange de molécules avec des « packing parameter » différents peut mener à tous les types de phases citées précédemment, voire même à d'autres phases plus exotiques, comme les phases cubiques.

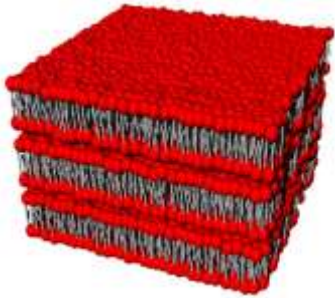
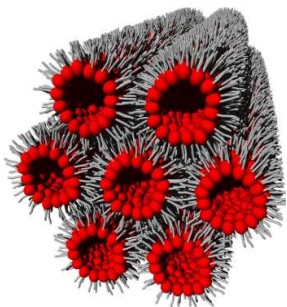
packing parameter	$p \leq 0.5$	$0.5 \leq p \leq 1$	$p \geq 1$
Type d'organisation	Micelle sphérique si $p \leq 1/3$ ou Phase hexagonale micellaire (H_I)	Bicouche ou Phase lamellaire (L_α) $p \approx 0.5$: courbure positive $p \approx 1$: plane	Micelles inverses ou Phase hexagonale inverse (H_{II})
Représentation schématique des phases			

Table 6 - Organisation des molécules amphipathiques en fonction du « packing parameter » p .
(Illustrations tirées de la référence Tresset, 2009).

Dans le cas des membranes, qui sont des phases lamellaires, on peut trouver plusieurs phospholipides ayant des valeurs de p bien différentes. Ces mélanges permettent notamment de moduler certains paramètres de la membrane, comme l'épaisseur, la courbure ou encore la fluidité à l'intérieur et à l'extérieur de la bicouche.

C.3.1.2 Différents types de mimes d'environnement membranaires.

Pour comprendre l'interaction du fragment [31-53] avec la membrane mitochondriale, nous avons utilisé plusieurs milieux, de complexité croissante, qui vont se rapprocher de plus en plus de la membrane d'une mitochondrie (Figure 55).

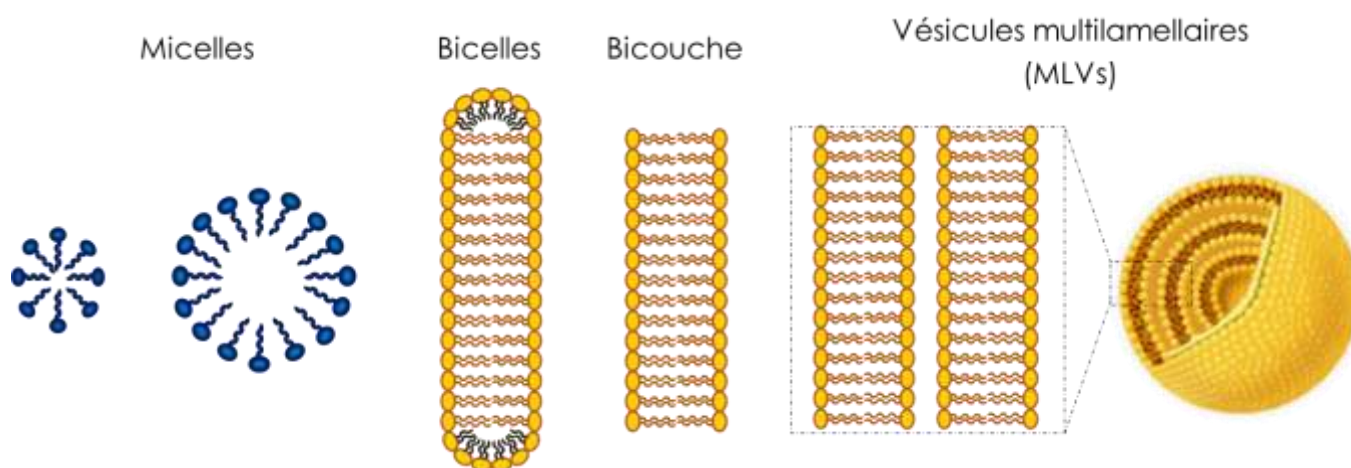


Figure 55 - Les différents mimes d'environnements membranaires utilisés dans l'étude du fragment [31-53].

C.3.1.2.1 Les micelles.

Les protéines interagissant avec des membranes ont souvent besoin d'un environnement hydrophobe pour pouvoir se structurer. Il suffit parfois de simples micelles, à base de détergents ou de lipides, pour pallier ce problème.

Dans un premier temps, nous avons choisi un détergent, le sodium dodécyl sulfate (SDS), et un lipide, la dodécyl phosphocholine (DPC), qui sont des modèles micellaires couramment utilisés comme environnement membranaire simplifié. Chacune de ces molécules va former naturellement des micelles, avec une surface anionique pour le SDS et zwitterionique pour le DPC (Figure 56).

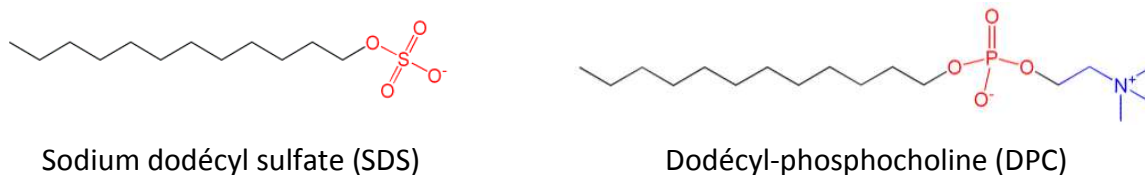


Figure 56 - Formules des molécules utilisées pour former les micelles.

C.3.1.2.2 Les bicouches de lipides.

Les micelles sont des modèles membranaires simples qui apportent les conditions hydrophobes et polaires d'une membrane, mais elles n'ont pas la géométrie qui correspond à une bicouche de phospholipides. Pour s'approcher de cette géométrie et de la composition des membranes mitochondriales, nous avons également utilisé des mélanges de phospholipides, sous forme de bicelles et de MLVs.

C.3.1.2.2.1 Composition des membranes mitochondriales.

La composition de ces mélanges de phospholipides a été guidée par la nature des lipides composant les sites de contact des membranes mitochondriales (Table 7).

Composant	Membrane Externe	Membrane ext. Sites de contact	Membrane int. Sites de contact	Membrane interne
Acides gras	8.2 %	3.4 %	5.6 %	7.6 %
Diacylglycérol	0.3 %	1.7 %	5.8 %	2.8 %
Triacylglycérol	0.7 %	5.8 %	5.1 %	0.6 %
Cholestérol	7.1 %	9.4 %	0.4 %	2.3 %
Phosphatidylcholine	40.9 %	25.9 %	25.8 %	35.1 %
Sphingomyéline	1.8 %	3.1 %	2.2 %	0.7 %
Phosphatidylinositol	9.1 %	7.7 %	7.7 %	5.0 %
Phosphatidylsérine	<0.1 %	<0.1 %	<0.1 %	<0.1 %
Phosphatidyléthanolamine	26.8 %	21.5 %	21.7 %	26.5 %
Cardiolipine	4.0 %	20.2 %	24.4 %	18.0 %
Lysophosphatidylcholine	0.4 %	0.1 %	0.1 %	0.2 %
Lysophosphatidyléthanolamine	0.1 %	<0.1 %	<0.1 %	0.1 %

Table 7 - Composition lipidique des membranes mitochondriales. (Données tirées de Ardail et al., 1990).

Les phospholipides majoritaires dans les membranes de mitochondries sont la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE) : la membrane externe contient environ 40% de PC pour 27% de PE. Mais ces proportions changent au niveau des sites de contact, notamment la quantité de PC diminue au profit de la cardiolipine (CL).

Enfin, le 4^{ème} composant lipidique est le cholestérol (Chol), qui possède une influence non négligeable sur la dynamique membranaire. En effet, ce lipide est connu pour rigidifier les membranes en ordonnant les chaînes carbonées des lipides (Ohvo-Rekilä et al., 2002).

Parmi ces 4 lipides, seule la cardiolipine est chargée négativement : PC et PE sont zwitterioniques et le cholestérol ne possède pas de charges. Nous avons réalisé 4 mélanges en ajoutant progressivement ces lipides pour identifier l'influence de chacun d'eux sur l'interaction du fragment [31-53] avec une membrane de type mitochondriale.

C.3.1.2.2.2 Bicelles et MLVs.

PC et PE correspondent à la tête polaire des phospholipides, la longueur et la nature de la partie hydrophobe varient selon le type de membrane.

Pour les expériences de dichroïsme circulaire et fluorescence, nous avons utilisé des bicelles. Ce système s'organise sous forme de disques : constitués d'une bicouche de lipides à chaînes longues, fermée à sa périphérie par des lipides à chaînes courtes.

Dans notre étude les lipides à chaînes courte (DHPC) et longue (DMPC) possèdent tous une tête PC (Figure 57). L'influence de la cardiolipine a été testée en intégrant de la cardiolipine naturelle, extraite du cœur de bœuf.

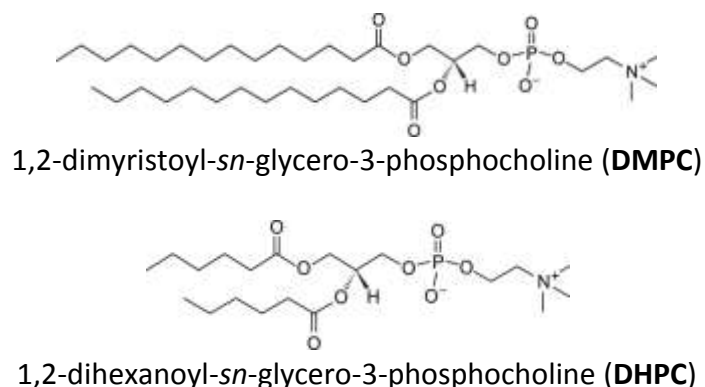


Figure 57 - Formules des lipides utilisés pour les bicelles.

Pour les expériences de Résonance Plasmonique à Ondes guidées (PWR) et Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) solide, nous avons utilisé les MLVs, qui seront le modèle d'environnement membranaire le plus complexe. Ces vésicules sont constituées de phospholipides avec des chaînes carbonées en C16 (POPC et POPE) donnant une épaisseur homogène à la membrane (Figure 58). Cette longueur de chaîne permet également d'intégrer la cardiolipine, qui possède une chaîne en C18.

Trois types de mélanges seront utilisés, permettant d'ajouter progressivement les 4 composants majeurs de la membrane externe mitochondriale : POPC/POPE, POPC/POPE/CL et POPC/POPE/CL/Chol.

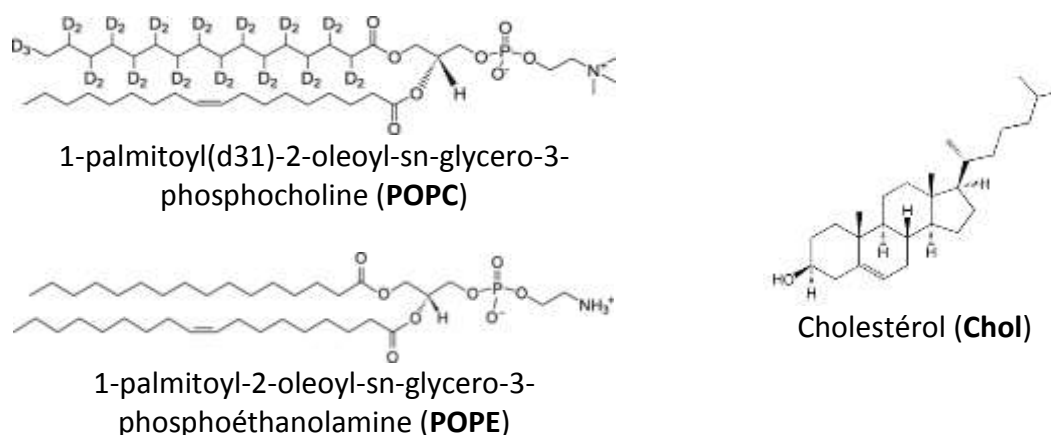


Figure 58 - Formules des lipides utilisés pour les MLVs.

A noter enfin, que pour la RMN solide nous avons également utilisé de la cardiolipine synthétique. En effet, la cardiolipine naturelle (Figure 59) présentait plus de signaux Phosphore que prévu, rendant l'exploitation des données compliquée.

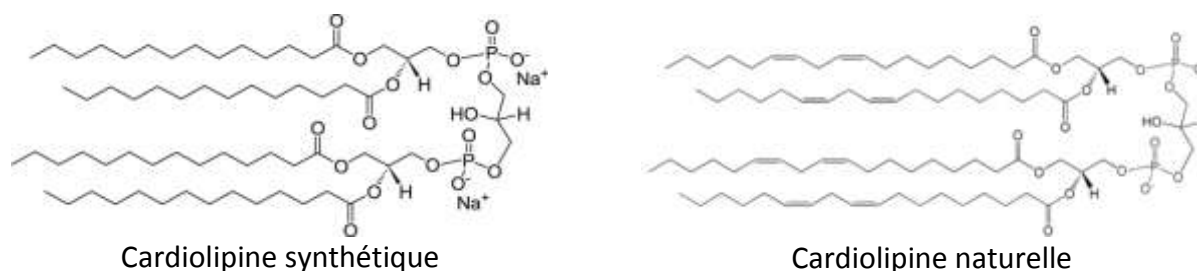


Figure 59 - Formules des cardiolipines naturelle et synthétique.

C.3.2 Effet du milieu sur la structuration du peptide

Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si différents types d'environnement membranaire ont une influence sur la structuration du fragment d'adressage, grâce au Dichroïsme Circulaire (CD). Cette approche nous a également permis de choisir les conditions optimales de préparation d'un échantillon pour la RMN. Cette seconde technique est utilisée pour déterminer la structure tridimensionnelle du peptide, mais également pointer les acides aminés affectés par un changement de milieu.

C.3.2.1 Un spectre de Dichroïsme Circulaire dépendant du milieu.

C.3.2.1.1 Analyse dans l'eau et en présence de TFE.

Lorsqu'il est dans l'eau, le fragment [31-53] est déstructuré à 40%. Le reste se répartit essentiellement entre des éléments structuraux de type feuillets β et du turns. Le fragment d'adressage de la mitogaligine fait partie d'une protéine de 97 résidus et il est en position centrale, il peut donc se retrouver au cœur de la protéine si celle-ci se replie. Pour savoir si ce peptide possède une propension à se structurer, nous avons utilisé du 2,2,2-TriFluoroEthanol (TFE).

En effet, si une protéine est capable d'adopter une structure secondaire spécifique en milieu hydrophobe, un faible pourcentage de TFE suffit généralement à induire un tel repliement. Cette petite molécule favorise la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires, aidant ainsi à la formation ou la stabilisation de structures secondaires (Reiersen et al., 2000). Très souvent le TFE induit la formation d'hélices, mais il peut également favoriser un repliement en feuillet (Shanmugam et al., 2011).

Le fragment [31-53], majoritairement déstructuré dans l'eau, est peu structuré à 70% de TFE (Figure 60) avec en moyenne 7.5 résidus non structurés, 5.2 en Turn, 5.6 de type β et 4.8 de type α . Une hélice étant formée d'au moins 5 résidus, nous pouvons dire que ce peptide ne prendra pas de forme hélicoïdale. De même pour la structure β , avec seulement 3.3 résidus il est peu probable que le fragment [31-53] forme un véritable brin β .

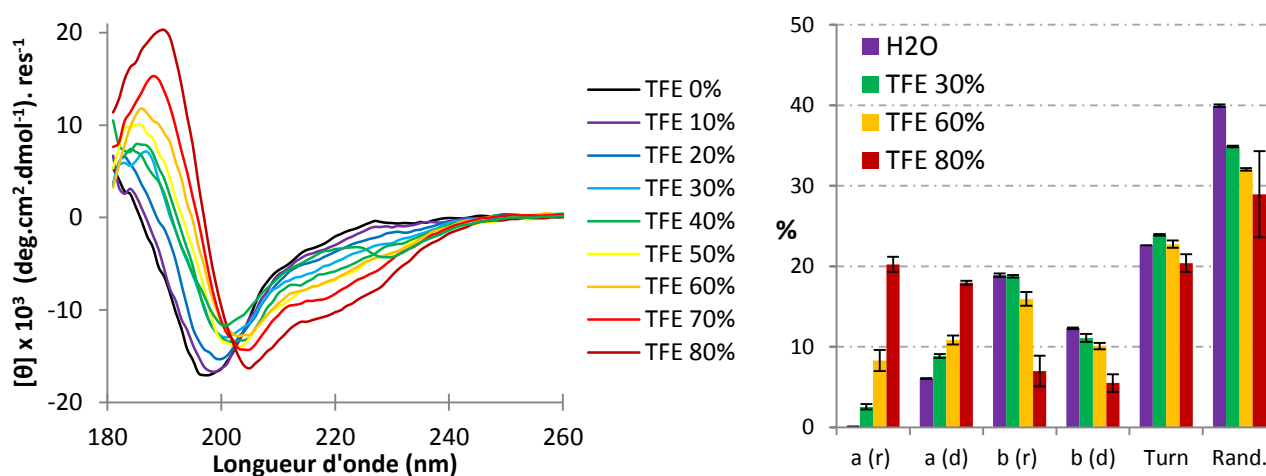


Figure 60 - Dichroïsme circulaire sur le fragment [31-53] en présence de TFE. Spectres (gauche) et composition en structures secondaires exprimée en % (droite). Les catégories de structures secondaires sont, de gauche à droite : hélice α régulière (r) et déformée (d), feuillet β régulier et déformé, Turn, non structuré (Rand).

C.3.2.1.2 Structuration dans un milieu micellaire.

Les micelles de DPC (zwitterionique) et SDS (anionique) sont classiquement utilisées comme modèles membranaires simples (Figure 61).

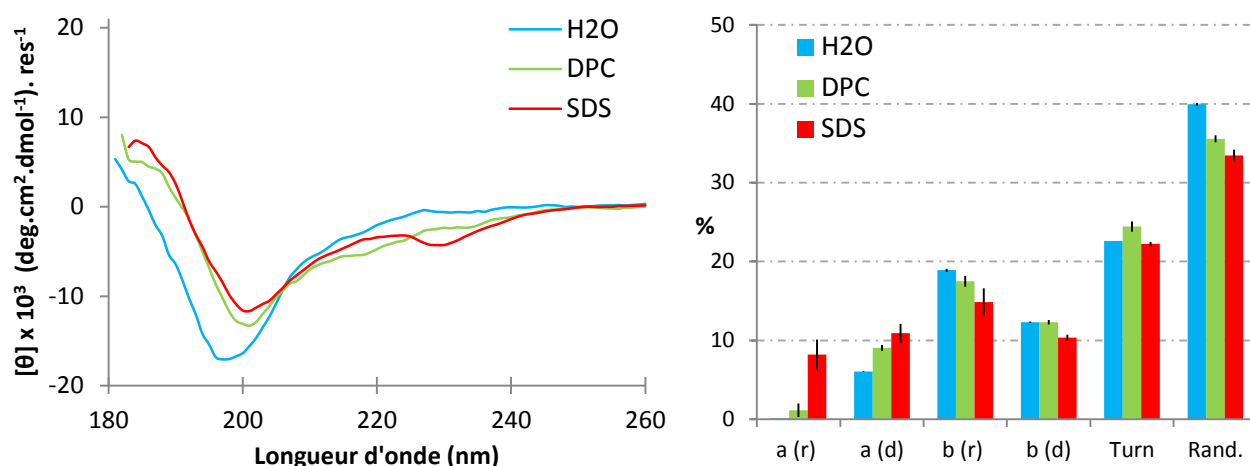


Figure 61 - Dichroïsme circulaire sur le fragment [31-53] en présence de micelles. Spectres CD enregistrés (gauche) et composition en structures secondaires exprimée en % (droite).

La présence de micelles induit un léger changement d'allure du spectre de dichroïsme circulaire. La déconvolution des spectres indique une légère augmentation de la fraction en hélice, mais le pourcentage ne correspond qu'à deux résidus supplémentaires (

Table 8). Seule une faible proportion des résidus fait partie des hélices et feuillets réguliers, il n'y a donc probablement pas de formation d'une véritable hélice ou de brin(s) β.

	α rég.		α déf.		β rég.		β déf.		Turn		Non struc.	
	%	Rés.	%	Rés.	%	Rés.	%	Rés.	%	Rés.	%	Rés.
H ₂ O	0.1	0.0	6.1	1.4	18.9	4.3	12.3	2.8	22.6	5.2	40.0	9.2
DPC	1.2	0.3	9.1	2.1	17.5	4.0	12.3	2.8	24.5	5.6	35.6	8.2
SDS	8.2	1.9	10.9	2.5	14.9	3.4	10.4	2.4	22.3	5.1	33.5	7.7

Table 8 - Structuration du peptide dans l'eau et en présence de micelles. Composition en structures secondaires exprimées en % et en nombre de résidus.

A noter, le minimum autour de 230 nm enregistré en présence des micelles de SDS. Un spectre similaire a été observé avec l'indolicidine, un petit peptide riche en tryptophanes (Ladokhin et al., 1997). Dans cette étude, le minimum était dû à la présence des tryptophanes et une conformation du peptide en forme de Turn (Ladokhin et al., 1999), ce qui pourrait être également le cas pour le fragment de mitogaline.

C.3.2.1.3 Structuration en présence d'une bicouche de lipides.

Des bicelles de différentes compositions vont nous permettre d'observer l'influence de la cardiolipine sur la structuration du peptide. Les bicelles sont constituées de lipides à chaîne longue (DMPC) organisés en bicouche, fermée sous forme de disques par des lipides à chaîne courte (DHPC). Le ratio DMPC/DHPC de 3/1 permet d'obtenir une surface plane suffisamment importante pour pouvoir intégrer de la cardiolipine, tout en gardant une bicouche relativement plane.

Les sites de jonction des membranes mitochondriales contenant 20% de cardiolipine, nous voulions tester des bicelles contenant la même quantité de cardiolipine, mais ce système a en partie précipité. Ce problème de stabilité a également été rencontré lors de l'étude de la doxorubicine en présence du même type de bicelles, lorsqu'il y avait plus de 18% de cardiolipine (Parker et al., 2001). Nous avons donc réalisé nos expériences sur des systèmes contenant seulement 10% de cardiolipine. A noter, enfin, que les bicelles sont plus grandes que les micelles, surtout en présence du peptide : un phénomène de diffusion empêche l'acquisition de données en dessous de 200 nm.

Le spectre CD du peptide en présence de bicelles zwitterioniques (mélange DMPC/DHPC) est tout à fait semblable à celui enregistré dans l'eau. La structure n'étant pas modifiée, il n'y a probablement pas d'interaction entre le peptide et ce type de bicelles.

En présence de cardiolipine on observe un minimum entre 210 et 220 nm (Figure 62) et l'amplitude des modifications est du même ordre que celles observées en présence de micelles. Mais l'acquisition n'étant pas possible en dessous de 205 nm, nous ne pouvons pas effectuer de déconvolution et déterminer les modifications de structuration induites par la présence de cardiolipine.

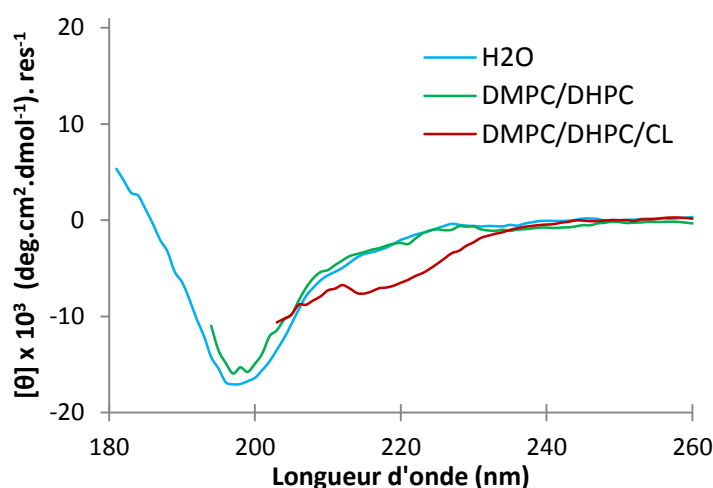


Figure 62 - Dichroïsme circulaire sur le fragment [31-53] en présence de bicelles.

C.3.2.1.4 Structuration du peptide en présence d'une membrane.

Ces expériences de dichroïsme circulaire ont montré qu'un milieu membranaire favorise légèrement la structuration du fragment [31-53], sans qu'il n'adopte une structure secondaire canonique. La présence de charges anioniques à la surface des milieux membranaires (SDS ou CL) semble favoriser ces modifications, mais le peptide reste majoritairement non structuré.

Plusieurs peptides interagissant avec des membranes vont se structurer à leur contact, c'est le cas notamment des CPPs (Cell Penetrating Peptides) qui forment des hélices. L'étude de trois de ces peptides, la pénétratine, pIsI et le transportan, montre que la présence d'un milieu membranaire est nécessaire pour obtenir une structuration de ces peptides (Magzoub et al., 2001). Pour pIsI, un changement de courbure du milieu induit même un changement radical de sa conformation, passant d'une hélice α en présence de micelles à un feuillet β en présence de phospholipides.

La présence d'un milieu membrano-mimétique induit également une modification de la structuration de certains AMPs (Antimicrobial Peptides) comme la Tritrpticine. L'interaction de ce peptide avec la membrane se déroule en deux étapes : une première phase où la Tritrpticine se place à l'horizontale au niveau des têtes des lipides, puis une seconde phase où le peptide s'insère dans la membrane en formant un pore transmembranaire. L'utilisation respective de bicouches lipidiques et de micelles a permis d'observer la structuration du peptide au cours de ces deux étapes (Bozelli et al., 2012).

Si, pour tous ces peptides, la présence d'un milieu membranaire induit une modification importante de leur structuration, ce n'est pas le cas du fragment [31-53] de la mitogaligine. En effet, son repliement est légèrement différent en présence d'un milieu membranaire, mais il n'y a pas de formation de structure secondaire régulière.

C.3.2.2 Détermination de la structure tridimensionnelle par RMN.

C.3.2.2.1 Choix des conditions expérimentales.

La présence de cardiolipine est importante pour l'étude du fragment [31-53], mais son utilisation en RMN liquide n'est pas aisée. En effet, les protons des chaînes aliphatiques des phospholipides et des protéines se retrouvent dans la même gamme de fréquences RMN. En travaillant avec un rapport Peptide/Lipide de 1/50, comme en dichroïsme circulaire, le signal RMN du peptide serait masqué par celui des lipides. Il existe deux moyens de contourner ce problème. Le premier est de deutérer les chaînes des phospholipides, mais la cardiolipine deutérée n'est pas commercialisée. Le second serait d'utiliser un peptide marqué ^{15}N et/ou ^{13}C pour filtrer les signaux correspondant au peptide.

Le dichroïsme circulaire nous a montré que le fragment [31-53] est un peu plus structuré en présence d'un milieu membranaire, que dans l'eau. Les micelles de SDS ou de DPC ont souvent été utilisées pour déterminer la structure RMN de petites protéines (Damberg et al., 2001). La nature anionique du SDS nous a donc poussé à choisir ce milieu pour l'acquisition d'un jeu de données RMN permettant de calculer la structure tridimensionnelle du fragment [31-53]. La température de 35°C a été choisie pour l'acquisition des données RMN car la résolution des spectres était meilleure à 35°C par rapport à 25°C.

C.3.2.2.2 Attribution des déplacements chimiques.

L'analyse du spectre TOCSY a permis d'identifier les 23 systèmes de spins du fragment [31-53] de la mitogaligine. Un spectre NOESY a été utilisé pour attribuer ces systèmes de spins aux atomes d'hydrogène des 23 résidus du peptide (Figure 63). L'analyse du spectre ^{15}N -HSQC, enregistré en abondance naturelle, a permis d'obtenir les déplacements chimiques des atomes d'Azote. La table des déplacements chimiques du peptide se trouve en Annexe 2.

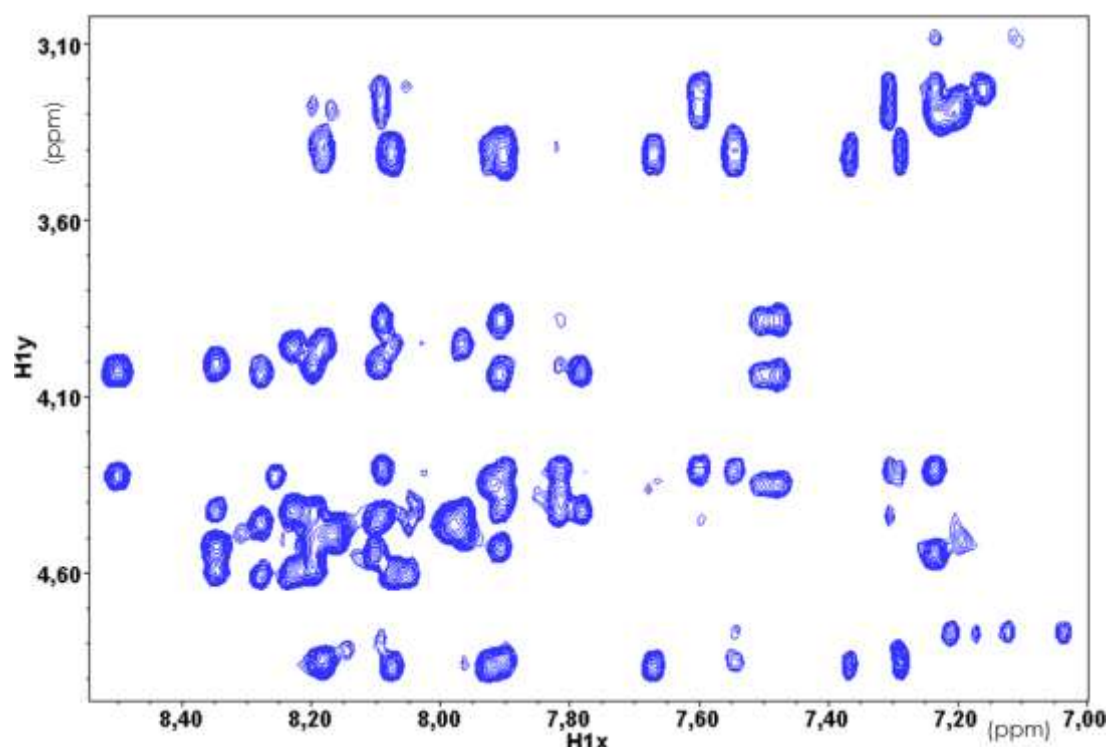


Figure 63 - Spectre NOESY du fragment [31-53] en présence de SDS : zoom sur la zone des HN-HA
Spectre enregistré sur un spectromètre 600 MHz à 35°C, peptide à 1 mM et SDS à 100 mM.

La valeur des déplacements chimiques des atomes du squelette peptidique peut donner des indices sur la structuration du peptide. Le calcul du CSD (Chemical Shift Deviation) compare les déplacements chimiques du peptide, à ceux obtenus dans une protéine non structurée (Wishart et al., 1995). A partir de trois résidus consécutifs avec un CSD de même signe, on peut prédire le type de structure secondaire : un CSD négatif correspond à un résidu situé dans une hélice α , un CSD positif correspond à un feuillet β .

Initialement, la prédiction des structures secondaires était basée sur les déplacements chimiques de plusieurs carbones ($C\alpha$, $C\beta$, et CO) et des $H\alpha$ (Wishart et al., 1991, 1992). Les progrès de la RMN ont permis la résolution de nombreuses structures et un affinement des statistiques, qui permettent maintenant d'intégrer les autres atomes du squelette carboné H_N et N (Wang, 2002).

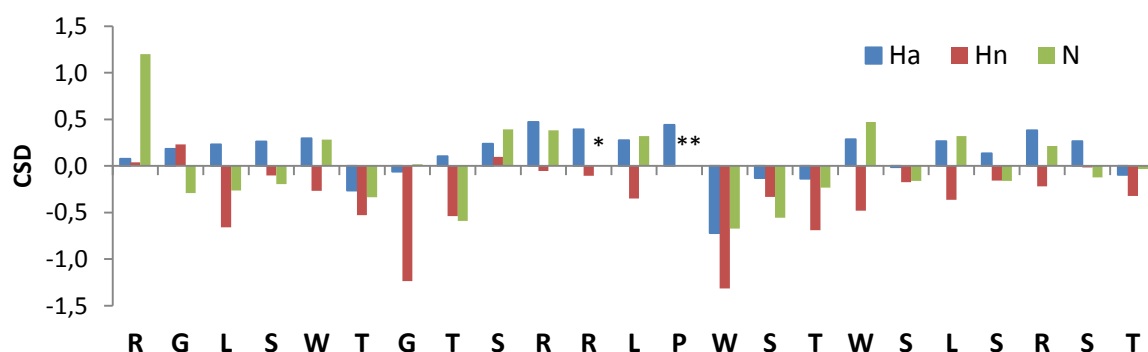


Figure 64 - Prédiction des structures secondaires du fragment [31-53] en présence de micelles de SDS. Les CSDs sont calculés à partir des déplacements chimiques des atomes du squelette peptidique ($H\alpha$, H_N et N) et pondérés en fonction de la variation de déplacement chimique.

Les CSDs calculés pour le fragment [31-53] dans les micelles de SDS (Figure 64) sont plutôt de faible amplitude, ce qui correspond à un peptide peu structuré. Quelques résidus seulement ont un CSD de même signe pour les trois atomes pris en compte dans le calcul : R1, T6, S9, W14, S15, T16, S18 et T23. Parmi eux, il n'y a que trois acides aminés qui se suivent avec un CSD de même signe (W14, S15 et T16) correspondant à une structuration de type hélice α .

Le dichroïsme circulaire nous a montré précédemment qu'il n'y avait pas de formation d'une véritable hélice α , en présence de micelles de SDS. Mais la déconvolution indique également 5 résidus impliqués dans des Turns. La région 14-16 pourrait alors faire partie d'un Turn, correspondant à un CSD négatif. Pour le reste du peptide, les valeurs de CSD semblent indiquer qu'il est faiblement structuré, ce qui correspond aux données de dichroïsme circulaire.

C.3.2.2.3 Calcul de structure.

La structure du fragment [31-53] a été calculée avec le programme ARIA, à partir de 307 contraintes de distances nOe (Figure 65). Parmi les 1000 structures calculées dans l'itération finale, les 100 meilleures structures, classées par énergie de contraintes, ont été raffinées dans l'eau.

Nb de contraintes utilisées

NOE total	307
Intra-résiduel	100
Séquentiel	77
Moyenne distance ($i-j \leq 5$)	47
Longue distance ($i-j > 5$)	0
Ambiguë	83

Violations

Nb moyen $> 0,5 \text{ \AA}$	0
Nb moyen $> 0,3 \text{ \AA}$	1,4

Energies sur les 10 meilleures structures

E_{tot}	-365,50
E_{bond}	8,16
E_{angle}	36,56
E_{impr}	18,10
E_{dihed}	110,52
E_{vdw}	-20,52
E_{elec}	-554,48
E_{noe}	36,16

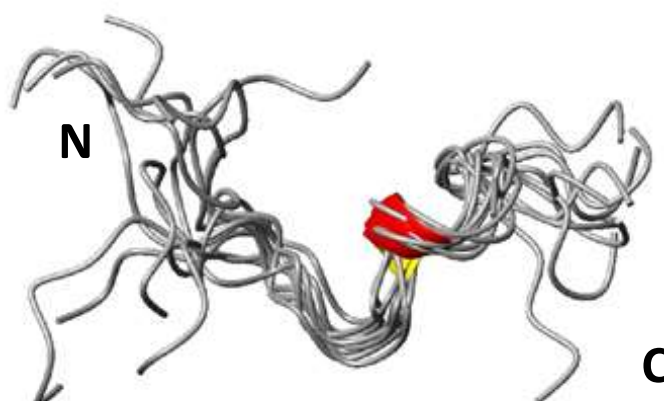


Diagramme de Ramachandran (%)

Zones très favorables	60,0
Zones autorisées	39,4
Zones autorisées étendues	0,6
Zones interdites	0,0

RMSD moyen ($\text{\AA}$) sur la région 6-19

Squelette peptidique	2,18 $\pm 0,58$
Tous les atomes	3,11 $\pm 0,53$

Figure 65 – Statistiques structurales sur l'ensemble des 10 structures représentatives du fragment [31-53] dans le SDS.

La distribution des aminoacides dans le diagramme de Ramachandran ne montre aucun résidu dans les zones interdites et 60% d'entre eux sont dans les zones très favorables (Figure 66).

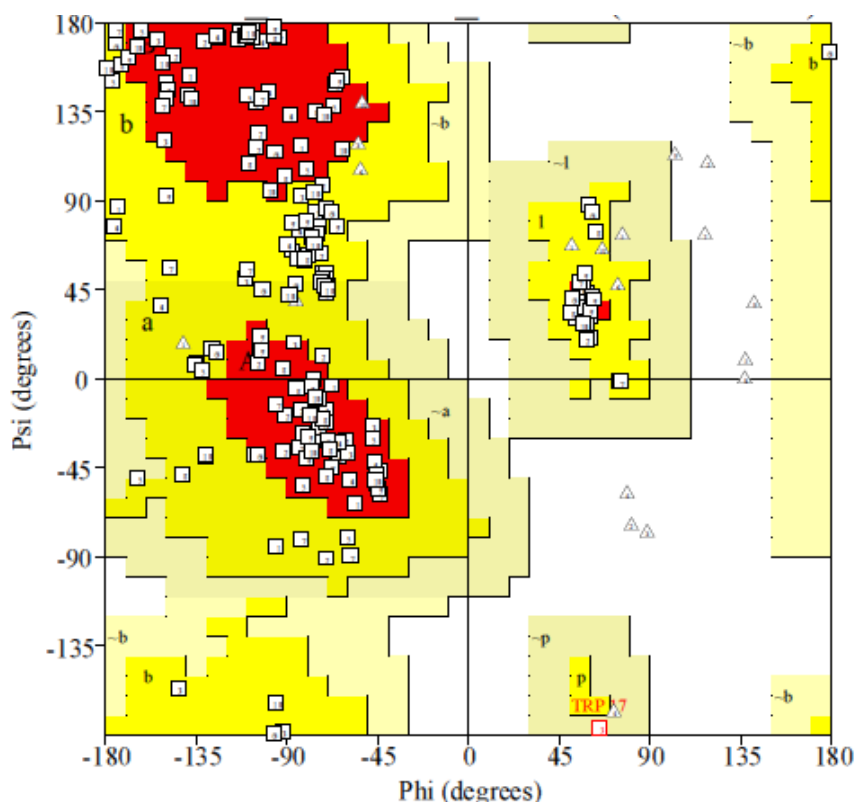


Figure 66 - Diagramme de Ramachandran pour les 10 meilleures structures.

Les résidus R11, P13, W14, S15 et T16 sont rassemblés dans la zone correspondant aux hélices α . L'analyse des déplacements chimiques du peptide indiquait une tendance à former de l'hélice α dans cette région, mais la géométrie du squelette peptidique n'est reconnue comme un tour d'hélice que dans 4 structures. Ces acides aminés pourraient cependant correspondre aux résidus des catégories Turn et Hélices α prédites par le Dichroïsme Circulaire.

Pour les feuillets β , les résidus sont distribués le long de la séquence : L3, W5, L12 et W17 sont rassemblés dans les zones caractéristiques, S4 et R10 peuvent y être assimilés. Cette répartition ne permet donc pas de former de brin β . Par contre ces résultats correspondent bien à ceux obtenus par Dichroïsme Circulaire qui prédisaient 5 résidus pour cette catégorie.

Le fragment 31-53 n'adopte pas de structure secondaire régulière, de type hélice ou feuillet, qui nécessite l'enchaînement de plusieurs acides aminés dans la même conformation. Ceci explique les spectres de dichroïsme circulaire enregistrés pour ce peptide, correspondant à un repliement « peu structuré ». Cependant, il ne faut pas oublier que ce peptide correspond à une séquence interne d'une protéine de taille plus importante : il n'est donc pas exclu que ce fragment se structure de manière différente dans la mitogaline entière.

Malgré l'absence de structures secondaires régulières, le repliement du fragment [31-53] n'est pas aléatoire. La présence d'une Proline en position 13 facilite la formation d'un cluster impliquant les acides aminés W14, W17, L12 et L19, qui se retrouve dans toutes les structures (Figure 67).

Si l'on observe le potentiel d'hydrophobicité, calculé avec le logiciel SYBYL (option MOLCAD), les zones contenant les tryptophanes sont légèrement plus hydrophobes et les extrémités N et C-terminale plus hydrophiles. Enfin si l'on regarde le potentiel électrostatique, également calculé avec le logiciel SYBYL, les zones positives correspondent aux Arginines réparties tout au long de la séquence.

Le fragment [31-53] prend donc une forme relativement plane et étendue avec la région du cluster légèrement plus hydrophobe. Mais la répartition de ses charges positives ne fait pas de ce peptide une molécule amphiphile.

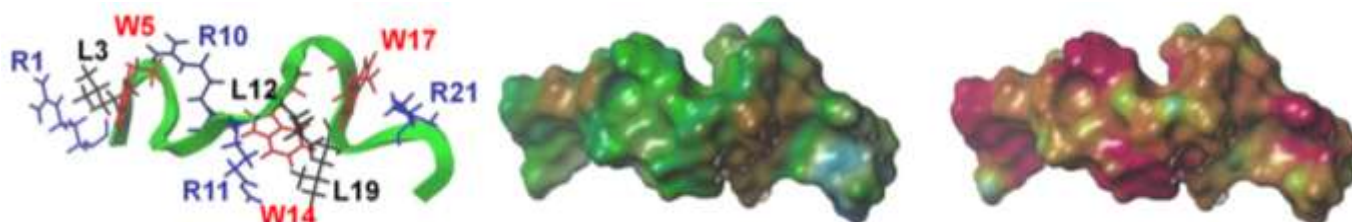


Figure 67 - Structure tridimensionnelle du fragment [31-53] et représentations du potentiel d'hydrophobicité et des régions électrostatiques. A gauche, représentation tridimensionnelle du peptide : les Trp sont en rouge, les Arg en bleu et les Leu en noir. Au milieu, représentation du potentiel d'hydrophobicité : les zones hydrophobes sont en marron et les zones hydrophiles en bleu (échelle : -0.12, +0.12). A droite, représentation du potentiel électrostatique : les zones positives sont en rouge et les zones négatives en bleu (échelle : -300, +300 kcal.mol⁻¹).

C.3.2.2.4 Comparaison des spectres ¹⁵N-HSQC dans l'eau et le SDS.

Le déplacement chimique des atomes est directement influencé par leur environnement. Or, si on compare les spectres ¹⁵N-HSQC du peptide, enregistrés dans l'eau et en présence de micelles de SDS, nous pouvons observer un déplacement de tous les pics (Figure 68).

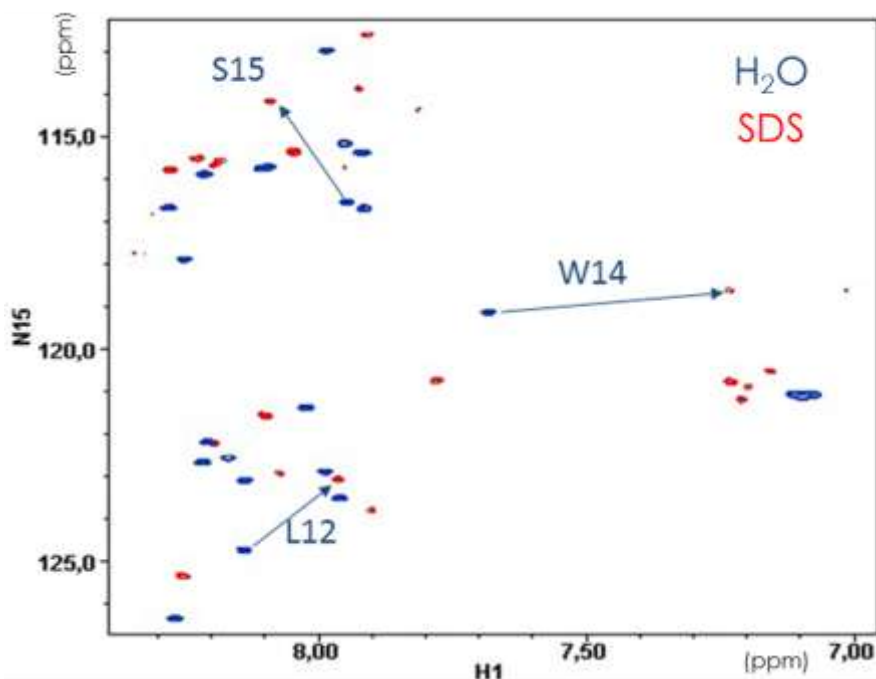


Figure 68 - Superposition des spectres ¹⁵N-HSQC (abondance naturelle) enregistrés dans l'eau (bleu) et en présence de micelles de SDS (rouge). Spectres enregistrés sur un spectromètre 600 MHz à 35°C, peptide à 1 mM et SDS à 100 mM.

Nous pouvons quantifier le déplacement des pics en calculant la différence de déplacement chimique (ΔCS) entre les spectres, dans les deux dimensions (Table 9).

	H ₂ O		SDS		ΔCS
	H _N	N	H _N	N	
1 ARG	8.27	126.34	8.25	125.34	0.16
2 GLY	8.45	109.95	8.50	108.51	0.24
3 LEU	8.02	121.37	7.78	120.74	0.26
4 SER	8.21	115.89	8.22	115.52	0.06
5 TRP	8.17	122.56	8.07	122.92	0.11
6 THR	7.91	115.38	7.92	113.86	0.25
7 GLY	7.67	110.07	7.49	109.78	0.18
8 THR	7.99	112.97	7.91	112.61	0.09
9 SER	8.25	117.89	8.34	117.73	0.09
10 ARG	8.22	122.66	8.20	122.22	0.07
11 ARG	8.21	122.19	8.24		*
12 LEU	8.14	124.72	7.96	123.06	0.32
13 PRO					*
14 TRP	7.68	119.14	7.23	118.61	0.46
15 SER	7.95	116.54	8.09	114.16	0.42
16 THR	7.95	115.16	7.82	114.38	0.18
17 TRP	7.99	122.88	7.90	123.78	0.17
18 SER	7.91	116.68	8.19	115.65	0.32
19 LEU	7.96	123.50	7.96	123.06	0.07
20 SER	8.10	115.74	8.19	115.65	0.09
21 ARG	8.14	123.09	8.10	121.57	0.25
22 SER	8.28	116.67	8.28	115.79	0.14
23 THR	8.10	115.74	8.05	115.35	0.08

Table 9 - Attribution des spectres ¹⁵N-HSQC du fragment [31-53] dans l'eau et en présence des micelles de SDS. P13 n'apparaît pas sur les spectres ¹⁵N-HSQC et R11 est manquante sur le spectre dans le SDS.

Les acides aminés les plus affectés par le passage de l'eau aux micelles de SDS sont L12, W14, S15 et S18, qui correspondent à la zone du cluster (Figure 69). Cette variation de déplacement chimique peut être la conséquence de deux phénomènes : une modification de la structure et/ou une modification d'environnement. Ainsi la présence des micelles de SDS peut favoriser la formation du cluster et/ou son enfouissement par rapport au solvant.

