

Modèle d'étude de l'insertion des protéines membranaires

La colicine A produite par *Citrobacter freundii* et l'aérollysine produite par *Aeromonas hydrophila* sont deux protéines bien représentatives de classes très différentes de protéines formatrices de pores. La colicine A est une protéine formée uniquement d'hélices α qui possède une « épingle à cheveux » hydrophobe enfouie au sein de sa structure en milieu aqueux. C'est une « protéine membranaire dite inversée ». L'aérollysine, en revanche, est formée essentiellement de feuilletts β et ne possède pas de longue séquence hydrophobe. Cette toxine est sécrétée sous la forme d'un précurseur qui devient actif après clivage protéolytique des 41 à 43 acides aminés C-terminaux. Les mécanismes d'insertion de ces protéines dans une bicouche lipidique ainsi que leur structure finale dans la membrane constituent d'intéressants modèles pour comprendre les mécanismes d'insertion et de translocation des protéines membranaires.

F. Gisou van der Goot
Franc Pattus

ADRESSE

F. G. Van der Goot : chercheur. F. Pattus : directeur de recherche au Cnrs, chef de groupe. Laboratoire européen de biologie moléculaire (EMBL). Postfach 10.2209. Meyerhofstrasse 1, D6900 Heidelberg, Allemagne.

TIRÉS A PART

F. Pattus.

m/s n° 2 vol. 9, février 93

Les membranes biologiques sont constituées essentiellement d'une bicouche lipidique et de protéines membranaires. Dans cette bicouche, les lipides, qui sont des molécules amphiphiles, sont organisés avec leur tête polaire orientée vers le milieu aqueux et leurs chaînes d'acides gras vers l'intérieur hydrophobe. Ils forment ainsi une barrière extrêmement efficace contre le libre passage de solutés et de macromolécules solubles. Les protéines membranaires assurent la fonction d'échange de matière, d'énergie et d'informations, essentielle à la survie de la cellule. La membrane cytoplasmique, en particulier, permet aux cellules de mainte-

nir une composition chimique du cytosol différente de celle du milieu extérieur.

La pathogénicité de certaines bactéries est due à la production de toxines protéiques capables de détruire les gradients ioniques et la balance osmotique qui existe de part et d'autre de la membrane cytoplasmique, perturbant ainsi le métabolisme cellulaire. Leur activité ionophorique provient de leur capacité à s'insérer de façon permanente dans une membrane biologique et à former, ainsi, des pores transmembranaires. Comment ces macromolécules, synthétisées par la bactérie sous une forme soluble, sont capables de devenir des protéines intrinsèques de membrane

RÉFÉRENCES

1. Li J. Bacterial toxins. *Curr Op Struct Biol* 1992 ; 2 : 545-56.
2. Pattus F, Massotte D, Wilmsen HU, *et al.* Colicins : prokaryotic killer-pores *Experientia* 1990 ; 46 : 180-92.
3. Géli V, Baty D, Pattus F, Lazdunski C. Topology and function of the integral membrane protein conferring immunity to colicin A. *Mol Microbiol* 1989 ; 3 : 679-87.
4. Lazdunski C, Baty D, Gely V, *et al.* The membrane channel-forming colicin A : synthesis, secretion, structure, action and immunity. *Biochim Biophys Acta* 1988 ; 947 : 445-64.
5. Cramer WA, Cohen FS, Merrill AR, Song HY. Structure and dynamics of the colicin E1 channel. *Mol Microbiol* 1990 ; 4 : 519-26.
6. Bourdineau J-P, Boulanger P, Lazdunski C, Letellier L. *In vivo* properties of colicin A : channel activity is voltage dependent but translocation may be voltage independent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 1037-41.
7. Schein SJ, Kagan B, Finkelstein A. Colicin K acts by forming voltage-dependent channels in phospholipid planar bilayer membranes. *Nature* 1978 ; 276 : 159-63.
8. Martincz MC, Lazdunski C, Pattus F. Isolation, molecular and functional properties of the C-terminal domain of colicin A. *EMBO J* 1983 ; 2 : 1501-7.
9. Parker MW, Pattus F, Tucker AD, Tsernoglou D. Structure of the membrane-pore-forming fragment of colicin A. *Nature* 1989 ; 337 : 93-6.
10. Parker MW, Postma JP, Pattus F, Tucker AD, Tsernoglou D. Refined structure of the pore-forming domain of colicin A at 2.4 Å resolution. *J Mol Biol* 1992 ; 224 : 639-57.
11. Parker MW, Tucker AD, Tsernoglou D, Pattus F. Insights into membrane insertion based on studies of colicins. *Trends Biochem Sci* 1990 ; 15 : 126-9.

