

Un moteur rotatif biomoléculaire

L'ATP synthase est une extraordinaire machine moléculaire dans laquelle se produit un mouvement de rotation. Or, il est maintenant possible de modifier cette protéine par des méthodes de mutagenèse dirigée pour créer une interface avec des éléments artificiels. Une expérience réalisée à l'Université Cornell décrit ainsi la

fabrication d'un moteur biomoléculaire qui consomme de l'ATP pour mettre en rotation un microbarreau métallique. Il s'agit là du prélude à l'apparition d'une gamme d'objets hybrides, biologiques et mécaniques, aux possibilités fascinantes et insoupçonnées.

L'étude des moteurs moléculaires biologiques est un domaine en pleine expansion. C'est là en effet que s'effectue la jonction entre le monde microscopique des réactions chimiques ou biochimiques, et le monde macroscopique des mouvements mécaniques. Très souvent, par exemple au niveau des muscles, des réactions d'association/dissociation sont converties en mouvement de glissement entre fibres. Ceci conduit à des moteurs que l'on peut qualifier de « linéaires », où un équipage mobile se déplace dans une direction déterminée. Les mouvements de rotation sont en revanche rares (dans l'état actuel de nos connaissances), et les moteurs correspondants nettement plus complexes. L'analogie avec les moteurs macroscopiques de la vie quotidienne pose de plus d'intéressants problèmes fondamentaux. Récemment, l'élucidation de la structure et du fonctionnement de l'ATP-synthase a conduit à la mise en évidence d'un véritable mouvement rotatif interne à l'échelle de la protéine. Plus extraordinaire, il est maintenant possible, par une combinaison de biotechnologies et de nano technologies, de démonter une partie de ce moteur moléculaire pour l'associer à des composants mécaniques artificiels. L'équipe de Carlo Montemagno, à Cornell University (États-Unis), a ainsi réalisé un moteur fondé sur une seule molécule d'ATP-ase, dont le mouvement peut être observé directement au microscope [1-3]. Il s'agit sans aucun doute du prélude à l'apparition d'une nouvelle gamme d'objets moléculaires hybrides aux possibilités insoupçonnées.

La structure et le fonctionnement de l'ATP-synthase/ATP-ase

Rappelons que l'ATP-synthase catalyse la formation d'ATP (adénosine triphosphate) à partir d'ADP (adénosine diphosphate) et de phosphate, selon une réaction endoénergétique. La molécule obtenue sert ainsi de monnaie d'échange dans nombre de processus biologiques consommateurs d'énergie. La synthèse de l'ATP requiert un apport d'énergie qui est assuré par l'utilisation d'un gradient de concentration de protons au travers d'une membrane. La structure de l'ATP-synthase, résolue en 1994, montre ainsi deux unités, une partie F_0 , que l'on peut qualifier de « turbine à protons », et une partie F_1 , qui synthétise l'ATP [4]. Le transfert d'énergie de F_0 vers F_1 est assuré de manière mécanique par un axe rotatif assurant le couplage entre la réaction qui produit de l'énergie et celle qui en consomme. Ce mécanisme extraordinaire, sans précédent dans la nature, était supputé depuis les années 1980 par P.D. Boyer [5], et a été définitivement établi par la résolution de la structure cristallographique 15 ans plus tard. Notons que, dans les organismes vivants, ce mécanisme n'est pas destiné à obtenir un mouvement de rotation macroscopique*, mais ce dernier objectif peut être atteint par des modifications artificielles de l'ATP-synthase.

* L'autre moteur rotatif naturel connu, beaucoup plus gros, est celui qui actionne les flagelles de certaines bactéries [6]. Curieusement, le flagelle est constitué de filaments tournant sur eux-mêmes dans le même sens, ce qui implique nécessairement des frottements dans leurs zones de contact.