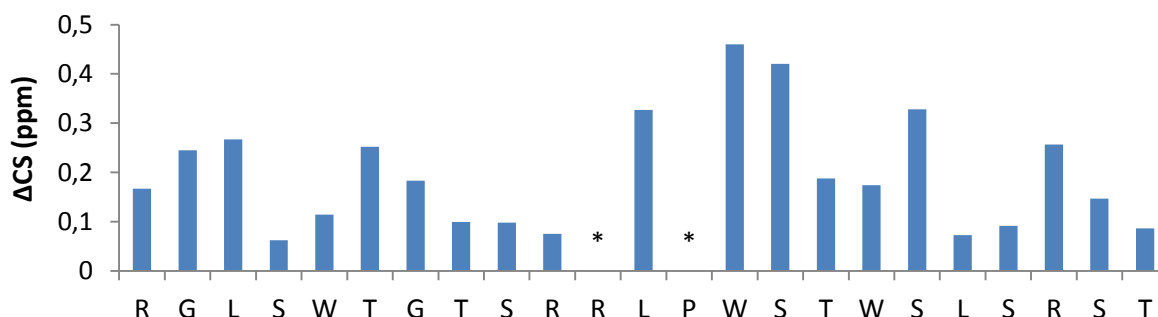


Figure 69 - Variation de déplacement chimique des H_N et N, entre l'eau et le SDS. Sur le graphique, les * correspondent aux résidus manquants.

C.3.3 Enfouissement du peptide dans les milieux membranaires

Nous avons vu que l'utilisation de différents environnements membranaires permet d'influencer légèrement la structuration du fragment d'adressage de la mitogaline. Nous avons voulu évaluer l'interaction du peptide avec ces milieux en étudiant la fluorescence des tryptophanes. De plus, connaissant la structure du fragment [31-53] dans les micelles de SDS, nous avons également évalué l'enfouissement du peptide dans ces micelles, grâce à l'acquisition de données RMN en présence d'ions paramagnétiques.

C.3.3.1 Etude de la fluorescence des tryptophanes

Les tryptophanes sont souvent utilisés comme sondes pour suivre des modifications d'environnement (Lakowicz, 1999). Pour étudier indépendamment la fluorescence des trois tryptophanes du fragment [31-53], j'ai synthétisé et utilisé des peptides mutants où deux tryptophanes sont substitués par des phénylalanines (Table 10).

Fragment [31-53]	Séquence	Trp étudié
Natif	RGLS W TGTSRRLP W ST W SLSRST	-
Mutant W5F W14F	RGLS F TGTSRRLP F ST W SLSRST	W17
Mutant W5F W17F	RGLS F TGTSRRLP W ST F SLSRST	W14
Mutant W14F W17F	RGLS W TGTSRRLP F ST F SLSRST	W5

Table 10 - Peptides utilisés pour les expériences de spectrométrie de fluorescence.

C.3.3.1.1 Spectres de référence dans l'eau.

Lorsque le peptide est dans l'eau, le maximum d'émission de fluorescence se situe autour de 357 nm pour les trois mutants (Figure 70) et correspond à un tryptophane totalement accessible aux molécules d'eau (Lakowicz, 1999). Cependant l'intensité de fluorescence varie d'un mutant à l'autre : W5F-W14F et W14F-W17F ont la même intensité, alors que W5F-W17F a une intensité plus importante.

Le cycle du tryptophane étant très sensible à son environnement, beaucoup de facteurs peuvent moduler l'intensité de fluorescence qu'il émet. Ainsi des agents quenchers de fluorescence, comme l'oxygène, peuvent diminuer l'intensité émise par le fluorophore. Un tryptophane dans une protéine dénaturée est facilement accessible au solvant et donc à l'oxygène de l'eau : il aura une intensité faible. Par rapport aux tryptophanes 5 et 17, la position centrale du tryptophane 14 au sein de la structure peut le protéger un peu plus de la proximité des molécules d'eau, d'où son intensité plus importante.

Les spectres de dichroïsme circulaire enregistrés en parallèle étant similaires pour les trois peptides mutants, on peut considérer que les mutations des tryptophanes n'entraînent pas de modification structurale significative. A noter cependant que le spectre CD du peptide mutant conservant le tryptophane 14 (peptide W5F-W17F) est celui qui se rapproche le plus du peptide natif.

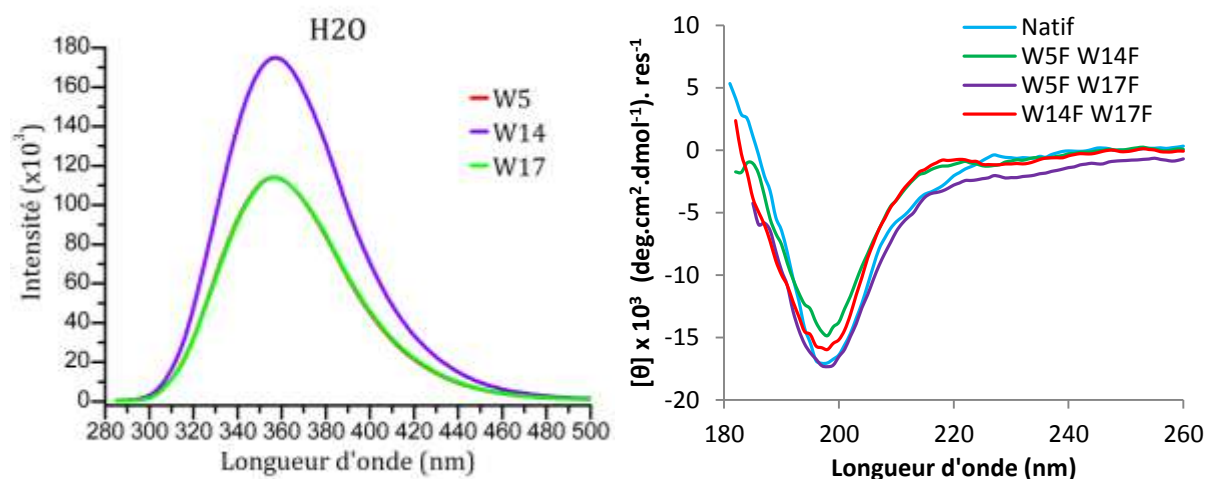


Figure 70 - Spectres de fluorescence (gauche) et dichroïsme circulaire (droite) sur les peptides mutants et natif dans l'eau. Spectres enregistrés à température ambiante sur des échantillons composés de 0,1 mg/mL de peptide (soit 36,7 et 37,8 μM , pour les peptides natif et mutants) à pH 5,5.

C.3.3.1.2 Spectres dans les micelles de SDS et de DPC.

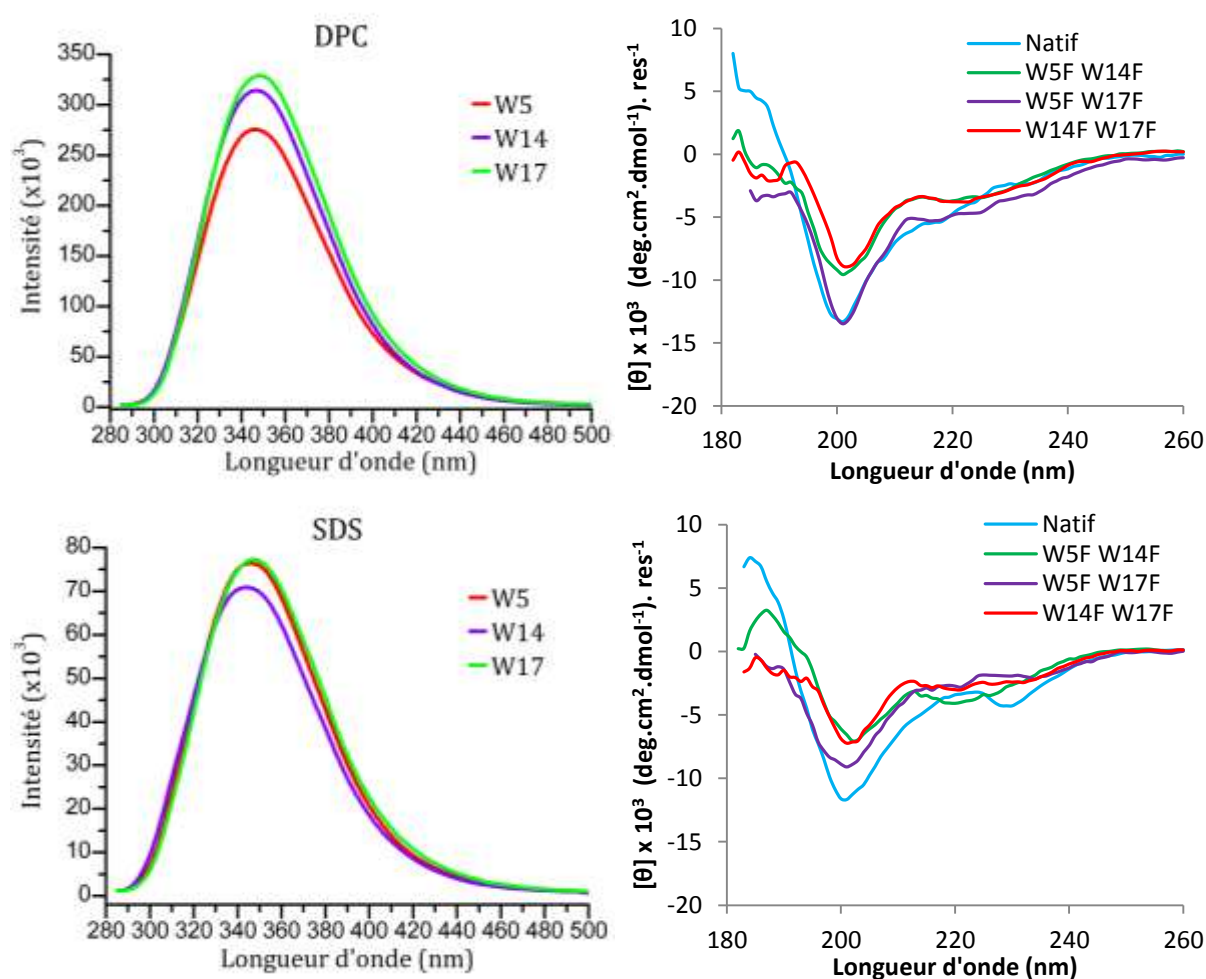


Figure 71 - Spectres de fluorescence (gauche) et dichroïsme circulaire (droite) sur les peptides mutants et natif en présence de micelles de DPC (haut) ou SDS (bas). Spectres enregistrés à température ambiante en présence de DPC (20mM) ou SDS (10mM). Les échantillons sont composés de 0,1 mg/mL de peptide (soit 36,7 et 37,8 μM , pour les peptides natif et mutants) à pH 5,5.

En présence des micelles de SDS ou DPC, le maximum de fluorescence des tryptophanes est décalé vers des longueurs d'onde plus faibles que dans l'eau, autour de 346 nm : ils sont donc dans un environnement plus apolaire (Figure 71).

Par contre, les tryptophanes ne sont pas enfouis dans un environnement totalement apolaire, car le maximum de fluorescence se trouverait autour de 320 nm (Lakowicz, 1999). Le peptide est bien en contact avec les micelles, mais les tryptophanes sont peu enfouis.

Contrairement à ce qui a été observé dans l'eau, il n'y a pas de différence d'intensité importante entre les trois mutants, en présence de micelles. L'accessibilité aux molécules d'eau serait donc similaire pour les trois tryptophanes.

En présence des micelles de DPC, les peptides mutants ont un spectre CD légèrement différent de celui du peptide natif, sauf pour le mutant W5F-W17F. Ce mutant est également celui dont le spectre se rapproche le plus de celui du peptide natif en présence de SDS. Or la structure déterminée dans les micelles de SDS montre que le cycle du tryptophane 14 est en position centrale par rapport au peptide et forme un cluster avec L12 et W17. Même si les phénylalanines ont une conformation proche de celle des tryptophanes, W14 reste indispensable à la structuration du peptide.

C.3.3.1.3 Spectres en présence de bicelles.

Pour tester l'influence de la cardiolipine, nous avons utilisé des bicelles de DMPC/DHPC contenant ou non 10% de cardiolipine. Contrairement aux observations en présence de micelles, les résultats obtenus avec les bicelles sont différents suivant la charge du mélange : zwitterionique pour DMPC/DHPC, et anionique pour DMPC/DHPC/CL.

En présence des bicelles de DMPC/DHPC, les trois tryptophanes ont un maximum de fluorescence à 356 nm, correspondant à un tryptophane exposé au solvant (Figure 72). L'intensité de fluorescence varie d'un mutant à l'autre : W5F-W14F et W14F-W17F ont la même intensité, tandis que W5F-W17F a une intensité plus importante. Comme dans le cas de l'eau, les spectres CD étant similaires pour les trois peptides, la position centrale de W14 peut expliquer la différence d'intensité enregistrée.

La présence de cardiolipine provoque un décalage du maximum de fluorescence vers des longueurs d'onde plus faible, 342 nm pour les trois tryptophanes. Ce décalage (15 nm environ) est plus important que celui observé avec les micelles de SDS (11 nm en moyenne), mais les cycles des tryptophanes ne sont pas totalement dans un environnement hydrophobe. Comme avec les micelles, l'intensité de la fluorescence est similaire pour les trois tryptophanes.

Enfin, les trois peptides mutants présentent un spectre CD similaire, mais légèrement différent de celui du peptide natif. Les trois tryptophanes sont donc indispensables pour maintenir la conformation native du peptide.

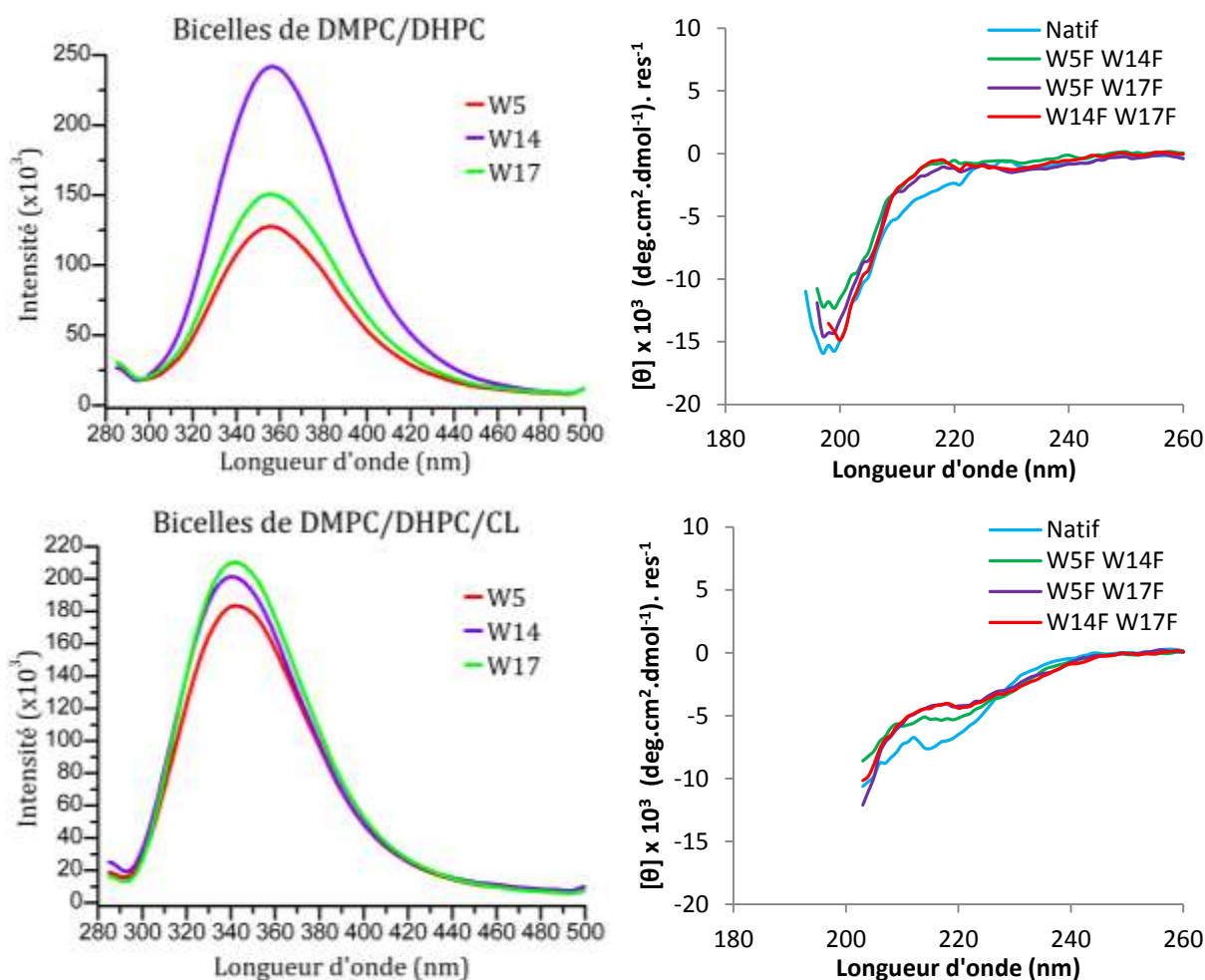


Figure 72 - Spectres de fluorescence (gauche) et dichroïsme circulaire (droite) sur les peptides mutants et natif en présence des bicelles de DMPC/DHPC (haut) et DMPC/DHPC/CL (bas). Spectres enregistrés à température ambiante sur des échantillons composés de 0,1 mg/mL de peptide (soit 36,7 et 37,8 μM , pour les peptides natif et mutants) à pH 5,5.

C.3.3.2 Comparaison des différents modèles membranaires.

C.3.3.2.1 Décalage du maximum de fluorescence.

Dans toutes les conditions les trois tryptophanes ont un maximum de fluorescence similaire (Table 11) et suivant les milieux utilisés, un décalage de l'ordre de 10 à 15 nm a été enregistré. Des décalages similaires ont été observés avec plusieurs peptides mis en présence de micelles et de bicouches (Bozelli et al., 2012, Magzoub et al., 2001) et correspondent à une localisation au niveau de la tête des phospholipides membranaires (Fragneto et al., 2000).

Le peptide interagit donc avec des milieux micellaires (SDS ou DPC) mais en restant proche de leur surface : les cycles des tryptophanes sont localisés au niveau des têtes des lipides, à l'interface des micelles avec le solvant.

L'interaction avec une bicouche de phospholipides va dépendre de la tête polaire des phospholipides. En effet, les tryptophanes ne semblent pas être influencés par une bicouche zwitterionique (DMPC/DHPC). Par contre, une bicouche contenant de la cardiolipine (DMPC/DHPC/CL) provoque un décalage plus important que celui observé dans les milieux micellaires.

Fragment [31-53]	Trp étudié	Réf. Eau λ (nm)	λ en nm (décalage)			
			SDS	DPC	DMPC/DHPC	DMPC/DHPC/CL
Mutant W14F W17F	W5	357	346 (11)	346 (11)	356 (1)	342 (15)
Mutant W5F W17F	W14	356	344 (12)	347 (9)	356 (0)	340 (16)
Mutant W5F W14F	W17	357	347 (10)	347 (10)	356 (1)	342 (15)

Table 11 - Récapitulatif des longueurs d'onde du maximum d'émission de fluorescence.

C.3.3.2.2 Interaction avec des micelles.

Si on compare les spectres enregistrés dans l'eau et en présence de micelles de DPC, on observe un décalage du maximum de fluorescence vers des longueurs d'onde plus faibles et une augmentation significative de l'intensité de fluorescence pour les trois tryptophanes (Figure 73). Ceci correspond à une interaction du peptide avec les molécules de DPC, entraînant une diminution de l'accessibilité des tryptophanes aux molécules d'eau.

En présence des micelles de SDS on observe également un décalage du maximum de fluorescence similaire à celui observé avec le DPC, par contre l'intensité de fluorescence a considérablement diminué, correspondant à un environnement local différent.

Nous savons maintenant que les trois tryptophanes se placent au niveau de l'interface avec le solvant, c'est-à-dire au niveau des têtes du SDS ou du DPC, or cette interface est de nature différente entre les deux molécules (Figure 56, p85). En effet, la tête du SDS est composée d'un groupement sulfate, tandis que le DPC possède un groupement NH_3^+ suivi d'un phosphate. L'encombrement des atomes et la répartition des charges seront donc totalement différents entre ces deux interfaces.

Le fragment [31-53] contenant quatre Arginines, des interactions électrostatiques de nature différente entre le SDS et le DPC peuvent tout à fait modifier localement l'environnement des cycles des tryptophanes et provoquer une extinction de fluorescence dans le cas du SDS.

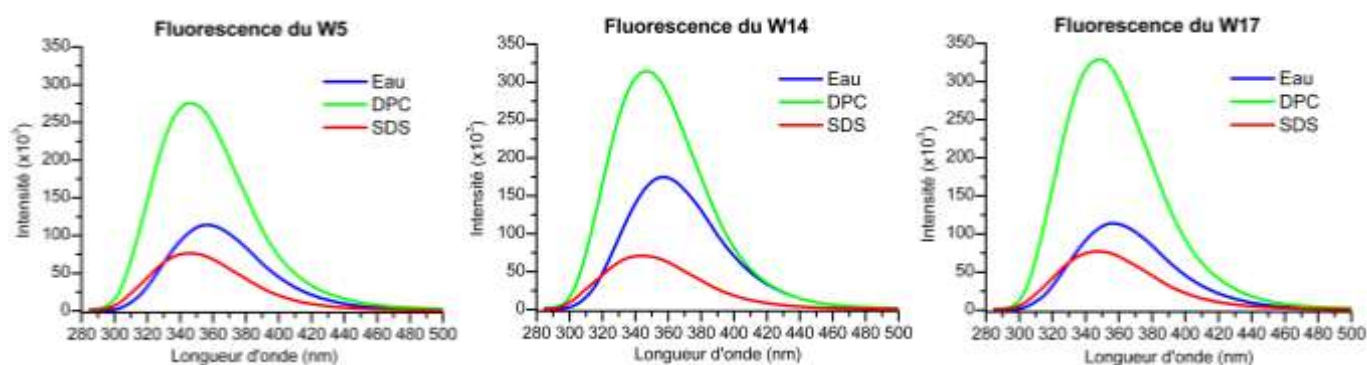


Figure 73 - Fluorescence des peptides mutants dans l'eau et les micelles.

C.3.3.2.3 Interaction avec une bicouche de lipides.

Si on compare les spectres enregistrés dans l'eau en présence de bicelles de DMPC/DHPC, il n'y a pas de décalage du maximum de fluorescence pour les trois tryptophanes, mais une augmentation de l'intensité pour les peptides mutants W5F-W17F et W5F-W14F (Figure 74). Un spectre CD légèrement différent entre l'eau et les bicelles de DMPC/DHPC permet d'expliquer une différence d'environnement local pour ces deux mutants.

Par rapport à l'eau, la présence de bicelles contenant de la cardiolipine induit un décalage du maximum de fluorescence et une augmentation d'intensité pour les trois peptides : il y a bien un enfouissement des cycles des tryptophanes dans ce milieu.

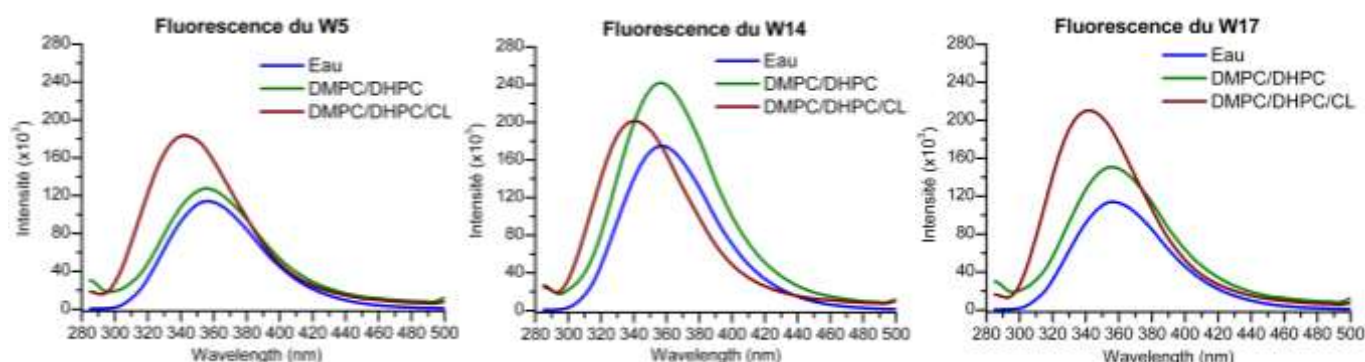


Figure 74 - Fluorescence des peptides mutants dans l'eau et en présence de bicelles de DMPC/DHPC et DMPC/DHPC/CL.

C.3.3.3 Enfouissement du peptide dans les micelles de SDS

La présence d'agents paramagnétiques affecte la relaxation des atomes situés à proximité de ces molécules. Plus un atome est proche d'un agent paramagnétique, plus son signal RMN s'élargit, diminuant ainsi son intensité. Différentes sondes paramagnétiques, plus ou moins accessibles au solvant, sont ainsi utilisées pour étudier l'enfouissement des atomes d'une protéine, au sein d'une structure, mais également dans un environnement micellaire (Damberg et al., 2001).

C.3.3.3.1 Accessibilité au solvant.

Pour évaluer l'accessibilité des atomes du peptide, nous avons utilisé du Mn^{2+} , qui affecte les signaux des atomes directement accessibles au solvant ou situés à l'interface des milieux membranaires. La majorité des signaux RMN du fragment [31-53] est affectée par la présence de Mn^{2+} (Figure 75) : la totalité du peptide est donc accessible au solvant et peu enfoui dans les micelles de SDS.

Les signaux qui persistent aux plus fortes concentrations d'agent paramagnétique correspondent aux cycles des tryptophanes et aux extrémités des chaînes latérales des Arginines. Cependant, ces derniers aminoacides portent un groupement guanidinium au bout de leur chaîne latérale, qui peut entraîner une répulsion électrostatique locale des ions Mn^{2+} . Les atomes situés au bout des chaînes latérales des Arginines, qui sont moins affectés par la présence de Mn^{2+} , ne sont donc pas forcément moins accessibles au solvant.

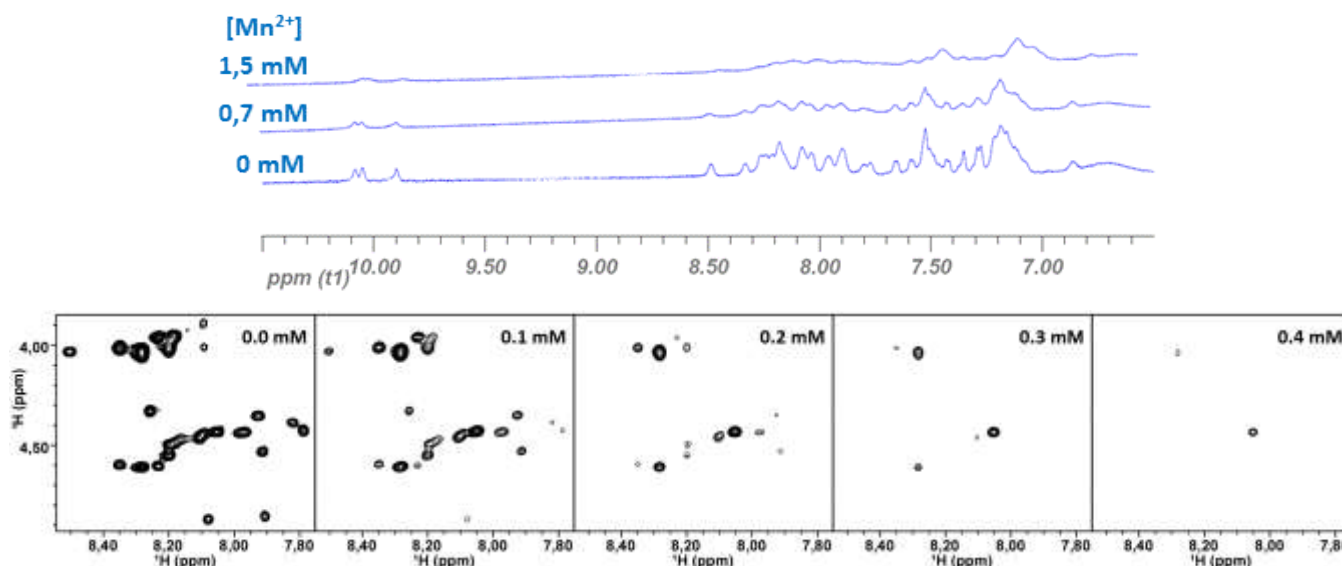


Figure 75 - Spectres TOCSY du fragment [31-53] en présence de micelles de SDS et d'une quantité croissante de Mn^{2+} . Région des protons amines (haut) et zoom sur les pics de corrélations HN-HA (bas). Spectres enregistrés sur un spectromètre 600 MHz à 35°C : peptide (1 mM) et SDS deutéré (100 mM) à pH 5,5.

L'intensité des pics de corrélation du peptide diminue avec l'augmentation de la concentration en ions Mn^{2+} (Figure 76) suivant l'exponentielle de formule :

$$y = A \cdot e^{-Bx}$$

Le facteur B peut être assimilé au taux de décroissance, calculé en fonction de la concentration en ion paramagnétique (Hilty et al., 2004). Ainsi, les atomes les plus accessibles aux ions Mn^{2+} ont leur intensité qui diminue à de faibles concentrations en ions paramagnétiques, donnant une exponentielle avec un facteur B élevé.

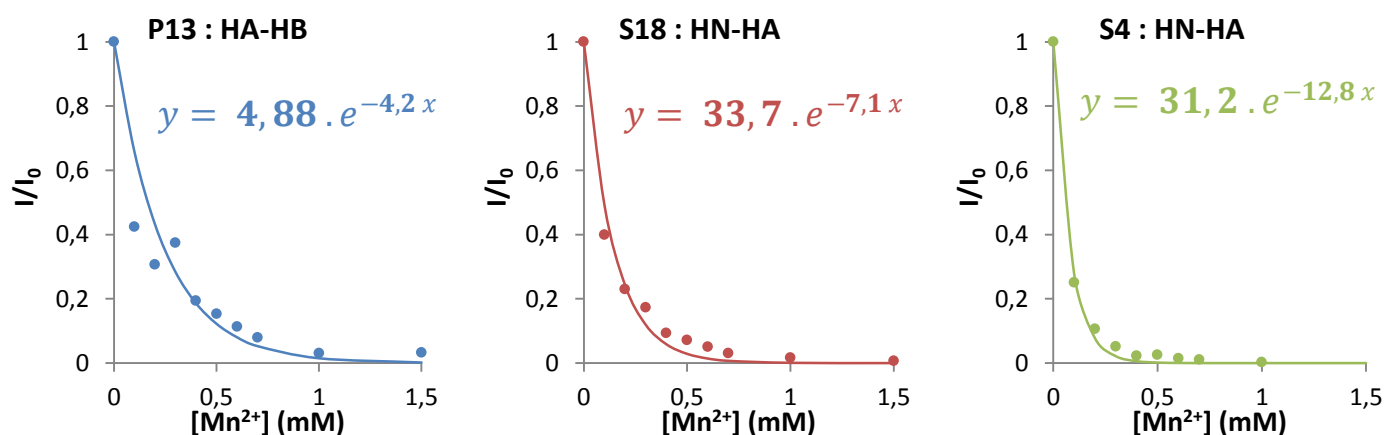


Figure 76 – Perte d'intensité des pics de corrélation du peptide en présence d'ions Mn^{2+} .

Le fragment [31-53] étant peu structuré, nous avons observé uniquement des atomes situés sur le squelette peptidique. L'étude des pics de corrélation HN-HA (HA-HB pour la Proline) va donc nous renseigner sur l'accessibilité du squelette aux ions Mn^{2+} (Figure 77) : la région 12-14 est la moins accessible et la région 1-4 la plus accessible. Les résidus 15-17 et 20 seraient également un peu plus accessibles que le reste du peptide.

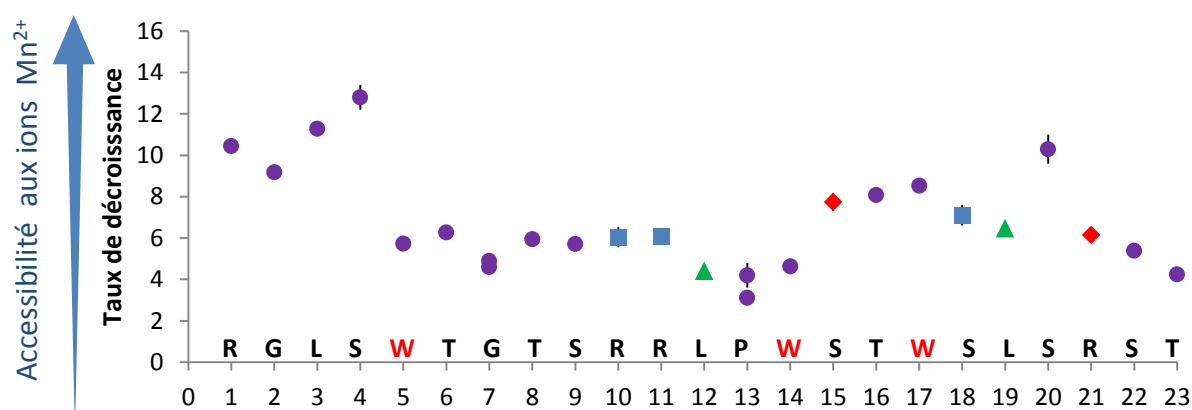


Figure 77 - Accessibilité du squelette carboné aux ions Mn^{2+} . Pour chaque résidu, le taux de décroissance (facteur B de l'exponentielle) est indiqué pour les pics de corrélation HN-HA (●) et HA-HB pour P13. Certains signaux se chevauchant, le taux de décroissance peut être mal estimé: c'est le cas de R10-R11-S18 (■), L12-L19 (▲) et S15-S21 (◆).

Si l'on observe la structure tridimensionnelle du peptide, la région 1-4 correspond à une région très flexible. Or la flexibilité est un facteur qui influence la relaxation des atomes (Kosol et al., 2010), augmentant l'effet paramagnétique : l'accessibilité de cette région est donc particulièrement grande. Pour les autres régions, une accessibilité plus importante aux ions Mn^{2+} ne correspond pas forcément à un enfouissement plus faible dans les micelles de SDS. En effet, il peut exister des interactions électrostatiques entre les ions paramagnétiques, les têtes du SDS et les chaînes latérales des Arginines, pouvant provoquer un biais dans la titration des signaux.

Si on observe la localisation des groupements guanidinium situés sur les chaînes latérales des Arginines (Figure 78), nous pouvons voir que les charges de ces groupements peuvent couvrir une grande partie du peptide : ainsi la région 12-14 serait protégée du solvant par les amines de R10 et R11 et la région 15-17 serait au contraire plus accessible. Cette localisation peut tout à fait expliquer les différences de facteur B observées.

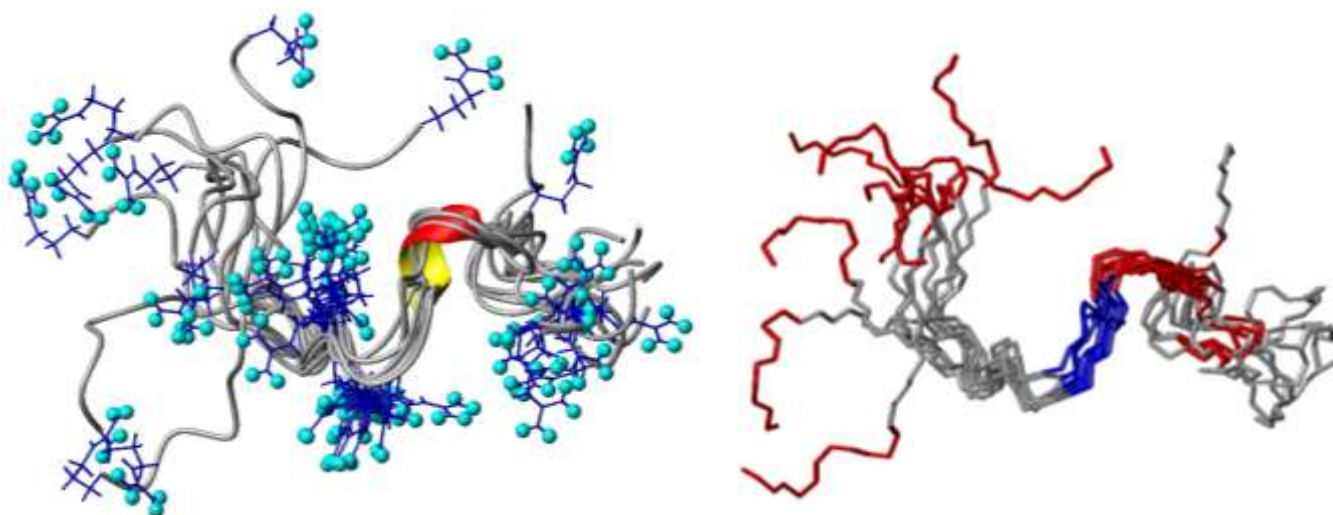


Figure 78 - Accessibilité du peptide aux ions Mn^{2+} , en présence des micelles de SDS. Superposition des 10 meilleures structures avec les amines des chaînes latérales des Arginines représentées en boule (gauche). Quelques structures avec le squelette carboné coloré suivant l'accessibilité aux ions Mn^{2+} (droite): en rouge les résidus plus accessibles et en bleu les moins accessibles.

Pour s'affranchir des interactions électrostatiques dues à la charge du Mn^{2+} , une nouvelle titration des signaux du peptide en présence d'une sonde paramagnétique neutre a été réalisée. Françoise Paquet a utilisé du gadodiamide, qui est une sonde paramagnétique soluble, comme les ions Mn^{2+} (Respondek et al., 2007).

L'utilisation de cette sonde montre également une diminution de tous les signaux du peptide, confirmant un faible enfouissement du peptide (Figure 79). Cependant, il n'y a pas de grande disparité dans les valeurs d'accessibilité. Le fragment [31-53] se placerait donc plutôt à l'horizontale par rapport à la surface des micelles.

Les résidus de la première moitié du peptide possèdent une accessibilité similaire, alors que ceux de la seconde partie présentent plus de variations. Les résidus centraux R11, L12 et P13 sont les moins accessibles, probablement à cause de la formation du cluster autour de W14 qui diminue légèrement l'accessibilité au solvant de ces résidus. La variabilité de la zone C-terminale peut correspondre à la formation des turn, qui entraîne une oscillation dans les taux de décroissance (Respondek et al., 2007).

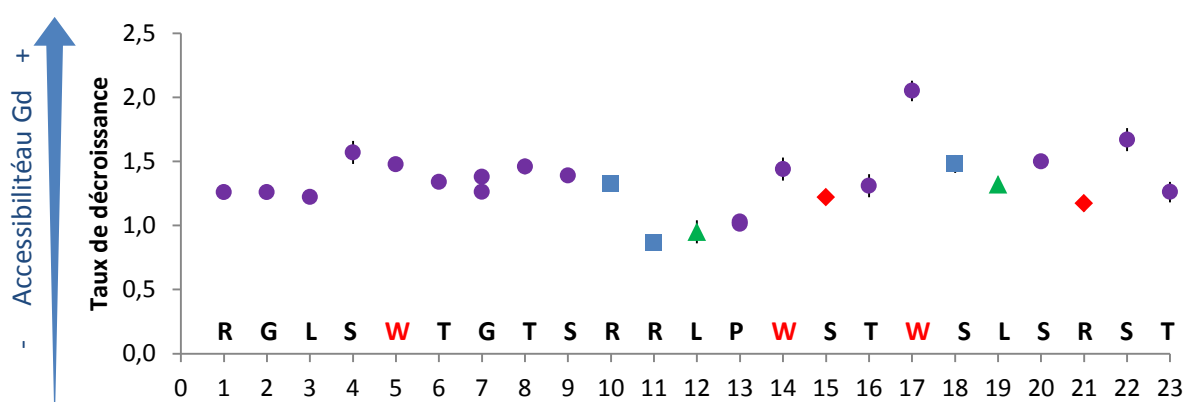


Figure 79 - Accessibilité du squelette carboné au gadodiamide. Pour chaque résidu, le taux de décroissance (facteur B de l'exponentielle) est indiqué pour les pics de corrélation HN-HA (●) et HA-HB pour P13. Certains signaux se chevauchant, le taux de décroissance peut être mal estimé: c'est le cas de R10-R11-S18 (■), L12-L19 (▲) et S15-S21 (◆).

C.3.3.3.2 Positionnement du peptide par rapport au SDS.

L'attribution des molécules de SDS dans la base données « Spectral Database for Organic Compounds » (http://sdb.sriodb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi : SDBS n°2985) montre que les protons situés en première position sur la chaîne carbonée ont un déplacement chimique autour de 4 ppm, et les suivants sont en-dessous de 2 ppm. Le spectre TOCSY des micelles de SDS peut donc être attribué, mais seuls les protons situés sur les carbones 1, 2 et 12 ont des signaux RMN distincts (Figure 80).

Comme pour le peptide, l'ajout d'une quantité croissante d'ions Mn^{2+} entraîne une diminution de l'intensité des signaux RMN des molécules de SDS, suivant une courbe exponentielle. Plus on descend le long de la chaîne carbonée, plus l'atténuation des signaux est faible : nous pouvons donc nous servir de ces données comme étalon pour positionner le peptide par rapport aux micelles.

Le facteur B obtenu pour le pic de corrélation entre les positions 1 et 2 est un peu plus faible que le minimum obtenu avec le peptide : 2,8 contre 3,11 pour le pic HA-HB de P13. Le fragment [31-53] est donc faiblement enfoui dans les micelles : il est localisé au niveau des têtes polaires.

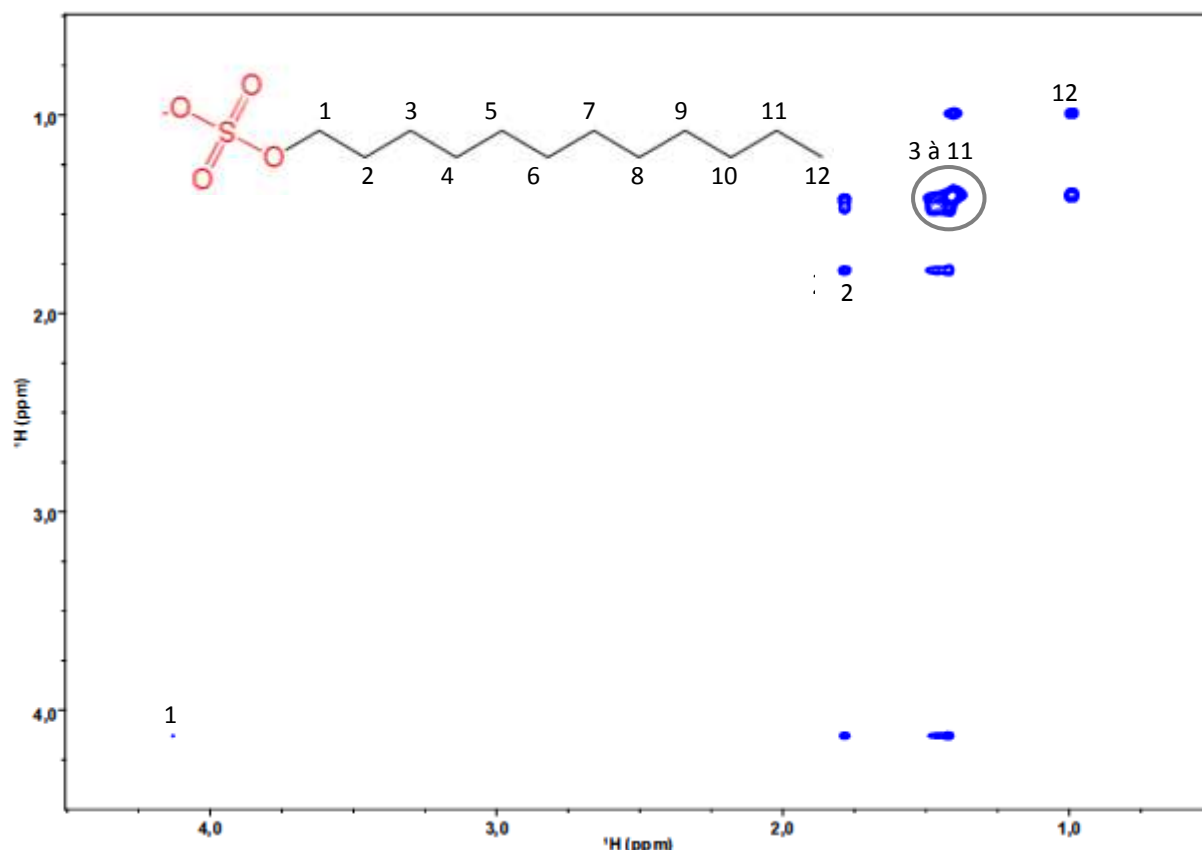


Figure 80 - Spectre TOCSY des molécules de SDS, enregistré dans l'eau. L'échantillon est composé de SDS à 100mM dans l'eau. Le spectre a été enregistré dans les mêmes conditions que ceux du peptide : à 35°C, sur un spectromètre Varian 600 MHz. L'attribution est donnée sur la diagonale du spectre.

C.3.4 Effet du peptide sur une membrane de phospholipides

Nous avons vu que différents milieux membranaires (micelles et bicelles) peuvent légèrement influencer le repliement du fragment d'adressage mitochondrial. Nous savons également que ce peptide est capable d'interagir avec les lipides, en se plaçant à l'interface des milieux membranaires.

Des analyses de RMN du solide et PWR vont maintenant nous permettre d'explorer l'effet du peptide sur le milieu membranaire, à travers l'étude de la dynamique et l'organisation des phospholipides. L'utilisation de membranes de compositions diverses permettra également d'observer l'influence de la cardiolipine sur l'interaction peptide/lipide.

C.3.4.1 La dynamique des lipides étudiée par RMN du solide.

L'étude de la dynamique des lipides par RMN solide passe principalement par l'observation de deux noyaux. Le Phosphore que l'on retrouve au niveau de la tête de tous les phospholipides, sous forme de groupement phosphate, et le Deutérium que l'on substitue aux atomes d'hydrogène situés le long des chaînes carbonées. Ces deux noyaux vont apporter des informations sur la dynamique des atomes situés à l'intérieur (^2H) ou à la surface (^{31}P) de la membrane de phospholipides.

Dans notre étude, nous avons utilisé quatre lipides correspondant aux composants majoritaires des sites de jonction des membranes mitochondriales : la phosphatidylcholine (POPC), la phosphoéthanolamine (POPE), la cardiolipine (CL) et le cholestérol (Chol). Trois mélanges formant des MLVs ont été utilisés pour observer l'effet de la cardiolipine et du cholestérol : POPC/POPE, POPC/POPE/CL et POPE/POPC/CL/Chol.

Tous ces lipides, à l'exception du cholestérol, possèdent au moins un groupement phosphate (deux pour la cardiolipine). Le deutérium ayant une faible abondance naturelle : il est introduit dans les chaînes carbonées en substituant certains atomes d'hydrogène. Pour pouvoir comparer les spectres ^2H nous n'avons utilisé qu'un seul lipide deutéré, le POPC, qui est présent dans toutes les compositions. Les deux chaînes carbonées de ce phospholipide ne sont pas équivalentes. Donc pour simplifier le spectre ^2H , nous avons utilisé du POPC deutéré sur une seule de ses chaînes (POPC-d31).