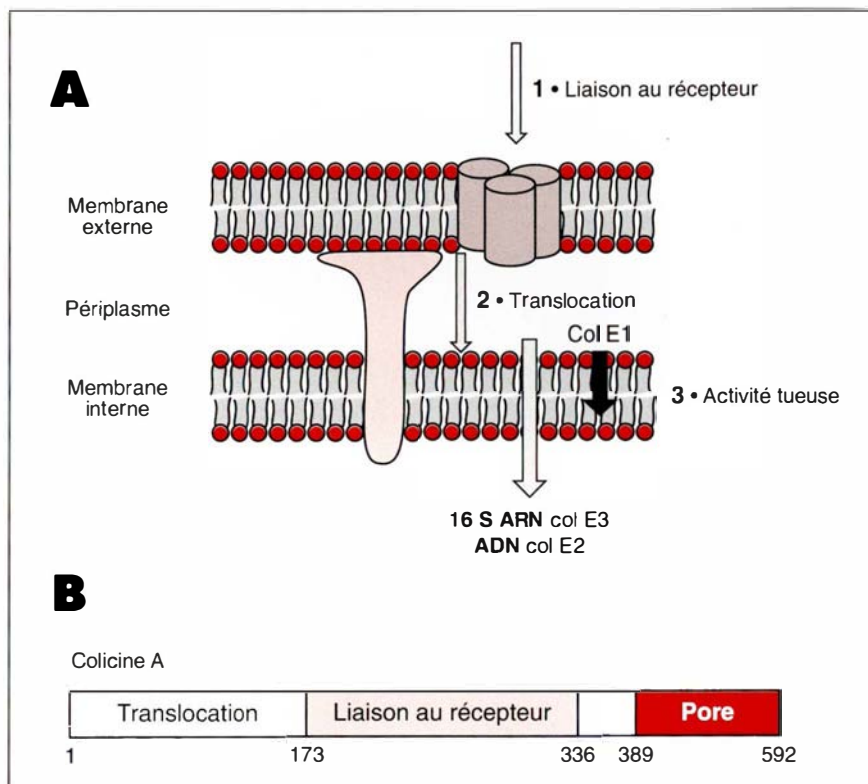


Figure 1. **Mécanismes d'action des colicines.** (A) L'activité des colicines peut être divisée en trois étapes : fixation sur un récepteur de la membrane externe, translocation au travers de l'enveloppe bactérienne et activité létale proprement dite (pore, nucléase). (B) La structure de la colicine A est modulaire. Elle est composée de trois domaines structuraux responsables chacun de l'une des trois étapes décrites ci-dessus.

est une question à laquelle nous n'avons actuellement que peu de réponses.

Une excellente revue vient d'être publiée sur les toxines bactériennes et, en particulier, celles formatrices de pores [1]. Dans cet article, nous nous contenterons de décrire deux types distincts de toxines bactériennes : la famille des colicines ionophoriques et l'aérolisine. Ces protéines ont des tailles, des structures secondaires et tertiaires, des cibles et des modes d'action très différents. Nous mentionnerons en quoi les études sur ces toxines permettent de mieux comprendre les mécanismes d'insertion et de translocation de protéines dans et au travers des membranes.

Les colicines

Les colicines forment une famille d'antibiotiques naturels produits par

des bactéries gram-négatives qui n'agissent que sur des souches bactériennes de la même espèce ou d'espèces voisines [2]. Ces protéines de 400 à 600 acides aminés sont solubles dans l'eau. Les gènes codant pour les colicines sont portés par des plasmides. Ces derniers codent aussi pour une protéine dite d'immunité qui rend la bactérie productrice insensible à la colicine qu'elle produit, *via* un mécanisme encore mal compris [3]. L'expression des colicines étant induite par des agents mutagènes, elles peuvent être produites en grande quantité, ce qui les rend accessibles aux études structurales par des méthodes spectroscopiques, biochimiques ou biophysiques. Le mode d'action de toutes les colicines peut être divisé en trois étapes (figure 1A). La colicine se lie d'abord à un récepteur sur la membrane externe de la bactérie cible, traverse

ensuite l'enveloppe bactérienne pour finalement rejoindre la cible cellulaire où elle va exercer son activité létale. Chacune de ces étapes est assurée par un domaine structural distinct de la protéine (figure 1B). En fonction de leur activité létale, les colicines peuvent être divisées en quatre groupes. Le groupe le plus important (colA, E1, B, N, K Ia et Ib), est celui des colicines qui forment des pores ioniques dans la membrane cytoplasmique des bactéries, induisant une dépolarisation de la cellule [4]. Les autres colicines appartiennent aux groupes des désoxyribonucléases (colE2), des ribonucléases (colE3) ou des inhibiteurs de la biosynthèse de la muréine (colM) (figure 1A).

Dans le cadre de cet article, nous n'aborderons que la famille des colicines ionophoriques [5]. *In vivo*, l'addition de ces colicines à des bactéries provoque un flux sortant massif du K^+ intracellulaire [6]. L'ouverture du canal est contrôlée par la valeur du potentiel transmembranaire.

In vitro, dans des bicouches lipidiques planes, ces colicines forment aussi des canaux ioniques dépendants du voltage [7]. La formation du canal est due plus précisément au domaine C-terminal (205 acides aminés pour la colicine A, 189 pour la colicine E1) dont la séquence est hautement conservée au sein de la famille [8]. Ce domaine, insensible aux protéases, peut être isolé après digestion par la trypsine, la thermolysine ou la bromélaïne. Bien que possédant une longue séquence hydrophobe de 35 à 49 acides aminés typique des protéines membranaires, les différents domaines C-terminaux, de même que les colicines entières correspondantes, sont parfaitement solubles dans l'eau. Le fragment C-terminal de la colicine A a été cristallisé et sa structure tertiaire en solution a pu être déterminée à 2,4 Å de résolution [9, 10]. Le peptide est constitué de 10 hélices α (figure 2). Deux de ces hélices, 8 et 9, forment au centre de la structure une épingle à cheveux hydrophobe autour de laquelle les huit autres, qui sont amphipathiques, forment une gaine de protection contre le solvant, assurant ainsi la solubilité de la protéine. Ce type de structure a été qualifié de « protéine membranaire inver-

sée » du fait de cette séquence hydrophobe centrale.