Nous avons réalisé le même type d'acquisition pour les expériences ^{31}P et ^2H , avec une variation de la température sur les 3 types de MLVs, en présence ou non du peptide. Cependant, pour les spectres ^{31}P , seules les expériences réalisées sur les vésicules les plus complexes (POPC/POPE/CL/Chol) ont pu être analysées avec précision.

C.3.4.1.1 Effet de la montée en température.

C.3.4.1.1.1 Augmentation de la fluidité du système.

Au sein des membranes, les lipides sont organisés sous forme de bicouches, cette organisation est également appelée « phase lamellaire ». Nous pouvons distinguer deux types de phase lamellaire en fonction de la dynamique des lipides : une phase dite « gel » où les lipides sont peu mobiles, et une phase dite « fluide » où les lipides sont plus dynamiques.

En RMN solide, la transition entre une phase gel et une phase fluide peut être observée en augmentant la température de l'échantillon. En effet lorsque la mobilité des atomes augmente, le signal est moyenné : l'anisotropie de déplacement chimique est alors plus faible et la largeur totale du signal diminue (Figure 81).

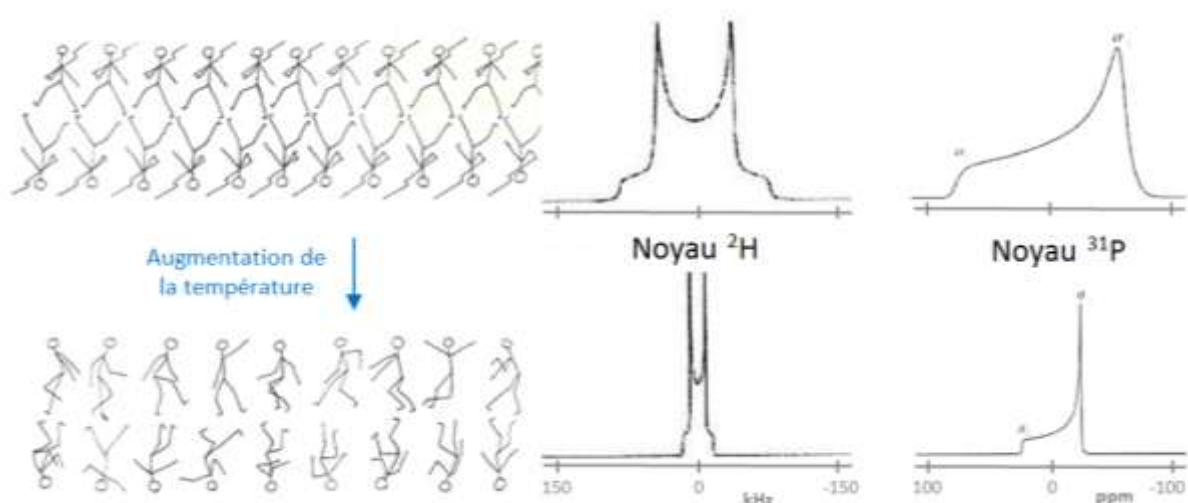


Figure 81 - Transition d'une phase gel à une phase fluide et conséquences sur les spectres RMN.

Représentation schématique d'une bicouche de lipides (gauche). Spectres RMN d'un noyau ^2H (centre) et ^{31}P (droite) tirés de Dufourc, 1986.

La montée en température provoque bien un affinement progressif du spectre RMN pour tous nos échantillons (Figure 82). Cependant dès 15°C notre système présente un spectre correspondant à une phase fluide, avec des éclatements quadripolaires distincts pour les spectres ^2H : la température de transition entre la phase gel et la phase fluide se situe donc en dessous de 15°C.

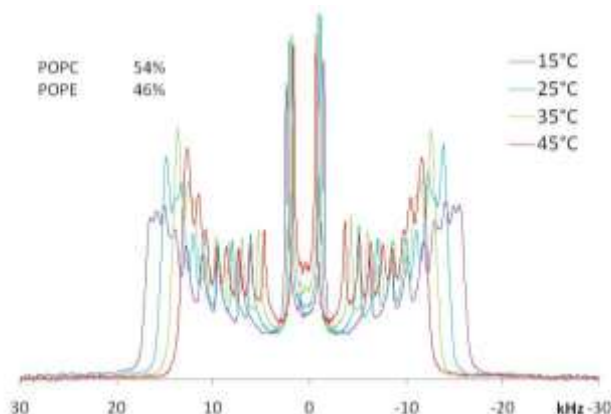


Figure 82 – Superposition des spectres RMN ^2H enregistrés à différentes températures. Spectres RMN ^2H de POPC-d31 (40,3mM), dans une MLV composée de POPC/POPE. Le spectre est enregistré à différentes températures sur un spectromètre RMN 800 MHz.

La même observation est faite pour les trois compositions de membranes, en présence ou non de peptide. Par la suite, ne seront donc présentés que les spectres enregistrés à 35°C, correspondant à la température la plus proche de la température physiologique.

C.3.4.1.1.2 Mobilité le long de la chaîne carbonée.

Lorsque le système membranaire est en phase fluide, les atomes de deutérium introduits à différentes positions sur la chaîne carbonée donneront des signaux RMN que l'on peut distinguer (Figure 83). Le doublet au centre du spectre RMN correspond au groupement CD_3 le plus mobile, situé au bout de la chaîne carbonée. Ensuite, plus on s'éloigne du centre du spectre plus on remonte le long de la chaîne des lipides. Enfin, les atomes de deutérium situés près de la tête sont beaucoup moins mobiles : leurs signaux se confondent et forment un plateau à chaque extrémité du spectre RMN (Douliez, 2004; Grélard et al., 2010).

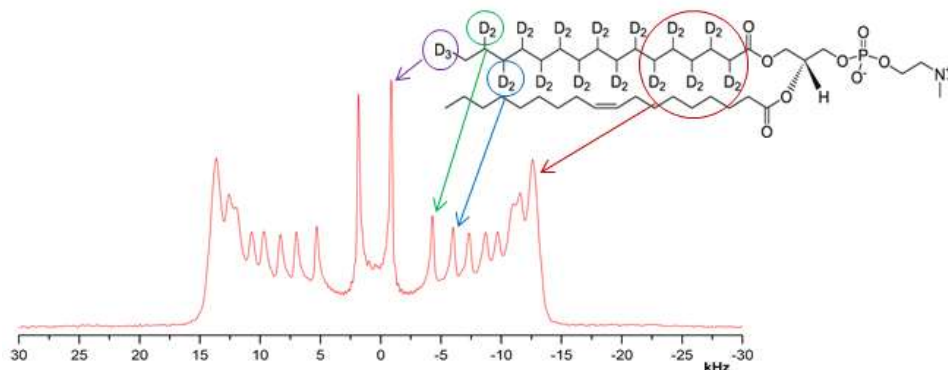


Figure 83 - Attribution des signaux des atomes de Deutérium d'un phospholipide deutéré sur une de ses chaînes. Spectre RMN ^2H de POPC-d31 (40,3 mM), dans une MLV composée de POPC/POPE. Le spectre est enregistré dans l'eau à 35°C, sur un spectromètre RMN 800 MHz.

La mesure des éclatements quadripolaires permet d'accéder au paramètre d'ordre (S_{CD}). Ce paramètre, qui traduit la notion de mobilité, est calculé suivant l'équation ci-dessous. Sa valeur varie de 0 à 1, correspondant respectivement à un atome très dynamique et un atome très peu mobile.

$$S_{CD} = \frac{\Delta \nu_Q^{90^\circ}}{A_Q} \times \frac{4}{3}$$

$\Delta \nu_Q^{90^\circ}$ (Hz) est l'éclatement quadripolaire mesuré sur le spectre. A_Q est la constante de couplage quadripolaire statique, égale à 167 kHz dans le cas d'une liaison C-²H (Burnett et al., 1971).

Dans le cas des lipides, les groupements d'atomes situés sur la chaîne carbonée n'ont pas tous la même mobilité : plus on s'éloigne de la tête des lipides, plus la liberté de mouvement des atomes est importante (Paddy et al., 1985). Dans le cas d'une organisation en phase lamellaire, cette différence de mobilité est un peu plus marquée : les atomes situés sur la première partie du lipide ont globalement la même mobilité, tandis que les atomes en bout de chaîne sont beaucoup plus mobiles. Le profil d'ordre obtenu pour le mélange POPC/POPE est donc caractéristique de ce type d'organisation (Figure 84). La reconstruction du spectre par simulation montre que la largeur de raie suit la même distribution : plus un atome est mobile plus la largeur de raie diminue.

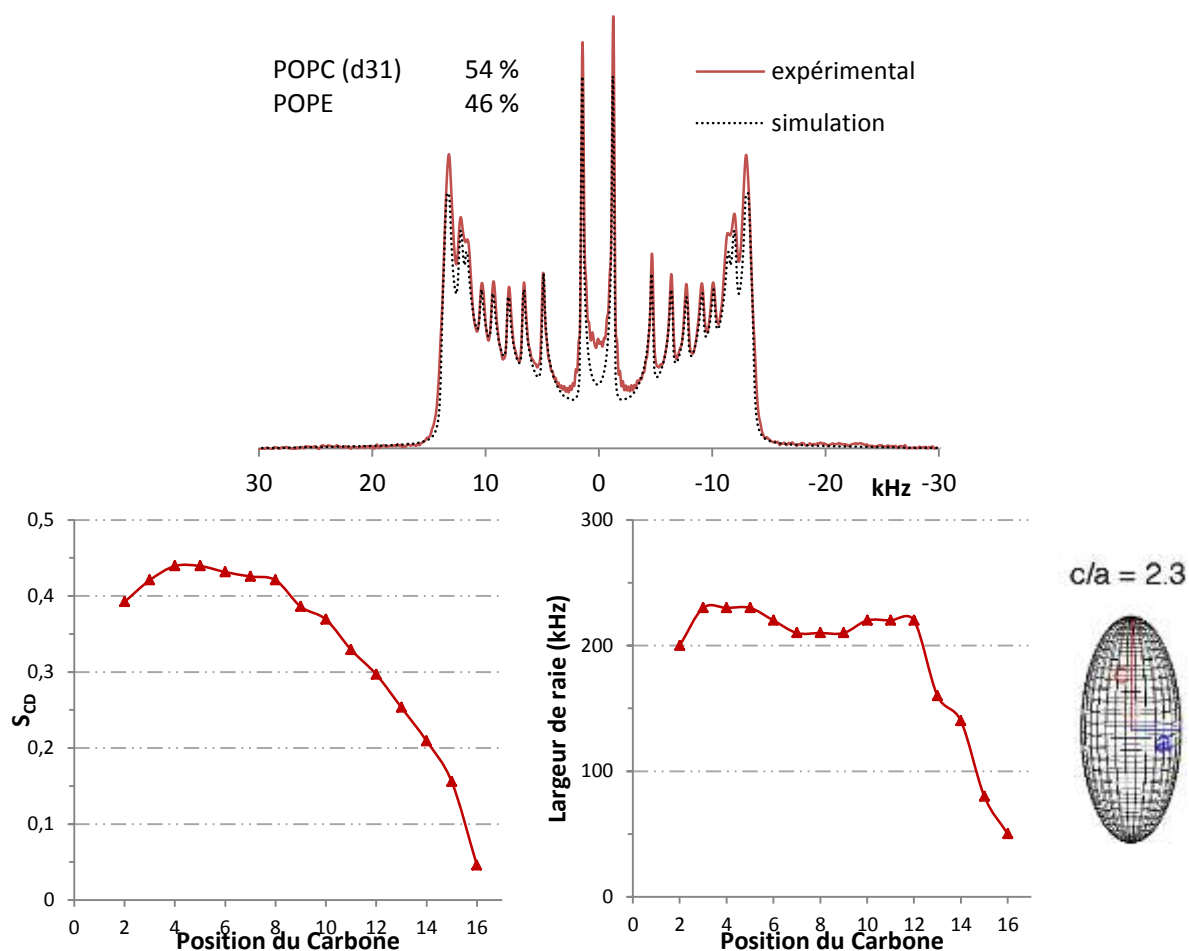


Figure 84 - Spectre RMN ²H du mélange POPC/POPE à 35°C. En haut, superposition des spectres expérimental et simulé. En bas, les paramètres utilisés pour la simulation : profil d'ordre calculé à partir de l'éclatement quadripolaire (gauche), largeur des raies (milieu) et déformation des vésicules (droite).

La simulation permet également d'évaluer le rapport c/a , correspondant à la déformation des vésicules. Dans le cas du mélange de POPC/POPE, ce rapport indique une déformation des vésicules sous forme de prolata, qui se traduit notamment par la haute résolution du signal (voir p66).

Cependant, un spectre RMN enregistré avec un spectromètre à champ plus faible (500 MHz) ne présente pas ce profil de spectre « orienté », ce qui indique que la déformation et l'orientation des vésicules est due à la puissance du champ magnétique utilisé.

C.3.4.1.2 Influence du peptide sur le mélange POPC/POPE.

Pour connaître l'influence du peptide sur la dynamique des lipides, nous allons comparer les spectres RMN enregistrés sur les lipides seuls et en présence de peptide (ratio peptide/lipide de 1/100). Pour le mélange POPC/POPE, la présence du fragment [31-53] entraîne une augmentation de l'intensité des raies, sans modification significative de l'éclatement quadripolaire (Figure 85). Cette modification correspond à une déformation et une orientation des vésicules dans le champ magnétique, sous forme de prolata (Loudet et al., 2010).

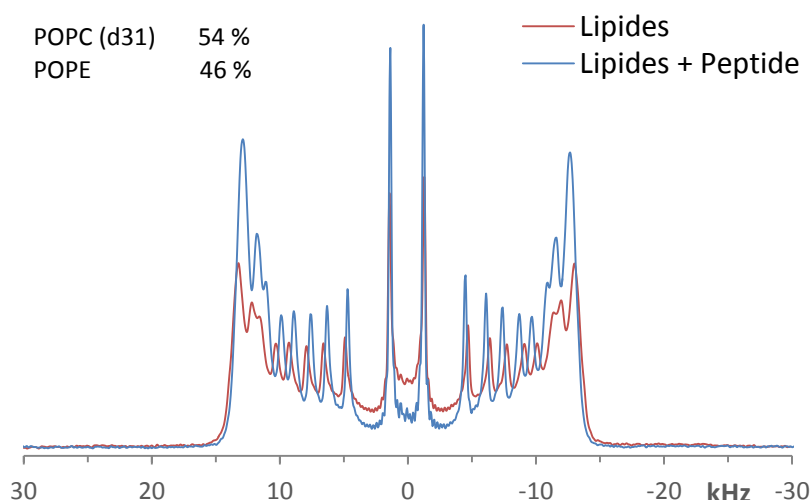


Figure 85 - Superposition des spectres RMN ^2H du mélange POPC/POPE à 35°C avec et sans peptide. Spectres RMN ^2H de POPC-d31 (40,3 mM), dans une MLV composée de POPC/POPE, en présence ou non du fragment [31-53] avec un ratio peptide/lipide égal à 1/100. Les spectres sont enregistrés dans l'eau à 35°C, sur un spectromètre RMN 800 MHz.

Le profil d'ordre en présence du peptide est similaire à celui du mélange de lipides seuls (Figure 86). La largeur de raie suit également le même profil, indiquant qu'il n'y a pas de modification dans l'organisation des lipides. Cependant, la simulation indique une forte augmentation du rapport c/a , confirmant une déformation plus importante des vésicules en présence du peptide.

Etant donnée l'absence de modification dans l'organisation et la dynamique des lipides, cette déformation est la conséquence d'une courbure plus importante de la membrane. Cette courbure entraînant une déformation en prolate, on parle de courbure positive.

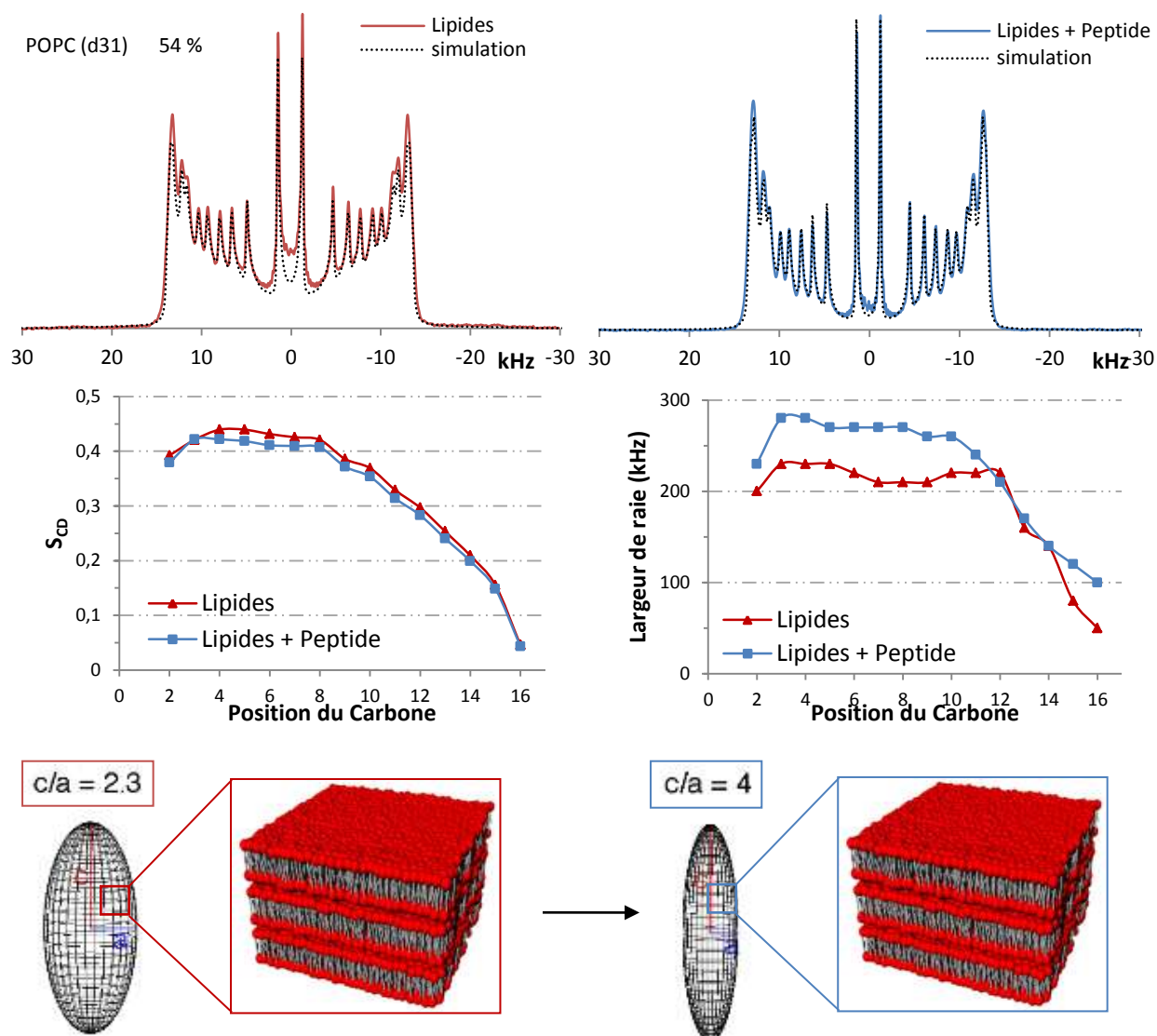


Figure 86 – Simulations des spectres RMN ^2H du mélange POPC/POPE à 35°C, en présence ou non du peptide. En haut, les spectres expérimentaux et simulés du mélange de lipides seuls (gauche) et en présence de peptide (droite) avec un ratio peptide/lipide de 1/100. Au centre, les paramètres utilisés pour les simulations : profil d'ordre calculé à partir de l'éclatement quadripolaire (gauche) et largeur des raies (droite). En bas, vision schématique de la déformation des vésicules.

C.3.4.1.3 Effet de la cardiolipine.

C.3.4.1.3.1 Un changement d'organisation.

Le spectre deutérium du mélange POPC/POPE/CL est différent de celui enregistré sur le mélange POPC/POPE (Figure 87). Sur le mélange contenant la cardiolipine, l'intensité et la résolution des signaux sont importantes uniquement au centre du spectre, correspondant aux atomes en bout de chaîne carbonée.

Les groupements proches de la tête des phospholipides sont donc très peu mobiles par rapport au bout des chaînes carbonées : ce type de profil est caractéristique d'une organisation des lipides en phase hexagonale inverse (Chupin et al., 1987).

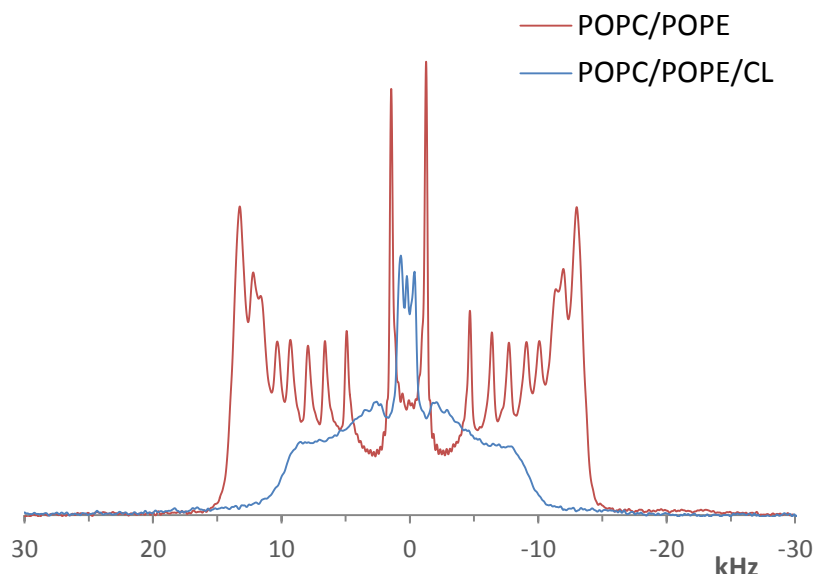


Figure 87 – Superposition des spectres RMN ^2H des mélanges de lipides seuls : POPC/POPE et POPC/POPE/CL. Spectres RMN ^2H de POPC-d31 dans une MLV composée de POPC/POPE (40,3mM) ou de POPC/POPE/CL (27,7mM). Les spectres sont enregistrés dans l'eau à 35°C, sur un spectromètre RMN 800 MHz.

En effet, dans ce type de phase les têtes des phospholipides sont regroupées au centre du système, et les queues hydrophobes à la périphérie (Figure 88) ce qui augmente la dynamique des groupements situés au bout des chaînes carbonées (Douliez, 2004).

De plus, la structure de la cardiolipine prédispose bien ce phospholipide à une organisation en phase inverse, à cause d'un encombrement de la tête très faible par rapport à l'espace occupé par les quatre queues hydrophobes (Powell et al., 1985).

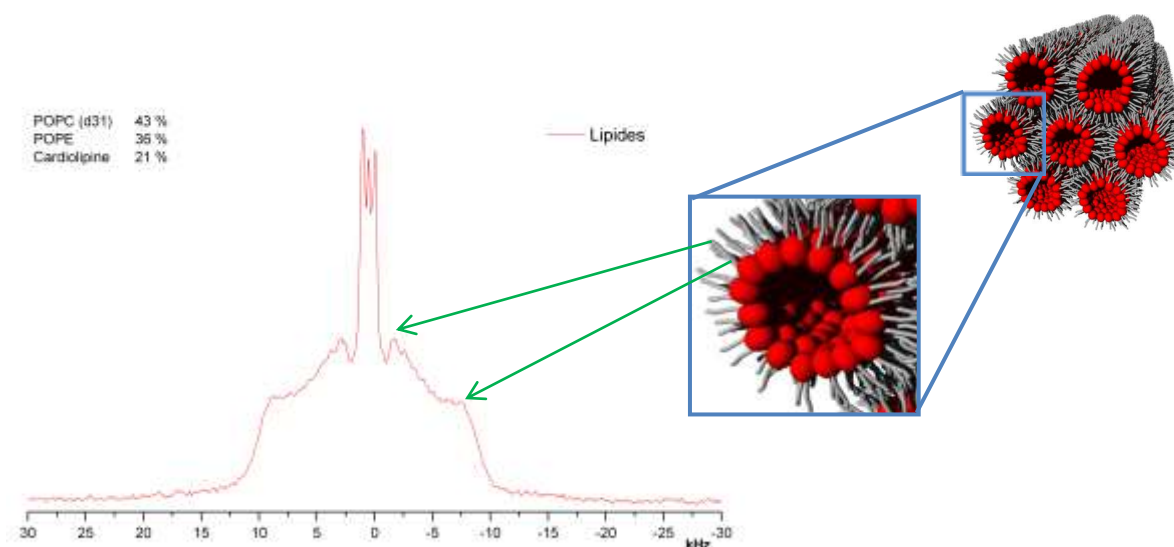


Figure 88 - Spectres RMN ^2H du mélange POPC/POPE/CL à 35°C. Spectre RMN ^2H de POPC-d31 (27,7 mM) enregistré dans l'eau à 35°C, sur un spectromètre RMN 800 MHz (gauche). Représentation schématique d'une organisation en phase hexagonale inverse (droite).

La présence de 20% de cardiolipine suffit donc à provoquer l'organisation du mélange POPC/POPE/CL en phase hexagonale inverse. Il est utile de rappeler que les pourcentages choisis permettent de se rapprocher de la composition des sites de fusion des membranes mitochondriales interne et externe (Table 7, p86).

Or les phénomènes de fusion de membranes peuvent passer par la formation de structures inversées et la présence de cardiolipine à ces endroits particuliers facilite la courbure des membranes (Figure 89). Notre modèle de membranes synthétiques reflète donc bien la dynamique des phospholipides au niveau des sites de fusion mitochondriaux.

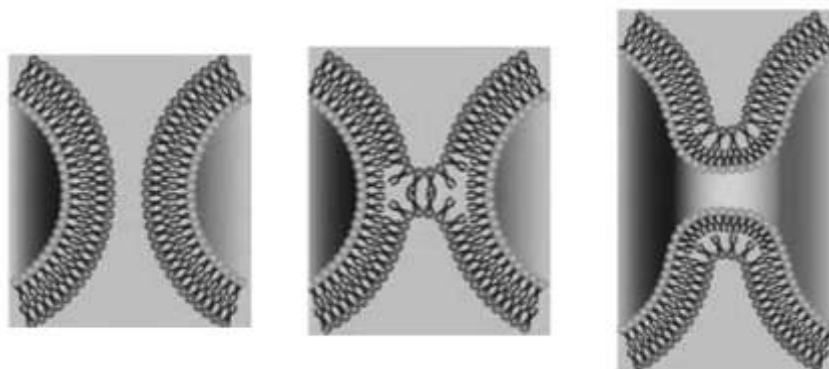


Figure 89 - Etapes simplifiées de la fusion membranaire (tiré de Mondal Roy et al., 2011). Contact entre les membranes (gauche), fusion des lipides du feuillet externe ou « hemifusion state » (milieu) et formation du pore de fusion (droite).

C.3.4.1.3.2 Influence du peptide sur le mélange POPC/POPE/CL.

En présence du peptide, avec un ratio Peptide/Lipide de 1/100, le spectre RMN enregistré correspond de nouveau à une organisation en phase lamellaire (Figure 90). Les paramètres d'ordre le long de la chaîne carbonée sont plus importants en présence du peptide, ce qui peut s'expliquer par l'organisation différente des lipides. En effet, en phase hexagonale inverse les chaînes carbonées sont moins ordonnées car elles ont globalement une plus grande liberté de mouvements par rapport aux têtes des lipides.

La largeur de raie est également très différente en présence ou non du peptide, notamment pour les atomes situés près de la tête du lipide. La largeur de raie très importante pour ces atomes dans le mélange de lipides seuls est trois fois moins importante en présence du peptide : les têtes des lipides, bloquées en phase hexagonale inverse, retrouveraient une certaine dynamique en phase lamellaire.

La présence du fragment [31-53] aurait donc pour effet d'empêcher la formation de phase hexagonale inverse, malgré la présence de cardiolipine au sein de la membrane. Les modifications les plus importantes se situent à proximité de la tête des lipides et nous savons maintenant que le peptide a tendance à rester au niveau de cette interface. La formation de la phase hexagonale inverse serait donc gênée physiquement par la présence du peptide.

De plus, si on observe la surface de la membrane lorsqu'elle est organisée en phase hexagonale inverse et en phase lamellaire, le passage de la première à la seconde organisation correspond également à une courbure positive de la membrane, déjà observée avec le mélange POPC/POPE.

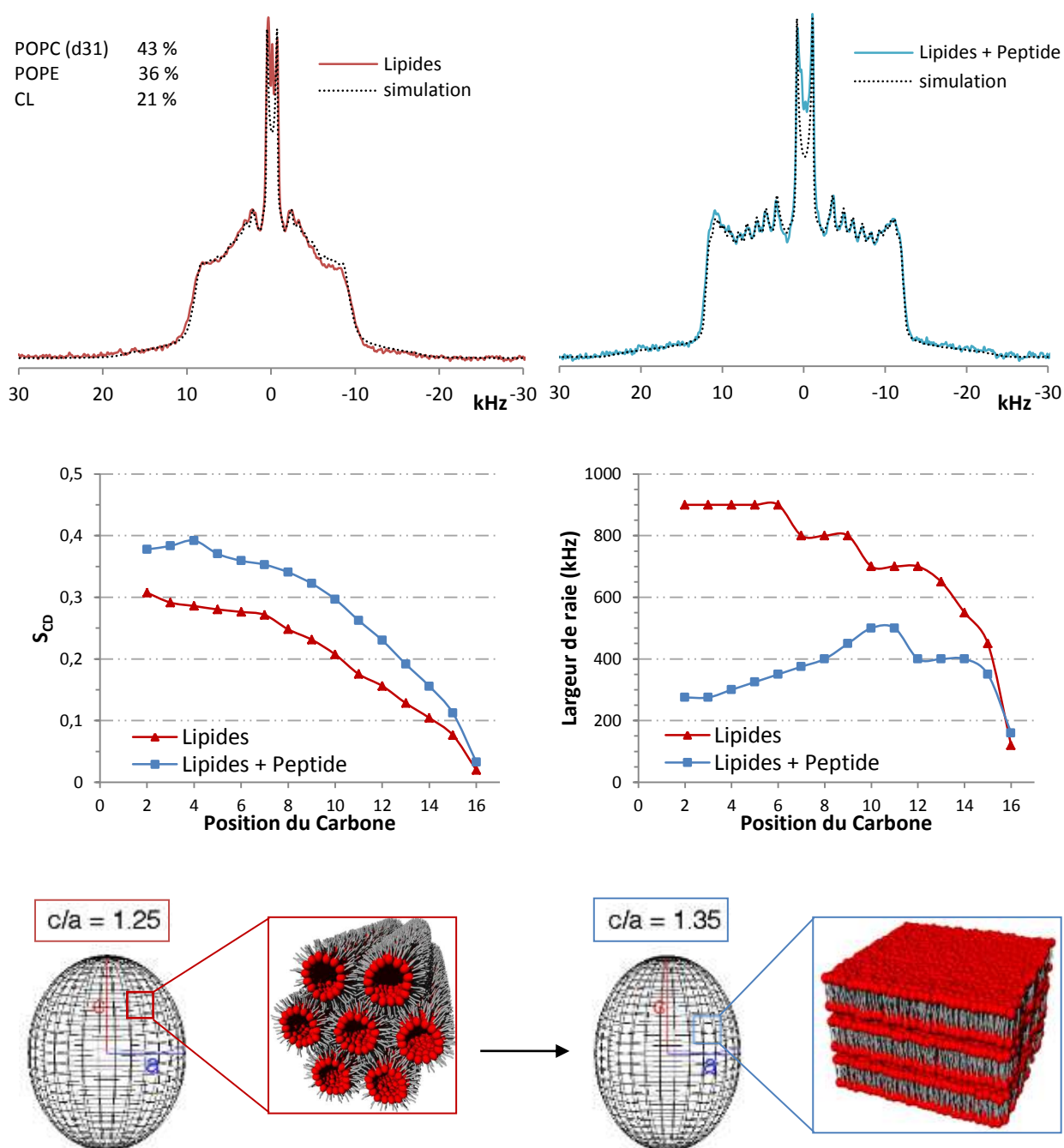


Figure 90 - Spectres RMN ^2H du mélange POPC/POPE/CL à 35°C en présence ou non du peptide.

En haut, les spectres expérimentaux et simulés du mélange de lipides seuls (gauche) et en présence de peptide (droite) avec un ratio peptide/lipide de 1/100. Au centre, les paramètres utilisés pour les simulations : profil d'ordre calculé à partir de l'éclatement quadripolaire (gauche) et largeur des raies (droite).

En bas, vision schématique de la déformation des vésicules.

C.3.4.1.4 Etude du mélange le plus complexe.

La présence de cholestérol provoque une organisation en phase lamellaire fluide, malgré la présence de cardiolipine (Figure 91). Cependant, le spectre RMN en présence de cholestérol est différent de celui obtenu avec le mélange POPC/POPE : la résolution et l'intensité des raies sont beaucoup moins importantes avec le mélange le plus complexe.

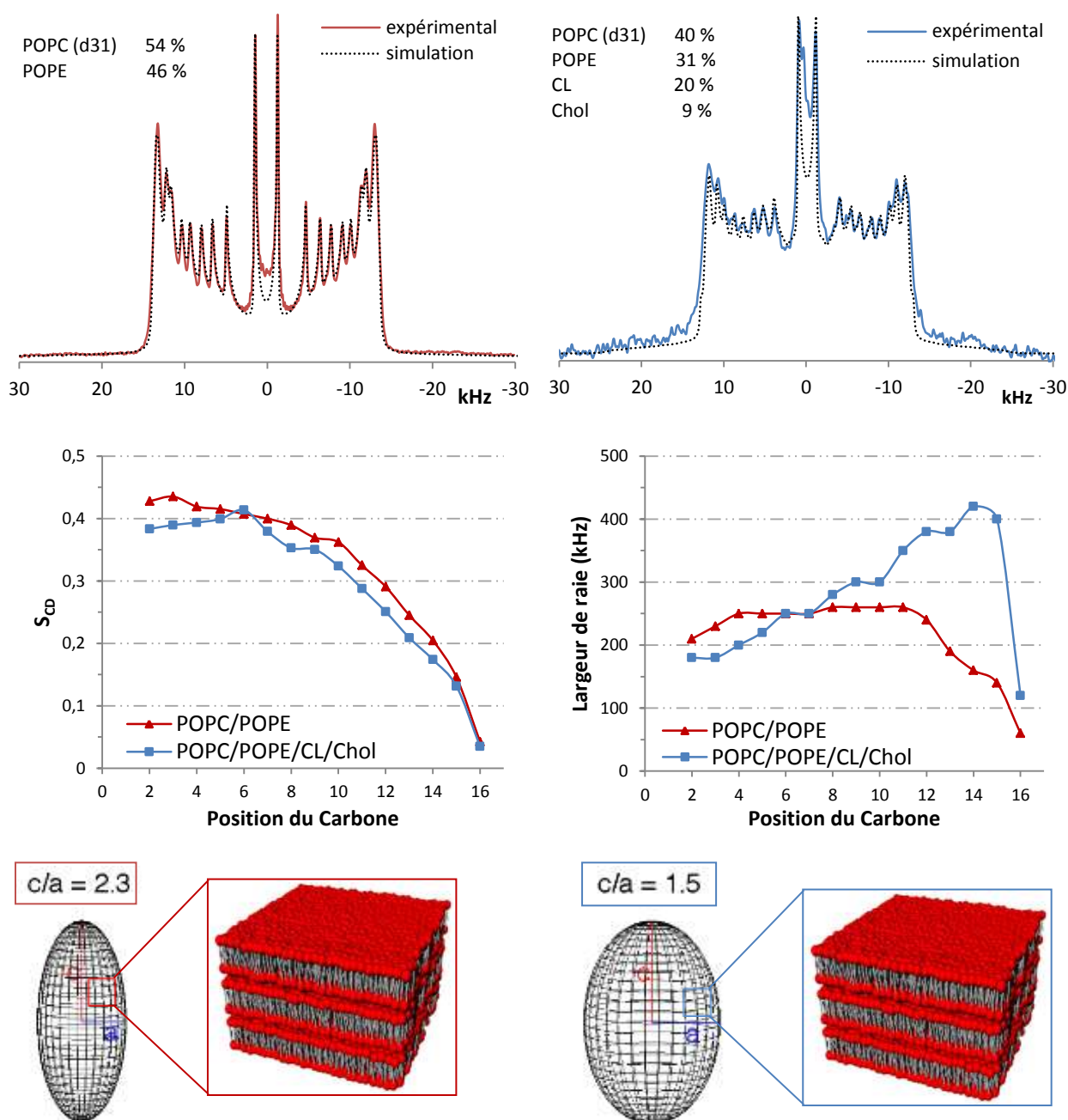


Figure 91 - Comparaison des mélanges de lipides seuls : POPC/POPE et POPC/POPE/CL/Chol. Etude des mélanges POPC/POPE (gauche) et POPC/POPE/CL/Chol (droite) : spectres expérimentaux (haut), déformation des vésicules et organisation des lipides (milieu). Au centre, les paramètres utilisés pour les simulations : profil d'ordre calculé à partir de l'éclatement quadripolaire (gauche) et largeur des raies (droite). En bas, vision schématique de la déformation des vésicules.

Malgré un profil d'ordre similaire, les simulations montrent une largeur de raie plus élevée sur la fin de la chaîne carbonée, en présence de cholestérol : la dynamique de cette région des lipides est donc moins importante.

Ces modifications correspondent tout à fait à un effet du cholestérol, qui est de rigidifier les membranes en ordonnant les chaînes carbonées des lipides (Ohvo-Rekilä et al., 2002; Silviu, 2003). Le rassemblement des chaînes peut également contrebalancer la formation de la phase hexagonale inverse, permettant ainsi le maintien d'une organisation en phase lamellaire, malgré les 20 % de cardiolipine.

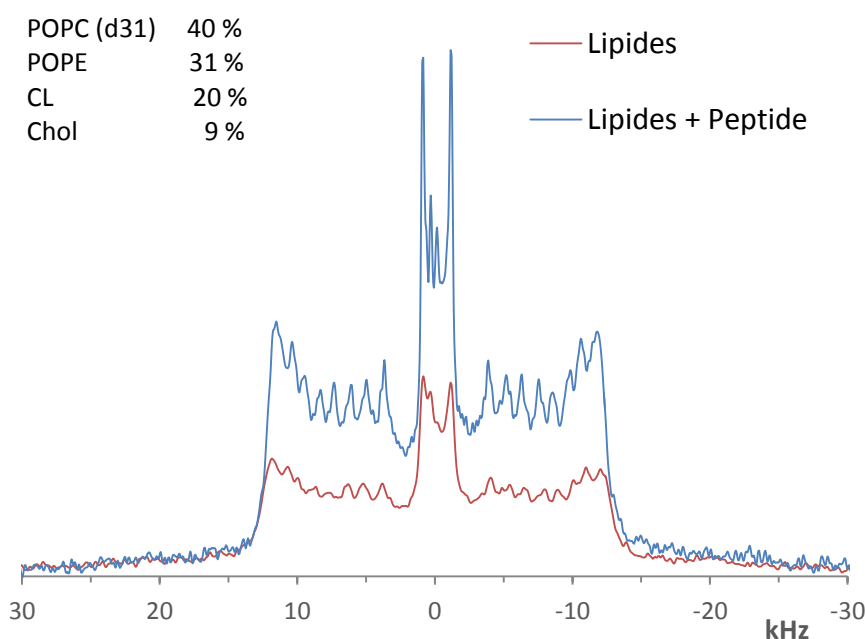


Figure 92 - Superposition des spectres RMN ^2H du mélange POPC/POPE/CL/Chol à 35°C avec et sans peptide. Spectres RMN ^2H de POPC-d31 (25,5mM) dans une MLV composée de POPC/POPE/CL/Chol, en présence ou non du fragment [31-53] avec un ratio peptide/lipide égal à 1/100. Les spectres sont enregistrés dans l'eau à 35°C, sur un spectromètre RMN 800 MHz.

Comme pour le mélange POPC/POPE, la présence du peptide (ratio Peptide/Lipide de 1/100) entraîne une augmentation de la résolution du spectre RMN sans augmentation de la largeur du signal (Figure 92). Le profil d'ordre et la largeur de raies restent similaires, tandis que le rapport c/a augmente légèrement (Figure 93). Les vésicules sont donc à nouveau un peu plus déformées en prolates : la présence du fragment [31-53] entraînerait là aussi une courbure positive de la membrane.

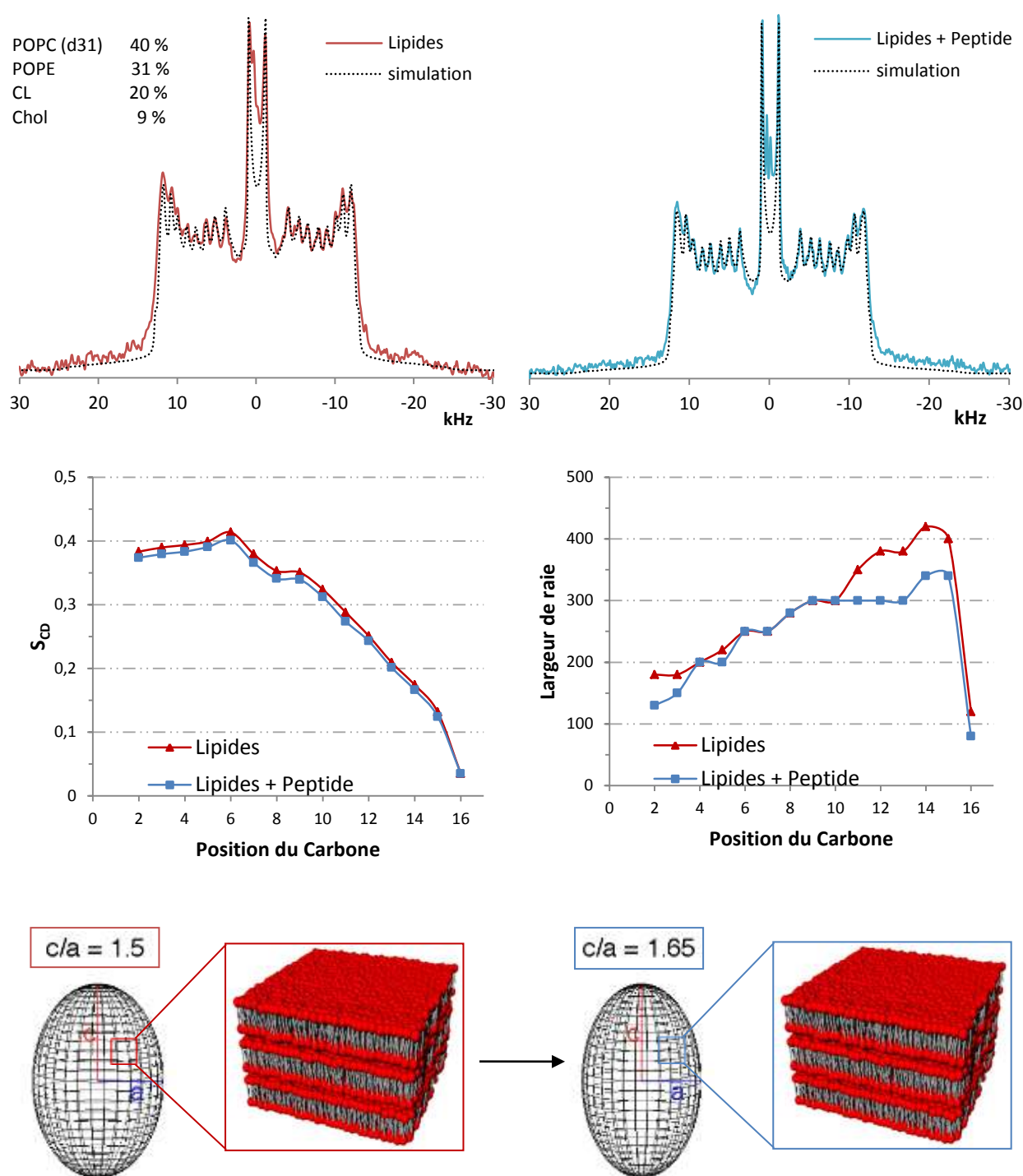


Figure 93 - Spectres RMN ^2H du mélange POPC/POPE/CL/Chol à 35°C en présence ou non du peptide.

En haut, les spectres expérimentaux et simulés du mélange de lipides seuls (gauche) et en présence de peptide (droite) avec un ratio peptide/lipide de 1/100. Au centre, les paramètres utilisés pour les simulations : profil d'ordre calculé à partir de l'éclatement quadripolaire (gauche) et largeur des raies (droite).

En bas, vision schématique de la déformation des vésicules.

C.3.4.1.5 RMN ^{31}P : mobilité au niveau de la tête des lipides.

L'étude des noyaux ^{31}P apporte cette fois-ci des informations sur la dynamique au niveau des têtes des lipides. Le spectre enregistré sur le mélange POPC/POPE/CL/Chol reflète une organisation des lipides en phase lamellaire : il est composé de la superposition de trois signaux, correspondants aux atomes de phosphore du POPC, du POPE et de la cardiolipine (Figure 94). Si les composantes perpendiculaires du tenseur (à droite) sont bien visibles et distinctes pour les trois lipides, leurs composantes parallèles (à gauche) n'ont pas une résolution suffisante pour être distinguées.

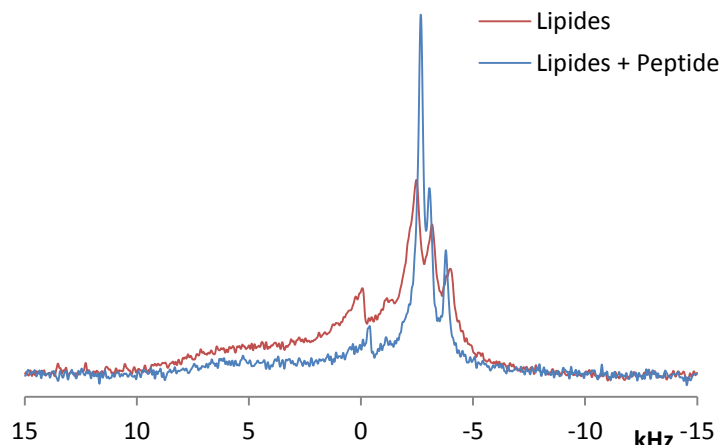


Figure 94 - Superposition des spectres RMN ^{31}P du mélange POPC/POPE/CL/Chol à 35°C avec et sans peptide

Les spectres RMN ^{31}P sont enregistrés dans l'eau à 35°C, sur un spectromètre RMN 800 MHz, sur une MLV composée de POPC/POPE/CL/Chol, en présence ou non du fragment [31-53] avec un ratio peptide/lipide égal à 1/100. Chaque spectre correspond à la superposition des signaux des groupements Phosphore contenus dans le POPC (50,9mM), le POPE (39,5mM) et la cardiolipine (25,7mM).

La présence du peptide provoque une modification de l'intensité des raies pour les trois lipides : la composante perpendiculaire du tenseur est plus fine et plus intense, au détriment de la composante parallèle qui diminue. Ce type de modifications correspond à une déformation et une orientation des vésicules dans le champ magnétique sous forme de prolates. Cette observation concorde avec les résultats obtenus en RMN ^2H sur la dynamique des chaînes carbonées.

C.3.4.1.6 Spécificité du peptide pour un lipide particulier ?

Les expériences de RMN statique ^2H et ^{31}P ont montré que le fragment [31-53] interagit avec les phospholipides, provoquant une courbure positive de la membrane. Cependant, nous ne savons pas si ce peptide interagit plus spécifiquement avec un des lipides.

En exerçant une rotation des échantillons pendant l'acquisition, le signal RMN est moyenné. En comparant le spectre ^{31}P en présence et en absence du peptide, nous pouvons savoir si le fragment [31-53] interagit avec un phospholipide en particulier (Marius et al., 2012). Nous avons donc réalisé ces expériences sur les mélanges POPC/POPE et POPC/POPE/CL/Chol. Nous n'avons pas utilisé le mélange intermédiaire POPC/POPE/CL, contenant de la cardiolipine naturelle, car son spectre ^{31}P était trop complexe pour être analysé.

C.3.4.1.6.1 Etude du mélange de lipides seuls.

L'intensité des raies étant proportionnelle à la quantité de noyau Phosphore dans l'échantillon, nous pouvons attribuer les pics aux différents phospholipides (Figure 95).

- pour le mélange POPC/POPE (courbe bleue) : POPC étant majoritaire, il correspond au pic le plus intense, et POPE au pic le moins intense.
- pour le mélange POPC/POPE/CL/Chol (courbe rouge), l'attribution est plus délicate. En effet, la cardiolipine possède deux noyaux Phosphore, contre un seul pour le POPC et le POPE. Pour une proportion de lipides POPC/POPE/CL de 4/3/2 : nous avons donc une proportion en noyaux Phosphore de 4/3/4. Il y a donc autant de noyaux Phosphore pour le POPC et la cardiolipine : le pic le moins intense correspond au POPE, mais les pics les plus intenses peuvent correspondre indifféremment à la cardiolipine et au POPC.

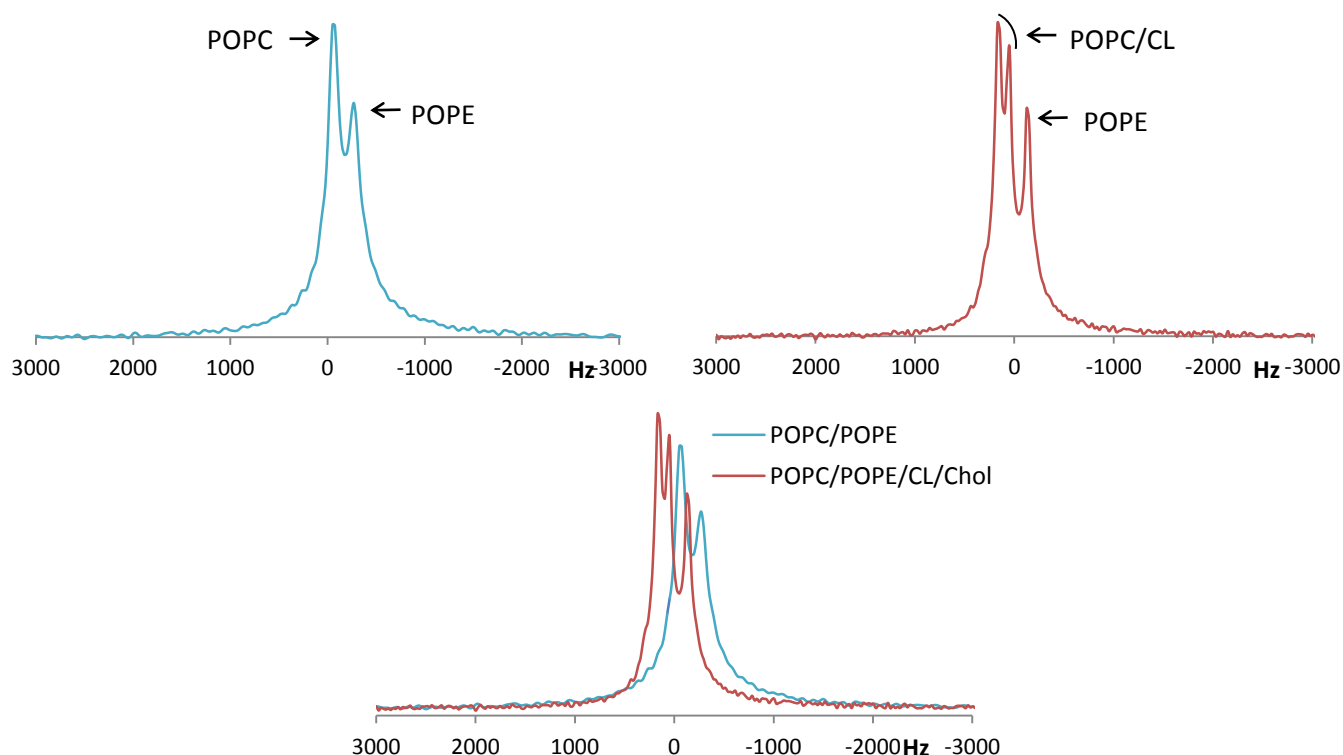


Figure 95 - Spectre ^{31}P en rotation sur les mélanges de lipides seuls. En haut, spectres du mélange POPC/POPE (gauche) et POPC/POPE/CL/Chol (droite). En bas, superposition des deux spectres. Les spectres RMN ^{31}P (écho de Hahn avec une rotation de 8kHz) sont enregistrés dans l'eau à 35°C, sur un spectromètre RMN 800 MHz, sur une MLV composée de POPC/POPE ou de POPC/POPE/CL/Chol. Chaque spectre correspond à la superposition des signaux ^{31}P contenus dans le POPC (79,7 mM et 50,9 mM dans les mélanges respectifs), le POPE (68,6 mM et 39,5 mM dans les mélanges respectifs) et la Cardiolipine (25,7 mM).

La superposition des spectres avec et sans cardiolipine pourrait permettre d'attribuer son signal, comme ce fut le cas dans l'étude de l'interaction du cytochrome c avec un mélange DOPC/DOPE/CL (Pinheiro et al., 1994). Mais dans notre système, la superposition des spectres des deux mélanges montre que la présence de cardiolipine et de cholestérol provoque un déplacement des raies du POPC et du POPE. Il n'est donc pas possible de se baser sur le spectre POPC/POPE, afin de déterminer par élimination la raie correspondant à la cardiolipine sur le spectre POPC/POPE/CL/Chol. Pour faire cette attribution, il sera nécessaire de reproduire l'expérience avec des rapports de lipides légèrement différents.

C.3.4.1.6.2 Influence du peptide.

Pour le mélange POPC/POPE, les spectres avec et sans peptide sont quasiment superposables (Figure 96). La petite variation d'intensité et le spectre un petit peu plus fin en présence du peptide peut correspondre à une légère augmentation de la dynamique du système, déjà observée en RMN statique.

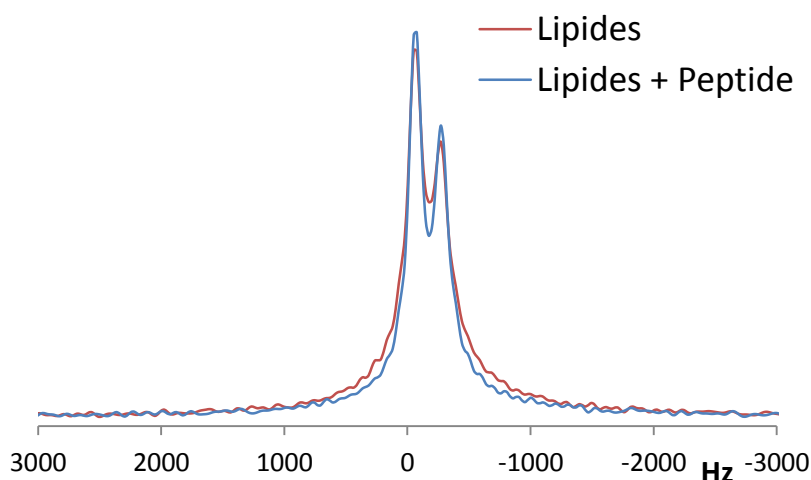


Figure 96 - Superposition des spectres RMN ^{31}P en rotation du mélange POPC/POPE avec et sans peptide.

Les spectres RMN ^{31}P (écho de Hahn avec une rotation de 8kHz) sont enregistrés dans l'eau à 35°C, sur un spectromètre RMN 800 MHz, sur une MLV composée de POPC/POPE, en présence ou non du fragment [31-53] avec un ratio peptide/lipide égal à 1/100. Chaque spectre correspond à la superposition des signaux ^{31}P contenus dans le POPC (79,7 mM) et le POPE (68,6 mM).

Pour le mélange POPC/POPE/CL/Chol, la présence du peptide modifie l'intensité et la position des raies de tous les phospholipides (Figure 97). Dans ce cas, il y a bien une interaction du peptide au niveau des têtes mais les trois phospholipides sont touchés : il n'y a donc pas d'effet spécifique du fragment [31-53] avec un lipide en particulier.

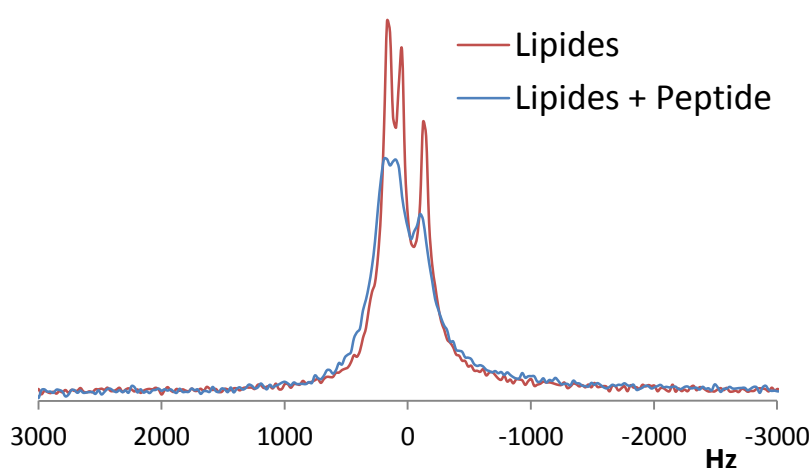


Figure 97 - Superposition des spectres RMN ^{31}P en rotation du mélange POPC/POPE/CL/Chol avec et sans peptide. Les spectres RMN ^{31}P (écho de Hahn avec une rotation de 8kHz) sont enregistrés dans l'eau à 35°C, sur un spectromètre RMN 800 MHz, sur une MLV composée de POPC/POPE/CL/Chol, en présence ou non du fragment [31-53] avec un ratio peptide/lipide égal à 1/100. Chaque spectre correspond à la superposition des signaux ^{31}P contenus dans le POPC (50,9 mM), le POPE (39,5 mM) et la cardiolipine (25,7 mM).

C.3.4.1.7 Dynamique de la membrane en présence du peptide.

Les résultats des expériences de RMN solide ont clairement montré un effet du fragment [31-53] sur l'organisation et la dynamique des phospholipides. Les expériences RMN statique ^{31}P et ^2H ont permis d'étudier la dynamique à la surface et à l'intérieur de la bicouche de phospholipides.

Dans le cas du mélange POPC/POPE/CL, l'insertion du peptide entraîne un encombrement stérique plus important au niveau des têtes des lipides, empêchant la formation de phase hexagonale inverse, que l'on peut observer en absence de fragment [31-53]. Lorsque le mélange de lipides est organisé en phase lamellaire (mélanges POPC/POPE et POPC/POPE/CL/Chol), la présence du peptide accentue la déformation et l'orientation des vésicules sous forme de prolate.

La déformation des vésicules est due à deux paramètres : une mobilité légèrement plus importante des lipides, qui rend la membrane un peu plus élastique et déformable, et une courbure mécanique de la membrane. Cette courbure peut s'expliquer par la localisation du peptide à l'interface de la membrane. En effet, pour s'insérer dans la bicouche, le fragment [31-53] doit pousser les têtes des lipides (Figure 98). La membrane étant élastique, elle peut se courber pour permettre cette insertion : l'écartement des têtes provoque donc une courbure positive de la membrane.

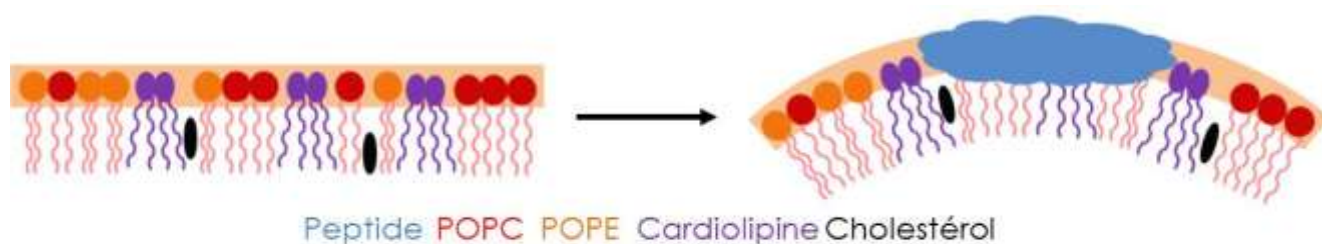


Figure 98 - Représentation schématique de la déformation de la membrane suite à l'insertion du fragment [31-53] au niveau de la tête des lipides.

Jusqu'à maintenant, toutes les expériences menées sur l'interaction du peptide avec des membranes ont montré que la cardiolipine était nécessaire. Le peptide étant chargé positivement et la cardiolipine négativement, on pouvait soupçonner une interaction spécifique de type électrostatique entre ces deux molécules. Or les expériences de RMN ^{31}P en rotation ont montré que le fragment [31-53] a bien un effet sur le mélange POPC/POPE/CL/Chol, mais qu'il n'y a pas d'interaction spécifique avec la cardiolipine.

C.3.4.2 Etude de l'interaction peptide/membrane par PWR.

La spectroscopie de résonance à ondes guidées (PWR) est une technique dérivée de la SPR (Résonance Plasmonique de Surface), qui permet notamment de mesurer l'interaction entre une protéine et une bicouche de phospholipides en suspension (Salamon et al., 1997; Salamon et al., 2004). Les expériences ont été réalisées dans le cadre d'une collaboration avec Isabel Alves (Bordeaux), qui a participé à la mise au point de cette technique et a construit son propre prototype de spectromètre PWR.

C.3.4.2.1 Affinité du peptide pour les membranes synthétiques.

Nous avons utilisé la PWR pour évaluer l'affinité du fragment [31-53] de la mitogaligine pour le modèle membranaire le plus complexe, constitué de POPC/POPE/CL/Chol.

L'ajout de peptide provoque un décalage positif du signal avec les deux types de lumière polarisée (Figure 99), ce qui correspond à une interaction du peptide avec la membrane, accompagnée d'une réorganisation des lipides. Cependant, il n'est pas possible de distinguer les modifications dues à l'insertion du peptide, de celles provoquées par le réarrangement des lipides.

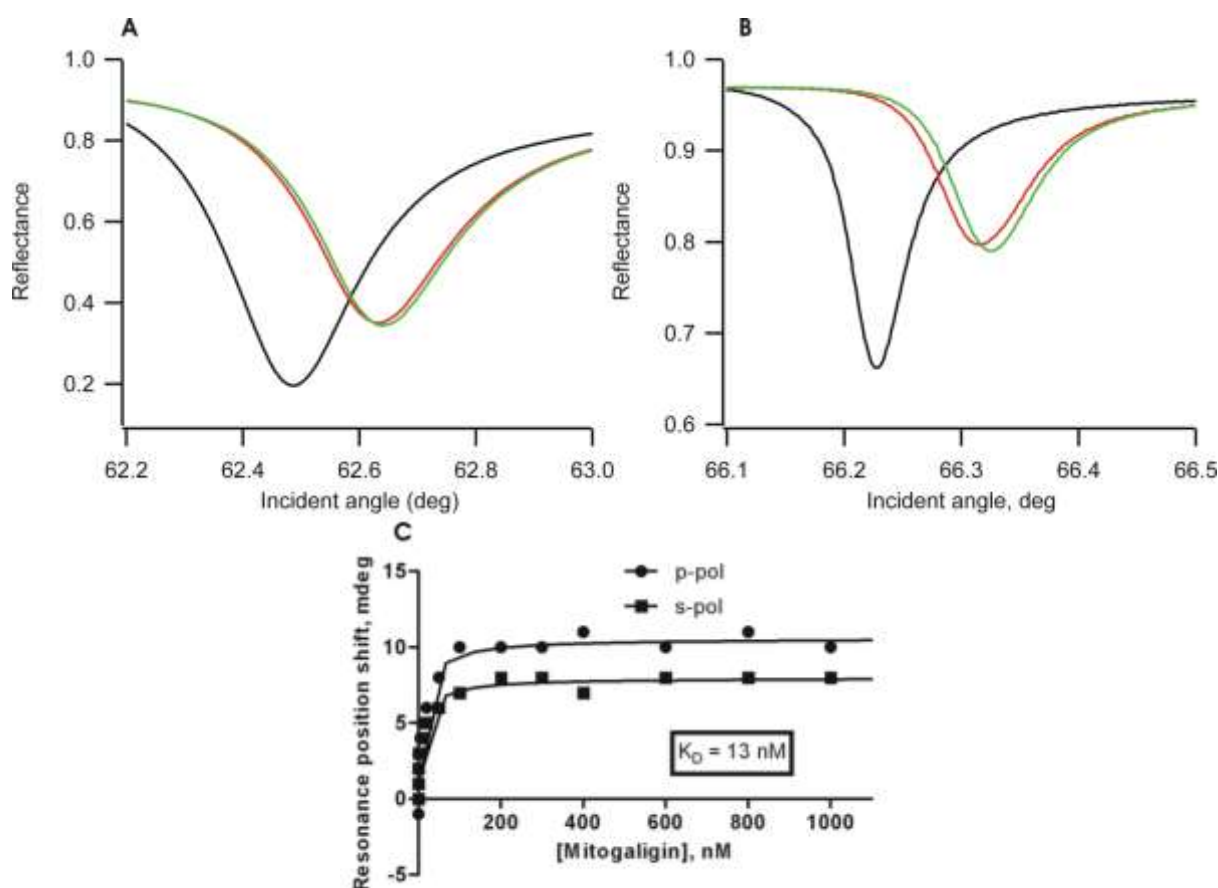


Figure 99 - Interaction du fragment [31-53] de la mitogaligine avec une membrane de POPC/POPE/CL/Chol. Spectres PWR acquis en lumière p-polarisée (A) et s-polarisée (B) : avec le tampon seul (noir), après formation de la bicouche lipidique (rouge) et en présence de 1 μM de peptide (vert). Le graphique (C) représente le déplacement du signal en fonction de la concentration en peptide, permettant de déterminer un K_D apparent.

Le fragment [31-53] de la mitogaligine possède une forte affinité pour cette composition de membrane, avec un K_D apparent de 13 nM. L'amplitude des décalages étant similaires avec les deux types de lumière polarisée, il n'y a pas d'orientation spécifique du système.

Enfin, l'analyse graphique des données indique que les changements sont en majorité dus à une modification de la masse et non de la structure du système (96 et 4 % pour les contributions respectives) : on aurait donc une accumulation du peptide à la surface de la membrane, sans organisation structurale spécifique du système.

C.3.4.2.2 Influence de la cardiolipine.

Pour observer l'influence de la cardiolipine, le même type d'expérience a été réalisé sur un mélange POPC/POPE (Figure 100). Là aussi, le fragment [31-53] interagit avec la membrane, mais de manière non spécifique (K_D de 800 nM) : un décalage est observé à partir de 20 nM de peptide, contre 100 pM pour le mélange complexe POPC/POPE/CL/Chol.

L'analyse graphique indique également une contribution de masse majoritaire par rapport à la structure (85 et 15 % respectivement). Enfin, l'amplitude du décalage est plus grande que sur le modèle précédent, mais cela est dû à la quantité de peptide utilisée, qui est plus importante.

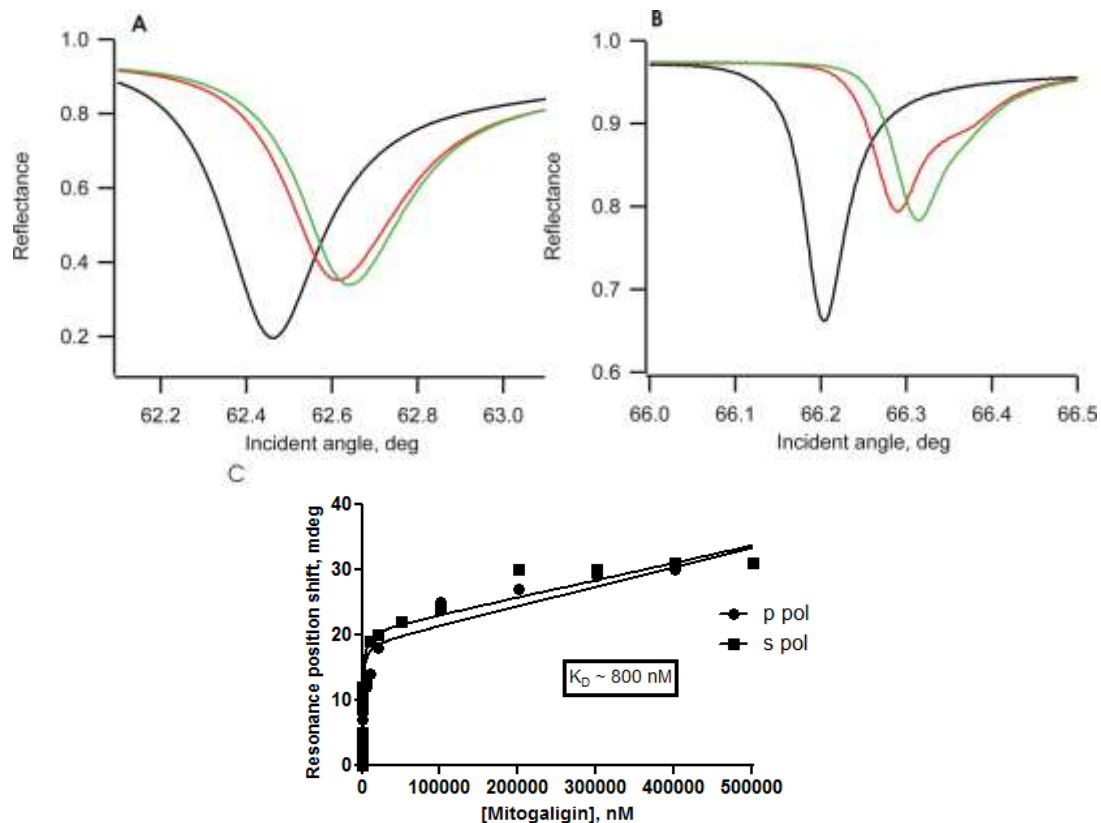


Figure 100 - Interaction du fragment [31-53] de la mitogaligine avec une membrane de POPC/POPE. Spectres PWR acquis en lumière p-polarisée (A) et s-polarisée (B) : avec le tampon seul (noir), après formation de la bicouche lipidique (rouge) et en présence de 200 μ M de peptide (vert). Le graphique (C) représente le déplacement du signal en fonction de la concentration en peptide, permettant de déterminer un K_D apparent.

A noter que l'asymétrie du signal de la bicouche en lumière s-polarisée (épaulement sur la courbe rouge de droite) est probablement due à une hétérogénéité latérale de la membrane correspondant à la formation de microdomaines lipidiques (Salamon et al., 2005). Cette asymétrie est diminuée en présence du peptide, ce qui confirme un réarrangement des lipides suite à l'insertion du fragment [31-53].

Ces expériences confirment une interaction du fragment d'adressage mitochondrial de la mitogaligine avec nos membranes synthétiques modèles, et plus particulièrement avec le modèle le plus complexe contenant de la cardiolipine. L'interaction forte enregistrée pour cette composition permet également de confirmer et quantifier une affinité importante du peptide pour les membranes contenant ce phospholipide.

C.4 Conclusion sur l'étude du fragment d'adressage mitochondrial

C.4.1 Une activité cytotoxique confirmée.

La micro-injection du fragment d'adressage mitochondrial, dans différents types de cellules humaines, a confirmé une activité cytotoxique importante, avec une entrée en apoptose de 50-60 % des cellules dans les deux premières heures, et 98 % après une nuit à 37°C. Cette activité baisse très nettement lorsque le peptide est injecté dans le noyau et n'est plus présente si le peptide se trouve dans le milieu de culture des cellules. Ces expériences ont donc confirmé la nécessité d'une localisation du peptide dans le cytoplasme cellulaire pour déclencher le processus apoptotique.

Le relargage de la protéine mitochondriale CTMP après la micro-injection du fragment [31-53] dans le cytoplasme indique bien une perturbation de la membrane mitochondriale. Cependant, la confirmation visuelle d'une colocalisation du peptide couplé à un fluorophore et des mitochondries n'a pu être établie, car la rhodamine utilisée comme fluorophore dans ces expériences a adressé le peptide vers le noyau.

L'étude de la cytotoxicité du fragment d'adressage mitochondrial [31-53] a montré que ce peptide a bien la capacité d'induire l'apoptose cellulaire par la voie intrinsèque mitochondriale, avec une toxicité du même ordre de grandeur que la protéine tBid appartenant à la famille Bcl-2 (Moreau et al., 2003; Gonzalez et al., 2010). Cette famille rassemble les protéines humaines impliquées dans la régulation de l'apoptose mitochondriale et le domaine BH3, commun à toutes ces protéines, est nécessaire dans la plupart des processus. Cependant, le fragment [31-53] ne présente aucune homologie de séquence avec le domaine BH3.

Une étude de la structuration du fragment [31-53] et de son interaction avec des modèles membranaires était donc nécessaire pour en savoir un peu plus sur le mécanisme permettant à ce peptide de déclencher la fuite de cytochrome c mitochondrial, à l'origine de l'apoptose cellulaire.

C.4.2 Pas de structure canonique mais un repliement spécifique.

De nombreux peptides peuvent adopter une conformation spécifique au contact de leur cible, à l'image de la pénétratine qui se structure face à une membrane anionique (Magzoub et al., 2002) ou la protéine pro-apoptotique Bax qui change de conformation suivant la nature du milieu membranaire utilisé (Sani et al., 2009). Nous avons donc observé le repliement du fragment [31-53] en présence de différents environnements membranaires.

Les expériences de dichroïsme circulaire ont montré que le fragment d'adressage, majoritairement non structuré dans l'eau, ne forme pas de structure secondaire canonique, que ce soit en présence de micelles ou d'une bicouche lipidique. Ce peptide n'a donc pas de propension à adopter une structure secondaire canonique face à un environnement membranaire. De légères modifications sont néanmoins observées lorsque le milieu utilisé est anionique, à l'image de la cardiolipine, c'est pourquoi nous avons choisi les micelles de SDS pour déterminer la structure tridimensionnelle du fragment [31-53].

La structure 3D a été déterminée à partir de données RMN et confirme l'absence de structures secondaires régulières. Le fragment [31-53] ne forme donc pas d'hélice α , contrairement aux protéines de la famille Bcl-2 (Youle et al., 2008) ou à de nombreux peptides antimicrobiens déstabilisateurs de membranes (Andrès et al., 2007).

Malgré cette absence de structures secondaires régulières, le fragment d'adressage de la mitogaline prend une conformation spécifique (Figure 101), avec la formation d'un cluster impliquant les résidus W14, W17, L12 et L19, qui oriente les chaînes latérales vers la même face du peptide. De plus, la partie N-terminale du fragment est plus flexible avec une charnière au niveau de S9.

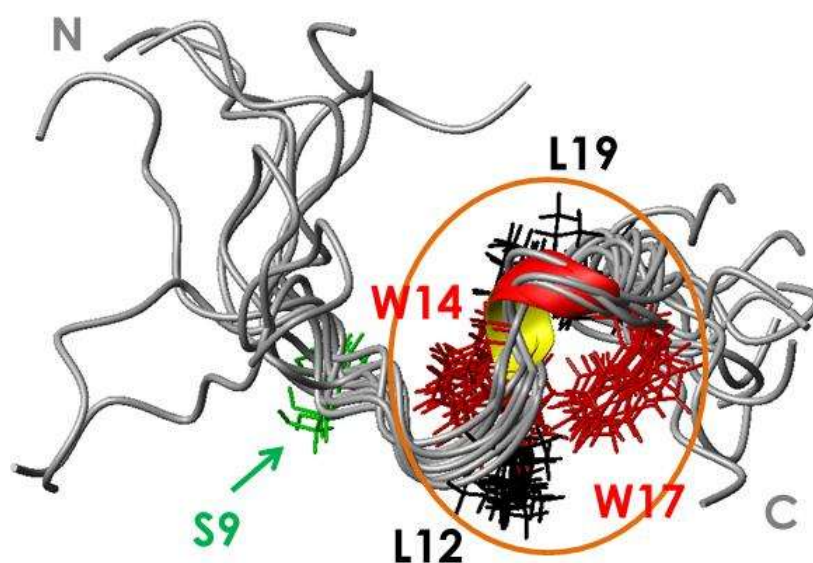


Figure 101 - Visualisation du cluster et du bras N-terminal flexible sur la superposition des 10 structures tridimensionnelles représentatives du fragment [31-53] en solution.

Suivant l'orientation de la partie 1-8, le tryptophane W5 peut se retrouver du même côté que les résidus du cluster ou se placer dans le même axe que W14 et W17 (Figure 102).

Le peptide compte également trois Leucines, qui vont toujours s'orienter de la même manière par rapport aux tryptophanes : L3 est tournée vers W5 et semble former un prolongement des cycles, tandis que L12 et L19 se placent systématiquement de chaque côté des tryptophanes.

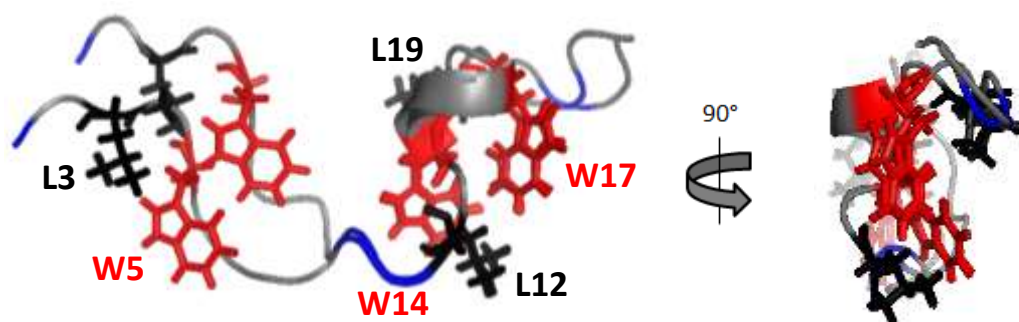


Figure 102 – Orientation des chaînes latérales des Trp et Leu dans la structure tridimensionnelle du fragment [31-53]. Superposition de 2 structures avec les Trp colorés en rouge et les Leu en noir.

Enfin, les chaînes latérales des quatre Arg présentent une grande flexibilité (Figure 103) : R1 sous forme étendue pointe vers l'extérieur du peptide, tandis que R21 peut soit pointer vers l'extérieur soit se replier vers le cluster et s'orienter vers les cycles des tryptophanes. Au centre du peptide, R10 et R11 peuvent se replier de part et d'autre du squelette peptidique, à l'image du battement d'ailes d'un oiseau.

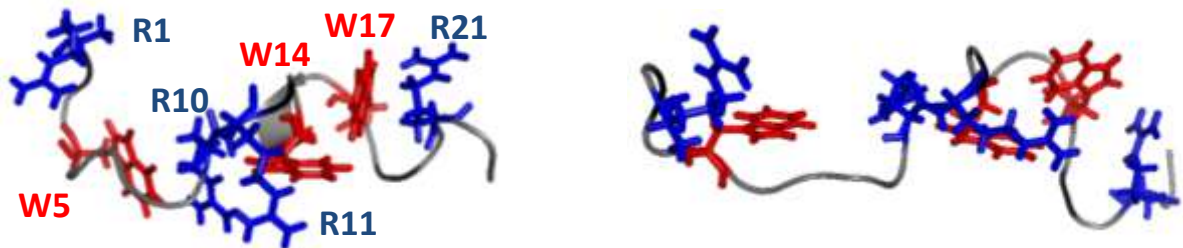


Figure 103 – Exemples d'orientation des chaînes latérales des Arginines dans 2 structures du fragment [31-53]. Les Trp sont colorés en rouge et les Arg en bleu.

Le fragment [31-53] prend une forme globale plutôt plane et l'analyse des potentiels d'hydrophobicité ainsi que la répartition des charges ne montrent pas de face particulièrement cationique ou lipophile. Contrairement aux domaines BH3 des protéines de la famille Bcl-2 ou à certains peptides antimicrobiens, le fragment [31-53] ne forme pas de structure amphiphile.

Cependant, l'orientation des chaînes latérales suggère un alignement possible des tryptophanes et Leucines sur une même face, laissant les Arginines pointer vers l'extérieur du peptide. Or ce type de répartition peut se retrouver dans la Triterpticine, un peptide antimicrobien avec une séquence très proche de celle du fragment [31-53] de la mitogaligine (Figure 104). La Triterpticine est capable de détruire l'intégrité de la membrane des bactéries, par la formation de pores membranaires (Salay et al., 2004).

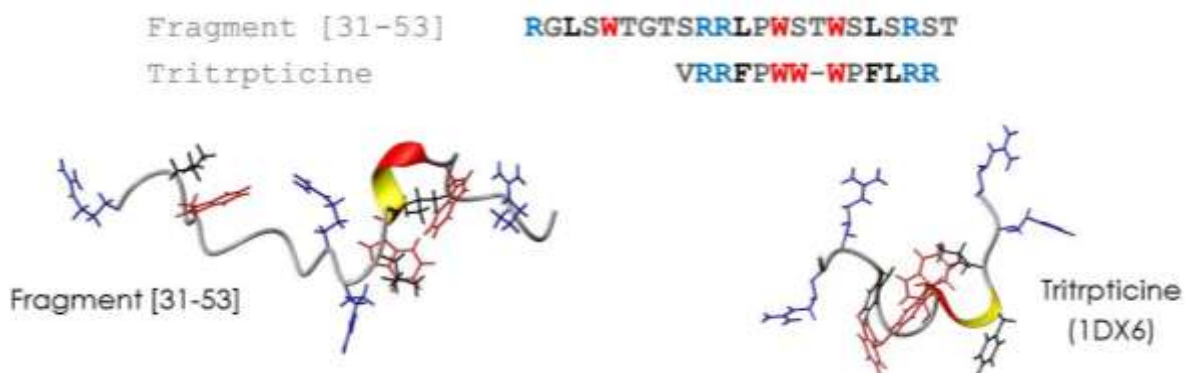


Figure 104 - Comparaison entre le fragment d'adressage mitochondrial de la mitogaligine et la Triterpticine. Alignement des séquences et structures tridimensionnelles : le fragment [31-53] est à gauche, la Triterpticine (Schibli et al., 2006) à droite. Les Trp, Arg et Leu, sont respectivement colorés en rouge, bleu et noir.

La mutation de certains acides aminés a montré que le repliement global de la Triterpticine est maintenu par les tryptophanes et Prolines. Les Trp et Phe forment une surface hydrophobe responsable de l'enfouissement du peptide dans les membranes, mais la présence des Arg est indispensable pour l'interaction avec les lipides (Schibli et al., 2006). Le fragment [31-53] de la mitogaligine pourrait tout à fait adopter le même type de comportement en orientant ses tryptophanes et Leucines vers la membrane.

C.4.3 Enfouissement du peptide dans les membranes.

L'émission de fluorescence des tryptophanes est dépendante de l'environnement local de leur cycle, faisant de ces aminoacides de très bons senseurs des changements de milieu. Les trois tryptophanes du fragment d'adressage mitochondrial ont un comportement similaire dans les différents milieux testés. Un spectre typique d'un tryptophane exposé au solvant est enregistré dans l'eau et en présence de bicelles zwitterioniques. Par contre un changement d'environnement important est enregistré en présence de milieux anioniques, comme les micelles de SDS ou les bicelles contenant de la cardiolipine.

L'étude de la structuration du fragment [31-53] suggère une interaction avec des membranes anioniques, mais avec une localisation à l'interface membranaire due à la présence des tryptophanes et Arginines. Le même type de résultats a été obtenu avec la pénétratine, dont la localisation a été prouvée (Fagneto et al., 2000; Magzoub et al., 2001). Cette localisation proche de l'interface est fréquemment retrouvée parmi les protéines contenant un nombre important de tryptophanes (Yau et al., 1998).

L'analyse de données RMN, enregistrées en présence d'ions paramagnétiques, permet de préciser l'enfouissement de tous les aminoacides dans les micelles de SDS. La présence de Mn^{2+} et Gd affectent la majorité du peptide, ce qui correspond à un faible enfouissement dans les micelles. Cependant, certains résidus sont plus protégés du solvant, comme les cycles des tryptophanes et les Leucines. Le peptide serait donc localisé à l'interface du milieu membranaire, avec ses résidus hydrophobes orientés vers l'intérieur de la membrane.

Pour vérifier cette répartition des acides aminés, des simulations de dynamique moléculaire en gros grain ont été réalisées par Norbert Garnier (CBM, Orléans). Ces simulations du peptide en présence d'une membrane contenant de la cardiolipine (DOPC/DOPE/CL/Chol) sont de deux types. Soit le peptide et les lipides sont placés de manière aléatoire dans la boîte de simulation et la membrane lipidique se forme en présence du peptide. Soit le peptide est placé à 6 nm d'une membrane préformée, avec une orientation aléatoire par rapport à celle-ci.

Dans le premier type de simulation, la bicouche de lipides se forme spontanément et rapidement avec le peptide localisé au niveau des têtes des lipides. Dans le second cas, le peptide est rapidement attiré par la membrane et reste localisé au niveau de la même interface.

Si l'on observe la répartition des atomes du peptide tout au long de ces simulations, on observe toujours le même type de répartition (Figure 105) : les Arginines se placent à proximité des têtes de lipides, tandis que les tryptophanes et Leucines sont légèrement plus enfouis et se situent plus près du début de la chaîne carbonée. Ces résultats confirment un faible enfouissement du peptide et concordent avec les résultats expérimentaux obtenus jusqu'ici.

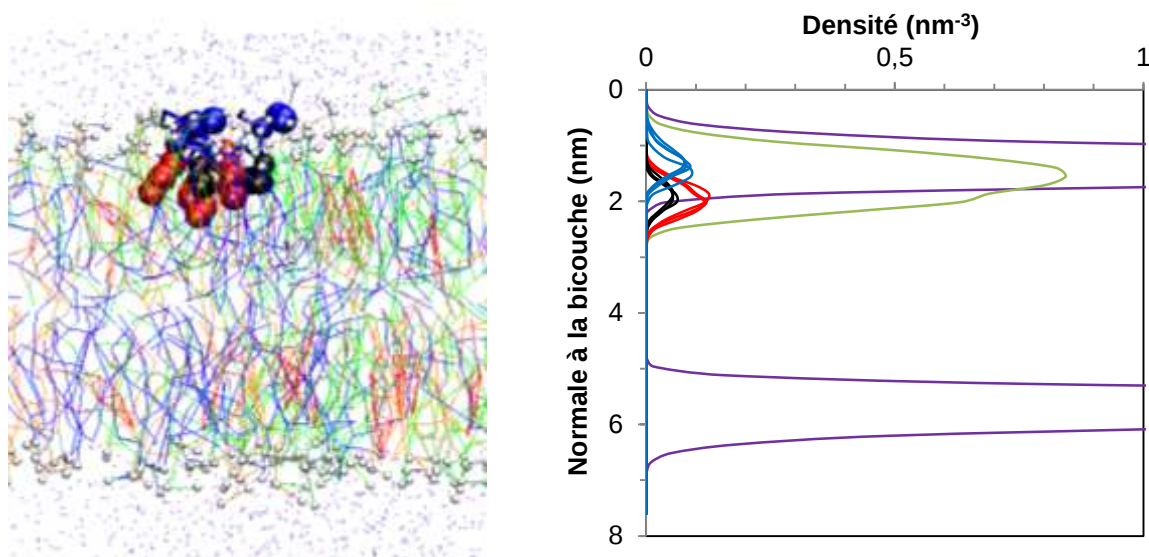


Figure 105 – Capture d'écran en fin de simulation et répartition des atomes pendant toute la durée de la simulation. Les têtes des lipides sont représentées par des petites sphères blanches et les chaînes carbonées de la cardiolipine, du POPC et du POPE sont respectivement colorées en bleu, vert et orange. Le peptide est représenté en boules et les Arginines sont colorées en bleu, les tryptophanes en rouge et les Leucines en noir.

C.4.4 Effet du peptide sur la dynamique des lipides.

Jusqu'à maintenant, nous nous sommes penchés sur l'effet de la présence d'un environnement membranaire sur la structuration du fragment [31-53] de la mitogaligine. Mais pour décrire l'interaction du peptide avec les membranes mitochondriales, nous devons également étudier l'effet du peptide sur la dynamique et l'organisation des lipides.

Pour cela nous avons utilisé des membranes synthétiques, de composition proche de celle de la mitochondrie, contenant ou non de la cardiolipine. La technique de PWR nous a permis de tester l'affinité du peptide pour ces modèles de membranes : si le peptide présente peu d'affinité pour une bicouche zwitterionique, la présence de cardiolipine provoque une interaction très forte, avec un K_d apparent de 13 nM. Ces résultats confirment l'importance de la cardiolipine dans l'interaction du fragment [31-53] avec les membranes. Or dans les cellules humaines, ce phospholipide n'est présent qu'au niveau des membranes mitochondriales, ce qui peut expliquer que le peptide soit actif lorsqu'il est localisé dans le cytoplasme et inactif lorsqu'il est à l'extérieur de la cellule.

La technique de PWR permet également de déceler une orientation du système due à la formation d'une hélice ou d'un pore transmembranaire par exemple. Dans notre cas, le fragment d'adressage ne prend pas d'orientation spécifique et ne provoque pas d'organisation du système : il ne formerait donc pas de pore comme le fait la Tritrpticine.

La RMN du solide permet d'explorer des modifications dans la dynamique et l'organisation des lipides. L'étude des mélanges de lipides a montré que les membranes synthétiques que nous avons utilisées peuvent refléter le comportement naturel des lipides : avec la formation de bicouches fluides, correspondant au comportement de type « mosaïque fluide » des membranes cellulaires, ou une organisation en phase hexagonale inverse, que l'on peut retrouver au niveau des sites de jonctions membranaires. Le modèle membranaire que nous avons choisi est donc bien compatible avec les sites de jonctions des membranes mitochondriales que nous avons souhaité modéliser.

L'étude en présence du fragment [31-53] a montré des modifications dans la dynamique et l'organisation des lipides : le peptide est capable d'exercer une courbure positive de la membrane, déformant les vésicules et gênant la formation de phase hexagonale inverse. La localisation à l'interface du peptide permet d'expliquer ces résultats (Figure 106). Car en s'insérant parmi les têtes des lipides, le peptide par encombrement stérique peut pousser les lipides, entraînant une courbure positive de la membrane.

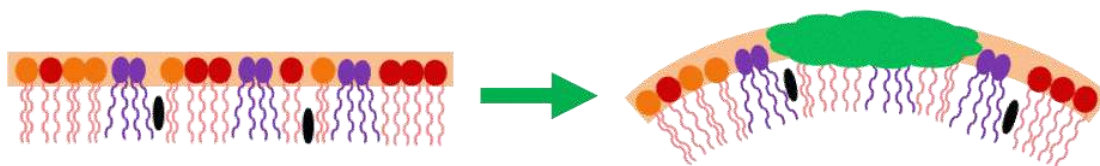


Figure 106 – Représentation schématisée de la courbure positive de la membrane induite par le fragment [31-53]. Le peptide, la cardiolipine, le POPC, le POPE et le cholestérol sont respectivement colorés en vert, violet, rouge, orange et noir.

Le fragment [31-53] de la mitogaligine est donc capable de modifier l'organisation des lipides en s'insérant parmi eux. La présence de cardiolipine chargée négativement pourrait augmenter l'attraction du peptide pour la membrane notamment grâce à une interaction électrostatique spécifique.

La technique de PWR permet de détecter la formation de rafts lipidiques, correspondant à la ségrégation d'un type de lipide : mais ce phénomène n'a pas été observé en présence du fragment [31-53]. Les simulations de dynamique moléculaire ont également montré que la répartition des lipides reste aléatoire malgré la présence du peptide. Enfin, les expériences de RMN ^{31}P en rotation ont montré que la présence du peptide semble affecter tous les lipides, et pas un phospholipide en particulier. Il ne semble donc pas y avoir de ségrégation de la cardiolipine. Cependant des mesures de calorimétrie menées prochainement permettront de confirmer ces observations.

L'ensemble des résultats de RMN solide et PWR montre que le peptide a un effet global sur l'organisation des lipides entraînant une courbure positive de la membrane mitochondriale, et empêchant la formation de phase hexagonale inverse. Cependant, son interaction forte avec les membranes contenant de la cardiolipine ne passerait pas par une ségrégation de ce lipide, comme pour les protéines Bid et Bax (Lutter et al., 2001; Kuwana et al., 2002; Kim et al., 2004).

C.4.5 Un peptide cytotoxique humain, déstabilisateur de membranes.

Contrairement à différents peptides interagissant avec des membranes, le fragment [31-53] de la mitogaligine ne forme pas de structure secondaire canonique. Cependant le repliement adopté par ce peptide, et notamment la formation d'un cluster de tryptophanes et Leucines, lui permet d'interagir avec les membranes à la manière de certains peptides amphipathiques (Brogden, 2005; Toke, 2005).

La première étape d'interaction de ces peptides avec les membranes correspond à une insertion à la surface des lipides provoquant une courbure positive de la membrane (Figure 107) et ce phénomène est bien observé dans le cas du fragment [31-53]. La répartition et l'orientation des tryptophanes et Leucines permettent au peptide d'interagir avec la membrane, et la présence d'Arginines maintient sa localisation au niveau des têtes des lipides.

Nous avons également observé que la présence de cardiolipine est essentielle pour une forte affinité du peptide avec les modèles membranaires étudiés. Le rassemblement de cardiolipine au niveau des sites de jonction entre les membranes mitochondriales forme une surface négative, qui attirerait le fragment [31-53] et faciliterait son insertion.

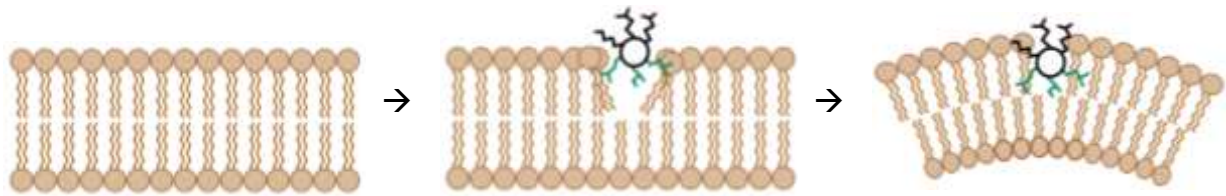


Figure 107 - Courbure positive d'une membrane suite à l'insertion d'une molécule amphipatique, ici de type hélice α (tiré de McMahon et al., 2005).