Sur la base de cette structure tridimensionnelle et de données biochimiques et spectroscopiques, un modèle de l'étape initiale d'insertion du fragment C-terminal dans la membrane a été proposé par Parker *et al.* ([10, 11], figure 3, p. 175). Le fragment C-terminal interagirait électrostatiquement avec les lipides néga-

tifs de la membrane par l'intermédiaire d'un anneau de huit résidus chargés positivement qui entourent la boucle reliant les hélices 8 et 9. Ces deux hélices se trouvent alors positionnées perpendiculairement au plan de la membrane. Au voisinage de celle-ci, un changement de conformation de la protéine entraînerait l'ouverture de la structure, tel un parapluie, permettant à l'« épingle à

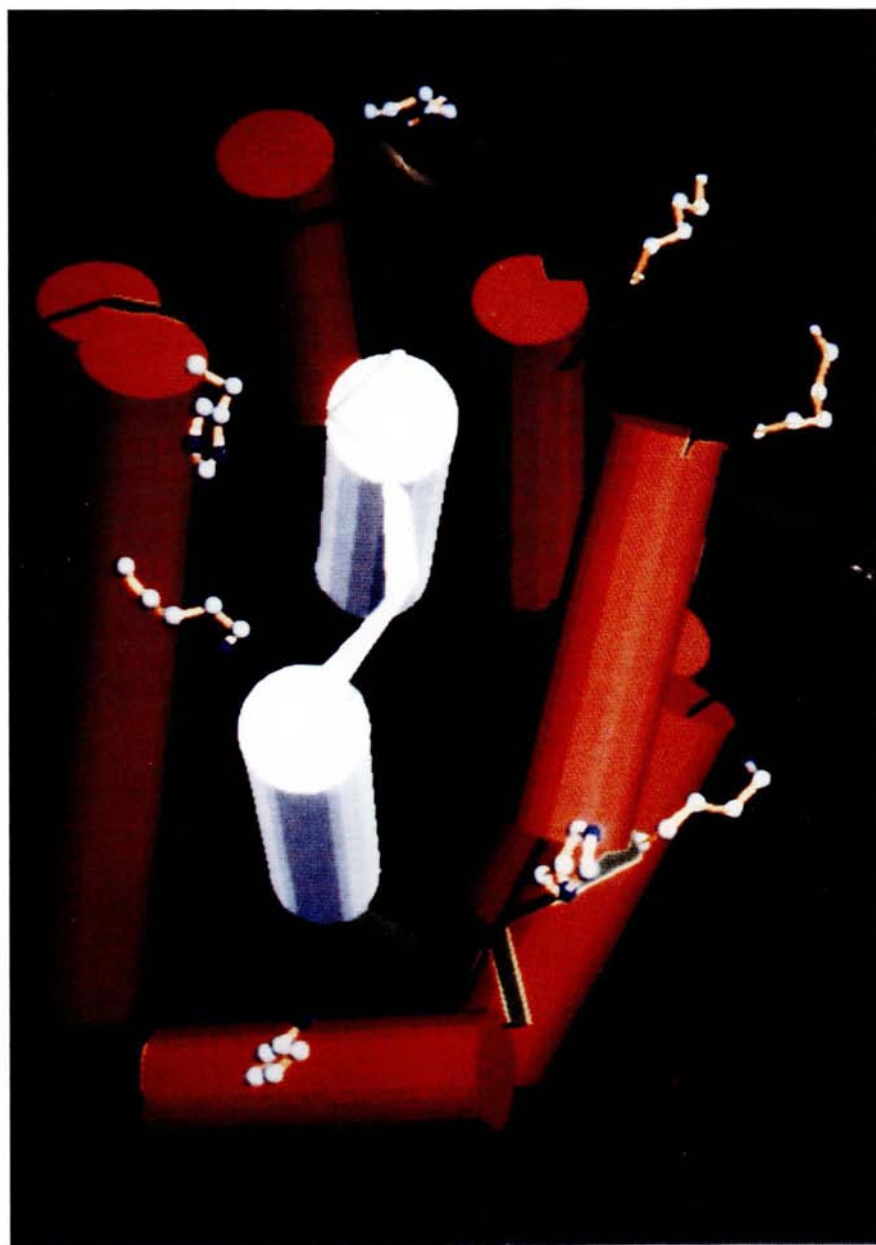


Figure 2. **Structure tridimensionnelle schématique du fragment formateur de pore de la colicine A.** Les deux hélices colorées en blanc sont hydrophobes et complètement enfouies à l'intérieur de la protéine, ce qui explique sa parfaite solubilité dans l'eau. (D'après [9, 10].)