Les études structurales menées sur le fragment [31-53] ont montré que ce peptide est capable de modifier l'intégrité des membranes, par insertion au niveau de la tête des lipides. La courbure positive exercée sur la membrane peut en modifier les propriétés et provoquer sa déstabilisation. Ce phénomène pourrait être à l'origine de la fuite de cytochrome c et de l'apoptose, observées dans le cas du fragment [31-53] de la mitogaligine.

Si nous connaissons maintenant la première étape d'interaction du peptide avec la membrane mitochondriale, nous ne sommes pas encore en mesure de préciser comment la fuite de cytochrome c s'effectue. En effet, le fragment [31-53] pourrait perméabiliser la membrane externe des mitochondries entraînant directement la fuite de cytochrome c, mais il pourrait également passer à travers cette membrane externe et agir de l'intérieur. Il pourrait alors déstabiliser l'interaction cardiolipine/cytochrome c et provoquer sa libération massive dans l'espace inter-membranaire, ce qui représente une étape indispensable au déclenchement de l'apoptose.

Outre une perméabilisation de la membrane externe, la modification de la dynamique des lipides provoquée par l'insertion du fragment [31-53] peut également perturber les mécanismes de fusion et fission des mitochondries, provoquant le déclenchement de l'apoptose. A l'image de certaines protéines de la machinerie de fission (Suen et al., 2008), le peptide pourrait être recruté par les protéines de la famille Bcl-2 pour amplifier le phénomène de l'apoptose. Il a d'ailleurs été observé que le gène galig est capable d'interférer avec la voie de Bcl-X_L (Duneau et al., 2005).

L'étude de l'activité cytotoxique du fragment [31-53] de la mitogaligine a montré que ce peptide est capable de déclencher l'apoptose cellulaire, avec une efficacité du même ordre que certaines protéines de la famille Bcl2, comme la protéine tBid. Or certains peptides issus de cette famille sont actuellement étudiés comme candidats pour des thérapies anti-cancéreuses impliquant l'apoptose. Il peut en être de même concernant le fragment d'adressage mitochondrial de la mitogaligine.

Nous avons également vu que le fragment [31-53] possède beaucoup de similitudes avec des peptides antimicrobiens. L'activité cytotoxique du peptide par micro-injection dans des cellules humaines nous laisse donc suspecter une certaine activité antimicrobienne. Des tests préliminaires montrent que ce peptide est capable de tuer certains types de bactéries, ouvrant également des perspectives d'application dans le domaine des peptides antibactériens.

PARTIE D. Etude de la Mitogaligine

En parallèle de l'étude du fragment d'adressage mitochondrial, le protocole de production de la protéine entière est mis au point. Une fois produite, le même type d'étude en présence d'un milieu membranaire sera mené sur la mitogaligine.

D.1 Production d'une protéine marquée.

D'après le gène *galig*, la mitogaligine est composée de 97 acides aminés, mais sa séquence ne présente pas de similitudes avec d'autres protéines connues et sa structure tridimensionnelle n'a pas encore été résolue. A l'instar de son fragment d'adressage mitochondrial, la mitogaligine pourrait avoir besoin d'un environnement membranaire pour se structurer : la répartition homogène des tryptophanes et Arginines le long de la séquence pourrait placer cette protéine à l'interface de la bicouche phospholipidique (Yau et al., 1998).

La structure de plusieurs protéines membranaires a pu être déterminée par RMN, en présence de micelles de SDS (Buck-Koehntop et al., 2005; Halskau et al., 2005) ou DPC (Zamoon et al., 2003; Ahn et al., 2006). Pour ces protéines, un marquage (^{15}N au minimum) a été nécessaire pour s'affranchir des signaux des molécules de SDS ou DPC.

La méthode la plus couramment utilisée pour produire des protéines marquées est l'expression par des bactéries recombinantes en milieu minimum : un plasmide est introduit dans les bactéries, qui vont produire la protéine d'intérêt, puis le contenu des bactéries est récupéré et purifié. La construction du plasmide permet d'introduire une étiquette (appelée aussi tag) accolée à la protéine, afin de faciliter l'étape de purification. Cette méthode de production (peu coûteuse pour un marquage ^{15}N) permet d'obtenir rapidement des quantités importantes de protéines uniformément marquées.

Nous avons également choisi de développer, en parallèle, une méthode de production par synthèse chimique, qui permet d'obtenir une protéine native que l'on peut marquer de manière sélective. Ce type de marquage permettrait, par exemple, d'obtenir directement et uniquement le signal RMN du fragment [31-53] de la mitogaligine lorsqu'il est inclus dans la protéine entière.

Le marquage sélectif a également été utilisé pour étudier par RMN des protéines intrinsèquement désordonnées, comme par exemple la protéine Tau (Harbison et al., 2012). Or, en l'absence de la protéine naturelle, nous n'avons aucun indice sur la structuration de la mitogaligine. Le marquage sélectif pourrait s'avérer particulièrement utile si la mitogaligine faisait également partie de ces protéines intrinsèquement désordonnées.

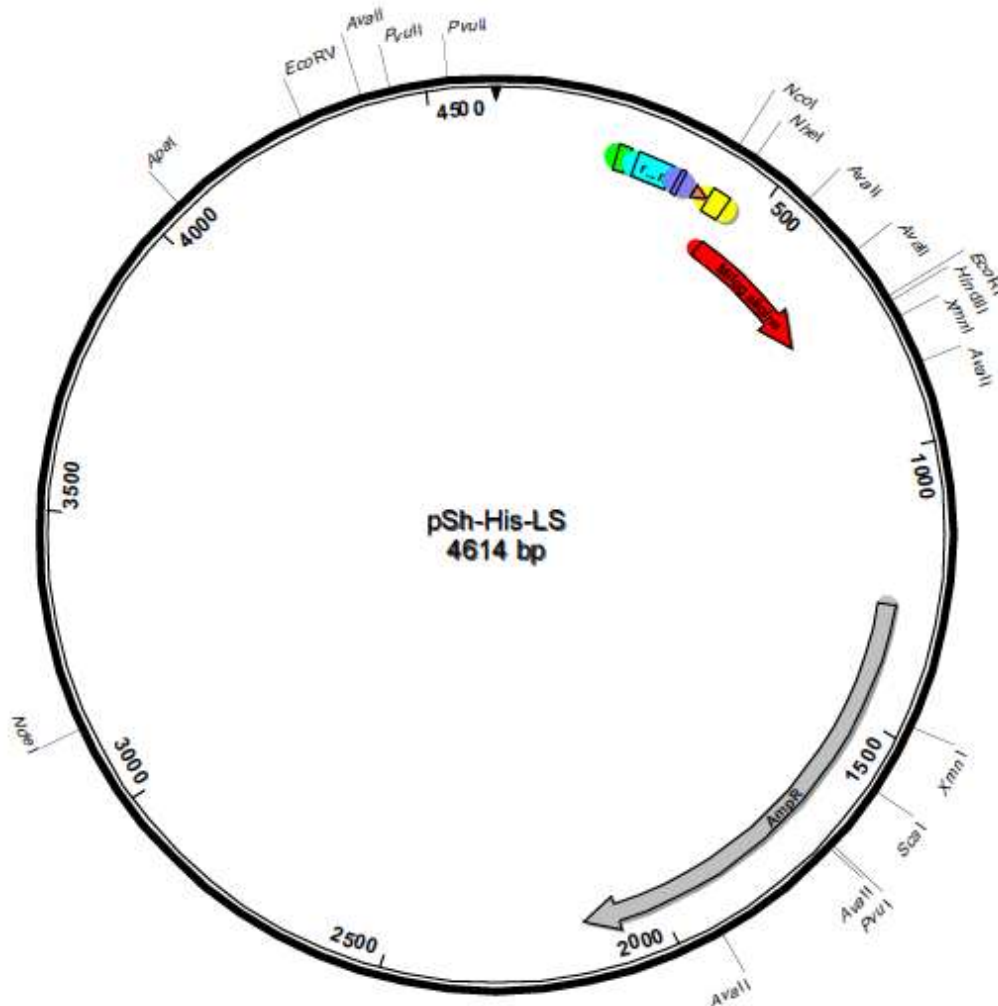
En parallèle de l'étude du fragment d'adressage mitochondrial, j'ai donc participé à la production de la mitogaligine. La mise au point des protocoles de production est faite en collaboration avec deux équipes du laboratoire : l'équipe d'Alain Legrand pour la production par bactéries recombinantes, et l'équipe d'Agnès Delmas pour la production par synthèse chimique.

D.2 Expression de la mitogaligine par des bactéries.

D.2.1 Le plasmide pSh-His-LS.

La production de la mitogaligine par des bactéries recombinantes a été mise au point par Stéphane Charpentier et Thierry Normand (équipe d'A. Legrand, CBM). Le plasmide introduit dans les bactéries contient différents éléments (Figure 108) :

- la séquence de la **mitogaligine** avec un **Tag de 6 Histidines** non clivable en position N-terminale, permettant une purification par affinité sur colonne de Nickel.
- un **opéron Lactose** pour démarrer l'expression du plasmide grâce à une induction à l'IPTG.
- un **gène de résistance à l'ampicilline** pour discriminer les bactéries n'ayant pas internalisé le plasmide.



MGGSHHHHHHASMARMGEPACWGRGLPRGFLSWGLPRAGTPRGLSWTGTSRRLP
WSTWSLSRSTCTWSLPRATQRPWGLPIFWTAKCPRSLPCHWPLWRPCWATDCAL

Figure 108 – Plasmide utilisé pour la production par bactéries recombinantes et séquence de la mitogaligine correspondantes.

D.2.2 Protocole de production et purification.

Le plasmide est intégré dans des bactéries *E. coli* de type DH5α et son expression est induite par de l'IPTG. Une fois produite, la protéine est purifiée sur une colonne d'affinité (Figure 109). L'ajout de TCEP durant tout le processus permet d'éviter la formation parasite de ponts disulfure intermoléculaires.

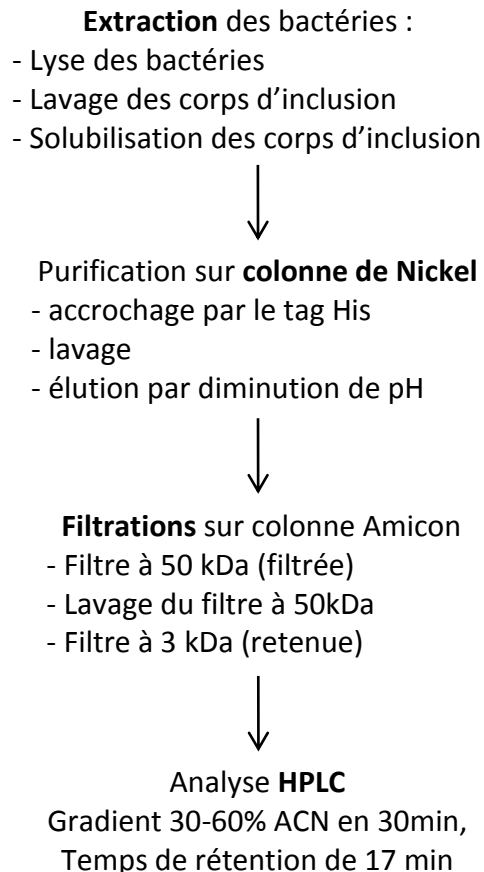


Figure 109 - Protocole de purification de la mitogaligine recombinante.

Lorsqu'elle est surexprimée, la mitogaligine n'est pas soluble : elle se trouve sous la forme de corps d'inclusion à l'intérieur des bactéries. Une fois les bactéries lysées, les corps d'inclusions sont récupérés, puis solubilisés dans un tampon dénaturant, à base d'urée.

La protéine, dans sa forme réduite et déstructurée, est purifiée sur une colonne d'affinité : le Tag Histidine interagit avec les ions Nickel de la colonne pour retenir la protéine. La mitogaligine est ensuite éluée de la colonne par diminution de pH. Enfin une filtration sur colonne Amicon permet d'éliminer par tamisage moléculaire les dernières molécules contaminantes qui auraient été retenues avec la mitogaligine.

Un passage sur une colonne HPLC et une vérification de la masse finalisent la production d'une mitogaligine réduite et dénaturée, possédant un Tag Histidine en position N-terminale. La protéine possédant 6 Cystéines, elle peut former jusqu'à 3 ponts disulfure : une étape de repliement oxydatif sera donc nécessaire pour établir ces ponts.

D.2.3 Application du protocole sur milieu minimum.

J'ai produit de la mitogaligine en milieu minimum, afin de valider le protocole pour la production d'une protéine marquée ^{15}N .

Des électrophorèses de type SDS-PAGE permettent de valider les différentes étapes de production (Figure 110) et de purification (Figure 111): une bande en dessous de 15 kDa confirme la présence de la mitogaligine (12,48 kDa et 12,65 kDa marquée ^{15}N).

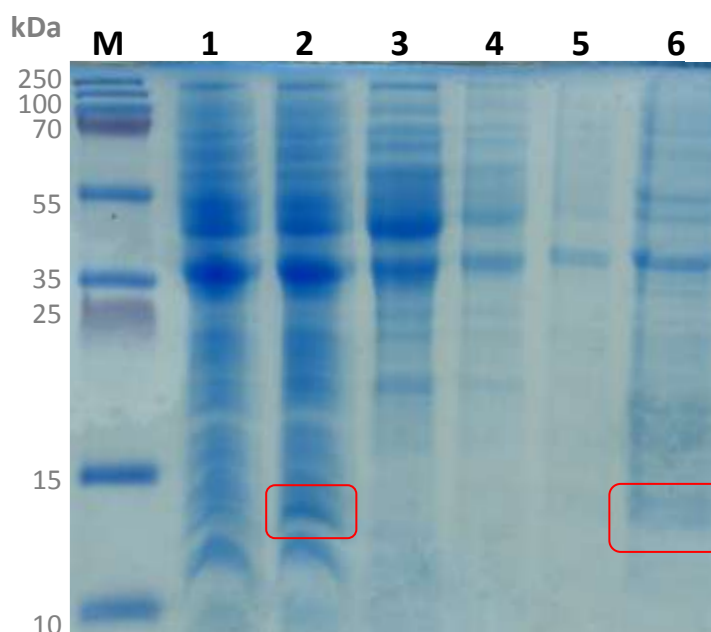


Figure 110 - Suivi des étapes de production en milieu marqué ^{15}N : gel Tris Tricine à 14,5% d'Acrylamide. Marqueur de taille (M), bactéries avant (1) et après (2) induction, surnageant après la lyse des bactéries (3), 1^{er} et 2nd lavages des corps d'inclusion (4 et 5), solubilisation des corps d'inclusion (6).

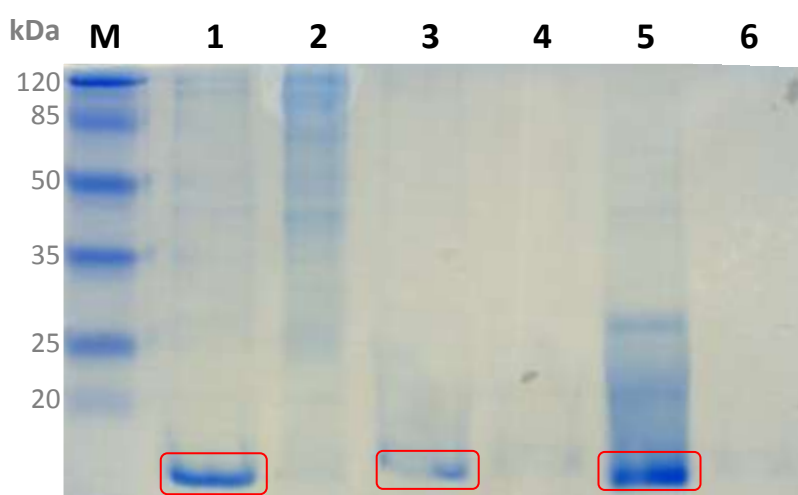


Figure 111 - Suivi des étapes de purification : gel Tris Tricine à 14,5% d'Acrylamide. Marqueur de taille (M), pool des fractions d'élution recueillies en sortie de la colonne d'affinité (1), retentat (2) et filtrat (3) de la colonne de filtration à 50 kDa, lavage du filtre à 50 kDa (4), retentat (2) et filtrat (3) de la colonne de filtration à 5 kDa.

Pour 1L de culture, nous avons obtenu environ 2mg de protéine. Une analyse HPLC et une caractérisation par MALDI-TOF ont permis de valider la production d'une mitogaligine marquée à plus de 90 % (Figure 112).

La protéine se trouve sous deux formes, avec et sans sa Méthionine initiale. L'analyse par spectrométrie de masse montre une protéine marquée à 92.4 % pour la protéine avec Méthionine et 96.5 % pour la protéine sans Méthionine.

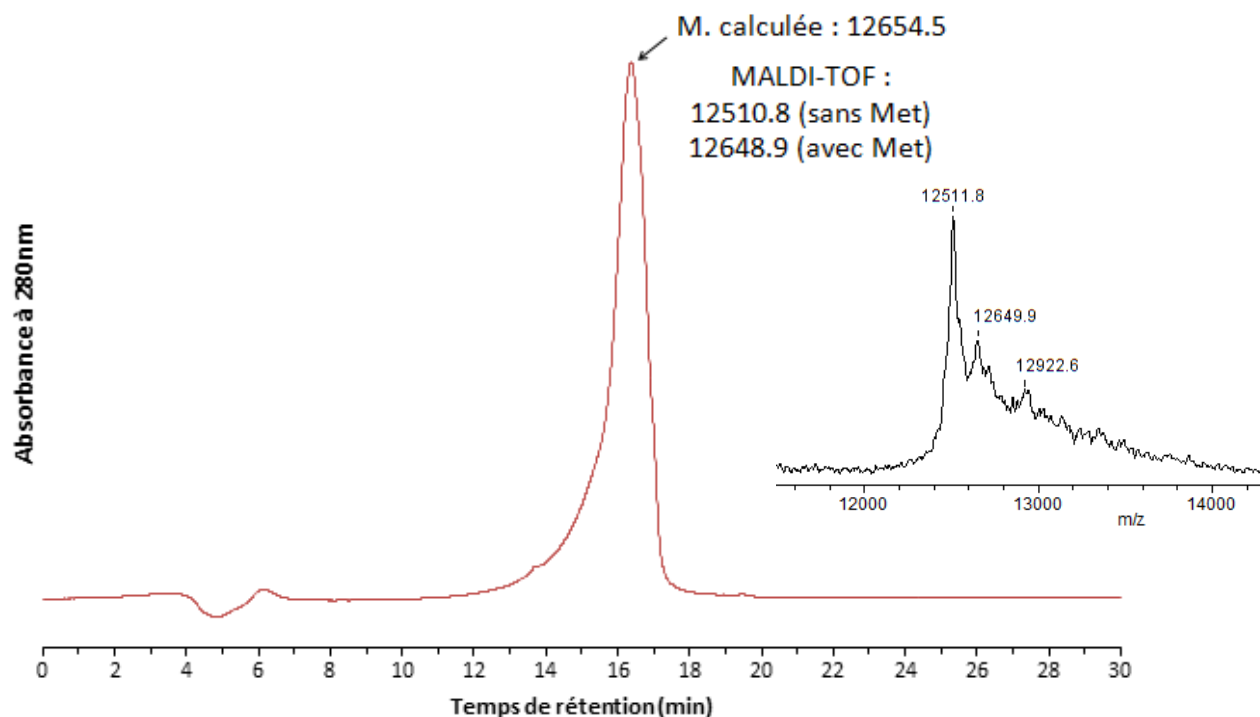


Figure 112 - Chromatogramme HPLC et profil MALDI-TOF de la mitogaligine ¹⁵N. Le chromatogramme est enregistré avec un gradient de 30 à 60% d'Acétonitrile en 30 min, sur une colonne C4. Les masses indiquées sur le profil MALDI-TOF correspondent aux masses [MH⁺]. La différence avec la masse calculée correspond à un marquage de la protéine à 96.5% pour la mitogaligine sans Met et 92.4% pour la mitogaligine avec Met.

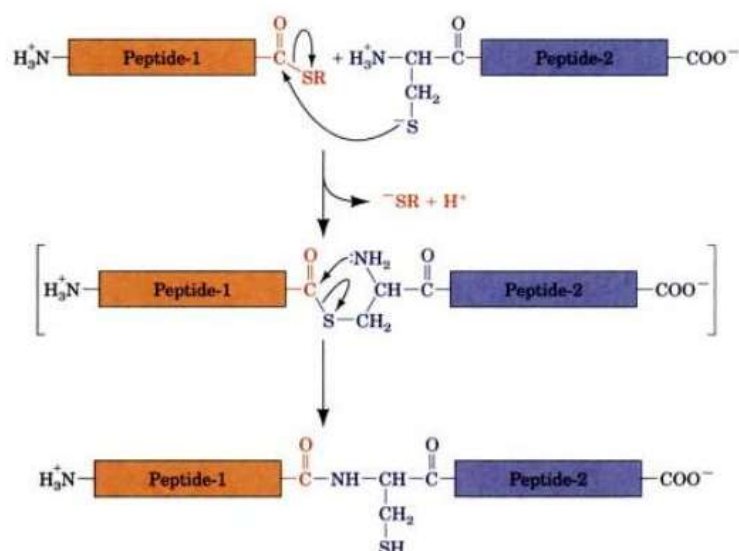
La mitogaligine produite est à l'état réduit, elle nécessite la mise au point d'une étape de repliement oxydatif. Cette dernière étape étant commune avec la protéine produite par synthèse chimique, nous y reviendrons après la description de la production par synthèse chimique.

D.3 Production par synthèse chimique.

D.3.1 Une production par ligation chimique.

Etant donnée la taille de la mitogaligine, la synthèse « pas à pas » par SPPS, comme pour la synthèse du fragment d'adressage, est difficilement envisageable. En effet, au-delà d'une cinquantaine d'acides aminés, la baisse de rendement des couplages peptidiques lorsque la chaîne s'allonge risque d'aboutir à un très faible rendement final. Ce résultat s'explique principalement par des phénomènes de repliements et/ou d'agrégation qui rendent l'amine peu accessible pour le couplage peptidique.

Actuellement, la méthodologie utilisée pour synthétiser chimiquement des petites protéines d'environ 10 kDa est la ligation chimique native (NCL). La NCL est une technique relativement récente qui consiste à condenser chimio sélectivement 2 fragments peptidiques (Dawson et al., 1994) : l'un contenant une fonction thioester en position C-terminale et l'autre une cystéine en position N-terminale. Une trans-thioestérification suivie d'un réarrangement intra moléculaire, permettent de former une liaison peptidique entre les deux fragments (Figure 113). La présence d'une cystéine est donc nécessaire au site de ligation et l'obtention du fragment thioester représente une étape clef de la méthodologie. Pour la mitogaligine, le site de ligation choisi se situe entre la Thréonine 53 et la Cystéine 54.



MAWRMGEPACWGRGLPRGFLSWGLPRAGTPRGLSWTGTSRRLPWSTWS
LSRSTCTWSLPRATQRPWGLPIFWTAKCPRSLPCHWPLWRPCWATDCAL

Figure 113 – Production de la mitogaligine par synthèse chimique en deux fragments, puis ligation. Réaction chimio-sélective utilisée pour la ligation native (Voet and Voet, 2005) et séquence de la mitogaligine produite.

D.3.2 Production du fragment [1-53]-SR.

La synthèse du fragment [1-53]-SR a été réalisée par Dominique Lelièvre (équipe d'A. Delmas, CBM) en utilisant une stratégie qu'il a précédemment développée (Lelièvre et al., 2008). Tout d'abord, le fragment [1-52] est synthétisé en accrochant S52 sur une résine via l'hydroxyle de sa chaîne latérale. Puis, la T53 fonctionnalisée est couplée au reste du peptide (Figure 114).

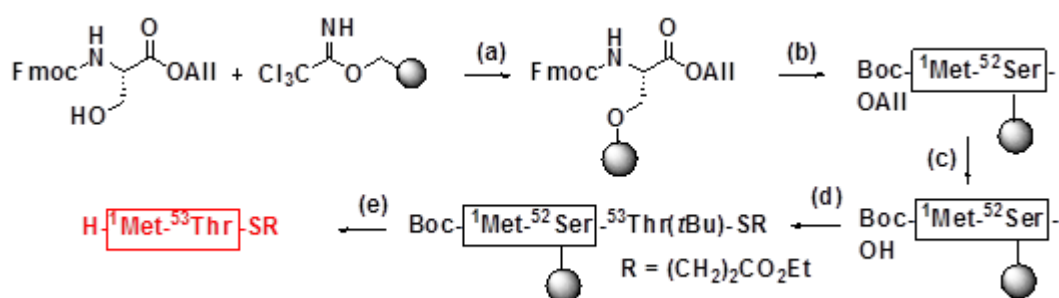


Figure 114 - Synthèse du fragment [1-53]-SR en deux étapes. Synthèse du fragment [1-52] suivie du couplage de du résidu 53 fonctionnalisé.

D.3.3 Production du fragment [54-97].

La production du fragment [54-97] se déroule de manière classique en stratégie Fmoc/tBu, comme pour le fragment d'adressage (Figure 115). J'ai réalisé la synthèse et la purification de ce fragment, qui a ensuite été utilisé pour la NCL.

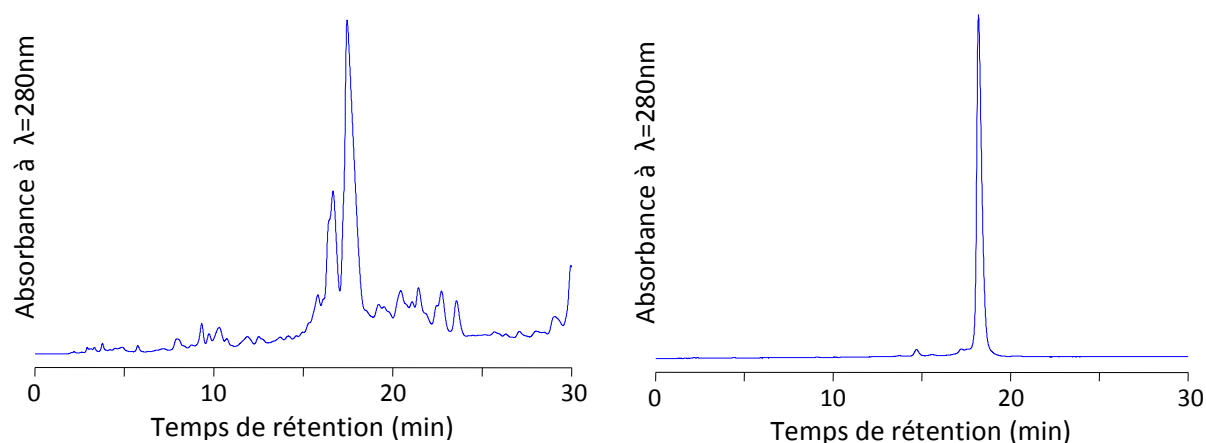


Figure 115 - Chromatogrammes HPLC du fragment [54-97] de la mitogaligine. Chromatogrammes HPLC du produit brut (gauche) et purifié (droite) : colonne C18 et gradient de 35 à 45% d'acétonitrile en 30 min. Les acides aminés en rouge ont subi un double couplage.

D.3.4 Ligation native des deux fragments de la mitogaligine.

La ligation native des deux fragments de la mitogaligine a également été réalisée par Dominique Lelièvre. Les peptides sont mis en solution dans un tampon phosphate à pH 7,5 et un catalyseur de thiol permet d'amorcer la réaction de ligation.

Généralement le thioester est activé à l'aide de 10 mM de MPAA et 1 % de benzylmercaptan ou 1 % de thiophénol, mais pour la mitogaligine 100 mM de MPAA ont été nécessaires pour obtenir une activation efficace, probablement à cause du branchement en position β du groupement thioester sur la Thréonine.

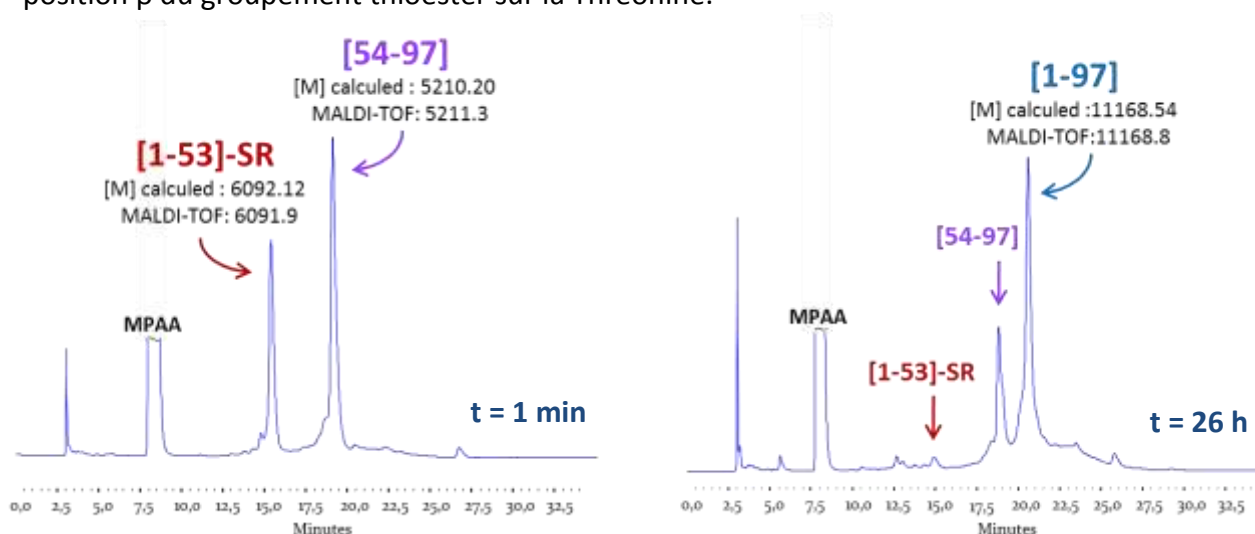


Figure 116 - Suivi HPLC de la ligation des fragments de la mitogaligine. Chromatogrammes HPLC à t=1min (gauche) et t=26h (droite) : colonne C18 et gradient de 25 à 35% d'acétonitrile en 30 min.

La réaction de ligation peut être suivie par HPLC et se termine lorsqu'un des deux fragments est totalement consommé : le fragment [54-97] étant le plus facile à produire, c'est lui qui a été mis en excès. La réaction de ligation est quasi-complète au bout de 26h (Figure 116). La mitogaligine réduite est ensuite purifiée par HPLC semi-préparative et caractérisée par MALDI-TOF.

D.4 Le repliement oxydatif.

Bien que jamais mis en évidence, il est raisonnable d'envisager que la mitogaligine « naturelle » contienne 3 ponts disulfure (6 cystéines dans la séquence), or que ce soit par synthèse chimique ou par expression bactérienne, les protéines produites sont sous formes réduites (-SH). Fréquemment, les groupements SH d'une protéine naturelle sont oxydés en ponts disulfure (-S-S-) intramoléculaires, qui confèrent une certaine rigidité à la structure 3D de la protéine.

L'étape de repliement oxydatif de la mitogaligine est en cours, mais les essais pratiqués jusqu'à maintenant indiquent des phénomènes de précipitation et/ou d'agrégation et/ou d'adsorption de la protéine réduite à pH supérieur à 6.5 (les conditions classiques de formation des ponts disulfure sont à pH 8). Le protocole de repliement oxydatif de la mitogaligine nécessite encore une mise au point particulière.

D.5 Le mécanisme d'action de la mitogaligine.

Grâce à l'étude du fragment d'adressage mitochondrial [31-53], plusieurs hypothèses concernant le mécanisme d'action de la mitogaligine peuvent actuellement être avancées. Ainsi, la mitogaligine pourrait agir à différents niveaux dans le relargage du cytochrome c.

Une interaction entre la mitogaligine et les membranes mitochondriales pourraient déstabiliser, de manière directe ou indirecte, l'interaction entre le cytochrome c et la cardiolipine, provoquant la libération du cytochrome dans l'espace inter-membranaire. Une désorganisation des lipides pourrait également provoquer l'ouverture des crêtes mitochondriales, indispensable à la redistribution du cytochrome c. L'interaction avec les lipides pourrait provoquer une perte d'intégrité de la membrane externe, provoquant la fuite du cytochrome vers le cytoplasme. Enfin, des désordres au niveau du fonctionnement général de la mitochondrie ne sont pas non plus à exclure, comme une désorganisation des lipides pouvant interférer dans les phénomènes de fusion et fission des mitochondries.

Des résultats très récents de microscopie électronique montrent que la mitogaligine serait localisée au niveau de la membrane interne des mitochondries. Le fragment d'adressage [31-53] pourrait attirer la protéine au niveau des membranes mitochondriales, et plus particulièrement au niveau des sites de jonction riches en cardiolipine. L'accumulation de matériel à la surface de la membrane pourrait la déstabiliser, facilitant ainsi le passage de la mitogaligine vers l'intérieur des mitochondries, et la localisation au niveau des sites de fusion permettrait un passage direct de la membrane externe à la membrane interne. Cette localisation au niveau de la membrane interne laisse également supposer que la mitogaligine pourrait être impliquée dans la première étape du relargage de cytochrome c, correspondant à l'accumulation du cytochrome c dans l'espace inter-membranaire. Une telle accumulation permettrait d'augmenter la quantité de cytochrome c sortant de la mitochondrie, sans pour autant déclencher l'apoptose.

PARTIE E. Conclusion générale et perspectives.

Ce travail de thèse a porté sur une nouvelle protéine impliquée dans l'apoptose, la mitogaligine, et plus particulièrement sur son fragment d'adressage mitochondrial : fragment interne [31-53].

Ce fragment d'adressage à lui seul est cytotoxique, et nous avons pu définir précisément sa toxicité sur trois types de cellules humaines : il déclenche de façon très efficace l'apoptose lorsqu'il est micro-injecté dans le cytoplasme alors qu'il n'a que très peu d'effet lorsqu'il est micro-injecté dans le noyau, et aucun s'il est à l'extérieur de la cellule. De plus, il perturbe l'intégrité membranaire, excluant certaines protéines de la mitochondrie. Or ce phénomène concorde avec le relargage de cytochrome c, à l'origine du déclenchement de l'apoptose par la voie mitochondriale.

Pour mieux comprendre le mode d'action de ce peptide sur la membrane mitochondriale et le rôle joué par la cardiolipine, lipide caractéristique de ces membranes, j'ai étudié par différentes techniques biophysiques complémentaires l'effet que le milieu membranaire avait sur la structuration du peptide et l'effet qu'avait le peptide sur la membrane.

Sans contenir de structure secondaire canonique, ni s'organiser en véritable structure amphiphile, le fragment d'adressage [31-53] de la mitogaligine a pourtant des propriétés structurales et des propriétés de surface communes aux peptides interagissant avec les membranes, comme certains peptides antimicrobiens par exemple. En effet, nous avons montré que le peptide se plaçait à plat sur la membrane, s'enfouissant dans l'interface membranaire avec les résidus tryptophanes et Leucines pointant vers les chaînes lipidiques et avec les résidus Arginines orientés vers le solvant.

Nous avons montré que le peptide ne se structurait pas particulièrement lors de l'interaction avec la membrane et qu'il n'induisait pas d'organisation des lipides dans la membrane, comme lors de la formation de pores par exemple. Nous avons mesuré une très forte affinité du fragment [31-53] de la mitogaligine pour des membranes contenant la cardiolipine (13nM), même si l'ensemble des lipides est touché de façon homogène par la présence du peptide. De plus, nous avons pu mettre en évidence que le peptide était capable d'induire une courbure positive de la membrane. Cette courbure va interférer avec tous les processus cellulaires qui impliquent des passages de la membrane en phase hexagonale inverse ou qui nécessitent une certaine flexibilité de la membrane.

En conclusion, j'ai pu établir au cours de mon travail de thèse les 1^{ères} données sur le mécanisme d'action du fragment d'adressage [31-53] de la mitogaligine. De plus, j'ai pu mettre au point l'ensemble des techniques qui pourront être utilisées pour l'étude structurale et fonctionnelle de la protéine entière.

Le fragment [31-53] de la mitogaligine humaine est particulièrement bien conservé parmi les mitogaligines de primates, mais il est le siège d'insertions et de délétions pour les espèces plus éloignées. L'adressage mitochondrial étant indispensable à la fonction pro-apoptotique de la mitogaligine, il n'est pas impossible que cette protéine possède une fonction différente en dehors des primates.

Cependant, la variation de séquence au sein du fragment [31-53] n'exclut pas totalement un adressage mitochondrial de la mitogaligine. En effet, la détermination de la structure tridimensionnelle du fragment [31-53] a montré que ce peptide n'adopte pas de structure secondaire particulière et prend une forme globalement étendue. Le fragment [31-53] pourrait tout à fait être localisé dans une boucle lorsqu'il est dans la protéine entière, dont la longueur et la composition en acides aminés varient d'une espèce à l'autre. Seule la résolution de la structure tridimensionnelle de la mitogaligine permettra de répondre à cette question.

En ce qui concerne la mitogaligine entière, j'ai participé au cours de ma thèse à sa production, qui s'est avérée très délicate aussi bien par voie d'expression que par synthèse chimique. Par voie de synthèse, la production des deux fragments synthétiques a pu être réalisée sans difficulté, ainsi que la ligation chimique. La difficulté actuelle est de solubiliser cette protéine dans des conditions compatibles avec le repliement oxydatif, notamment en termes de pH. La mitogaligine a également pu être produite dans *E. coli* mais le protocole reste à optimiser pour obtenir les quantités nécessaires aux études structurales, et le même problème se pose quant à sa manipulation au pH requis pour le repliement.

Une fois cette étape de production franchie, comme pour le fragment d'adressage mitochondrial, la résolution de la structure tridimensionnelle et l'étude de l'interaction entre la mitogaligine entière et les lipides constitutifs des membranes mitochondriales, seront entreprises pour comprendre le mécanisme d'action précis de la protéine sur la membrane mitochondriale.

Si la mitogaligine entière ne peut être produite et étudiée sous une forme stable et structurée en milieu aqueux, la résolution de sa structure tridimensionnelle sera à elle seule un nouveau challenge et nécessitera de subtils marquages et la recherche de conditions d'études adéquates : Cette protéine de séquence très originale est-elle intrinsèquement désordonnée ? Toutes les cystéines sont-elles impliquées dans des ponts disulfure ? Dans quel milieu membranaire l'étudier ?

Enfin, il ne faut pas oublier que le gène *galig*, codant la mitogaligine, est également capable de coder la cytogaligine. Cette localisation particulière des séquences codant les galigines, peut laisser supposer un fonctionnement conjoint de ces deux protéines, ou en tout cas une régulation interdépendante. Or, actuellement nous avons très peu de connaissances sur cette seconde galigine, si ce n'est sa localisation cytoplasmique. L'étude de la cytogaligine, et notamment la détermination de sa structure tridimensionnelle, devrait aider à préciser le fonctionnement et le rôle de cette protéine. De plus, elle pourrait également apporter de nouveaux indices quant au mécanisme d'action de la mitogaligine.

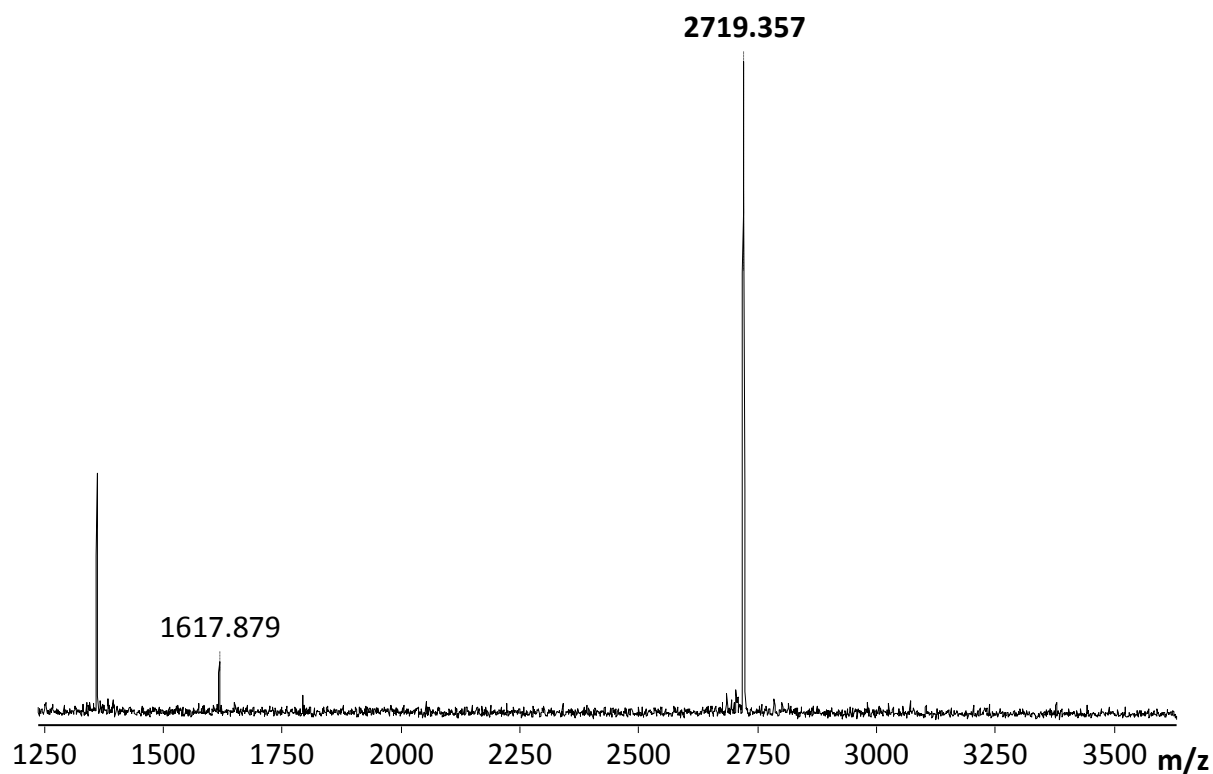
Annexe 1 - Caractérisation des peptides synthétisés

Peptide		Séquence	Masse moléculaire monoisotopique	
			Théorique	Exp.
1	Mitogaligine [31-53]	Ac-RGLSWTGTSRRLPWSTWLSRST-NH ₂	2718.41 (C ₁₂₀ H ₁₈₇ N ₃₉ O ₃₄)	2718.45
2	Mitogaligine [31-53] Mutant W5F-W14F	Ac-RGLSFTGTSRRLPFSTWLSRST-NH ₂	2640.39 (C ₁₁₆ H ₁₈₅ N ₃₇ O ₃₄)	2640.32
3	Mitogaligine [31-53] Mutant W5F-W17F	Ac-RGLSFTGTSRRLPWSTFSLRST-NH ₂	2640.39 (C ₁₁₆ H ₁₈₅ N ₃₇ O ₃₄)	2640.37
4	Mitogaligine [31-53] Mutant W14F-W17F	Ac-RGLSWTGTSRRLPFSTFSLRST-NH ₂	2640.39 (C ₁₁₆ H ₁₈₅ N ₃₇ O ₃₄)	2640.46
5	TAMRA – Mitogaligine [31-53]	TAMRA-RGLSWTGTSRRLPWSTWLSRST-NH ₂	3089.53 (C ₁₄₃ H ₂₀₅ N ₄₀ O ₃₈)	3089.63
6	Cytogaligine [70-89]	Ac-ESTQGHPAALGPTHLLDSQV-NH ₂	2098.06 (C ₉₀ H ₁₄₄ N ₂₈ O ₃₀)	2098.90
7	TAMRA – Cytogaligine [70-89]	TAMRA-ESTQGHPAALGPTHLLDSQV-NH ₂	2469.18 (C ₁₁₃ H ₁₆₂ N ₂₉ O ₃₄)	2469.00

Les masses inscrites sur les spectres MALDI-TOF des peptides n°1 à 4 correspondent aux masses des espèces monoprotonées : $[MH^+] = \text{Masse monoisotopique} + 1,0078$

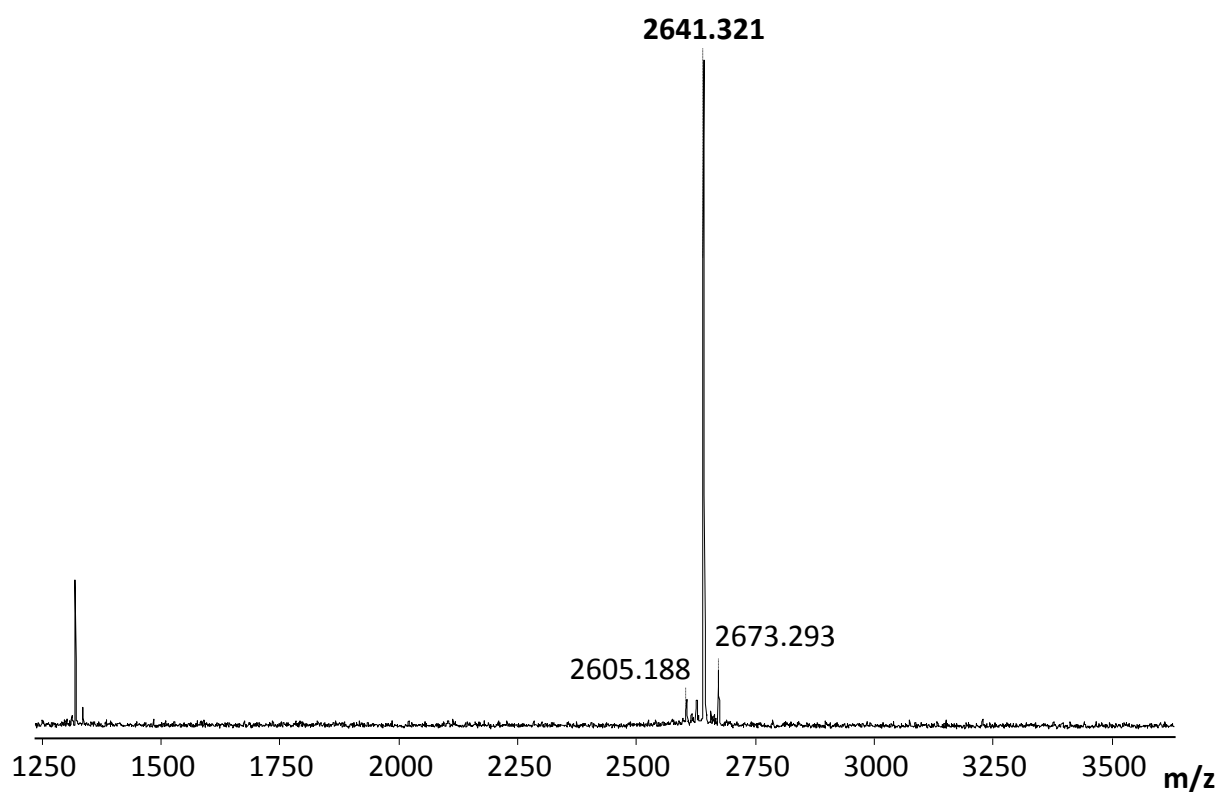
Peptide n°1

Mitogaligine [31-53] natif acétylé



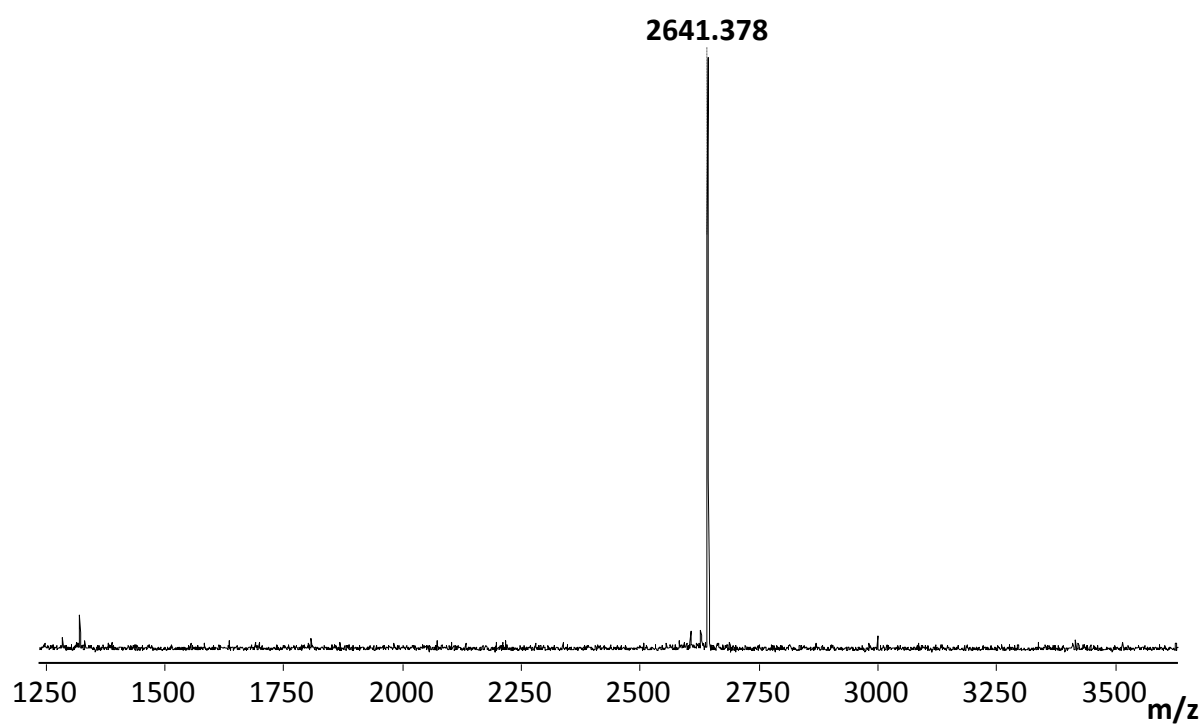
Peptide n°2

Mitogaligine [31-53] mutant W5F-W14F



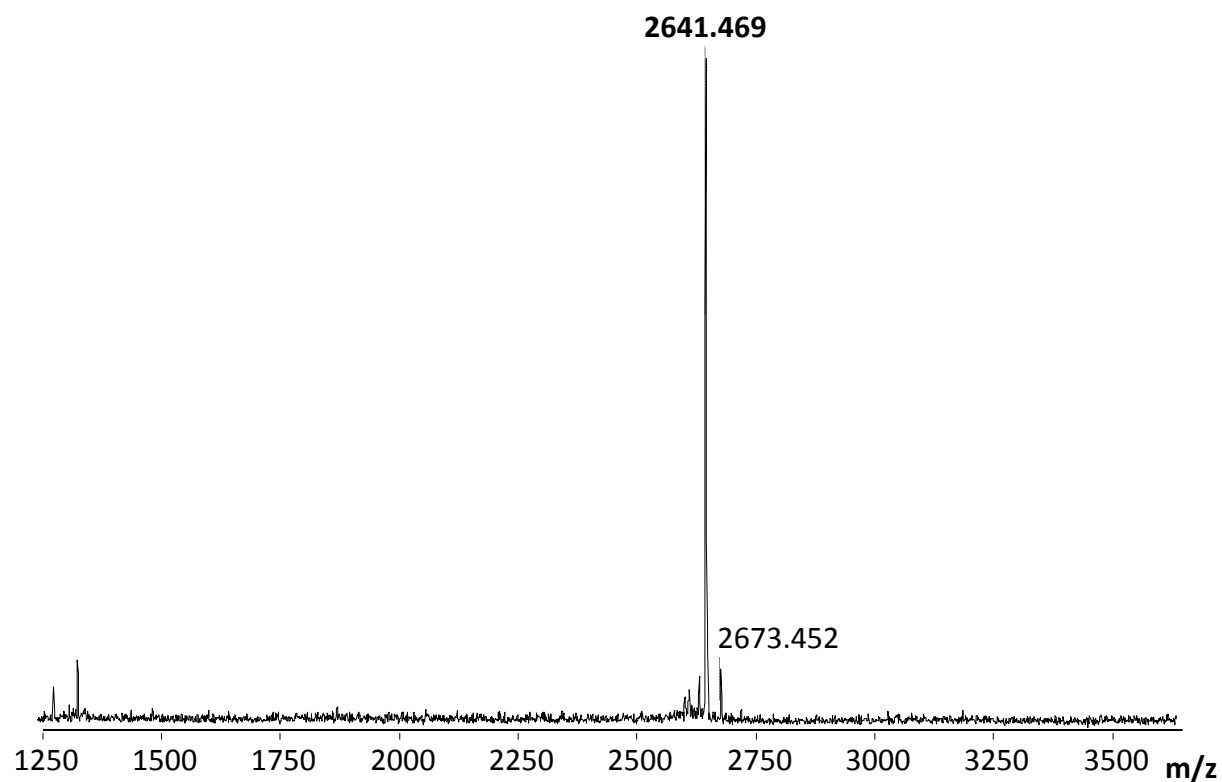
Peptide n°3

Mitogaligine [31-53] mutant W5F-W17F

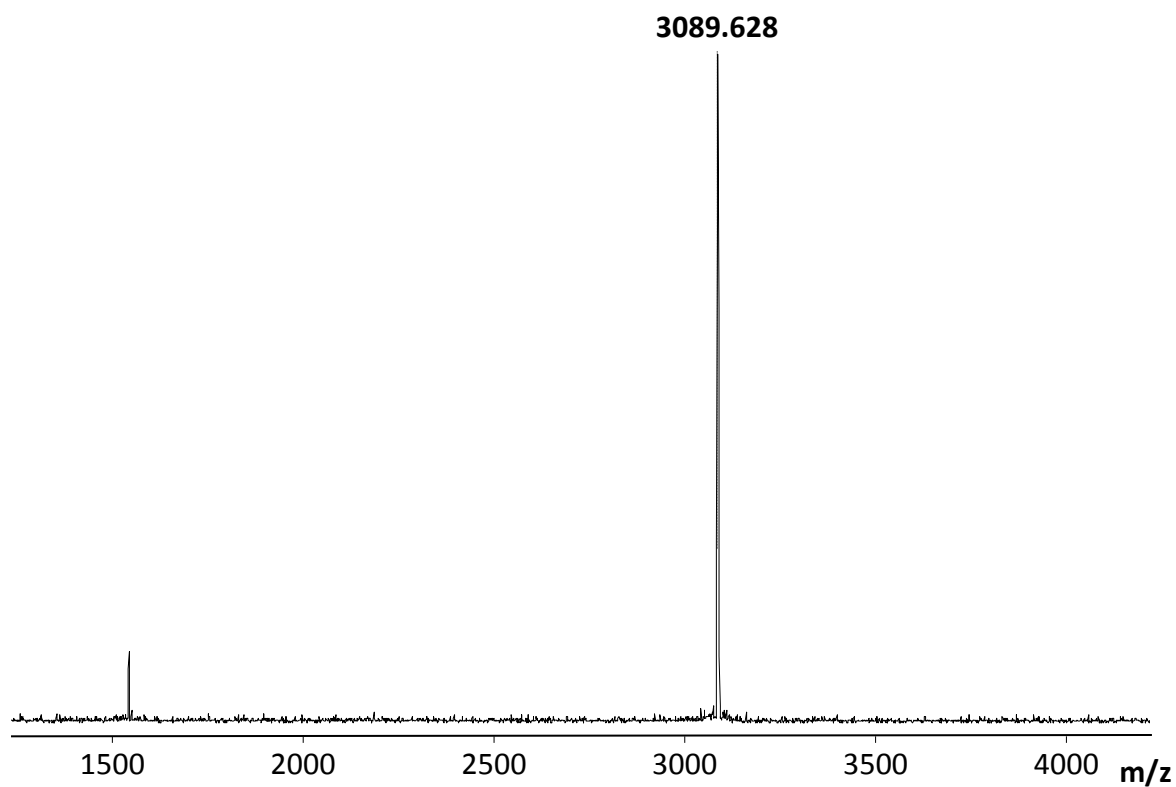


Peptide n°4

Mitogaligine [31-53] mutant W14F-W17F

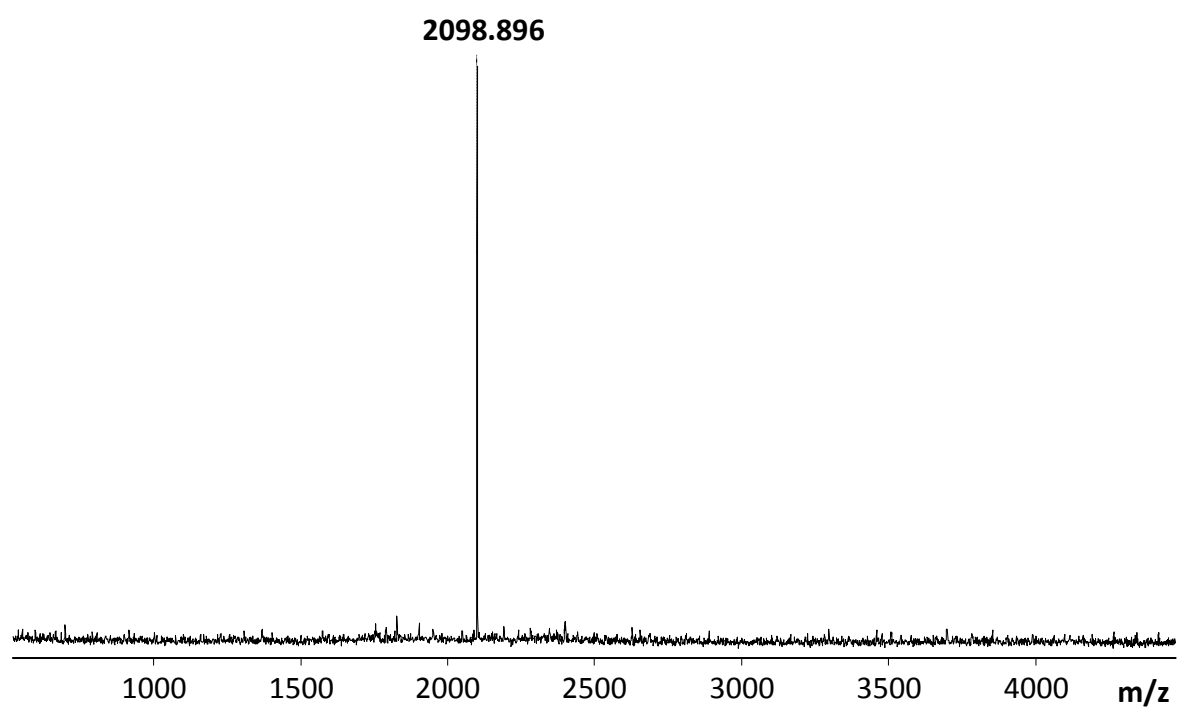
**Peptide n°5**

TAMRA - Mitogaligine [31-53] natif



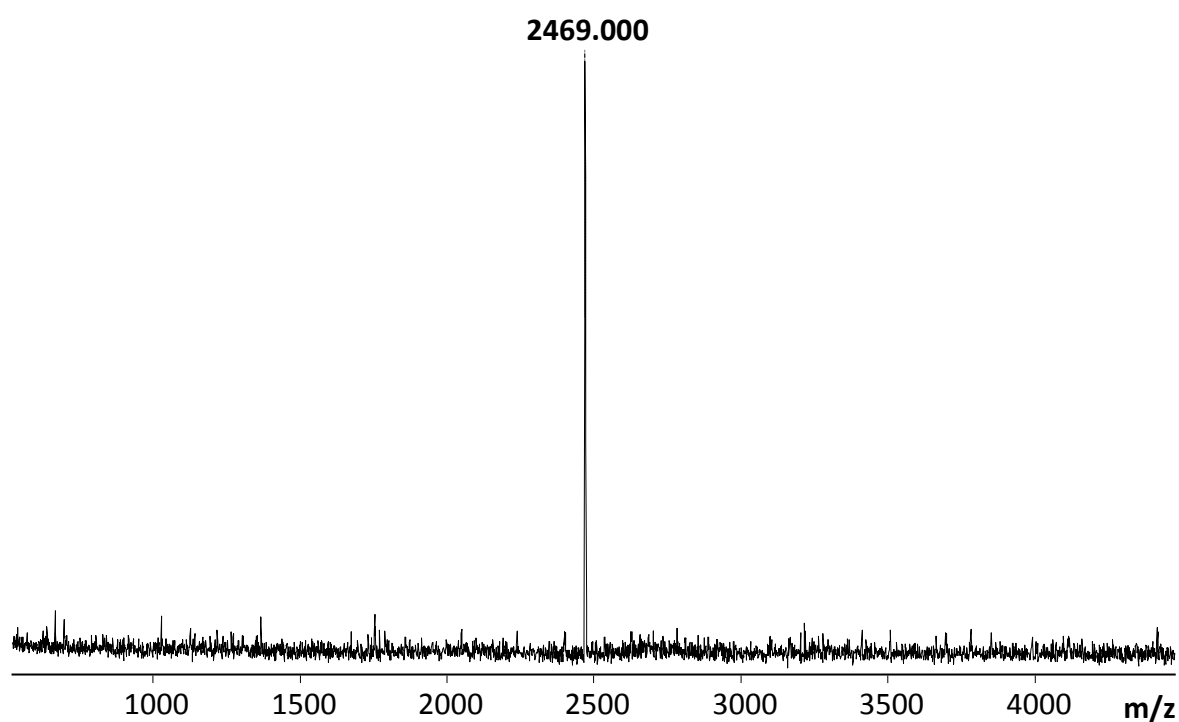
Peptide n°6

Cytogaligine [70-89]



Peptide n°7

TAMRA - Cytogaligine [70-89]



Annexe 2 – Table des déplacements chimiques du fragment [31-53] (1mM) dans le SDS (100mM) à pH 5,5 et 35°C.

Résidu	N	HN	HA	HB	HG	HD	HE	HZ	HH	NE
1 ARG	125,34	8,25	4,32	HB1 1,83 HB2 1,91	HG1 2,00 HG2	HD1 3,30 HD2	7,24			79,92
2 GLY	108,51	8,50	HA1 4,03 HA2							
3 LEU	120,74	7,78	4,42	HB1 1,79 HB2 1,70	1,50	HD11 0,99 HD21 0,97				
4 SER	115,52	8,23	4,60	HB1 3,96 HB2						
5 TRP	122,92	8,08	4,86	HB1 3,41 HB2		7,37	HE1 10,06 HE3 7,67	HZ2 7,50 HZ3 7,13	7,18	129,04
6 THR	113,87	7,92	4,34	*	1,18					
7 GLY	109,78	7,49	HA1 3,89 HA2 4,04							
8 THR	112,61	7,91	4,52	4,42	1,35					
9 SER	117,73	8,35	4,59	HB1 4,02 HB2						
10 ARG	122,22	8,20	4,50	HB1 1,93 HB2 1,78	HG1 2,02 HG2	HD1 3,28 HD2	7,20			79,50
11 ARG	*	8,17	4,47	HB1 1,84 HB2	HG1 1,98 HG2 1,76	HD1 3,30 HD2	7,20			79,80
12 LEU	123,06	7,98	4,44	HB1 1,54 HB2 1,53	0,87	HD11 1,05 HD21 0,95				
13 PRO			4,54	HB1 2,08 HB2 1,95	HG1 1,99 HG2 1,57	HD1 3,66 HD2 3,08				
14 TRP	118,62	7,24	4,31	HB1 3,30 HB2 3,22		7,31	HE1 10,10 HE3 7,60	HZ2 7,54 HZ3 7,12	7,20	129,83
15 SER	114,16	8,09	4,44	HB1 4,01 HB2 3,89						
16 THR	114,38	7,82	4,40	4,31	1,22					
17 TRP	123,78	7,91	4,85	HB1 3,40 HB2 3,41		7,29	HE1 9,91 HE3 7,54	HZ2 7,44 HZ3 6,88	7,10	128,35
18 SER	115,65	8,19	4,49	HB1 3,95 HB2						
19 LEU	123,06	7,97	4,44	HB1 1,80 HB2 1,77	1,76	HD11 1,05 HD21 1,04				
20 SER	115,65	8,20	4,55	HB1 4,02 HB2						
21 ARG	121,57	8,10	4,46	HB1 1,77 HB2 2,03	HG1 1,90 HG2	HD1 3,24 HD2	7,16			80,18
22 SER	115,79	8,28	4,60	HB1 4,03 HB2						
23 THR	115,35	8,05	4,43	4,43 1,35						

Seuls le N de R11 et HB de T6 manquent (*).

Annexe 3 - Communications orales et écrites.

Pendant ma thèse j'ai eu régulièrement l'opportunité de présenter mes travaux au cours de conférences orales :

- "Etude structurale et fonctionnelle du fragment d'adressage de la mitogaligine, une protéine de l'apoptose"

22^{ème} Colloque Biotechnocentre (*Seillac, France*) 22-23 Octobre 2009 (présentation d'affiche)

- "Etude structurale et fonctionnelle de la mitogaligine, une nouvelle protéine de l'apoptose"

Réunion RMN Biologique d'Ile de France (*Saclay, France*) 26 Novembre 2009

- "Etude structurale et fonctionnelle d'un peptide cytotoxique : le fragment d'adressage mitochondrial de la mitogaligine"

17^{ème} réunion GFPP (Groupe Français des Peptides et des Protéines) (*Aussois, France*)

30 Janvier – 4 Février 2011

J'ai également été sollicitée pour présenter les résultats obtenus en RMN du solide devant l'ensemble de la communauté française RMN au cours de la 3^{ème} journée utilisateur du TGIR-RMN :

- "Interactions du fragment d'adressage mitochondrial de la mitogaligine avec des membranes modèles"

3^{ème} journée des utilisateurs du TGIR-RMN Très Haut Champs (*Orléans, France*) 8 Novembre 2011

Mes travaux ont régulièrement fait l'objet de communications par affiche, dont récemment à l'ICMRBS à Lyon :

- Violette Senille, Sandrine Villette, Alain Legrand, Agnès Delmas and Céline Landon

"Etude structurale et fonctionnelle du fragment d'adressage de la mitogaligine, une protéine de l'apoptose"

22^{ème} Colloque Biotechnocentre (*Seillac, France*) 22-23 Octobre 2009

- Violette Senille, Olivier Delalande, Sandrine Villette, Alain Legrand, Agnès Delmas and Céline Landon

"Structural and functional studies of a fragment of mitogaligin, a protein involved in apoptosis"

NMR : a tool for Biology IX (*Paris, France*) 25-27 Janvier 2010

- Violette Senille, Olivier Delalande, Sandrine Villette, David Gosset, Martine Dubois, Alain Legrand, Dominique Lelièvre, Agnès Delmas, Céline Landon.

"Mitogaligin's addressing peptide involved in apoptosis: structural and functional studies"

Probes for peptide science: design and methodological development (*Paris, France*)

8 et 9 Avril 2010

- Violette Senille, Olivier Delalande, Sandrine Villette, David Gosset, Martine Dubois, Alain Legrand, Dominique Lelièvre, Agnès Delmas, Céline Landon.

“Etude du fragment d’adressage mitochondrial de la mitogaligine, une protéine pro-apoptotique”

XXII^{ème} congrès de la SFB (Société Française de Biophysique) (*La Colle-sur-Loup, France*)

28 Septembre – 1^{er} Octobre 2010

- Violette Senille, Cécile Courrèges, Isabel Alves, Karine Loth, Dominique Lelièvre, Norbert Garnier, Ned Lamb, Alain Legrand, Agnès Delmas, Erick Dufourc, Céline Landon.

“How the addressing fragment of a cell death protein, Mitogaligin, interacts with mitochondrial membrane ?”

XXVth ICMRBS (International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems)

(*Lyon, France*) 19-24 Août 2012

Enfin, deux publications dont je suis le premier auteur finaliseront le travail sur le fragment d’adressage et une 3^{ème} publication à plus long terme concernera la mitogaligine entière.

The addressing fragment of mitogaligin: First insights into functional and structural properties.

Violette SENILLE^[a], Dominique LELIEVRE^[a], Françoise PAQUET^[a], Norbert GARNIER^[a],
Ned LAMB^[b], Alain LEGRAND^[a], Agnès F. DELMAS^[a], Céline LANDON^{[a],*}

^[a]Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, affiliated to the University of Orléans,
rue Charles Sadron, 45071 Orléans cedex 2, France.

^[b]Institut de Génétique Humaine, CNRS UPR1142, 141 rue de la Cardonille, 34396 Montpellier cedex 5, France

Sous presse dans le journal CHEMBIOCHEM, il est inclus dans les pages qui suivent.

The addressing fragment of mitogaligin : Affinity and positive curvature of cardiolipin containing membranes.

Violette SENILLE¹, Cécile COURREGES², Isabel ALVES³, Karine LOTH¹, Dominique LELIEVRE¹,
Alain LEGRAND¹, Agnès DELMAS¹, Erick DUFOURC³, and Céline LANDON^{1,*}

¹CBM, CNRS UPR4301, rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 2, France.

²IECB, UMS 3033, 33607 Pessac, France

³CBMN-UMR 5248, b.at 14bis, allée Saint Hilaire, 33600 Pessac, France

En cours de rédaction, il sera soumis à BBA Biomembranes.

The addressing fragment of mitogaligin: First insights into functional and structural properties.

Violette SENILLE^[a], Dominique LELIEVRE^[a], Françoise PAQUET^[a], Norbert GARNIER^[a], Ned LAMB^[b],
Alain LEGRAND^[a], Agnès F. DELMAS^[a], Céline LANDON^{[a],*}

^[a]Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, affiliated to the University of Orléans, rue Charles Sadron, 45071 Orléans cedex 2, France.

^[b]Institut de Génétique Humaine, CNRS UPR1142, 141 rue de la Cardonille, 34396 Montpellier cedex 5, France

Keywords : Apoptosis, coarse-grained simulation, cytotoxic peptide, micelles, NMR structure

Abbreviations : AMPs, antimicrobial peptides; Boc, *tert*-butyloxycarbonyl; CG, coarse-grained ; CL, cardiolipin; CD, circular dichroism; CPPs, cell-penetrating peptides ; CTMP, carboxy-terminal modulator protein; DHPC, 1,2-dihexanoyl-glycero-3-phosphocholine; DMPC, 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DOPC, dioleoyl-phosphatidylethanolamine; DOPE, dioleoyl-phosphatidylcholine; DPC, dodecyl-phosphocholine; Gd(DTPA-BMA), gadolinium-diethylenetriamin pentaacetic acid-bismethylamide or gadodiamide ; HBTU, 2-(1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate; HOBt, N-hydroxybenzotriazole; HSQC, heteronuclear single quantum coherence; NMP, *N*-Methyl-2-pyrrolidone; NMR, nuclear magnetic resonance; NOE, nuclear Overhauser effect; NOESY, nuclear Overhauser effect spectroscopy; Pbf, 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl; PBS, phosphate buffered saline; P/L ratio, peptide/lipide ratio; SDS, sodium dodecyl sulphate; *t*Bu, *tert*-butyle; TFA, trifluoroacetic acid; TFE, trifluoroethanol; TOCSY, total correlation spectroscopy; Trt, triphenylmethyl (trityl).

ABSTRACT

Mitogaligin is a novel mitochondrial targeting protein involved in cell death. The sequence of the protein is unrelated to that of any known pro- or anti-apoptotic protein. Mitochondrial targeting is controlled by an internal sequence from residues 31 to 53, and while this sequence is essential and sufficient to provoke cell death, the precise mechanism of action at the mitochondrial membrane remains to be elucidated. Here, focusing on the [31-53] fragment, we first assessed and confirmed its cell cytotoxicity by microinjection. Subsequently, through membrane models, we evaluated the impact of the membrane environment on the 3D structure of the peptide and on how the peptide is embedded and oriented within membranes. The fragment is well organized, even though it does not contain a canonical secondary structure and adopts an interfacial location. Structural comparison with other membrane interacting Trp-rich peptides demonstrated similarities with the antimicrobial peptide tritricidin.

INTRODUCTION

The human gene *galig*, an internal gene embedded within *galectin-3*^[1], could be involved in the physiological cell death pathways that maintain homeostasis. The expression of *galig* in human cells causes severe morphological alterations, leading to

cell death^[2]. These dysfunctions are associated with the release from the mitochondria of cytochrome c, a well-known cell death effector commonly used as an index of cell death implicating mitochondrial pathways^[3]. By use of two overlapping open reading frames, *galig* is translated into two completely different proteins unrelated to

galectin-3, mitogaligin and cytogaligin that target distinct sub-cellular sites, the mitochondria and the cytosol, respectively. Co-transfection of *galig* with the anti-apoptotic protein Bcl-x_L, a member of the Bcl-2 protein family, significantly reduces the release of cytochrome c and increases cell survival^[2], suggesting that *galig*-induced proteins and Bcl-x_L share a common pathway. In contrast, this protective effect against *galig*-induced cell death is not detected with Bcl-2, which does not antagonize apoptosis in the same way^[4].

In the present work, we have focused on mitogaligin, a highly positive 97-residue protein (12 arginines) unusually rich in tryptophan for a human protein (12 tryptophans), the sequence of which is unrelated to any known pro- or anti-apoptotic protein. Its sequence correlates with mitochondrial-imported proteins^[5], known to be rich in basic, hydrophobic, and hydroxylated residues. Moreover, its high content of tryptophan makes it resemble antimicrobial peptides (AMPs) and is certainly involved in its membrane localization and/or addressing.

The mitochondrial targeting of mitogaligin is controlled by an internal sequence^[2], which is essential and sufficient to provoke cytochrome c release and subsequent cell death. It was first predicted to span residues 35 and 53 of the protein^[6], and has since been more precisely delineated to residues 31 to 53 by use of EGFP-based reporters^[2]. Incubation of the [31-53] peptide with isolated mitochondria promotes the release of a substantial amount of cytochrome c, suggesting a direct interaction between the peptide and the mitochondrial membrane before triggering cell death^[2]. Accordingly, previous *in vitro* studies using liposomes of various compositions indicate that cardiolipin, a unique mitochondria-specific phospholipid, is involved^[7]. However, the precise interaction of this cytotoxic peptide at the mitochondrial membrane remains to be elucidated.

Here, we report on the *in cell* cytotoxicity of the [31-53] fragment assessed after microinjections and provide evidence for a major perturbation of the mitochondrial distribution. Subsequently, we evaluate through membrane models mimicking the

mitochondrial membrane, the impact of the membrane environment on the 3D structure of the [31-53] peptide and on how the peptide is embedded and oriented within the membrane.

EXPERIMENTAL SECTION

Peptide sequences

The [31-53] mitogaligin peptide and three mutants (W35F-W44F, W35F-W47F and W44F-W47F) were synthesized along with a control peptide based on the [70-89] fragment of cytogaligin known to be non-toxic for mammalian cells^[2].

1: [31-53] mitogaligin peptide
Ac-RGLS**W**TGTSRRLP**W**ST**W**SLSRST-NH₂

2: [31-53]W35F-W44F mutant
Ac-RGLS**F**TGTSRRLP**F**ST**W**SLSRST-NH₂

3: [31-53]W35F-W47F mutant
Ac-RGLS**F**TGTSRRLP**W**ST**F**SLSRST-NH₂

4: [31-53]W44F-W47F mutant
Ac-RGLS**W**TGTSRRLP**F**ST**F**SLSRST-NH₂

5: [70-89] cytogaligin peptide
Ac-ESTQGHPAALGPThLLDSQV-NH₂

Solid Phase Peptide Synthesis

All peptides were synthesized on an automated 433A synthesizer (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France) using standard Fmoc/*t*Bu chemistry at a 0.1 mmol scale with ChemMatrix® as the solid support, HBTU/HOBt as coupling reagent and 20% piperidine in NMP for deprotection. Elongation was performed automatically using a 10-fold excess of protected amino acids and coupling reagents. The protecting groups used for the side chains were Pbf for arginine, Boc for tryptophan, *t*Bu for serine, threonine, aspartic acid and glutamic acid, and Trt for glutamine and histidine. A final acetylation was also performed with acetic anhydride.

On completion of the peptide elongation, the peptide resin was transferred into a polypropylene syringe fitted with a polypropylene frit (Torvig, Niles, USA) and treated with a mixture of TFA/H₂O/*i*Pr₃SiH/Phenol/Dodecanethiol (84:5:1:5:5) for 4 h. After filtration, the peptide was precipitated with cold diethyl

ether, recovered by centrifugation, and washed three times with diethyl ether. The pellet was dissolved in H₂O/MeCN (4:1) with 0.1% TFA. The overall yields of purified peptides (from aminomethyl ChemMatrix® resin) were between 31% and 52%.

Analysis and purification

The crude peptides were analyzed and purified by RP-HPLC (Reversed Phase – High-Performance Liquid Chromatography) (Supp data 1 & 2) and characterized by MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Time of Flight) mass spectrometry (Supp data 3). HPLC analyses were carried out on a LaChrom 7000 system equipped with a Merck-Hitachi L-7100 pump and a Merck-Hitachi L-7455 diode array detector with a Merck-Hitachi D-7000 interface, which was also used for purification. The machines were equipped with C18 reversed-phase columns, Nucleosil, 300 Å, 5 µm, 250 mm x 4.6 mm for the analytical separations, or 250 mm x 10.5 mm for purification. Solvents A and B containing 0.1 % of TFA were H₂O and MeCN, respectively. Mass spectrometry analyses were performed on an Autoflex MALDI-TOF instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) using α-cyano-4-hydroxycinnamic acid as the matrix.

Incubation of HeLa cells

Incubation of HeLa cells was performed by diluting the peptide solution (6 mM in PBS) directly into the cell culture medium, in order to obtain a final concentration ranging from 200 to 400 µM of the [31-53] peptide. Several pictures were recorded during 60 min, using a Zeiss AxioVert microscope (Supp data 4).

Microinjection and immunofluorescence

Experiments were performed using three different cell types, U2OS osteosarcoma epithelial cells, primary human myoblasts (HMM) and immortalized human fibroblasts (T11). Each series was repeated in triplicate. Cells were microinjected, fixed, processed for immunofluorescence and photographed as described previously^[8,9]. Peptides were diluted in 0.5 x PBS (70 mM NaCl, 1.5 mM KCl, 0.75 mM KH₂PO₄, 4 mM Na₂HPO₄, pH 7.3). Concentrations refer to the concentrations in

the microinjection needle. For subsequent identification of injected cells, and localization of the microinjected compounds, peptides were routinely co-injected with inert marker antibodies (rabbit IgGs).

To confirm cytotoxicity, human fibroblasts were labeled for 16 hours with 20 µM resazurin (Vybrant, Molecular Probes, Invitrogen, Les Ulis cedex, France) from a 20 mM stock solution in water added directly to the cell culture media. After confirming that cells were loaded with red resorufin fluorescent, cells were microinjected with i) an inert antibody alone, ii) an inert antibody and 40 nM of a control peptide ([70-89] cytogaligin peptide), or iii) an inert antibody and 40 nM of the [31-53] mitogaligin peptide. After overnight incubation, cells were fixed and stained for the inert antibody and the number of resorufin positive cells counted. Experiments were repeated twice.

Human fibroblasts were transfected for 24 hours with an N-terminal-mCherry tagged human CTMP¹, a protein known to be distributed between the plasma membrane and mitochondrial compartments^[10], using Liopfectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Then, suitable cells (not cells highly over-expressing mCherry-CTMP) were microinjected with either the control peptide or the [31-53] mitogaligin peptide (40 nM), and the inert rabbit marker. After different times of incubation, cells were fixed and stained for the marker antibody. Experiments were repeated in triplicate.

Circular Dichroism experiments

The CD experiments were carried out in a Jasco J-810 spectropolarimeter at room temperature, in a 1 mm-path-length quartz cell. Spectra were scanned from 180 to 260 nm at 100 nm.min⁻¹ using a 1 nm band width, and analyzed with CDPro software^[11]. The final spectra were the average of 3 scans from which a blank spectrum had been subtracted. Solutions containing 0.1 mg/mL of the [31-53] fragment (36.7 µM) were used to record CD spectra with i) an increasing

¹ C-terminal modulator protein of the insulin signaling kinase Akt1

content of trifluoroethanol (TFE), ii) 10 mM sodium dodecyl sulphate (SDS) micelles, iii) 20 mM dodecyl-phosphocholine (DPC) micelles, iv) bicelles of DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) and DHPC (1,2-dihexanoyl-glycero-3-phosphocholine).

A ratio of 3 DMPC for 1 DHPC was chosen to obtain a planar bilayer capable of integrating cardiolipin (CL). Although 20% CL would have been a better representative of mitochondrial junction sites, only 10% of CL was integrated to stable bicelles in order to avoid precipitation^[12]. The peptide/lipid ratio (P/L) was 1/50.

Fluorescence spectroscopy

Tryptophan fluorescence was measured at room temperature in a Jobin Yvon FluoroMax2 Spectrometer. All measurements were made with a 3 mm path-length fluorescence quartz cell on 100 μ L solution samples used for CD experiments (see above). Tryptophan fluorescence was excited at 280 nm and the emission was scanned between 285 and 500 nm (1 scan/sec, every nm, and excitation and emission slits of 2 nm). The data were normalized and origin software v8.0 (Microcal, Northampton, MA) was used to determine the maximum of emission.

Three-dimensional NMR structure

A standard set of 2D ^1H -NMR TOCSY (120 ms) and NOESY (120 ms) was performed, on a 1 mM solution of the [31-53] fragment in 100 mM deuterated SDS at pH 5.5, and at 308 K. In order to compare chemical shifts of the peptide in water and in SDS micelles, ^{15}N -HSQC (natural abundance) were performed. All spectra were recorded on a VARIAN INOVA 600 MHz spectrometer. The NMR data sets were processed using the NMRPipe/NMRDraw software package^[13]. ^1H chemical shifts were assigned according to classical procedures. NOE cross-peaks were integrated and assigned within the NMRView software^[14] and structure calculations were performed with the ARIA 2 software^[15]. The calculations were initiated using the default parameters of ARIA and a first set of easily assigned NOEs. At the end of each run, the new assignments proposed by ARIA were checked manually and introduced (or not) in the following calculation. This iterative

process was repeated until complete assignment of the NOESY map. A last run of 1000 structures was then performed with the final list of NOE derived distance restraints, and 100 structures were refined in the last step of calculation. The 10 structures without residual NOE violation and with the lowest residual NOE energy were selected and considered as representative of the peptide structures. Representation and quantitative analysis of the calculated structures were performed using MOLMOL^[16] and in-house programs.

Paramagnetic NMR

Two samples containing the [31-53] fragment (1 mM) in 100 mM SDS at pH 5.5 were prepared. Two datasets of 2D ^1H -NMR Watergate TOCSY (120ms) were acquired at 308 K, either with increasing amounts of MnCl_2 , from 0.1 to 1.5 mM final concentration, or with an increasing amount of Gd(DTPA-BMA) paramagnetic agent (gadodiamide). Similar experiments were performed on 100 mM SDS micelles, without peptide, with a Mn^{2+} concentration range from 0.1 to 0.5 mM, or with a Gd (DTPA-BMA) concentration range from 0.1 to 2.0 mM. The intensity of correlation peaks was plotted against the paramagnetic concentration, using the NMRView software^[14]. Peak intensity followed a decreasing exponential curve.

Dynamics

To study the addressing of the [31-53] mitogaligin peptide to the mitochondrial membrane, coarse-grained (CG) molecular dynamics simulations were performed in a membrane model. The MARTINI force field^[17,18] was used to describe the peptide, the lipids (DOPC, DOPE and cholesterol), the ions (Na^+ and Cl^-) and water. The cardiolipin (CL) coarse-grained parameters and coordinates were kindly provided by Martin Dahlberg^[19]. The coarse-grained model for the peptide was determined from the three dimensional NMR structure. Two different kinds of simulation were carried out. In the first simulation, the peptide was combined with randomly positioned CG DOPC(60), DOPE(45), cholesterol(15), Cl^- ions(4), Na^+ ions(30) and CL(30) molecules. The system was energy-minimized in

500 steps using the steepest descent method, solvated with 1740 CG water molecules and energy minimized again. A 2 μ s production period was then performed on the current system with a time step of 25 fs. The temperature was kept at $T=310$ K with a Berendsen thermostat with a coupling constant of 1 ps. The pressure was isotropically coupled at 1 bar with a Berendsen barostat, a 1 ps coupling constant and a compressibility of 3.10^{-5} bar $^{-1}$.

In the second simulation, the peptide was introduced into a pre-equilibrated bilayer model (DOPC(53), DOPE(39), cholesterol(15), Cl $^{-}$ ions(4), Na $^{+}$ ions(24) and CL(24) molecules) at a distance of 6 nm from the bilayer interface. After energy minimization, a 2 μ s production period was performed using the same parameters as previously described. All calculations were performed using the GROMACS software package, version 4.5 $^{[20]}$ on a multi-processor (Linux Beowulf clusters) with four dual 3.06 GHz Intel Xeon processors. For each simulation type three independent simulations were performed corresponding to different initial CG models.

RESULTS

Peptide Toxicity in living culture cells

The intrinsic cytotoxicity of the [31-53] mitogaligin peptide was assessed after direct micro-needle microinjection into human cells. No cytotoxicity was observed 24 hours after microinjection of the control peptide (40 nM, Figure 1A-B) even at high concentrations (300 nM, Supp data 5). This absence of cytotoxicity was comparable to the effects of injecting either the buffer alone, or the inert rabbit marker antibodies alone.

In contrast, microinjection of the [31-53] mitogaligin peptide (40 nM) in the cytoplasm induced visible toxic effects on cells in few minutes. Considering a dilution factor of 1/20 – 1/10 during injection, this represents a biologically-relevant intracellular concentration between 2 and 4 nM. Figure 1C-D depicts the effect within 90 minutes after injection. An overall cytotoxicity (around 98 %) was reached between 90 minutes and 24 hours. At concentrations below 40 nM, a near

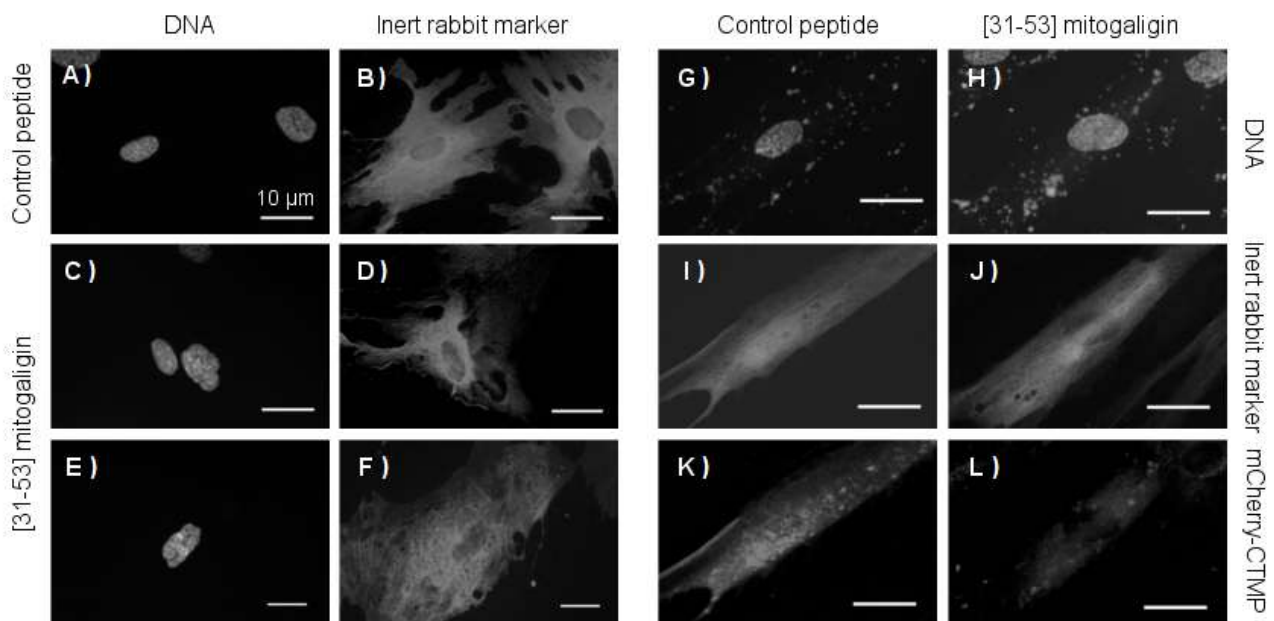


Figure 1: Microinjection experiments with [31-53] mitogaligin injected into human cells. Human fibroblasts were microinjected with peptides in the presence of an inert rabbit marker for subsequent identification of injected cells. Left: At different times after injection, cells were fixed and stained for DNA or inert rabbit marker antibody. Panels A-B are typical images of cells injected with 40 nM of the control peptide in the cytoplasm (incubated overnight); panels C-D are typical of cells injected with 40 nM of the [31-53] mitogaligin peptide in the cytoplasm (after 90 minutes); Panels E-F show cells injected with the [31-53] mitogaligin peptide in the nucleus (after 90 minutes). Right: Cells were fixed and stained for DNA or inert rabbit marker antibody. Column G/I/K displays the distribution of mCherry-CTMP in the mitochondria and membrane in cells injected with control peptide whereas column H/J/L evidences the loss of this signal in cells injected with the [31-53] mitogaligin peptide.

linear decrease was observed down to 6 nM (in the needle), at which point no more cytotoxic effect was detected. Cytotoxicity of the [31-53] peptide was accompanied by the formation of actin stress fibers, detachment of the peripheral regions of the cells, and finally cell death with or without complete loss of adhesion. These effects of mitogaligin peptide injection were independent of the cell type used (Supp data 5). Interestingly, when the peptide was microinjected into the nucleus the cytotoxicity was dramatically reduced (Figure 1 E-F & Supp data 6). A potential explanation for this reduced toxicity lies in the highly basic nature of the mitogaligin peptide. This would favor not only nuclear localization but also a strong interaction with DNA, thus retaining the peptide in the nucleus despite its small size which would normally allow easy interchange between the nuclear and cytoplasmic compartments.

Cytotoxicity was also assessed after incubating cells with resazurin (Vybrant) for 16 hours. In healthy cells, resazurin is converted into resorufin, a highly red fluorescent molecule which can be detected in living or fixed cells. Cells microinjected with inert antibodies alone or antibodies and control peptide showed bright internal fluorescence for resorufin 90 minutes after injection. In contrast, in cells microinjected with 40 nM of the [31-53] mitogaligin peptide, resorufin red fluorescence could no longer be detected 90 minutes after injection (Supp data 7). These data confirm the cytotoxic effects of the [31-53] mitogaligin fragment.

We next examined whether microinjection of the [31-53] peptide into the cytoplasm would alter mitochondrial behavior in living culture cells. Our initial attempts were conducted using classical mitochondrial tracers (rhodamine 123, mitotracker), but after the recovery time (30 minutes at 37°C) tracer signals were completely lost. We therefore chose to follow the effect of the [31-53] mitogaligin fragment on the localization of CTMP, a known mitochondrial protein, distributed in both the mitochondrial membrane and cytoplasm. Injection of the control peptide did not disrupt this pattern (Figure 1 column G/I/K). In contrast, in cells microinjected with the [31-53] mitogaligin fragment, the signal for mCherry-CTMP was

significantly attenuated and mitochondrial localization was lost (Figure 1 column H/J/L). While the overall number of double injected cells was relatively low (25), the effect observed was constant. These data suggest first that the [31-53] mitogaligin peptide was toxic, and second that at least a part of this toxicity stemmed from an effect at the mitochondrial membrane.

Interaction with membrane models

When excited at 280 nm, tryptophan fluorescence emission is dependent on the polarity of the local environment and on the presence of quenchers. The unique tryptophan residue present in each of the three mutants (W35F-W44F, W35F-W47F and W44F-W47F mutants, see experimental section for primary sequences) can be used as intrinsic fluorescent probes to check the interaction of the peptide with lipidic micelles/bicelles and estimate its embedding. CD spectra were recorded from the same samples as fluorescence spectra in order to check if the overall structure was affected by tryptophan-to-phenylalanine mutations.

In water, the fluorescence emission spectra of the three mutants showed a maximum around 357 nm, which is consistent with each tryptophan being totally accessible to water molecules (Supp data 8). The CD spectra of the mutant peptides did not show any significant variations with the native peptide, confirming that the overall structure was not affected by the mutations (Supp data 9).

In SDS micelles the wavelength of fluorescence emission maximum of tryptophan was blue-shifted around 346 nm (Supp data 8). This demonstrates that the peptide interacted with the micelles, but only at the interface of detergent molecules. A complete embedding of tryptophan within the micelles would lead to a maximum emission fluorescence wavelength around 320 nm^[21]. The corresponding CD spectra reveal slight differences between the native peptide and the mutants, suggesting that the mutation of tryptophan-to-phenylalanine slightly impacts the structure in a hydrophobic environment.

In DMPC/DHPC bicelles, the wavelength of the fluorescence emission maximum was 356 nm, which is consistent with the total accessibility of tryptophans to water molecules and

non-interacting peptides with zwitterionic bicelles. Upon addition of cardiolipin to DMPC/DHPC bicelles, the maximum emission wavelengths of tryptophans were blue-shifted around 342 nm. The observed shift (around 15 nm), which is slightly greater than the shifts recorded in SDS micelles (around 11 nm), indicated an interaction of the [31-53] peptide with anionic bicelles containing cardiolipin and an interfacial embedding of each tryptophan, but not a total embedding of tryptophans in the bicelle.

In the absence of CL, the CD spectra recorded for the native peptide and the three mutants in DMPC/DHPC bicelles were superimposable with the CD spectra obtained in water, even if the size of the bicelles prevented acquiring CD spectra below 195 nm (*data not shown*). Unfortunately, in the presence of CL, diffusion prevents the recording of signals below 205 nm and proper acquisition of CD spectra.