RÉFÉRENCES

12. Lakey JH, González-Mañas JM, Van der Goot FG, Pattus F. The membrane insertion of colicins. *FEBS Lett* 1992 ; 307 : 26-9.
 13. Lakey JH, Massotte D, Heitz F, *et al.* Membrane insertion of the pore-forming domain of colicin A : a spectroscopic study. *Eur J Biochem* 1991 ; 196 : 599-607.
 14. Brunden KR, Uratani Y, Cramer WA. Dependence of the conformation of a colicin E1 channel-forming peptide on acidic pH and solvent polarity. *J Biol Chem* 1984 ; 259 : 7682-7.
 15. van der Goot FG, González-Mañas JM, Lakey JH, Pattus F. A « molten globule » membrane-insertion intermediate of the pore-forming domain of colicin A. *Nature* 1991 ; 354 : 408-10.
 16. Muga A, González-Mañas JM, Lakey JH, Pattus F, Surewicz WK. pH dependent stability and membrane insertion of the pore forming domain of colicin A. *J Biol Chem* 1993 (sous presse).
 17. Ptitsyn OB. The molten globule state In : Creighton TE, ed. *Protein Folding*. New York : WH Freeman, 1992 : 243-300.
 18. Merrill AR, Cramer WA. Identification of a voltage-responsive segment of the potential-gated colicin E1 ion channel. *Biochemistry* 1990 ; 20 : 8529-34.
 19. Slatin SL. Colicin E1 in planar lipid bilayers. *Int J Biochem* 1988 ; 20 : 737-44.
 20. Song HY, Cohen FS, Cramer WA. Membrane topography of ColE1 gene products : the hydrophobic anchor of the colicin E1 channel is a helical hairpin. *J Bacteriol* 1991 ; 173 : 2927-34.
 21. Buckley JT. Crossing three membranes. Channel formation by aerolysin *FEBS Lett* 1992 ; 307 : 30-3.
 22. van der Goot FG, Lakey JH, Pattus F, *et al.* Spectroscopic study of the activation and oligomerization of the channel-forming toxin aerolysin : identification of the site of proteolytic activation. *Biochemistry* 1993 ; 31 : 8566-70.
- cheveux » hydrophobe de pénétrer dans la bicouche en laissant les autres hélices à la surface. Dans cette conformation, toutes les surfaces hydrophobes de la protéine sont en contact avec les chaînes carbonées des lipides alors que les surfaces hydrophiles sont orientées vers le milieu aqueux. Comme nous le verrons, un certain nombre de résultats expérimentaux ont conduit à réviser ce modèle (figure 3, [12]).
- Des études de dichroïsme circulaire en présence et en absence de lipides ont permis de montrer que la structure secondaire de la colicine était maintenue lors de l'insertion. Ces observations confirment l'hypothèse selon laquelle l'interaction avec la membrane induit uniquement un réarrangement des hélices entre elles et non une restructuration des éléments de structures secondaires. Lakey *et al.* [13] ont montré, par des mesures de transfert d'énergie de fluorescence, que les hélices 1 et 2 s'éloignaient effectivement du reste de la structure lors de l'interaction du domaine C-terminal de la colicine A avec des vésicules membranaires. En revanche, en désaccord avec le premier modèle proposé, l'épingle hydrophobe (hélices 8 et 9) reste groupée avec les hélices 3 à 7 à la surface de la membrane comme elles l'étaient dans la structure soluble [12]. Finalement, par mutagenèse dirigée, des cystéines ont été introduites artificiellement dans la séquence du fragment C-terminal de la colicine A, qui n'en contient pas, de façon à pouvoir relier les différentes hélices par des ponts disulfures (D. Duché, communication personnelle). Lorsque des hélices 1 et 9 sont reliées par un pont disulfure, il n'y a pas d'insertion de la protéine dans la membrane. Ces différents résultats ont amené Lakey *et al.* [12] à proposer un nouveau modèle dit en « canif suisse » (*the swiss pen knife model*) illustré dans la figure 3.
- Il apparaît clairement dans la figure 3 que, malgré le maintien de la structure secondaire, l'ouverture en « canif suisse » de la colicine correspond à un important changement de conformation. Des études récentes ont permis de mieux comprendre une telle transformation. Des expériences faites sur des membranes artificielles ont montré que la colicine (A ou E1) a une préférence marquée pour les lipides chargés négativement. Cette affinité augmente de façon considérable lorsque le pH de la solution devient plus acide ou lorsque la force ionique est diminuée. Par ailleurs, il a été montré que la diminution du pH modifie la structure même de la protéine. Le fragment C-terminal de la colicine E1 devient plus sensible aux protéases bien que son rayon hydrodynamique demeure inchangé [14]. Celui de la colicine A perd sa structure tertiaire, tout en maintenant une structure secondaire proche de la structure native [15]. Dans cette configuration, l'intérieur hydrophobe de la molécule reste inaccessible aux molécules d'eau. De plus, aucune transition thermique n'a pu être observée à pH acide par calorimétrie différentielle en balayage de température [16], suggérant là encore que la protéine n'a pas sa structure native. Le fragment C-terminal de la colicine A adopte donc à pH acide une conformation « semi-dénaturée » appelée « globule en fusion » (ou *molten globule*, [17]). Ce nouveau concept, introduit en 1983 par Ptitsyn, allait à l'encontre d'une idée ancienne selon laquelle une protéine ne pouvait adopter que deux états conformationnels : soit natif, ou totalement replié, soit dénaturé, ou déplié. Le globule en fusion a été observé durant les étapes précoces du processus de repliement des protéines mais peut aussi être obtenu à pH très acide ou très basique ainsi qu'à haute température.
- Ces études *in vitro* ont montré que l'augmentation de la cinétique d'insertion de la colicine A dans la membrane lors de l'abaissement du pH était parfaitement corrélée avec l'apparition de l'état de « globule en fusion ». Cet état confère à la protéine une plus grande flexibilité, ce qui permet de minimiser le coût énergétique de l'ouverture en « canif suisse » de la structure.
- Alors que l'insertion des colicines dans la membrane est décrite de façon relativement précise, le mécanisme d'ouverture du canal reste très obscur. Des études en bicouche plane ont montré que le canal, dont le diamètre a pu être estimé à 0,8-1 nm, était peu spécifique et dépendant du