Structural studies

Circular dichroism

With a negative ellipticity and a minimum around 198 nm (Figure 2) the CD spectrum of the [31-53] peptide in water revealed a weak structuration. Among the 23 residues of the [31-53] peptide, 4-7 residues are displayed in β -sheet conformation, 5 are considered to be involved in turns, 1-2 are described as non-regular helices, and the remainder are not structured. To estimate if the fragment has a high propensity to form secondary structures in more apolar media, CD spectra were recorded with an increasing amount of TFE. TFE is known to favour intra-molecular hydrogen bonds, therefore stabilizing secondary structures, predominantly helices, but sometimes β -sheets too. In our case, TFE addition induces a slight shift of the minimum to a higher wavelength and a maximum around 190 nm. Even 70% of TFE only induced a slight increase in helical contents (4-5 residues), whereas 5-6 residues remained considered as β -sheet. The analysis of CD spectra recorded with SDS micelles gave a comparable percentage as with 70% TFE, evidencing that the [31-53] peptide had only

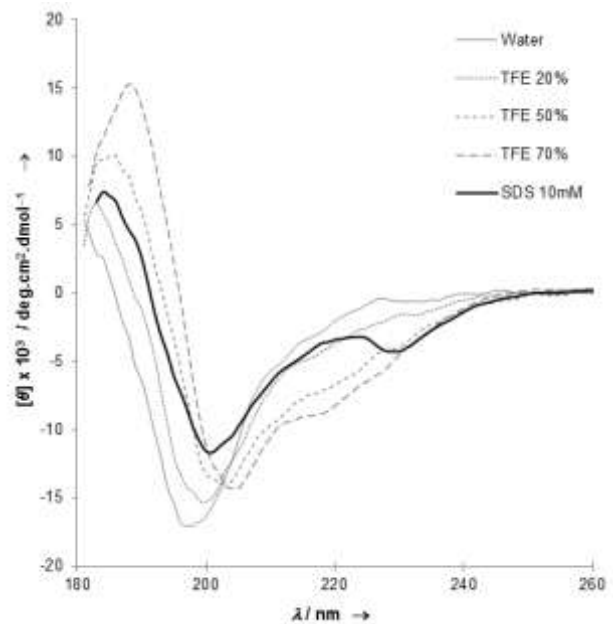


Figure 2 : CD spectra of the [31-53] mitogaligin fragment recorded in aqueous solution (grey line), with the addition of TFE (dashed lines) and in 10mM SDS micelles (black line).

a very weak propensity to form secondary structures. It is noticeable that the additional minimum around 230 nm observed for the sample recorded in SDS micelles could be due to tryptophan(s), as already observed on tryptophan-rich peptides^[22].

NMR structural study in SDS micelles

Due to the complexity of biological membranes, membrane-mimetic environments are to be used for structural biology^[23]. Over the years, various membrane-mimetic models have been used: organic solvents, detergent/lipid micelles, bicelles, and lipid bilayers. The more complex models increase the effective size of the system, leading to slow tumbling in solution, a long correlation time, and a short transverse relaxation time, factors unfavorable for solution NMR studies. Even if larger micelle and bicelle systems are sometimes required to stabilize the active forms of dynamic membrane proteins^[24], detergent micelles are a reasonable mimic of membrane environments for solution NMR structural studies of small membrane interacting peptides/proteins, and are therefore the most commonly used membrane-mimicking media. SDS has a net negative charge, like mitochondrial membranes. Moreover, the

structures for several membrane-targeting peptides were found to be similar in SDS micelles or anionic phosphatidylglycerols. Since the insertion of the [31-53] fragment in SDS micelles was comparable to that in DMPC/DHPC/CL bicelles, we considered that SDS micelles are a convenient membrane model to determine a 3D structure of the [31-53] fragment. The 23 spin systems were identified in the TOCSY spectrum, and a complete assignment of proton chemical shifts was obtained with the NOESY spectrum. Chemical shifts have been deposited in the BioMagResBank(<http://www.bmrb.wisc.edu/>). Only the N chemical shift of R41 is missing. NOE peaks were picked and integrated in NMRView. A first set of intra-residues and sequential peaks were assigned. Additional

assignments were progressively proposed during the ARIA runs, and manually validated. The 307 final distance restraints used in the last run are detailed in Table 1. A representative structure is depicted in Figure 3 (top), and the complete set of 10 representative conformers are given in Supp data 10. The final set of structures is in total agreement with the experimental data, and only 1.4 residual violations of distance restraints are larger than 0.3 Å. 60%, and 39.4% of the residues were found in the most favorable regions, and the favorable region of the Ramachandran plot, respectively, none of the residues standing in the disallowed regions. The RMSD value calculated for the backbone was 2.18 ± 0.58 Å (Table 1).

¹⁵N-HSQC spectra in water and with SDS

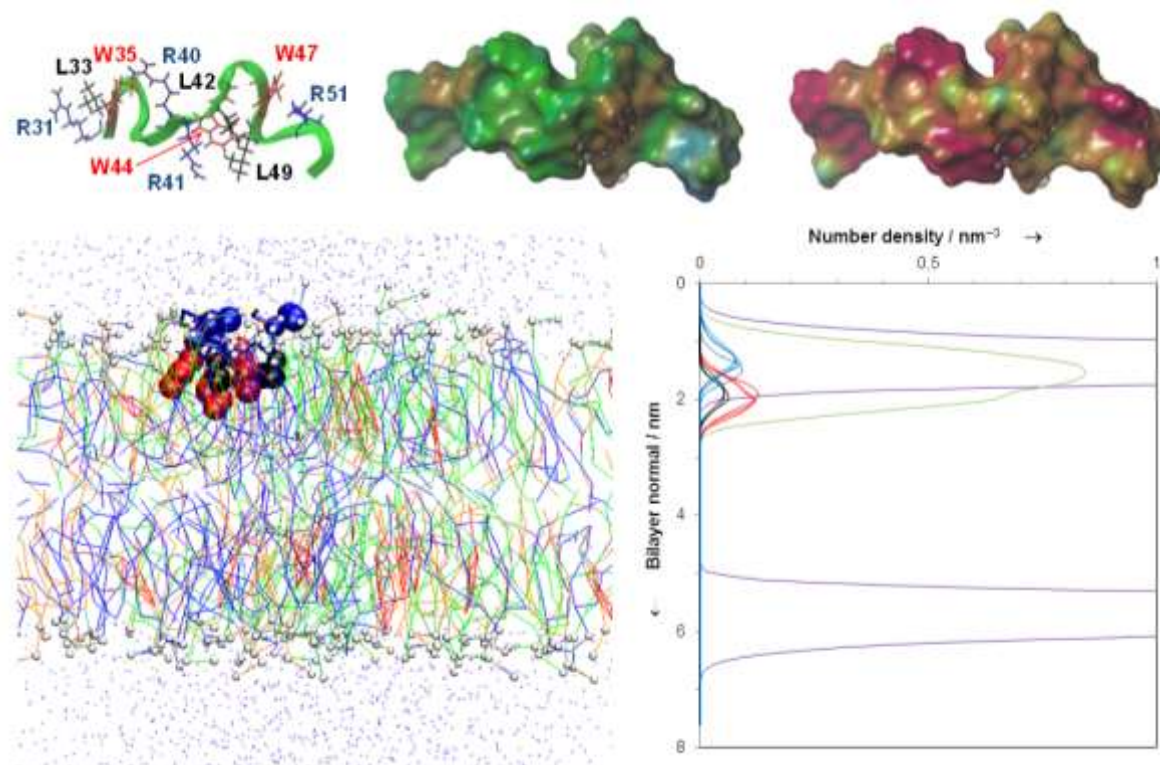


Figure 3 : Top : NMR structure in SDS micelles. Left: Schematic representation of the [31-53] fragment (green ribbon) with arginine residues (31, 40, 41 and 51) drawn in blue, tryptophans (35, 44 and 47) in red, and leucines (33, 42 and 49) in black, respectively. Middle: Hydrophobic and hydrophilic potential areas, calculated with the MOLCAD option at the Connolly surfaces, are displayed in brown and blue, respectively. Green surfaces represent an intermediate hydrophobicity (scale -0.12, +0.12); drawn with SYBYL software (TRIPOS Inc., St. Louis, MO). Right: Electrostatic positive and negative areas, calculated with SYBYL software at the Connolly surfaces, are displayed in red and blue, respectively. Intermediate areas are in green (scale -300, +300 kcal.mol⁻¹);

Bottom : Coarse-grained simulations. Left: Snapshot at the end of the dynamic simulation; Coarse-grains are shown in red, black and blue, for tryptophans, leucines and arginines, respectively. Heads of lipids are represented by small white spheres, and lipid chains are represented by blue, green and orange lines for cardiolipin, DOPC and DOPE, respectively. Cholesterol molecules are drawn by red lines, whereas water molecules are depicted by blue points; Right: Average atom number density profile along the normal bilayer calculated over the last 1 μs trajectory. Tryptophans, leucines and arginines are drawn as on the left. The [31-53] fragment is drawn in green and the heads of lipids in violet.

Noe restraints	
Total	307
Intraresidue ($ i-j = 0$)	100
Sequential ($ i-j = 1$)	77
Medium range ($2 \leq i-j \leq 4$)	47
Long range ($ i-j \geq 5$)	0
Ambiguous	83
RMSD (residues 36-49; pairwise, Å)	
Backbone atoms	2.18 ± 0.58
All atoms	3.11 ± 0.53
Ramachandran plot¹ (%)	
Most favored regions	60.0
Additional allowed regions	39.4
Generously allowed regions	0.6
Disallowed regions	0.0
Energies² (kcal.mol ⁻¹)	
Electrostatic	-554.5 ± 29.0
van der Waals	-20.5 ± 7.1
E _{NOE}	36.2 ± 3.1
Total energy	-365.5 ± 25.3

¹ Determined by PROCHECK

² Calculated with the standard parameters of ARIA

Table 1 : Structural statistics for the ten final models of the [31-53] addressing fragment of mitogaligin.

micelles singled out four residues (L42, W44, S45 and S48) particularly affected by the media composition (Supp data 11 & 12). These NMR shifts can be caused by structural and/or environmental modifications and are consistent with embedding of the hydrophobic area into the micelle, as well as slight structural modifications in the core of the peptide.

Embedding of the peptide

When an increasing amount of paramagnetic Mn^{2+} was added into the SDS micelles solution, the intensity of all NMR signals of the peptide was strongly decreased (Figure 4 Top). This shows that all protons were accessible to the Mn^{2+} ions present in solution, and that the peptide was not deeply embedded in the micelle. Nevertheless protons of the highly flexible residues R31-S34, S45-W47 and S50 are more accessible to the paramagnetic ions, whereas protons of L42-W44 appear to be less accessible. Electrostatic repulsions between paramagnetic Mn^{2+} and positively charged arginines as well as electrostatic attraction between Mn^{2+} and negative side-chains of SDS could affect, or bias, these results.

When an increasing amount of the neutral and water-soluble paramagnetic agent Gd(DTPA-BMA) was added,^[25,26] excluding screen effects due to positive residues, the paramagnetic effect on the NH-HA signals of the peptide was not significantly different along the sequence (Figure 4 Bottom and Figure 5). This implies that the peptide is parallel to the surface of the membrane. Residues 41-43 are less accessible, near the central cluster involving W44. Moreover, the oscillations observed for the paramagnetic values of C-terminal region were typical of turns (Figure 5).

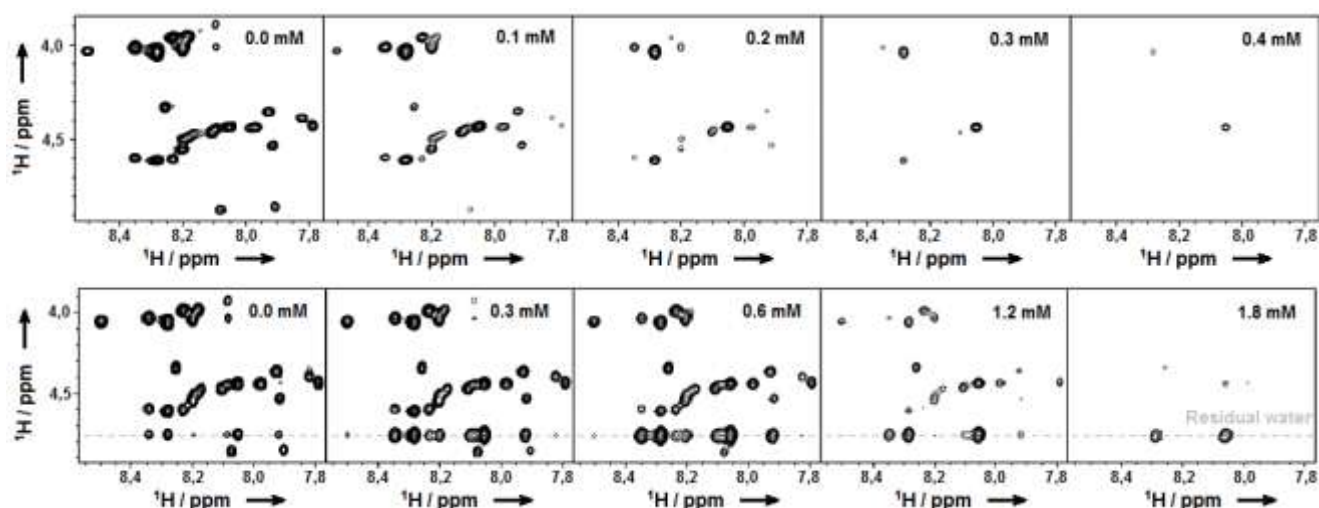


Figure 4 : HN-Hα region of 2D NMR TOCSY spectra in 100 mM SDS recorded with 1 mM of [31-53] addressing fragment of mitogaligin and increasing amount of paramagnetic agent : Mn^{2+} (0.0; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4 mM) (Top) or Gd (DTPA-BMA) (0.0; 0.3; 0.6; 1.2; 1.8 mM) (Bottom).



Figure 5 : Intensity decay of NMR signals of the [31-53] mitogaligin peptide in presence of Gd(DTPA-BMA) paramagnetic agent. For each aminoacid, intensity decay is indicated for the HN-HA correlation peak, except for P43 (HA-HB peak). Overlapped peaks (R40-R41-S48, L42-L49 and S45-S51) are indicated with ▲.

Coarse-grained molecular dynamics simulations

To investigate the addressing of the [31-53] mitogaligin peptide to the mitochondrial membrane, CG molecular dynamics calculations were performed, either by introducing the peptide in a pre-equilibrated bilayer model (3 independent simulations), or by combining the peptide with randomly positioned lipids (3 independent simulations). For these two kinds of simulation, the [31-53] fragment spontaneously inserts in the membrane interface, close to the lipid headgroups with all the residues embedded in the membrane (Figure 3 Bottom). To illustrate the insertion of the addressing peptide of mitogaligin into the mitochondrial membrane model, we calculated the average atom number density profile along the normal bilayer for all six simulations. These density profiles are similar and an example is given in Figure 3 (Bottom). Tryptophan and leucine residues pointed towards the interior of the membrane whereas arginine residues remained accessible to water.

DISCUSSION

It is now well established that the loss of mitochondrial integrity is a hallmark of cell death^[27]. During the *galig*-induced cell death process, mitochondria have been shown to play a crucial role as well as mitogaligin, a *galig*-induced protein which is presumed to destabilize the mitochondrial membrane^[2]. Previous studies showed that incubation of

isolated mitochondria with the [31-53] addressing fragment of mitogaligin induced cytochrome c release and that the anionic phospholipid cardiolipin, a specific component of mitochondrial membrane, interacted with the [31-53] mitogaligin peptide^[7].

The present study showed that the [31-53] addressing fragment was able to launch cell apoptosis when microinjected in cells (Figure 1) and was also able to disturb the mitochondrial membrane, inducing a mislocalization of a known mitochondrial protein. The addressing fragment of mitogaligin was active in the same range of concentration as the protein tBid, a pro-apoptotic Bcl-2 family member, and its α H6 helix implicated in CL interaction and apoptosis induction^[28-30]. This highlighted the biologically-relevant cytotoxic effect of the [31-53] mitogaligin peptide. The cytotoxic effect of the [31-53] peptide was less striking when microinjected in the nucleus, confirming that the mitochondria is the target. These new results are in total agreement with previous studies^[7] and shed more light on cardiolipin, a unique mitochondria-specific anionic phospholipid. To extend these observations and to gain new insights, we performed biophysical experiments to test the specificity of the binding of the [31-53] mitogaligin peptide to CL-containing bicelles, and to determine the most appropriate mitochondria-mimicking membrane model for further structural studies. Cardiolipin is present in inner mitochondrial membranes (18%) and represents 4% of lipids of the outer membrane. In the latter case, it is noticeable that cardiolipin is mainly concentrated at junctions between outer and inner membranes, where it reaches 20%^[31]. Therefore, to mimic the membrane environment, several membrane models with increasing complexity were built, and the effects on the addressing peptide were monitored by fluorescence spectroscopy and CD. The peptide did not interact with zwitterionic systems, but only with negatively charged models. This corroborates well with the *in-cell* results showing a drastic reduction in cytotoxicity when the [31-53] mitogaligin peptide was incubated rather than being microinjected (data not shown). Morphological changes were only detectable

after 50 minutes with a 400 μ M solution of the [31-53] mitogaligin peptide (Supp data 4). This demonstrates that the fragment is not capable of acting on the plasma membrane. In the negatively charged models, the [31-53] peptide did not insert deeply in the carbon chains, but rather set up at the interface of the micelles/bicelles, with an equivalent embedding of each tryptophan. This interfacial location of tryptophan-rich peptides has already been described, for example, for antimicrobial peptides (AMPs) or Cell Penetrating Peptides (CPPs)^[32–34].

Human mitogaligin has a high degree of sequence homology with the putative mitogaligins currently described for other mammals (Figure 6). Interestingly the addressing fragment is very well conserved for primate species but in an area of insertions or gaps for other mammal species. For example, the canine mitogaligin shows an insertion of 38 residues in this area. The murine mitogaligin is shortened by insertion of a stop codon (nucleotide substitution). If one considers that mitogaligins adopt a common 3D fold, the internal addressing fragment would be located in a protruding loop, differing in size according to the species. No sequence homologies of human mitogaligin with other known proteins – except mitogaligins from other species – could be found. Moreover, when analyzing mitogaligin sequences with different commonly-used software programs (sscp^[35–37], jpred^[38], PSIPRED^[39] and SOPMA^[40]) aimed at predicting secondary structures, mitogaligin is predominantly predicted to be unstructured. Even for the [31-53] addressing fragment no

reliable secondary structural predictions could be obtained. This can be due to the lack of sequence homology with proteins used as references in prediction software and/or because of the intrinsically unstructured properties of mitogaligin, which is reminiscent of mitochondrial-imported proteins. Therefore we experimentally explored the capacity of the [31-53] addressing fragment to adopt particular folds in the membrane environment. At least when extracted from the entire protein the [31-53] internal fragment does not adopt any canonical fold in water, and reveals a weak propensity to form secondary structures in more apolar media. Building an *in silico* model of the [31-53] fragment as a α -helix or a β -hairpin, it becomes obvious that the peptide cannot form amphipathic structures in these canonical conformations. In SDS micelles, without even canonical secondary structures, the [31-53] peptide is well organized around aromatic and hydrophilic residues, with a propensity to uncover amphiphilic surfaces. Moreover, no significant variations of NMR relaxation were observed, meaning that i) the embedding of the peptide is parallel to the surface of the membrane; ii) the implantation of the peptide into the micelle is weak. The latter point is in total accordance with results from fluorescence spectroscopy. From the analysis of the 3D structure and surface properties, it is clear that L42, W44 and L49 could provide the contact with the hydrophobic interior of the micelle, whereas arginine residues dispatched at the surface could ensure the solubility and interaction with negative heads of cardiolipins.

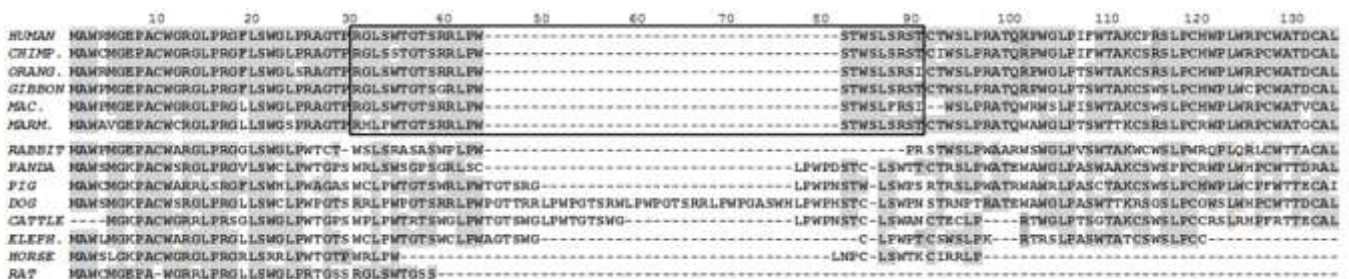


Figure 6: Sequence alignment of human mitogaligin with potential other mitogaligins currently described for other mammals. A black square highlights the high conservation of the addressing fragments of primate species. NCBI Accession numbers are given downward : galig gene for human (AF266280.1), and GAL3 gene for chimpanzee (XM_003314336.1), orangutan (XM_002824767.1), gibbon (XM_003267721.1), macaque (XM_002805084.1), marmoset (XM_002753970.1), rabbit (NM_001082338.1), panda (XM_002929247.1), pig (NM_001097501.1), dog (NM_001197043.1), cattle (NM_001102341.1), elephant (XM_003408661.1), horse (XM_001495733.3), rat (NM_031832.1) and mouse (NM_001145953.1).

To simulate the interaction of the [31-53] fragment with a more representative mitochondrial membrane model, coarse-grained simulations were performed with a lipid bilayer composed of the four major lipids found in mitochondrial junction sites. The embedding of each of the three tryptophan residues is equivalent, which perfectly correlates with the experimental results described above. Moreover, the embedding of the three leucine residues at the end of the simulation is in total accordance with the structural model. It is noticeable that these leucine residues are conserved among all mitogaligins currently described (Figure 6), whatever the species, certainly attesting to their essential role.

Aromatic side chains, particularly the indole ring of tryptophans, are known to strongly prefer partitioning in the interface regions of membranes^[41]. Tryptophan residues are able to form hydrogen bonds with both water and components of the lipid bilayers when residing in the interfacial region. These hydrogen-bonding partners would no longer be available to the tryptophan residues if the peptide inserted deeper into the hydrocarbon core. Furthermore, the large and bulky indole side chain would disrupt the cohesive hydrophobic interactions of the lipid acyl chains if the peptide buried deeper into the hydrocarbon core of a lipid bilayer, leading to high entropic energy costs. In the structure of the fragment [31-53], tryptophan residues are placed into the same face, where they can interact favourably with the hydrophobic-hydrophilic membrane interface. While the tryptophan residues cause the peptide to be inserted into membranes, the arginine residues stabilize the peptide by interacting with the negatively charged micelle surface. Tryptophan-rich peptides interacting with various types of membranes have been described in the literature^[34,35,42,43], in particular antimicrobial peptides. Mitochondrial membranes are phylogenetically related to bacterial membranes. Their negative charges are mainly due to the specific anionic phospholipid, cardiolipin, absent from all other eukaryotic cell membranes. Indeed, the activity measured for the [31-53] fragment

against *E. coli* ATCC25922 in minimal inhibitory concentration (MIC) preliminary assays is about 1-2 μ M (A.C. Lalmanach, personal communication). Therefore, we hypothesize that the first step of interaction of the human cytotoxic [31-53] mitogaligin fragment with mitochondrial membranes may resemble the interaction of some AMPs with bacterial membranes.

The [31-53] mitogaligin fragment displays some sequence homologies with three tryptophan-rich AMPs, differing in their 3D structures, amphiphilic properties, and mechanism of action. A structural comparison could provide first insights into the mechanism of action of the [31-53] fragment. Indolicidin is a 13-residue antimicrobial as well as haemolytic peptide with an extremely high tryptophan content (ILPWKWPWWPWR), belonging to the cathelicidin family. It forms a boat-shaped structure in negative SDS or neutral DPC micelles (PDB codes 1G8C and 1G89, respectively^[44]), with a hydrophobic central part and positively charged extremities. It is well accepted that indolicidin binds to surface lipopolysaccharides of gram-negative bacteria, thanks to an appropriate juxtaposition of the hydrophobic and the cationic residues so as to match a complementary site on the receptor. However, indolicidin may act on uncharged lipid membranes, which is not the case of the [31-53] mitogaligin fragment. The second AMP is LfcinB, a 25-residue antimicrobial peptide (FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF) released by pepsin cleavage of lactoferrin, that could have a major permeability effect on the cytoplasmic membrane of both Gram-positive and Gram-negative bacteria.^[45] Contrary to the [31-53] fragment, it forms a stable amphipathic twisted β -hairpin (PDB code 1LFC^[46]) with the tryptophan residues buried in the micelle and the arginine residues on opposite sides of the structure. Finally, the closest tryptophan-rich antimicrobial peptide to the [31-53] fragment of human mitogaligin is the amphipathic antimicrobial 13-residue tritrypticin extracted from the pig^[47]. Its sequence contains three tryptophans and four arginine residues (VRRFPWWPFLRR). Therefore, among the diverse family of AMPs, this cathelicidin-derived antimicrobial peptide has been classified as either a tryptophan-rich

or a proline/arginine-rich peptide. Its micelle-bound structure, composed of two adjacent turns around the two proline residues (PDB code 1D6X^[47]), is comparable to the structure of the [31-53] mitogaligin fragment. Aromatic tryptophan and phenylalanine residues are placed in a single hydrophobic surface and can interact favourably with the membrane interface. The high tryptophan content of this peptide and the burial of these residues in the micelle suggest that tryptophans play a critical role in the antimicrobial activity of tritrpticin. Moreover, the flexible N- and C-termini containing two positively charged arginine residues are each located on the other side of the structure and render this structure amphipathic. The detailed mechanism of action of tritrpticin at the membrane level is still under debate, but the potential for strong hydrogen bonding between the four positive arginine side chains and the phospholipid head groups could be a determining factor in the membrane disruptive properties^[48]. We hypothesize that the first step of interaction of the human cytotoxic mitogaligin [31-53] fragment with mitochondrial membranes may resemble the interaction of the pig antimicrobial tritrpticin with bacterial membranes.

CONCLUSION

First insights into the functional and structural properties of the addressing peptide [31-53] of the human mitogaligin are described here. This fragment displays a high potency to induce cell death when microinjected in the cytoplasm and displaces the mitochondrial protein CTMP. In SDS micelles, the fragment is well organized, even though it does not contain canonical secondary structures. Experimental data aimed at exploring the embedding of the peptide into model membranes, as well as coarse-grained simulations, pointed to an interfacial location of the peptide, with tryptophan and leucine residues pointing towards the interior of the membrane and arginine remaining accessible to the water side. A structural comparison with tryptophan-rich peptides interacting with membranes evidenced structural similarities with the antimicrobial tritrpticin. We hypothesize that the first step of

interaction of the human cytotoxic mitogaligin [31-53] fragment with mitochondrial membranes may resemble the interaction of the pig antimicrobial tritrpticin with bacterial membranes. Further experiments, aimed at characterizing the effect of the peptide on the membrane, are underway to better understand the precise mechanism of action of the [31-53] fragment in mitochondrial mimicking membranes.

ACKNOWLEDGEMENTS

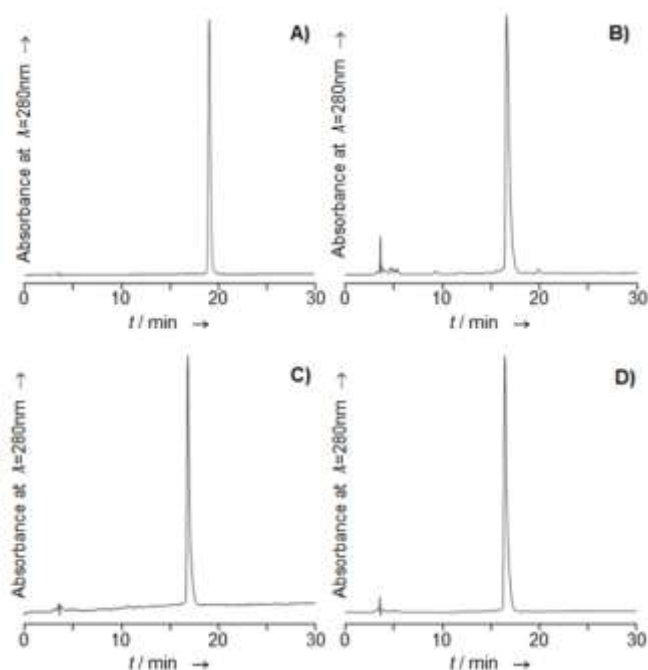
Violette Senille was supported by a doctoral fellowship from the CNRS and Région Centre. This project was also supported by “La ligue contre le cancer”. We thank Martine Dubois for HeLa cell cultures and David Gosset for preliminary microinjection experiments. We also thank Sandrine Villette for technical assistance on CD and fluorescence acquisitions, and Guillaume Gabant for mass spectrometry experiments.

REFERENCES

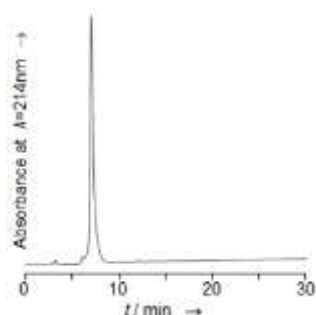
- [1] M. Guittaut, S. Charpentier, T. Normand, M. Dubois, J. Raimond, A. Legrand, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 2652–2657.
- [2] M. Duneau, M. Boyer-Guittaut, P. Gonzalez, S. Charpentier, T. Normand, M. Dubois, J. Raimond, A. Legrand, *Exp. Cell Res.* **2005**, 302, 194–205.
- [3] J. C. Goldstein, N. J. Waterhouse, P. Juin, G. I. Evan, D. R. Green, *Nat. Cell Biol.* **2000**, 2, 156–162.
- [4] T. Kaufmann, S. Schlipf, J. Sanz, K. Neubert, R. Stein, C. Borner, *J. Cell Biol.* **2003**, 160, 53–64.
- [5] K. N. Truscott, K. Brandner, N. Pfanner, *Curr. Biol.* **2003**, 13, R326–337.
- [6] K. Nakai, P. Horton, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, 24, 34–36.
- [7] P. Gonzalez, M. Duneau, S. Charpentier, T. Normand, L. Mollet, M. Dubois, A. Legrand, *Biochemistry* **2007**, 46, 7374–7382.
- [8] F. Girard, U. Strausfeld, A. Fernandez, N. J. Lamb, *Cell* **1991**, 67, 1169–1179.
- [9] C. Franckhauser, D. Mamaeva, L. Heron-Milhavet, A. Fernandez, N. J. C. Lamb, *PLoS ONE* **2010**, 5, e11798.
- [10] A. Parcellier, L. A. Tintignac, E. Zhuravleva, P. Cron, S. Schenk, L. Bozusic, B. A. Hemmings, *Cell. Signal.* **2009**, 21, 639–650.
- [11] N. Sreerama, S. Y. Venyaminov, R. W. Woody, *Protein Sci.* **1999**, 8, 370–380.
- [12] M. A. Parker, V. King, K. P. Howard, *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, 1514, 206–216.
- [13] F. Delaglio, S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1995**, 6, 277–293.

- [14] B. Johnson, R. Blevins, *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 603–614.
- [15] J. P. Linge, S. I. O'Donoghue, M. Nilges, *Meth. Enzymol.* **2001**, *339*, 71–90.
- [16] R. Koradi, M. Billeter, K. Wüthrich, *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 51–55, 29–32.
- [17] L. Monticelli, S. K. Kandasamy, X. Periole, R. G. Larson, D. P. Tieleman, S.-J. Marrink, *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 819–834.
- [18] S. J. Marrink, H. J. Risselada, S. Yefimov, D. P. Tieleman, A. H. de Vries, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 7812–7824.
- [19] M. Dahlberg, A. Maliniak, *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 1638–1649.
- [20] B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, E. Lindahl, *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 435–447.
- [21] J. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic/Plenum, New York, **1999**.
- [22] A. S. Ladokhin, M. E. Selsted, S. H. White, *Biochemistry* **1999**, *38*, 12313–12319.
- [23] G. Wang, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2008**, *9*, 50–69.
- [24] S. F. Poget, M. E. Girvin, *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 3098–3106.
- [25] M. Respondek, T. Madl, C. Göbl, R. Golser, K. Zangger, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5228–5234.
- [26] A. Walrant, A. Vogel, I. Correia, O. Lequin, B. E. S. Olausson, B. Desbat, S. Sagan, I. D. Alves, *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1818*, 1755–1763.
- [27] S. W. G. Tait, D. R. Green, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 621–632.
- [28] M. Madesh, B. Antonsson, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, G. Hajnóczky, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 5651–5659.
- [29] C. Moreau, P.-F. Cartron, A. Hunt, K. Meflah, D. R. Green, G. Evan, F. M. Vallette, P. Juin, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 19426–19435.
- [30] F. Gonzalez, F. Pariselli, O. Jalmar, P. Dupaigne, F. Sureau, M. Dellinger, E. A. Hendrickson, S. Bernard, P. X. Petit, *PLoS ONE* **2010**, *5*, e9342.
- [31] D. Ardail, J. P. Privat, M. Egret-Charlier, C. Levrat, F. Lerme, P. Louisot, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 18797–18802.
- [32] J. C. Bozelli Jr, E. T. Sasahara, M. R. S. Pinto, C. R. Nakaie, S. Schreier, *Chem. Phys. Lipids* **2012**, *165*, 365–373.
- [33] M. Magzoub, K. Kilk, L. E. G. Eriksson, Ü. Langel, A. Gräslund, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Biomembranes* **2001**, *1512*, 77–89.
- [34] G. Fragneto, F. Graner, T. Charitat, P. Dubos, E. Bellet-Amalric, *Langmuir* **2000**, *16*, 4581–4588.
- [35] F. Eisenhaber, B. Persson, P. Argos, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1995**, *30*, 1–94.
- [36] F. Eisenhaber, C. Frömmel, P. Argos, *Proteins* **1996**, *25*, 169–179.
- [37] F. Eisenhaber, F. Imperiale, P. Argos, C. Frömmel, *Proteins* **1996**, *25*, 157–168.
- [38] C. Cole, J. D. Barber, G. J. Barton, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, W197–W201.
- [39] L. J. McGuffin, K. Bryson, D. T. Jones, *Bioinformatics* **2000**, *16*, 404–405.
- [40] C. Geourjon, G. Deleage, *Comput. Appl. Biosci.* **1995**, *11*, 681–684.
- [41] W.-M. Yau, W. C. Wimley, K. Gawrisch, S. H. White, *Biochemistry* **1998**, *37*, 14713–14718.
- [42] D. I. Chan, E. J. Prenner, H. J. Vogel, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 1184–1202.
- [43] D. J. Schibli, R. F. Epand, H. J. Vogel, R. M. Epand, *Biochem. Cell Biol.* **2002**, *80*, 667–677.
- [44] A. Rozek, C. L. Friedrich, R. E. Hancock, *Biochemistry* **2000**, *39*, 15765–15774.
- [45] Y. Liu, F. Han, Y. Xie, Y. Wang, *Biometals* **2011**, *24*, 1069–1078.
- [46] P. M. Hwang, N. Zhou, X. Shan, C. H. Arrowsmith, H. J. Vogel, *Biochemistry* **1998**, *37*, 4288–4298.
- [47] D. J. Schibli, P. M. Hwang, H. J. Vogel, *Biochemistry* **1999**, *38*, 16749–16755.
- [48] L. T. Nguyen, L. de Boer, S. A. J. Zaat, H. J. Vogel, *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808*, 2297–2303.

SUPPLEMENTARY DATA



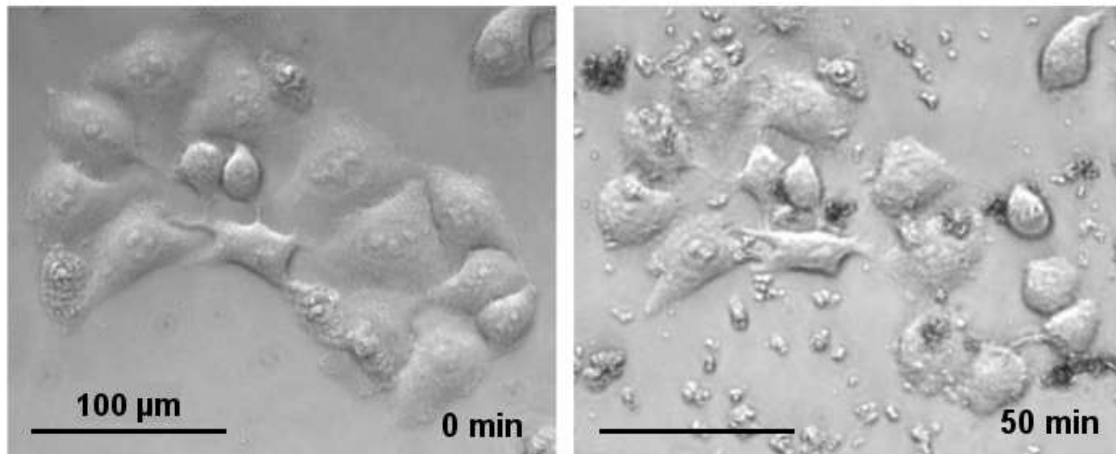
Supp data 1: Analytical HPLC profile of the (A) purified [31-53] addressing fragment of mitogaligin, and of the three mutants (B) W35F-W44F, (C) W35F-W47F and (D) W44F-W47F. C18 reversed phase column (300 Å) 5 µm, 4.6 x 150 mm with a linear gradient of 25-35% of buffer B over 30min and a flow rate of 1 mL/min (buffer A: 0.1% TFA in H₂O; buffer B: 0.1% TFA in CH₃CN).



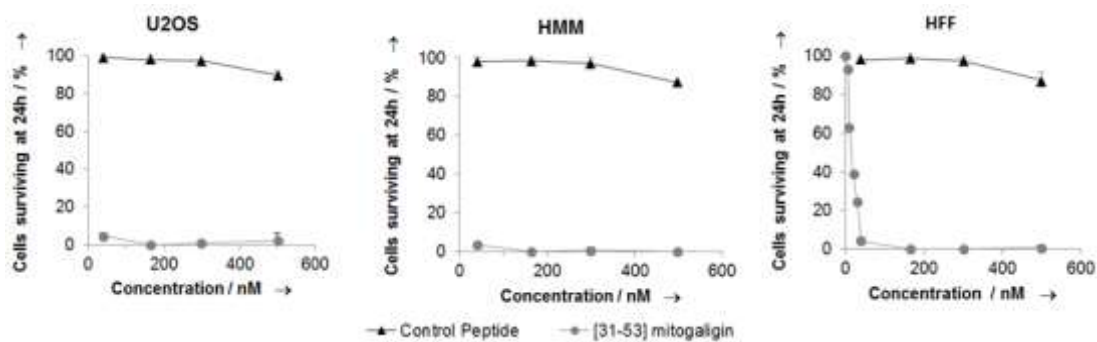
Supp data 2: Analytical HPLC profile of the purified [70-89] fragment of cytogaligin. C18 reversed phase column (300 Å) 5 µm, 4.6 x 150 mm with a linear gradient of 25-35% of buffer B over 30min and a flow rate of 1 mL/min (buffer A: 0.1% TFA in H₂O ; buffer B: 0.1% TFA in CH₃CN).

Peptide		Sequence	MALDI MS (m/z) [MH ⁺]	
			calc	found
1	Mitogaligin [31-53]	Ac-RGLSWTGTSRRLPWSTWLSRST-NH ₂	2718.41 (C ₁₂₀ H ₁₈₇ N ₃₉ O ₃₄)	2718.45
2	[31-53]W35F-W44F mutant	Ac-RGLSETGTSRRLPESTWLSRST-NH ₂	2640.39 (C ₁₁₆ H ₁₈₅ N ₃₇ O ₃₄)	2640.32
3	[31-53]W35F-W47F mutant	Ac-RGLSETGTSRRLPWSTESLSRST-NH ₂	2640.39 (C ₁₁₆ H ₁₈₅ N ₃₇ O ₃₄)	2640.37
4	[31-53]W44F-W47F mutant	Ac-RGLSWTGTSRRLPESTESLSRST-NH ₂	2640.39 (C ₁₁₆ H ₁₈₅ N ₃₇ O ₃₄)	2640.46
5	Cytogaligin [70-89]	Ac-ESTQGHPAALGPTHLLDSQV-NH ₂	2098.06 (C ₉₀ H ₁₄₄ N ₂₈ O ₃₀)	2098.90

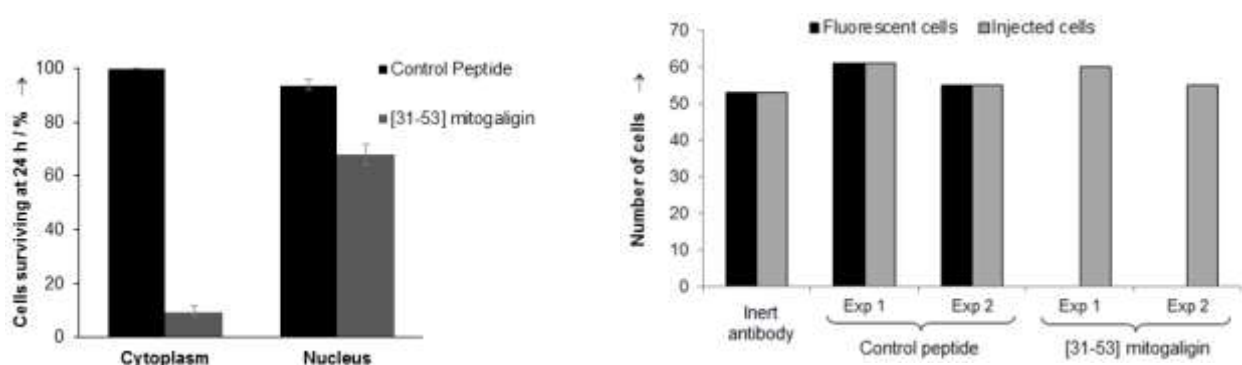
Supp data 3: Peptide sequences and MALDI-MS results for the [31-53] mitogaligin fragment, the three mutants, and the [70-89] cytogaligin fragment used as control peptide.



Supp data 4: Incubation of HeLa cells performed at room temperature, with 400 μ M of the [31-53] peptide directly added into the cell culture medium. Pictures recorded before addition (left) of the peptide and after 50 min (right). **No detectable morphological change was detectable at lower concentrations.**

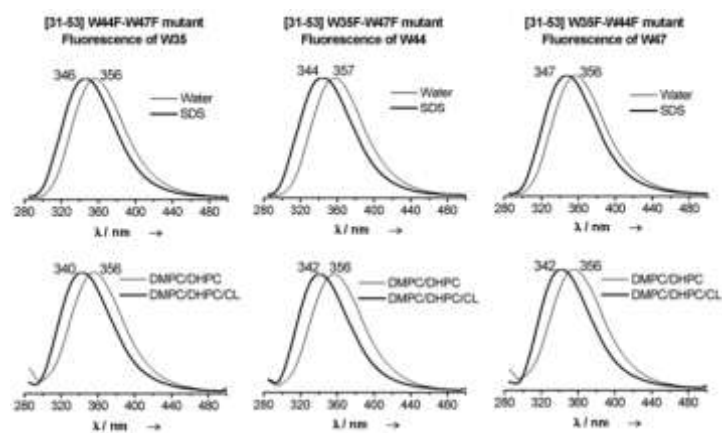


Supp data 5: Comparative analysis of [31-53] mitogaligin and control peptide toxicity. Shown are the percentages of cells surviving 24 hours after microinjection for different concentrations of peptide (Sample size 50 cells / experiment, done in triplicate) into 3 different cell types: U2OS osteo-sarcoma cells, human myoblasts (HMM) and fibroblasts (HFF).

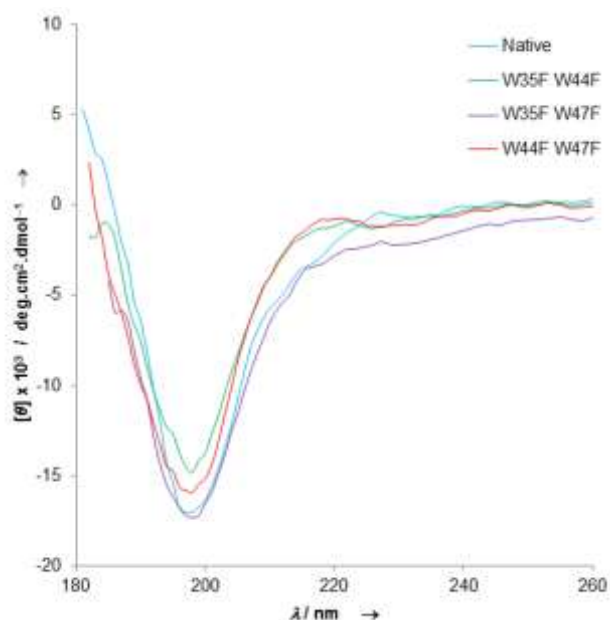


Supp data 6: Effects of nuclear versus cytoplasmic microinjections of 40 nM [31-53] mitogaligin peptide in human fibroblasts (Sample size 25 cells / experiment, done in triplicate).

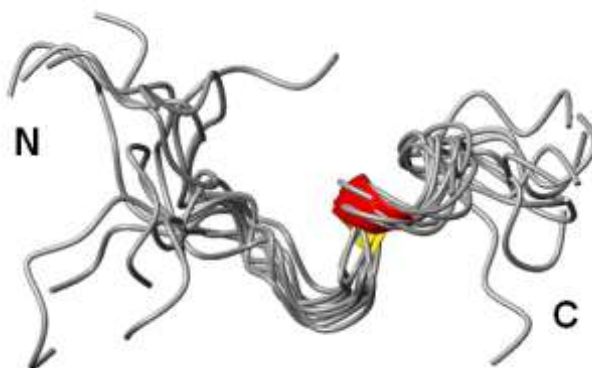
Supp data 7: Resazurin cell viability assay: Shown are the number of fluorescent cells after injection of 40nM of the [31-53] mitogaligin peptide or 40nM of the control peptide (black) versus the number of injected cells (grey). Experiments done in duplicate (overnight incubation).



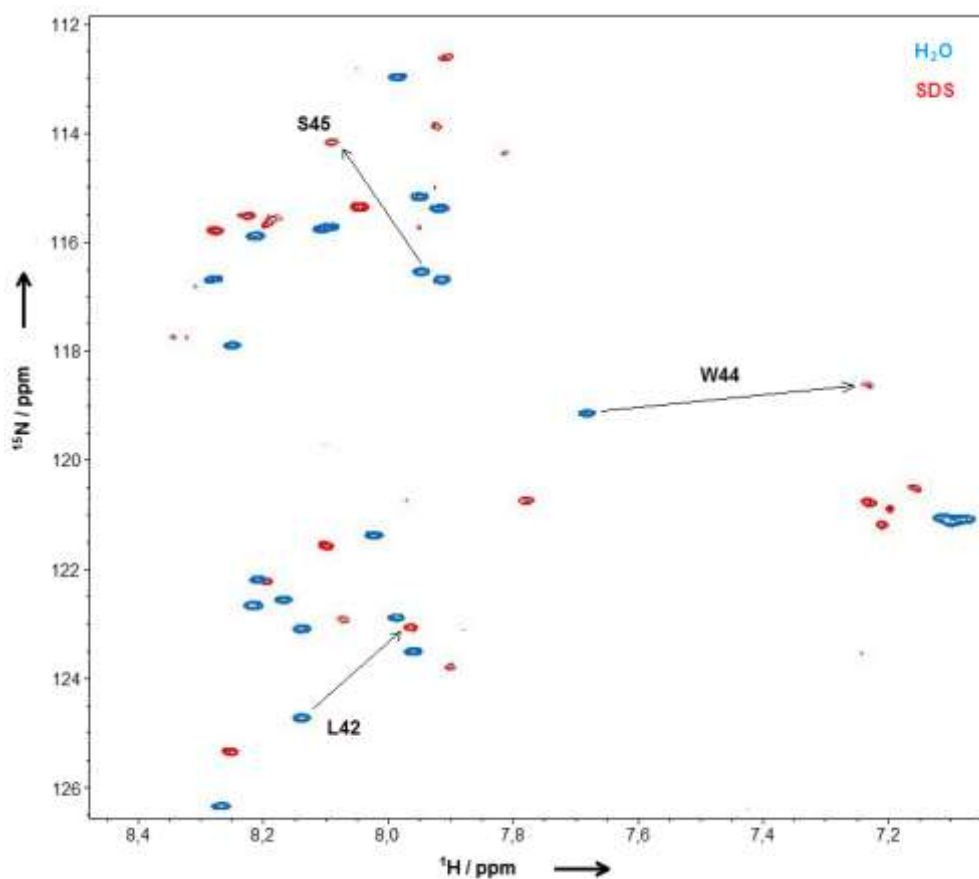
Supp data 8: From left to right: Emission of fluorescence recorded for the three mutants W44F-W47F, W35F-W47F and W35F-W44F. Top: comparison of fluorescence emission in SDS micelles (bold) and in H₂O; Bottom comparison of fluorescence emission in DMPC/DHPC/CL bicelles (bold) and DMPC/DHPC bicelles.