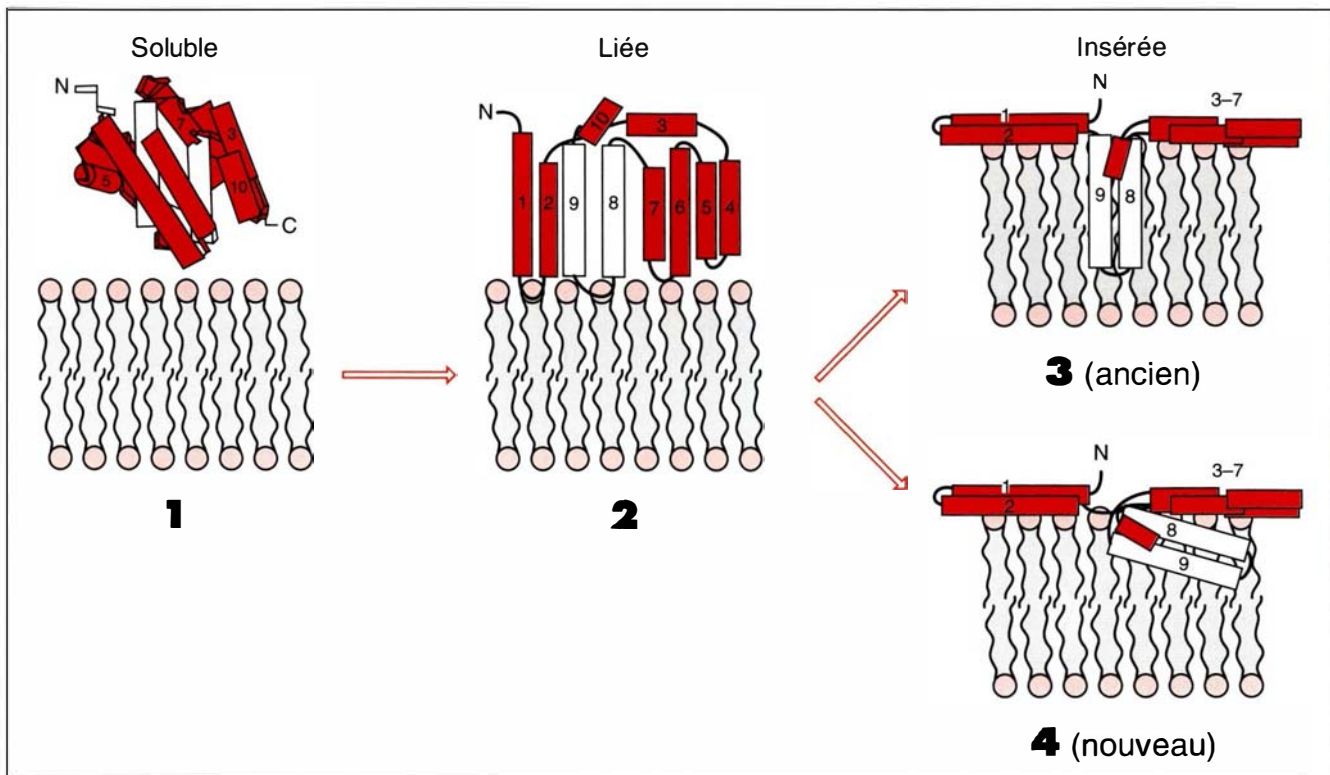


Figure 3. **Modèles de l'insertion du fragment formateur de pore de la colicine A dans une membrane lipidique.** (1) Le domaine interagit avec la membrane par des liaisons de type électrostatique, ce qui oriente l'épingle à cheveux perpendiculairement au plan de la membrane. (2) L'intermédiaire à la surface de la membrane subit une dénaturation partielle qui le transforme dans la conformation dite « globule en fusion ». La structure s'ouvre en (3) « parapluie » (ancien modèle) ou en (4) « couteau suisse » (nouveau modèle) pour donner la forme membranaire non activée. La formation du canal est une étape ultérieure dépendant du potentiel membranaire. (D'après [10-12].)

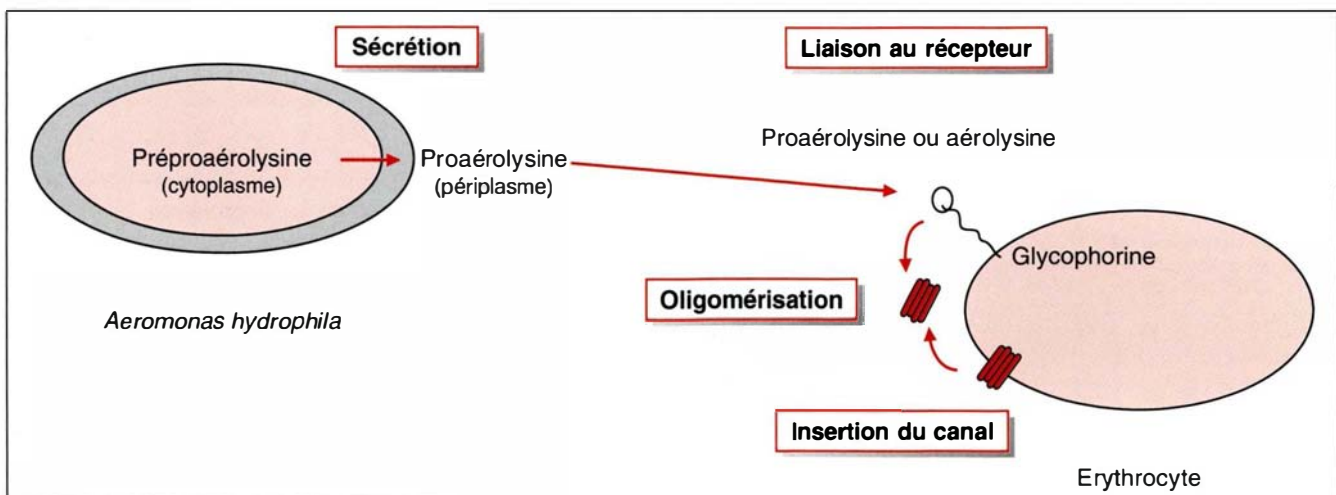


Figure 4. **Mode d'action de l'aérolysine.** La protoxine inactive est sécrétée par la bactérie, puis activée, en solution ou fixée à son récepteur à la surface de la cellule cible, par protéolyse de son extrémité C-terminale. La toxine s'associe pour former des oligomères capables de former un pore dans la membrane.

RÉFÉRENCES

23. Tucker AD, Parker MW, Tsernoglou D, Buckley JT. Crystallization of a proform of aerolysin, a hole-forming toxin from *Aeromonas hydrophila*. *J Mol Biol* 1990 ; 212 : 561-2.
 24. Wilmsen HU, Leonard KR, Tichelaar W, Buckley JT, Pattus F. The aerolysin channel is formed by heptamerization of the monomer. *EMBO J* 1992 ; 11 : 2457-63.
 25. van der Goot FG, Pattus F, Wong KR, Buckley JT. Oligomerization of the channel-forming toxin aerolysin precedes insertion into lipid bilayers. *Biochemistry* 1993 (sous presse).
 26. Engelman DM, Steitz TA. The spontaneous insertion of proteins into and across membranes : the helical hairpin hypothesis. *Cell* 1981 ; 23 : 411-22.
 27. Weiss MS, Abele U, Weckesser J, Welte W, Schiltz E, Schultz GE. Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin. *Science* 1991 ; 254 : 1627-30.
 28. Bhakdi S, Tranum-Jensen J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev* 1991 ; 55 : 733-51.
 29. Pattus F. Les armes peptidiques de la défense antimicrobienne : un champ d'investigation en pleine expansion. *médecine/sciences* 1992 ; 8 : 420-2.
 30. Hoffmann JA, Dimarcq JL, Bulet P. Les peptides antibactériens inducibles des insectes. *médecine/sciences* 1992 ; 8 : 432-40.
 31. Li J, Carroll J, Ellar DJ. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 25 Å resolution. *Nature* 1991 ; 353 : 815-21.
 32. Choe S, Bennett MJ, Fujii G, et al. The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature* 1992 ; 357 : 216-22.
 33. van der Goot FG, Lakey JH, Pattus F. The molten globule state as an intermediate for toxin insertion or translocation through membranes. *Trends Cell Biol* 1992 ; 2 : 343-8.
 34. Martin J, Langer T, Boteva R, Schrammel A, Horwich AL, Hartl FU. Chaperonin-mediated protein folding at the surface of groEL through a « molten globule »-like intermediate. *Nature* 1991 ; 352 : 36-42.
- voltage. Parker *et al.* [10, 11] ont proposé que l'ouverture du canal nécessitait la pénétration dans la membrane, sous l'effet du voltage, des hélices 3 à 7. Notons que, dans le cadre du nouveau modèle d'insertion en « canif suisse », les hélices 8 et 9 pourraient aussi pénétrer dans la bicouche. Un certain nombre d'expériences semblent indiquer qu'effectivement certaines hélices de la colicine s'insèrent dans la bicouche sous l'influence d'un potentiel transmembranaire [18-20]. Mais nous sommes encore loin de comprendre comment la colicine forme des canaux, voire, si une ou plusieurs molécules sont nécessaires pour les former.

L'aérolysine

L'aérolysine [21], une toxine formatrice de pores sécrétée par *Aeromonas hydrophila*, est le responsable majeur de la pathogénicité de cette bactérie gram-négative chez l'homme. Contrairement aux colicines, elle a donc pour cible des cellules eucaryotes (les érythrocytes étant généralement utilisés dans les tests d'activité). Cette toxine est synthétisée dans le cytoplasme de la bactérie sous une forme dite prépro (figure 4, p. 175). La préproaérolysine possède une séquence signal classique qui est clivée lors du passage à travers la membrane interne de la bactérie. La proaérolysine se retrouve dans le périplasme et va ensuite traverser la membrane externe par un mécanisme d'exportation encore mal connu. Contrairement au cas des colicines, la bactérie productrice n'est pas immune vis-à-vis de la toxine, mais se protège en sécrétant une forme inactive de la protéine, la proaérolysine. Une fois dans le milieu extracellulaire, la proaérolysine peut diffuser vers la cellule cible, où elle se lie à un récepteur membranaire, la glycophorine dans le cas des érythrocytes. La toxine est alors activée par clivage protéolytique d'un fragment C-terminal pour finalement former des canaux oligomériques dans la membrane cytoplasmique, conduisant ainsi à la lyse osmotique de la cellule cible.

Le gène de l'aérolysine a été cloné et séquencé. La protéine, constituée de 470 acides aminés, est très hydrophile

et ne possède pas de séquence hydrophobe caractéristique d'une protéine membranaire. D'après des prédictions de structure secondaire ainsi que des mesures en dichroïsme circulaire, elle est constituée essentiellement de feuillets β .

Malgré l'absence de séquences hydrophobes dans sa structure primaire, l'aérolysine peut s'insérer dans une bicouche lipidique. Comme seule la toxine mûre possède cette propriété, cela suggère que le processus d'activation induit le changement de conformation nécessaire au passage du milieu hydrophile au milieu hydrophobe. Le clivage des 43 derniers acides aminés par la trypsine n'induit toutefois pas de changement de structure secondaire ou tertiaire notable. Il confère cependant à la protéine la capacité de former des oligomères [22]. En solution, au-delà d'une certaine concentration de protéine (seuil dépendant de la force ionique du milieu et de la température), l'aérolysine forme spontanément des oligomères. Nous avons montré que ceux-ci sont extrêmement stables et de taille unique. Au cours du processus d'oligomérisation, des surfaces hydrophobes, préalablement enfouies au cœur de la structure, deviennent exposées au solvant fournissant ainsi la force motrice nécessaire pour que le pore perfore la membrane (van der Goot, non publié). D'un point de vue énergétique, le fait que l'oligomérisation de l'aérolysine ait lieu avant la pénétration dans la bicouche lipidique est favorable, puisqu'ainsi la lumière du pore, qui est hydrophile, ne se trouve jamais en contact avec les chaînes hydrocarbonées.