Supp data 9: CD spectra of the [31-53] mitogaligin fragment and of the three mutants (W44F-W47F, W35F-W47F and W35F-W44F) in water.



Supp data 10: Superimposition of the 10 models representative of the solution structure of the [31-53] fragment in SDS micelles.



Supp data 11: Superimposition of ^{15}N -HSQC spectra (natural abundance) of the [31-53] addressing fragment of mitogaligin, recorded in aqueous solution (blue) and with 100 mM of SDS micelles (red), on a 600 MHz NMR spectrometer, at pH 5.5 and 35°C.



Supp data 12: Chemical shift variations measured between ^{15}N -HSQC spectra (natural abundance) of the [31-53] addressing fragment of mitogaligin, recorded in aqueous solution and with 100 mM of SDS micelles, on a 600 MHz NMR spectrometer, at 35°C (* stands for missing peaks).

Bibliographie

Abbassi, F., Galanth, C., Amiche, M., Saito, K., Piesse, C., Zargarian, L., Hani, K., Nicolas, P., Lequin, O., and Ladram, A. (2008). Solution structure and model membrane interactions of temporins-SH, antimicrobial peptides from amphibian skin. A NMR spectroscopy and differential scanning calorimetry study. *Biochemistry* 47, 10513–10525.

Ahn, H.-C., Juranić, N., Macura, S., and Markley, J.L. (2006). Three-dimensional structure of the water-insoluble protein crambin in dodecylphosphocholine micelles and its minimal solvent-exposed surface. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 4398–4404.

Ahting, U., Waizenegger, T., Neupert, W., and Rapaport, D. (2005). Signal-anchored proteins follow a unique insertion pathway into the outer membrane of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 280, 48–53.

Andersson, S.G., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U.C., Podowski, R.M., Näslund, A.K., Eriksson, A.S., Winkler, H.H., and Kurland, C.G. (1998). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396, 133–140.

Andrès, E., and Dimarcq, J.-L. (2007). Peptides antimicrobiens cationiques : de l'étude de l'immunité innée à la production de médicaments. *Mise à jour. Médecine Et Maladies Infectieuses* 37, 194–199.

Aouacheria, A., Brunet, F., and Gouy, M. (2005). Phylogenomics of life-or-death switches in multicellular animals: Bcl-2, BH3-Only, and BNip families of apoptotic regulators. *Mol. Biol. Evol.* 22, 2395–2416.

Ardail, D., Privat, J.P., Egret-Charlier, M., Levrat, C., Lerme, F., and Louisot, P. (1990). Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J. Biol. Chem.* 265, 18797–18802.

Balayssac, S., Burlina, F., Convert, O., Bolbach, G., Chassaing, G., and Lequin, O. (2006). Comparison of penetratin and other homeodomain-derived cell-penetrating peptides: interaction in a membrane-mimicking environment and cellular uptake efficiency. *Biochemistry* 45, 1408–1420.

Batchelor, R., Windle, C.J., Buchoux, S., and Lorch, M. (2010). Cholesterol and Lipid Phases Influence the Interactions between Serotonin Receptor Agonists and Lipid Bilayers. *J. Biol. Chem.* 285, 41402–41411.

Bhardwaj, A., and Aggarwal, B.B. (2003). Receptor-mediated choreography of life and death. *J. Clin. Immunol.* 23, 317–332.

Biermans, W., Bakker, A., and Jacob, W. (1990). Contact sites between inner and outer mitochondrial membrane: A dynamic microcompartment for creatine kinase activity. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1018, 225–228.

Blaineau, S.V., and Aouacheria, A. (2009). BCL2DB: moving “helix-bundled” BCL-2 family members to their database. *Apoptosis* 14, 923–925.

Blanpain, C., Horsley, V., and Fuchs, E. (2007). Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell* 128, 445–458.

Bloom, M., Davis, J.H., and Mackay, A.L. (1981). Direct determination of the oriented sample nmr spectrum from the powder spectrum for systems with local axial symmetry. *Chemical Physics Letters* 80, 198–202.

Bogner, C., Leber, B., and Andrews, D.W. (2010). Apoptosis: embedded in membranes. *Current Opinion in Cell Biology* 22, 845–851.

De Botton, S., Sabri, S., Daugas, E., Zermati, Y., Guidotti, J.E., Hermine, O., Kroemer, G., Vainchenker, W., and Debili, N. (2002). Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood* 100, 1310–1317.

Bozelli, J.C., Jr, Sasahara, E.T., Pinto, M.R.S., Nakaie, C.R., and Schreier, S. (2012). Effect of head group and curvature on binding of the antimicrobial peptide tritrpticin to lipid membranes. *Chem. Phys. Lipids* 165, 365–373.

Brogden, K.A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 238–250.

Buck-Koehntop, B.A., Mascioni, A., Buffy, J.J., and Veglia, G. (2005). Structure, dynamics, and membrane topology of stannin: a mediator of neuronal cell apoptosis induced by trimethyltin chloride. *J. Mol. Biol.* 354, 652–665.

Bulheller, B.M., Rodger, A., and Hirst, J.D. (2007). Circular and linear dichroism of proteins. *Phys Chem Chem Phys* 9, 2020–2035.

Burnett, L.J., and Muller, B.H. (1971). Deuteron Quadrupole Coupling Constants in Three Solid Deuterated Paraffin Hydrocarbons: C₂D₆, C₄D₁₀, C₆D₁₄. *The Journal of Chemical Physics* 55, 5829–5831.

Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138, 628–644.

Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., and Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* 160, 189–200.

Chen, H., Vermulst, M., Wang, Y.E., Chomyn, A., Prolla, T.A., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2010). Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* 141, 280–289.

Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., and Green, D.R. (2010). The BCL-2 Family Reunion. *Molecular Cell* 37, 299–310.

Choi, S.-Y., Huang, P., Jenkins, G.M., Chan, D.C., Schiller, J., and Frohman, M.A. (2006). A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat. Cell Biol.* 8, 1255–1262.

Chou, J.J., Li, H., Salvesen, G.S., Yuan, J., and Wagner, G. (1999). Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell* 96, 615–624.

Chupin, V., Killian, J.A., and De Kruijff, B. (1987). ²H-nuclear magnetic resonance investigations on phospholipid acyl chain order and dynamics in the gramicidin-induced hexagonal HII phase. *Biophys. J.* 51, 395–405.

Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., Metzger, K., Frezza, C., Annaert, W., D’Adamio, L., et al. (2006). Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* 126, 163–175.

Cole, C., Barber, J.D., and Barton, G.J. (2008). The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research* 36, W197–W201.

Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., and Deléage, G. (2000). NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem. Sci.* 25, 147–150.

Cortese, J.D., Voglino, A.L., and Hackenbrock, C.R. (1998). Multiple conformations of physiological membrane-bound cytochrome c. *Biochemistry* 37, 6402–6409.

Cory, S., and Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* 2, 647–656.

Cregan, S.P., Dawson, V.L., and Slack, R.S. (2004). Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* 23, 2785–2796.

Cullen, S.P., Henry, C.M., and Martin, S.J. (2011). Staying Alive: Defensive Strategies in the BCL-2 Family Playbook. *Molecular Cell* 44, 509–510.

Czabotar, P.E., Lee, E.F., Van Delft, M.F., Day, C.L., Smith, B.J., Huang, D.C.S., Fairlie, W.D., Hinds, M.G., and Colman, P.M. (2007). Structural insights into the degradation of Mcl-1 induced by BH3 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 6217–6222.

Dahlberg, M., and Maliniak, A. (2010). Mechanical Properties of Coarse-Grained Bilayers Formed by Cardiolipin and Zwitterionic Lipids. *J. Chem. Theory Comput.* 6, 1638–1649.

Damberg, P., Jarvet, J., and Gräslund, A. (2001). [13] Micellar systems as solvents in peptide and protein structure determination. In *Nuclear Magnetic Resonance of Biological Macromolecules - Part B*, (Academic Press), pp. 271–285.

Danino, D., Moon, K.-H., and Hinshaw, J.E. (2004). Rapid constriction of lipid bilayers by the mechanochemical enzyme dynamin. *J. Struct. Biol.* 147, 259–267.

Davis, J.H., Jeffrey, K.R., Bloom, M., Valic, M.I., and Higgs, T.P. (1976). Quadrupolar echo deuteron magnetic resonance spectroscopy in ordered hydrocarbon chains. *Chemical Physics Letters* 42, 390–394.

Dawson, P.E., Muir, T.W., Clark-Lewis, I., and Kent, S.B. (1994). Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* 266, 776–779.

Day, C.L., Chen, L., Richardson, S.J., Harrison, P.J., Huang, D.C.S., and Hinds, M.G. (2005). Solution structure of prosurvival Mcl-1 and characterization of its binding by proapoptotic BH3-only ligands. *J. Biol. Chem.* 280, 4738–4744.

Day, C.L., Smits, C., Fan, F.C., Lee, E.F., Fairlie, W.D., and Hinds, M.G. (2008). Structure of the BH3 domains from the p53-inducible BH3-only proteins Noxa and Puma in complex with Mcl-1. *J. Mol. Biol.* 380, 958–971.

Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G.W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995). NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* 6, 277–293.

Denisov, A.Y., Madiraju, M.S.R., Chen, G., Khadir, A., Beauparlant, P., Attardo, G., Shore, G.C., and Gehring, K. (2003). Solution structure of human BCL-w: modulation of ligand binding by the C-terminal helix. *J. Biol. Chem.* 278, 21124–21128.

Desagher, S., and Martinou, J.-C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology* 10, 369–377.

Detmer, S.A., and Chan, D.C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 870–879.

Douliez, J.-P. (2004). Phase behavior of the palmitic acid/palmitin system. A ²H NMR study. *Langmuir* 20, 1543–1550.

Dufourc, E.J., Parish, E.J., Chitrakorn, S., and Smith, I.C.P. (1984). Structural and dynamical details of cholesterol-lipid interaction as revealed by deuterium NMR. *Biochemistry* 23, 6062–6071.

Dufourc, É.J., and Université de Bordeaux I (1986). La résonance magnétique nucléaire du deutérium et du phosphore dans les milieux organisés théorie et applications a l'étude de l'action de la mélittine et de la deltalysine sur les membranes biologiques.

Duneau, M., Boyer-Guittaut, M., Gonzalez, P., Charpentier, S., Normand, T., Dubois, M., Raimond, J., and Legrand, A. (2005). Galig, a novel cell death gene that encodes a mitochondrial protein promoting cytochrome c release. *Exp. Cell Res.* 302, 194–205.

Duvall, E., and Wyllie, A.. (1986). Death and the cell. *Immunology Today* 7, 115–119.

Eisenhaber, F., Frömmel, C., and Argos, P. (1996a). Prediction of secondary structural content of proteins from their amino acid composition alone. II. The paradox with secondary structural class. *Proteins* 25, 169–179.

Eisenhaber, F., Imperiale, F., Argos, P., and Frömmel, C. (1996b). Prediction of secondary structural content of proteins from their amino acid composition alone. I. New analytic vector decomposition methods. *Proteins* 25, 157–168.

Eisenhaber, F., Persson, B., and Argos, P. (1995). Protein structure prediction: recognition of primary, secondary, and tertiary structural features from amino acid sequence. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 1–94.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495–516.

Endo, T., and Yamano, K. (2010). Transport of proteins across or into the mitochondrial outer membrane. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1803, 706–714.

Fadeel, B., and Orrenius, S. (2005). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J. Intern. Med.* 258, 479–517.

Feldmann, G., Haouzi, D., Moreau, A., Durand-Schneider, A.M., Bringuier, A., Berson, A., Mansouri, A., Fau, D., and Pessayre, D. (2000). Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in Fas-mediated hepatic apoptosis in mice. *Hepatology* 31, 674–683.

Feng, W., Huang, S., Wu, H., and Zhang, M. (2007). Molecular basis of Bcl-xL's target recognition versatility revealed by the structure of Bcl-xL in complex with the BH3 domain of Beclin-1. *J. Mol. Biol.* 372, 223–235.

Fragneto, G., Graner, F., Charitat, T., Dubos, P., and Bellet-Amalric, E. (2000). Interaction of the Third Helix of Antennapedia Homeodomain with a Deposited Phospholipid Bilayer: A Neutron Reflectivity Structural Study. *Langmuir* 16, 4581–4588.

Franckhauser, C., Mamaeva, D., Heron-Milhavet, L., Fernandez, A., and Lamb, N.J.C. (2010). Distinct pools of cdc25C are phosphorylated on specific TP sites and differentially localized in human mitotic cells. *PLoS ONE* 5, e11798.

Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell* 1, 515–525.

Frederick, R.L., and Shaw, J.M. (2007). Moving mitochondria: establishing distribution of an essential organelle. *Traffic* 8, 1668–1675.

Frey, T.G., and Mannella, C.A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 25, 319–324.

Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B., et al. (2006). OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 126, 177–189.

Gakh, O., Cavadini, P., and Isaya, G. (2002). Mitochondrial processing peptidases. *Biochim. Biophys. Acta* 1592, 63–77.

Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A., and Lamb, N.J. (1991). Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 67, 1169–1179.

Glick, B.S., Brandt, A., Cunningham, K., Müller, S., Hallberg, R.L., and Schatz, G. (1992). Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell* 69, 809–822.

Glover, K.J., Whiles, J.A., Wu, G., Yu, N., Deems, R., Struppe, J.O., Stark, R.E., Komives, E.A., and Vold, R.R. (2001). Structural Evaluation of Phospholipid Bicelles for Solution-State Studies of Membrane-Associated Biomolecules. *Biophysical Journal* 81, 2163–2171.

Gogvadze, V., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2006). Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1757, 639–647.

Goldstein, J.C., Waterhouse, N.J., Juin, P., Evan, G.I., and Green, D.R. (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat. Cell Biol.* 2, 156–162.

Gonzalez, P., Duneau, M., Charpentier, S., Normand, T., Mollet, L., Dubois, M., and Legrand, A. (2007). Destabilization of Membranes Containing Cardiolipin or Its Precursors by Peptides Derived from Mitogaligin, a Cell Death Protein[†]. *Biochemistry* 46, 7374–7382.

Gonzalvez, F., and Gottlieb, E. (2007). Cardiolipin: setting the beat of apoptosis. *Apoptosis* 12, 877–885.

Gonzalvez, F., Pariselli, F., Dupaigne, P., Budihardjo, I., Lutter, M., Antonsson, B., Diolez, P., Manon, S., Martinou, J.-C., Goubern, M., et al. (2005). tBid interaction with cardiolipin primarily orchestrates mitochondrial dysfunctions and subsequently activates Bax and Bak. *Cell Death Differ.* *12*, 614–626.

Gonzalvez, F., Pariselli, F., Jalmar, O., Dupaigne, P., Sureau, F., Dellinger, M., Hendrickson, E.A., Bernard, S., and Petit, P.X. (2010). Mechanistic issues of the interaction of the hairpin-forming domain of tBid with mitochondrial cardiolipin. *PLoS ONE* *5*, e9342.

Gonzalvez, F., Schug, Z.T., Houtkooper, R.H., MacKenzie, E.D., Brooks, D.G., Wanders, R.J.A., Petit, P.X., Vaz, F.M., and Gottlieb, E. (2008). Cardiolipin provides an essential activating platform for caspase-8 on mitochondria. *J. Cell Biol.* *183*, 681–696.

Goping, I.S., Barry, M., Liston, P., Sawchuk, T., Constantinescu, G., Michalak, K.M., Shostak, I., Roberts, D.L., Hunter, A.M., Korneluk, R., et al. (2003). Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. *Immunity* *18*, 355–365.

Gorbenko, G.P. (1999). Structure of cytochrome c complexes with phospholipids as revealed by resonance energy transfer. *Biochim. Biophys. Acta* *1420*, 1–13.

Gottlieb, E. (2006). OPA1 and PARL keep a lid on apoptosis. *Cell* *126*, 27–29.

Green, D.R., and Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* *305*, 626–629.

Grélard, A., Loudet, C., Diller, A., and Dufourc, E.J. (2010). NMR Spectroscopy of Lipid Bilayers. In *Membrane Protein Structure Determination*, J.-J. Lacapère, ed. (Humana Press), pp. 341–359.

Guittaut, M., Charpentier, S., Normand, T., Dubois, M., Raimond, J., and Legrand, A. (2001). Identification of an internal gene to the human Galectin-3 gene with two different overlapping reading frames that do not encode Galectin-3. *J. Biol. Chem.* *276*, 2652–2657.

Halskau, O., Underhaug, J., Frøystein, N.A., and Martínez, A. (2005). Conformational flexibility of alpha-lactalbumin related to its membrane binding capacity. *J. Mol. Biol.* *349*, 1072–1086.

Harbison, N.W., Bhattacharya, S., and Eliezer, D. (2012). Assigning backbone NMR resonances for full length tau isoforms: efficient compromise between manual assignments and reduced dimensionality. *PLoS ONE* *7*, e34679.

Heiden, M.G.V., and Thompson, C.B. (1999). Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nature Cell Biology* *1*, E209–E216.

Helfrich, W. (1973). Lipid bilayer spheres: Deformation and birefringence in magnetic fields. *Physics Letters A* 43, 409–410.

Hennighausen, L., and Robinson, G.W. (2005). Information networks in the mammary gland. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 715–725.

Herlan, M., Vogel, F., Bornhovd, C., Neupert, W., and Reichert, A.S. (2003). Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J. Biol. Chem.* 278, 27781–27788.

Hess, B., Kutzner, C., Van der Spoel, D., and Lindahl, E. (2008). GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *J. Chem. Theory Comput.* 4, 435–447.

Hilty, C., Wider, G., Fernández, C., and Wüthrich, K. (2004). Membrane protein-lipid interactions in mixed micelles studied by NMR spectroscopy with the use of paramagnetic reagents. *Chembiochem* 5, 467–473.

Hinds, M.G., Smits, C., Fredericks-Short, R., Risk, J.M., Bailey, M., Huang, D.C.S., and Day, C.L. (2007). Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets. *Cell Death Differ.* 14, 128–136.

Hollenbeck, P.J., and Saxton, W.M. (2005). The axonal transport of mitochondria. *J. Cell. Sci.* 118, 5411–5419.

Horwich, A. (1990). Protein import into mitochondria and peroxisomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2, 625–633.

Hruby, V.J., Alves, I., Cowell, S., Salamon, Z., and Tollin, G. (2010). Use of plasmon waveguide resonance (PWR) spectroscopy for examining binding, signaling and lipid domain partitioning of membrane proteins. *Life Sci.* 86, 569–574.

Hwang, P.M., Zhou, N., Shan, X., Arrowsmith, C.H., and Vogel, H.J. (1998). Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin. *Biochemistry* 37, 4288–4298.

Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T., and Mihara, K. (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J.* 25, 2966–2977.

Jacobson, M.D., Weil, M., and Raff, M.C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* 88, 347–354.

John, G.B., Shang, Y., Li, L., Renken, C., Mannella, C.A., Selker, J.M.L., Rangell, L., Bennett, M.J., and Zha, J. (2005). The Mitochondrial Inner Membrane Protein Mitofilin Controls Cristae Morphology. *Mol. Biol. Cell* 16, 1543–1554.

Johnson, B., and Blevins, R. (1994). NMRView, A Computer Program for the Visualization and Analysis of NMR Data. *J. Biomol NMR* 4, 603–614.

Karbowski, M., Lee, Y.-J., Gaume, B., Jeong, S.-Y., Frank, S., Nechushtan, A., Santel, A., Fuller, M., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2002). Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J. Cell Biol.* 159, 931–938.

Karbowski, M., Neutzner, A., and Youle, R.J. (2007). The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division. *J. Cell Biol.* 178, 71–84.

Kaufmann, T., Schlipf, S., Sanz, J., Neubert, K., Stein, R., and Borner, C. (2003). Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *J. Cell Biol.* 160, 53–64.

Keij, J.F., Bell-Prince, C., and Steinkamp, J.A. (2000). Staining of mitochondrial membranes with 10-nonyl acridine orange MitoFluor Green, and MitoTracker Green is affected by mitochondrial membrane potential altering drugs. *Cytometry* 39, 203–210.

Kemper, C., Habib, S.J., Engl, G., Heckmeyer, P., Dimmer, K.S., and Rapaport, D. (2008). Integration of tail-anchored proteins into the mitochondrial outer membrane does not require any known import components. *J. Cell. Sci.* 121, 1990–1998.

Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., and Lemasters, J.J. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch. Biochem. Biophys.* 462, 245–253.

Kim, T.-H., Zhao, Y., Ding, W.-X., Shin, J.N., He, X., Seo, Y.-W., Chen, J., Rabinowich, H., Amoscato, A.A., and Yin, X.-M. (2004). Bid-Cardiolipin Interaction at Mitochondrial Contact Site Contributes to Mitochondrial Cristae Reorganization and Cytochrome C Release. *Mol. Biol. Cell* 15, 3061–3072.

Van der Klei, I.J., Veenhuis, M., and Neupert, W. (1994). A morphological view on mitochondrial protein targeting. *Microsc. Res. Tech.* 27, 284–293.

Komiya, T., Rospert, S., Koehler, C., Looser, R., Schatz, G., and Mihara, K. (1998). Interaction of mitochondrial targeting signals with acidic receptor domains along the protein import pathway: evidence for the “acid chain” hypothesis. *The EMBO Journal* 17, 3886–3898.

Koradi, R., Billeter, M., and Wüthrich, K. (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph* 14, 51–55, 29–32.

Koshiba, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* **305**, 858–862.

Kosol, S., and Zangger, K. (2010). Dynamics and orientation of a cationic antimicrobial peptide in two membrane-mimetic systems. *J. Struct. Biol.* **170**, 172–179.

Krzeminski, M., Loth, K., Boelens, R., and Bonvin, A.M. (2010). SAMPLEX: Automatic mapping of perturbed and unperturbed regions of proteins and complexes. *BMC Bioinformatics* **11**, 51.

Kumar, A. (2009). An overview of nested genes in eukaryotic genomes. *Eukaryotic Cell* **8**, 1321–1329.

Kutik, S., Stojanovski, D., Becker, L., Becker, T., Meinecke, M., Krüger, V., Prinz, C., Meisinger, C., Guiard, B., Wagner, R., et al. (2008). Dissecting membrane insertion of mitochondrial beta-barrel proteins. *Cell* **132**, 1011–1024.

Kuwana, T., Mackey, M.R., Perkins, G., Ellisman, M.H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* **111**, 331–342.

Ladokhin, A.S., Selsted, M.E., and White, S.H. (1997). Bilayer interactions of indolicidin, a small antimicrobial peptide rich in tryptophan, proline, and basic amino acids. *Biophys. J.* **72**, 794–805.

Ladokhin, A.S., Selsted, M.E., and White, S.H. (1999). CD spectra of indolicidin antimicrobial peptides suggest turns, not polyproline helix. *Biochemistry* **38**, 12313–12319.

Lakowicz, J. (1999). Principles of fluorescence spectroscopy (New York: Kluwer Academic/Plenum).

Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* **26**, 283–291.

Lavrik, I., Golks, A., and Krammer, P.H. (2005). Death receptor signaling. *J. Cell. Sci.* **118**, 265–267.

Lee, Y., Jeong, S.-Y., Karbowski, M., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2004). Roles of the Mammalian Mitochondrial Fission and Fusion Mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in Apoptosis. *Mol. Biol. Cell* **15**, 5001–5011.

Lelièvre, D., Barta, P., Aucagne, V., and Delmas, A.F. (2008). Preparation of peptide thioesters using Fmoc strategy through hydroxyl side chain anchoring. *Tetrahedron Letters* **49**, 4016–4019.

Lenaz, G., and Genova, M.L. (2009). Structural and functional organization of the mitochondrial respiratory chain: A dynamic super-assembly. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, 1750–1772.

Lenaz, G., and Genova, M.L. (2010). Structure and Organization of Mitochondrial Respiratory Complexes: A New Understanding of an Old Subject. *Antioxidants & Redox Signaling* 12, 961–1008.

Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., and Korsmeyer, S.J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2, 183–192.

Linge, J.P., O'Donoghue, S.I., and Nilges, M. (2001). Automated assignment of ambiguous nuclear overhauser effects with ARIA. *Meth. Enzymol.* 339, 71–90.

Liu, X., Dai, S., Zhu, Y., Marrack, P., and Kappler, J.W. (2003). The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function. *Immunity* 19, 341–352.

Liu, Y., Han, F., Xie, Y., and Wang, Y. (2011). Comparative antimicrobial activity and mechanism of action of bovine lactoferricin-derived synthetic peptides. *Biometals* 24, 1069–1078.

Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S.W.G., Bouchier-Hayes, L., Temirov, J., McCormick, L.L., Dillon, C.P., and Green, D.R. (2011). A Unified Model of Mammalian BCL-2 Protein Family Interactions at the Mitochondria. *Molecular Cell* 44, 517–531.

Loudet, C., Diller, A., Grélard, A., Oda, R., and Dufourc, E.J. (2010). Biphenyl phosphatidylcholine: A promoter of liposome deformation and bicelle collective orientation by magnetic fields. *Progress in Lipid Research* 49, 289–297.

Lovell, J.F., Billen, L.P., Bindner, S., Shamas-Din, A., Fradin, C., Leber, B., and Andrews, D.W. (2008). Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell* 135, 1074–1084.

Lutter, M., Fang, M., Luo, X., Nishijima, M., Xie, X., and Wang, X. (2000). Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat. Cell Biol.* 2, 754–761.

Lutter, M., Perkins, G.A., and Wang, X. (2001). The pro-apoptotic Bcl-2 family member tBid localizes to mitochondrial contact sites. *BMC Cell Biol.* 2, 22.

Madesh, M., Antonsson, B., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., and Hajnóczky, G. (2002). Rapid Kinetics of tBid-Induced Cytochrome C and Smac/DIABLO Release and Mitochondrial Depolarization. *J. Biol. Chem.* 277, 5651–5659.

Magzoub, M., Eriksson, L.E.G., and Gräslund, A. (2002). Conformational states of the cell-penetrating peptide penetratin when interacting with phospholipid vesicles: effects of surface charge and peptide concentration. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1563, 53–63.

Magzoub, M., Kilk, K., Eriksson, L.E.G., Langel, Ü., and Gräslund, A. (2001). Interaction and structure induction of cell-penetrating peptides in the presence of phospholipid vesicles. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1512, 77–89.

Margulis, L. (1970). Origin of eukaryotic cells; evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant, and animal cells on the Precambrian earth. (New Haven: Yale University Press).

Marius, P., De Planque, M.R.R., and Williamson, P.T.F. (2012). Probing the interaction of lipids with the non-annular binding sites of the potassium channel KcsA by magic-angle spinning NMR. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1818, 90–96.

Marrink, S.J., Risselada, H.J., Yefimov, S., Tieleman, D.P., and De Vries, A.H. (2007). The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations. *J. Phys. Chem. B* 111, 7812–7824.

McGuffin, L.J., Bryson, K., and Jones, D.T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16, 404–405.

McMahon, H.T., and Gallop, J.L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* 438, 590–596.

Merklinger, E., Gofman, Y., Kedrov, A., Driessen, A.J.M., Ben-Tal, N., Shai, Y., and Rapaport, D. (2012). Membrane integration of a mitochondrial signal-anchored protein does not require additional proteinaceous factors. *Biochem. J.* 442, 381–389.

Merrifield, R.B. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149–2154.

Moldoveanu, T., Liu, Q., Tocilj, A., Watson, M., Shore, G., and Gehring, K. (2006). The X-ray structure of a BAK homodimer reveals an inhibitory zinc binding site. *Mol. Cell* 24, 677–688.

Mondal Roy, S., and Sarkar, M. (2011). Membrane fusion induced by small molecules and ions. *J Lipids* 2011, 528784.

Monticelli, L., Kandasamy, S.K., Periole, X., Larson, R.G., Tieleman, D.P., and Marrink, S.-J. (2008). The MARTINI Coarse-Grained Force Field: Extension to Proteins. *J. Chem. Theory Comput.* 4, 819–834.

Moreau, C., Cartron, P.-F., Hunt, A., Meflah, K., Green, D.R., Evan, G., Vallette, F.M., and Juin, P. (2003). Minimal BH3 Peptides Promote Cell Death by Antagonizing Anti-Apoptotic Proteins. *J. Biol. Chem.* 278, 19426–19435.

Morris, R.L., and Hollenbeck, P.J. (1995). Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J. Cell Biol.* *131*, 1315–1326.

Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., et al. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* *381*, 335–341.

Mueller, P., Rudin, D.O., Tien, H.T., and Wescott, W.C. (1962). Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature* *194*, 979–980.

Nakai, K., and Horton, P. (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci.* *24*, 34–36.

Neupert, W., and Herrmann, J.M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 723–749.

Nguyen, L.T., De Boer, L., Zaat, S.A.J., and Vogel, H.J. (2011). Investigating the cationic side chains of the antimicrobial peptide tritrypticin: hydrogen bonding properties govern its membrane-disruptive activities. *Biochim. Biophys. Acta* *1808*, 2297–2303.

Nicolay, K., Rojo, M., Wallimann, T., Demel, R., and Hovius, R. (1990). The role of contact sites between inner and outer mitochondrial membrane in energy transfer. *Biochim. Biophys. Acta* *1018*, 229–233.

Nijhawan, D., Honarpour, N., and Wang, X. (2000). Apoptosis in neural development and disease. *Annu. Rev. Neurosci.* *23*, 73–87.

Norbury, C.J., and Hickson, I.D. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *41*, 367–401.

Oberstein, A., Jeffrey, P.D., and Shi, Y. (2007). Crystal Structure of the Bcl-XL-Bcl-2 Peptide Complex BECLIN 1 IS A NOVEL BH3-ONLY PROTEIN. *J. Biol. Chem.* *282*, 13123–13132.

Ohvo-Rekilä, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P., and Peter Slotte, J. (2002). Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research* *41*, 66–97.

Orrenius, S. (2004). Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol. Lett.* *149*, 19–23.

Osborne, B.A. (1996). Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* *8*, 245–254.

Ott, M., Robertson, J.D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2002). Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 1259–1263.

Paddy, M.R., Dahlquist, F.W., Dratz, E.A., and Deese, A.J. (1985). Simultaneous observation of order and dynamics at several defined positions in a single acyl chain using deuterium NMR of single acyl chain perdeuterated phosphatidylcholines. *Biochemistry* *24*, 5988–5995.

Palade, G.E. (1953). An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J. Histochem. Cytochem.* *1*, 188–211.

Parcellier, A., Tintignac, L.A., Zhuravleva, E., Cron, P., Schenk, S., Bozulic, L., and Hemmings, B.A. (2009). Carboxy-Terminal Modulator Protein (CTMP) is a mitochondrial protein that sensitizes cells to apoptosis. *Cell. Signal.* *21*, 639–650.

Parker, M.A., King, V., and Howard, K.P. (2001). Nuclear magnetic resonance study of doxorubicin binding to cardiolipin containing magnetically oriented phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* *1514*, 206–216.

Perkins, G., Renken, C., Martone, M.E., Young, S.J., Ellisman, M., and Frey, T. (1997). Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J. Struct. Biol.* *119*, 260–272.

Petros, A.M., Medek, A., Nettesheim, D.G., Kim, D.H., Yoon, H.S., Swift, K., Matayoshi, E.D., Oltersdorf, T., and Fesik, S.W. (2001). Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 3012–3017.

Petros, A.M., Nettesheim, D.G., Wang, Y., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Mack, J., Swift, K., Matayoshi, E.D., Zhang, H., Thompson, C.B., et al. (2000). Rationale for Bcl-xL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies. *Protein Sci.* *9*, 2528–2534.

Pinheiro, T.J.T., and Watts, A. (1994). Resolution of Individual Lipids in Mixed Phospholipid Membranes and Specific Lipid-Cytochrome c Interactions by Magic-Angle Spinning Solid-State Phosphorus-31 NMR. *Biochemistry* *33*, 2459–2467.

Pott, T., and Dufourc, E.J. (1995). Action of melittin on the DPPC-cholesterol liquid-ordered phase: a solid state ²H- and ³¹P-NMR study. *Biophys. J.* *68*, 965–977.

Powell, G.L., and Marsh, D. (1985). Polymorphic phase behavior of cardiolipin derivatives studied by ³¹P NMR and X-ray diffraction. *Biochemistry* *24*, 2902–2908.

Rance, M., and Byrd, R.A. (1983). Obtaining high-fidelity spin-12 powder spectra in anisotropic media: Phase-cycled Hahn echo spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance* (1969) 52, 221–240.

Rautureau, G.J.P., Day, C.L., and Hinds, M.G. (2010). The structure of Boo/Diva reveals a divergent Bcl-2 protein. *Proteins* 78, 2181–2186.

Reiersen, H., and Rees, A.R. (2000). Trifluoroethanol may form a solvent matrix for assisted hydrophobic interactions between peptide side chains. *Protein Engineering* 13, 739–743.

Renahan, A.G., Booth, C., and Potten, C.S. (2001). What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 322, 1536–1538.

Respondek, M., Madl, T., Göbl, C., Golser, R., and Zangger, K. (2007). Mapping the orientation of helices in micelle-bound peptides by paramagnetic relaxation waves. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 5228–5234.

Rozek, A., Friedrich, C.L., and Hancock, R.E. (2000). Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry* 39, 15765–15774.

Rupp, C., Steckel, H., and Müller, B.W. (2010). Mixed micelle formation with phosphatidylcholines: The influence of surfactants with different molecule structures. *International Journal of Pharmaceutics* 387, 120–128.

Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., Van Gurp, M., Van Loo, G., and Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861–2874.

Salamon, Z., Devanathan, S., Alves, I.D., and Tollin, G. (2005). Plasmon-waveguide resonance studies of lateral segregation of lipids and proteins into microdomains (rafts) in solid-supported bilayers. *J. Biol. Chem.* 280, 11175–11184.

Salamon, Z., Macleod, H.A., and Tollin, G. (1997). Coupled plasmon-waveguide resonators: a new spectroscopic tool for probing proteolipid film structure and properties. *Biophys. J.* 73, 2791–2797.

Salamon, Z., and Tollin, G. (2001). Optical anisotropy in lipid bilayer membranes: coupled plasmon-waveguide resonance measurements of molecular orientation, polarizability, and shape. *Biophys. J.* 80, 1557–1567.

Salamon, Z., and Tollin, G. (2004). Graphical analysis of mass and anisotropy changes observed by plasmon-waveguide resonance spectroscopy can provide useful insights into membrane protein function. *Biophys. J.* 86, 2508–2516.

Salay, L.C., Procopio, J., Oliveira, E., Nakaie, C.R., and Schreier, S. (2004). Ion channel-like activity of the antimicrobial peptide tritrpticin in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* **565**, 171–175.

Sanchez, J.-F., Hoh, F., Strub, M.-P., Aumelas, A., and Dumas, C. (2002). Structure of the cathelicidin motif of protegrin-3 precursor: structural insights into the activation mechanism of an antimicrobial protein. *Structure* **10**, 1363–1370.

Sani, M.-A., Dufourc, E.J., and Gröbner, G. (2009). How does the Bax- α 1 targeting sequence interact with mitochondrial membranes? The role of cardiolipin. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1788**, 623–631.

Sattler, M., Liang, H., Nettlesheim, D., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B., Chang, B.S., Minn, A.J., et al. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* **275**, 983–986.

Schafer, B., Quispe, J., Choudhary, V., Chipuk, J.E., Ajero, T.G., Du, H., Schneider, R., and Kuwana, T. (2009). Mitochondrial outer membrane proteins assist Bid in Bax-mediated lipidic pore formation. *Mol. Biol. Cell* **20**, 2276–2285.

Schibli, D.J., Hwang, P.M., and Vogel, H.J. (1999). Structure of the antimicrobial peptide tritrpticin bound to micelles: a distinct membrane-bound peptide fold. *Biochemistry* **38**, 16749–16755.

Schibli, D.J., Nguyen, L.T., Kernaghan, S.D., Rekdal, Ø., and Vogel, H.J. (2006). Structure-function analysis of tritrpticin analogs: potential relationships between antimicrobial activities, model membrane interactions, and their micelle-bound NMR structures. *Biophys. J.* **91**, 4413–4426.

Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S.A., Mannella, C.A., and Korsmeyer, S.J. (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev. Cell* **2**, 55–67.

Serasinghe, M.N., Seneviratne, A.M.P.B., Smrcka, A.V., and Yoon, Y. (2010). Identification and Characterization of Unique Proline-Rich Peptides Binding to the Mitochondrial Fission Protein hFis1. *J. Biol. Chem.* **285**, 620–630.

Shanmugam, G., Phambu, N., and Polavarapu, P.L. (2011). Unusual structural transition of antimicrobial VP1 peptide. *Biophysical Chemistry* **155**, 104–108.

Sheridan, C., and Martin, S.J. (2008). Commitment in apoptosis: slightly dead but mostly alive. *Trends in Cell Biology* **18**, 353–357.

Sheridan, C., and Martin, S.J. (2010). Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis. *Mitochondrion* **10**, 640–648.

Shimizu, S., Narita, M., and Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483–487.

Shroff, E.H., Snyder, C.M., Budinger, G.R.S., Jain, M., Chew, T.-L., Khuon, S., Perlman, H., and Chandel, N.S. (2009). BH3 Peptides Induce Mitochondrial Fission and Cell Death Independent of BAX/BAK. *PLoS ONE* 4, e5646.

Silvius, J.R. (2003). Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1610, 174–183.

Sjostrand, F.S. (1953). Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes. *Nature* 171, 30–32.

Smits, C., Czabotar, P.E., Hinds, M.G., and Day, C.L. (2008). Structural plasticity underpins promiscuous binding of the prosurvival protein A1. *Structure* 16, 818–829.

Sordet, O., Rébé, C., Plenchette, S., Zermati, Y., Hermine, O., Vainchenker, W., Garrido, C., Solary, E., and Dubrez-Daloz, L. (2002). Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood* 100, 4446–4453.

Sorice, M., Manganelli, V., Matarrese, P., Tinari, A., Misasi, R., Malorni, W., and Garofalo, T. (2009). Cardiolipin-enriched raft-like microdomains are essential activating platforms for apoptotic signals on mitochondria. *FEBS Lett.* 583, 2447–2450.

Sreerama, N., Venyaminov, S.Y., and Woody, R.W. (1999). Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Sci* 8, 370–380.

Stojanovski, D., Milenkovic, D., Müller, J.M., Gabriel, K., Schulze-Specking, A., Baker, M.J., Ryan, M.T., Guiard, B., Pfanner, N., and Chacinska, A. (2008). Mitochondrial protein import: precursor oxidation in a ternary complex with disulfide carrier and sulfhydryl oxidase. *J. Cell Biol.* 183, 195–202.

Strasser, A. (2005). The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 189–200.

Suen, D.-F., Norris, K.L., and Youle, R.J. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev.* 22, 1577–1590.

Suzuki, M., Youle, R.J., and Tjandra, N. (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103, 645–654.

Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 621–632.

Taylor, R.C., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 231–241.

Toke, O. (2005). Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers* 80, 717–735.

Tondera, D., Grandemange, S., Jourdain, A., Karbowski, M., Mattenberger, Y., Herzig, S., Da Cruz, S., Clerc, P., Raschke, I., Merkwirth, C., et al. (2009). SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J.* 28, 1589–1600.

Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 735–747.

Tresset, G. (2009). The multiple faces of self-assembled lipidic systems. *PMC Biophysics* 2, 3.

Truscott, K.N., Brandner, K., and Pfanner, N. (2003). Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr. Biol.* 13, R326–337.

Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C.M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440–1443.

Tuominen, E.K.J., Wallace, C.J.A., and Kinnunen, P.K.J. (2002). Phospholipid-cytochrome c interaction: evidence for the extended lipid anchorage. *J. Biol. Chem.* 277, 8822–8826.

Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J.A., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., et al. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 27, 433–446.

Uren, R.T., Dewson, G., Chen, L., Coyne, S.C., Huang, D.C.S., Adams, J.M., and Kluck, R.M. (2007). Mitochondrial permeabilization relies on BH3 ligands engaging multiple prosurvival Bcl-2 relatives, not Bak. *J. Cell Biol.* 177, 277–287.

Varadi, A., Johnson-Cadwell, L.I., Cirulli, V., Yoon, Y., Allan, V.J., and Rutter, G.A. (2004). Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1. *J. Cell. Sci.* 117, 4389–4400.

Vaux, D.L., Cory, S., and Adams, J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440–442.

Voet, D., and Voet, J.G. (2005). *Biochimie (De Boeck Supérieur)*.

Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W., and Reichert, A.S. (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.* 175, 237–247.

De Vos, K.J., Allan, V.J., Grierson, A.J., and Sheetz, M.P. (2005). Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission. *Curr. Biol.* **15**, 678–683.

Walrant, A., Vogel, A., Correia, I., Lequin, O., Olausson, B.E.S., Desbat, B., Sagan, S., and Alves, I.D. (2012). Membrane interactions of two arginine-rich peptides with different cell internalization capacities. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1818**, 1755–1763.

Wang, Y. (2002). Probability-based protein secondary structure identification using combined NMR chemical-shift data. *Protein Science* **11**, 852–861.

Webb, C.T., Gorman, M.A., Lazarou, M., Ryan, M.T., and Gulbis, J.M. (2006). Crystal structure of the mitochondrial chaperone TIM9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller. *Mol. Cell* **21**, 123–133.

Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* **14**, 2060–2071.

Wiedemann, N., Pfanner, N., and Ryan, M.T. (2001). The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria. *EMBO J.* **20**, 951–960.

Wiegant, J., Brouwer, A.K., Tanke, H.J., and Dirks, R.W. (2010). Visualizing Nucleic Acids in Living Cells by Fluorescence In Vivo Hybridization. In *Fluorescence in Situ Hybridization (FISH)*, J.M. Bridger, and E.V. Volpi, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 239–246.

Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., Van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., et al. (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* **315**, 856–859.

Wishart, D.S., Bigam, C.G., Holm, A., Hodges, R.S., and Sykes, B.D. (1995). ¹H, ¹³C and ¹⁵N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *J. Biomol. NMR* **5**, 67–81.

Wishart, D.S., Sykes, B.D., and Richards, F.M. (1991). Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *J. Mol. Biol.* **222**, 311–333.

Wishart, D.S., Sykes, B.D., and Richards, F.M. (1992). The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry* **31**, 1647–1651.

Yau, W.-M., Wimley, W.C., Gawrisch, K., and White, S.H. (1998). The Preference of Tryptophan for Membrane Interfaces [†]. *Biochemistry* **37**, 14713–14718.

Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 47–59.

Yu, P., Ma, D., and Xu, M. (2005). Nested genes in the human genome. *Genomics* 86, 414–422.

Zamoon, J., Mascioni, A., Thomas, D.D., and Veglia, G. (2003). NMR solution structure and topological orientation of monomeric phospholamban in dodecylphosphocholine micelles. *Biophys. J.* 85, 2589–2598.

Zha, H., Aimé-Sempé, C., Sato, T., and Reed, J.C. (1996). Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J. Biol. Chem.* 271, 7440–7444.

Violette SENILLE

Etude structurale et fonctionnelle du fragment d'adressage mitochondrial de la mitogaligine

Résumé

Ce travail a porté sur une nouvelle protéine impliquée dans l'apoptose, la mitogaligine, et plus particulièrement sur le fragment interne [31-53] responsable de son adressage à la mitochondrie. L'objectif général du projet est de comprendre au niveau atomique son mécanisme d'action sur les membranes mitochondriales.

Le fragment d'adressage est à lui seul cytotoxique. C'est pourquoi j'ai concentré l'essentiel de mon travail de thèse sur son étude. Nous avons défini sa toxicité sur des cellules humaines et montré qu'il perturbait l'intégrité membranaire, excluant certaines protéines de la mitochondrie. Ce phénomène concorde avec le relargage de cytochrome c, à l'origine du déclenchement de l'apoptose par la voie mitochondriale.

Pour mieux comprendre le mode d'action du fragment d'adressage et le rôle joué par la cardiolipine, lipide caractéristique des membranes mitochondriales, j'ai étudié par différentes techniques biophysiques complémentaires l'effet du milieu membranaire sur la structuration du peptide et l'effet du peptide sur la membrane. Le peptide a une très forte affinité (13nM) pour des membranes contenant de la cardiolipine. Il se place à plat sur la membrane, s'enfouissant dans l'interface, sans induire d'organisation particulière des lipides. De plus, nous avons mis en évidence que le peptide était capable d'induire une courbure positive de la membrane, ce qui va interférer avec de nombreux processus vitaux pour la cellule.

Enfin, pour réaliser les études structurales et fonctionnelles de la protéine entière, j'ai participé aux premières étapes de production de mitogaligine, qui s'est avéré très délicate aussi bien par voie d'expression que par synthèse chimique.

Mots clés : mitogaligine, apoptose, fragment d'adressage mitochondrial, cytotoxicité, structure, interaction, lipides, cardiolipine.

Structural and functional analysis of the mitochondrial addressing fragment of mitogaligin

Abstract

This work is about a new protein of apoptosis, mitogaligin, and more particularly about the internal fragment [31-53] responsible for its mitochondrial targeting. General aim of the project is to understand at the atomic scale its mechanism of action on mitochondrial membranes.

The addressing fragment is cytotoxic by itself. That is the reason why I focused the main part of my work on this peptide. We defined its toxicity on human cells and showed that it was capable of disrupting the membrane integrity, excluding some proteins from mitochondrion. This phenomenon agrees with the release of cytochrom c, which induces apoptosis by the mitochondrial pathway.

In order to better understand the mode of action of the addressing fragment and the role played by Cardiolipin, a specific lipid of mitochondrial membranes, I studied by various and complementary biophysics techniques the effect of membrane environments on the peptide structuration and the effect of the peptide on the membrane. The peptide has a very high affinity (13nM) for cardiolipin-containing membranes. It takes place parallel to the membrane, standing at the interface, without leading to a particular lipids organization. Furthermore, we highlighted that the peptide was capable of inducing a positive curvature of the membrane, what is going to interfere with numerous vital processes for the cell.

Finally, to realize the structural and functional studies of the whole protein, I was involved in the first stages of mitogaligin's production, which has proved to be very tricky either by recombinant pathway or by chemical synthesis.

Keywords : mitogaligin, apoptosis, mitochondrial addressing fragment, cytotoxicity, structure, interaction, lipids, cardiolipin.



Centre de Biophysique Moléculaire.
Rue Charles Sadron
45071 Orléans Cedex 02