En résumé, la proaérolysine se lie à un récepteur membranaire de la cellule cible, ce qui permet de concentrer la toxine à proximité de la membrane. Lorsque la protéine est activée par clivage d'un fragment C-terminal, la concentration est suffisamment élevée localement pour que l'oligomérisation ait lieu. L'oligomère s'insère alors dans la bicouche lipidique, dont l'environnement lui est plus favorable, et rompt la barrière de perméabilité de la membrane cytoplasmique.

Récemment, la proaérolysine a été cristallisée [23]. D'après l'analyse préliminaire des données cristallographi-

ques aux rayons X, la protéine est constituée essentiellement de feuillets β , confirmant les résultats de dichroïsme circulaire, et est organisée en au moins trois domaines. La détermination de la structure atomique de la protoxine est en voie d'achèvement.

L'oligomère d'aérolysine a été cristallisé en deux dimensions par reconstitution dans des vésicules membranaires constituées de phosphatidyléthanolamine extraite d'*E. coli*. L'image obtenue par microscopie électronique révèle une symétrie d'ordre sept suggérant que sept monomères s'unissent pour former le pore. En combinant des vues de face et de pro-

fil du canal reconstitué, un modèle tridimensionnel à faible résolution a été proposé (figure 5, [25]). Une partie cylindrique traverserait la membrane et formerait le pore à proprement parler, mais la plus grosse partie de la protéine resterait à l'extérieur, couchée sur la membrane. Le rôle de cette partie globulaire externe n'est pas encore connu. Elle pourrait contenir le site de reconnaissance du récepteur.

L'avenir semble très prometteur : l'accès à la structure atomique de la proaérolysine ainsi qu'à une image en trois dimensions de l'oligomère devrait permettre d'identifier les différents domaines de la protéine. Ces nouveaux résultats devraient grande-

ment faciliter notre connaissance du mécanisme d'action de cette toxine.

L'insertion dans une membrane requiert-elle un type de structure spécifique ?

En 1981, Engelman et Steitz [26] ont émis l'hypothèse, qui est généralement admise, que la première étape du mécanisme d'insertion d'une protéine dans une membrane est la pénétration d'une épingle à cheveux formée de deux hélices α hydrophobes. Quoique possédant ce type de structure, la colicine A en est clairement un contre-exemple puisque, lors de l'interaction de la protéine avec la membrane, les hélices 8 et 9 ne s'ancrent pas transversalement dans la bicouche lipidique.

Par ailleurs, sur la base de considérations énergétiques, Engelman et Steitz avaient aussi suggéré que seules des hélices α et 3_{10} (qui est une variante de l'hélice α classique) pouvaient résider dans une membrane, à l'exclusion de tout autre type de structure secondaire. Là encore des contre-exemples ont été trouvés récemment. La détermination de la structure des porines présentes dans la membrane externe des bactéries gram-négatives a montré que ces protéines transmembranaires étaient formées de trois tonneaux en feuillet β [27]. Les exemples de l'aérolysine et de l' α toxine [28] ont confirmé ce concept nouveau selon lequel des structures en feuillets β pouvaient pénétrer dans une membrane. Les défensines d'insectes ou de neutrophiles de mammifères, agents de la défense antimicrobienne, ont aussi des structures composées exclusivement de feuillet β ou des structures mixtes α/β [29, 30]. L'insertion d'une protéine dans une membrane ne requiert donc pas une structure unique.

Des toxines à d'autres systèmes

La détermination récente de la structure cristalline de l'endotoxine δ de *Bacillus thuringiensis* [31] et de la toxine diphtérique [32] ont montré que la structure du fragment C-terminal de la colicine A était un motif largement répandu, non seulement parmi les

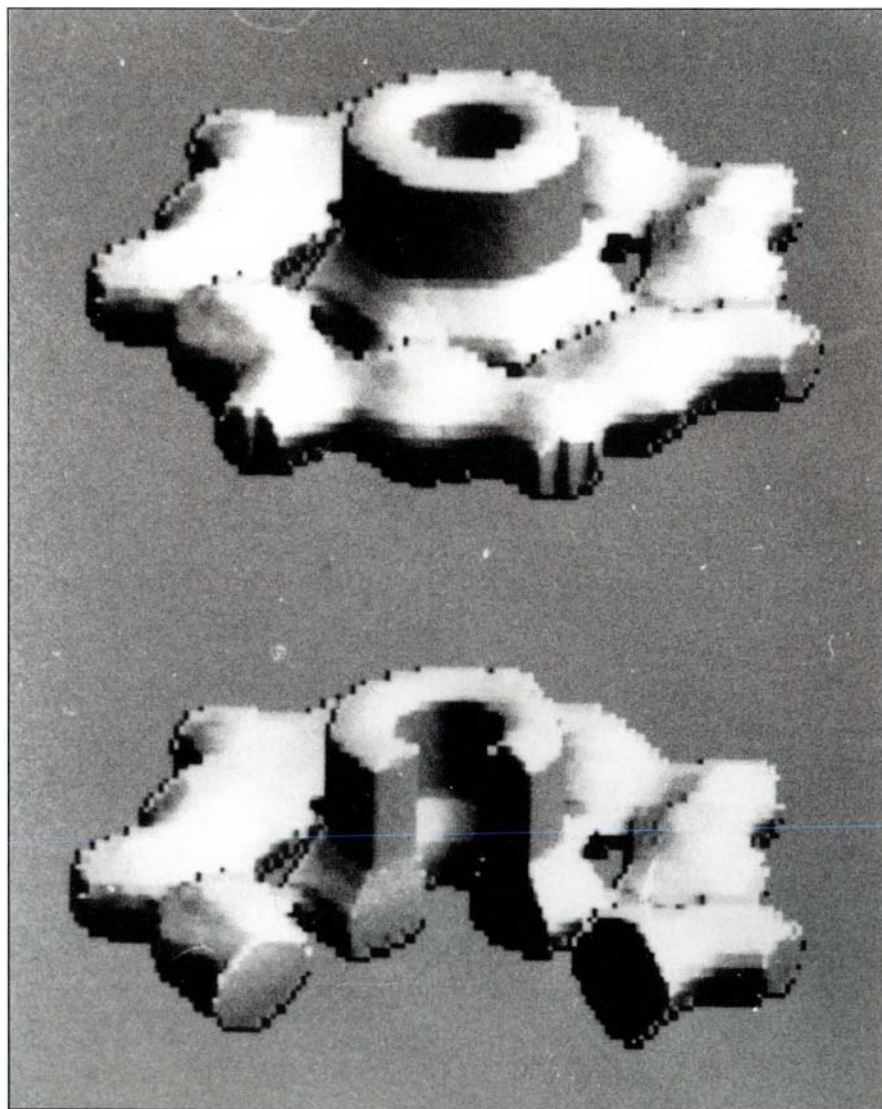


Figure 5. **Modèle de la structure tridimensionnelle du pore formé par l'aérolysine, fondé sur une analyse d'images de cristaux bidimensionnels membranaires de la toxine.** (D'après [26].)

toxines formatrices de pores, mais aussi parmi les toxines possédant une activité enzymatique. Le domaine formant le pore de l'endotoxine et la sous-unité B de la toxine diphtérique responsable de la translocation du domaine enzymatique (sous-unité A) au travers de la membrane sont tous les deux constitués d'un faisceau d'hélices protégeant du solvant une ou deux hélices hydrophobes. Il a été montré, en outre, que l'insertion de l'endotoxine et de la toxine diphtérique dans les membranes passe par l'intermédiaire de la conformation dite « globule en fusion » [33].

Le mécanisme décrit pour l'insertion des toxines dans une membrane semble avoir certains points communs avec le mécanisme de translocation post-traductionnelle des protéines. Sur la base de solides résultats expérimentaux, il est maintenant admis qu'une protéine doit être au moins partiellement dépliée pour franchir une membrane. Les arguments déterminants sont que tout facteur stabilisant la protéine inhibe la translocation alors que toute déstabilisation, par mutations ponctuelles par exemple, accélère le passage. Cette idée a été confortée par l'observation selon laquelle les protéines précurseurs interagissent avec des molécules chaperones dans le cytoplasme de manière post-traductionnelle. Cela empêcherait le précurseur d'acquies sa structure tertiaire finale en le maintenant dans une conformation dite « compétente pour la translocation ». Plus précisément, Martin *et al.* [34] ont pu montrer que des polypeptides, lorsqu'ils sont liés à la protéine chaperone groEL de *E. coli*, étaient dans l'état dit « globule en fusion ». La protéine est donc partiellement dénaturée pendant les premiers instants de l'interaction avec la membrane. Toutefois, on ignore encore quelle est la conformation de la protéine lors de son passage proprement dit. Bien que le modèle ayant la faveur des biologistes moléculaires implique la translocation de la chaîne polypeptidique sous forme dépliée dans un environnement entièrement protéique (un canal), il est concevable que, comme pour la translocation de la sous-unité A de la toxine diphtérique assistée par la sous-unité B, la translocation ait lieu à une interface protéine-lipide ■

Summary

Models to study protein insertion into membranes

Colicin A from *Citrobacter freundii* and aerolysin from *Aeromonas hydrophila* are representative of two classes of pore-forming toxins. Colicin A, an alpha-helical protein, contains an hydrophobic hairpin which is buried inside the structure in solution. It is an « inside out » membrane protein. Aerolysin is formed almost exclusively of β -sheet and possesses a very hydrophilic amino acid sequence. It is secreted as an inactive precursor which is activated by proteolytic removal of about 41-43 residues from the C-terminus. The mechanism of membrane insertion and the structure of the membrane bound form of these toxins are discussed.

RECHERCHE SUR LES ATAXIES HÉRÉDITAIRES

Appel d'offre 1993 pour bourses et subventions de recherche

Afin de stimuler les recherches sur l'ataxie de Friedreich et les autres formes héréditaires d'ataxie, l'Association Française de l'ataxie de Friedreich (AFAF) attribuera, en 1993, des bourses de recherche d'un montant de 50 000 à 150 000 F pour un total de 300 000 F. Les domaines considérés comprendront les aspects fondamentaux (génétique, biochimie, neurobiologie) de ces maladies chez l'homme ou dans des modèles animaux, ainsi que la recherche clinique. Les formulaires à compléter sont disponibles auprès de : AFAF Mme G. Vachon, 15, rue de Bréau, 77240 Cesson, Tél. : 60.63.20.42.

Date limite de dépôt des demandes : 15 avril 1993