Le schéma général de la protéine est donné figure 1. On y trouve un rotor tournant à l'intérieur d'un stator, ces deux composants s'étendant sur deux sous-unités notées F_0 et F_1 . Au niveau de la partie trans-membranaire F_0 , les protons pénètrent du côté des fortes concentrations pour être libérés du côté des plus faibles, et ce mouvement est transformé en rotation du rotor, dans un sens déterminé par suite de l'asymétrie du dispositif [7, 8]. L'axe γ , ainsi mû par l'écoulement des protons, tourne à l'intérieur de l'assemblage formé par les trois sous-unités $\alpha\beta$ qui constituent la partie F_1 . C'est à ce niveau que s'effectue la synthèse de l'ATP. Ce sont les unités β qui fixent les réactifs (ADP et phosphate), assurent la réaction grâce à l'apport d'énergie par la rotation forcée de l'axe γ , et permettent enfin la libération de l'ATP. Ces opérations sont activées tour à tour par la rotation de l'axe γ . De manière remarquable, l'ATP-synthase peut fonctionner à l'envers, c'est à dire en hydrolysant l'ATP pour pomper des protons contre leur gradient de concentration. Dans ces conditions, l'axe γ est au contraire mû par la partie F_1 , et un montage judicieux doit permettre de récupérer le travail correspondant, une fois supprimée la partie F_0 . Lorsque le site F_1 fonctionne en moteur, chaque sous-unité effectue les tâches précédentes mais dans l'ordre inverse, et bien entendu toujours selon une chronologie bien précise : fixation de l'ATP sur le site actif, réaction libérant l'énergie et conduisant à l'ADP et le phosphate encore liés au site actif, libération de l'ADP et du phosphate.

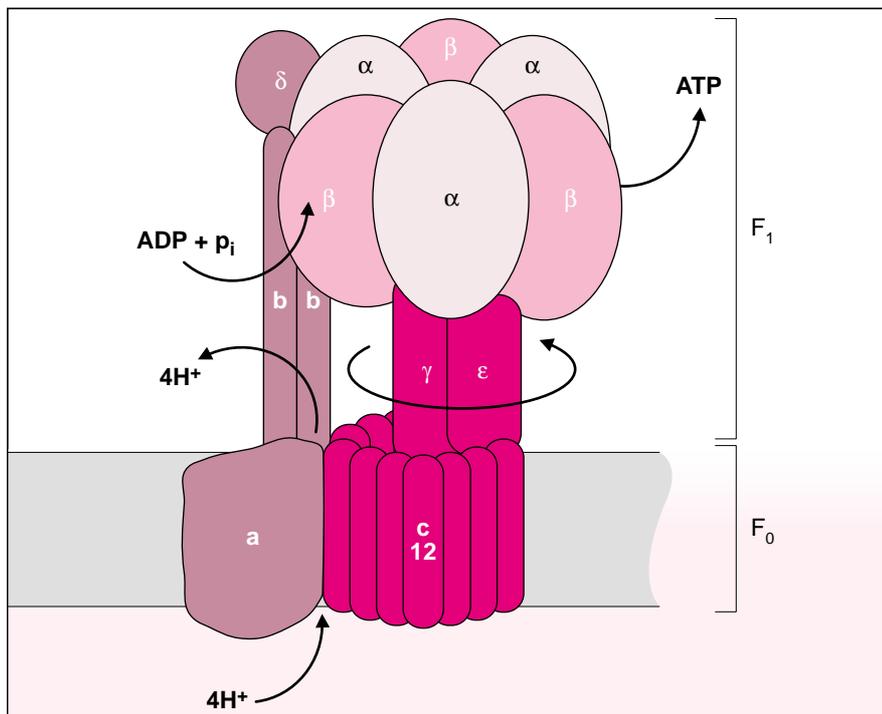


Figure 1. Structure générale de l'ATP synthase montrant les parties transmembranaire F_0 et soluble F_1 . Les parties en rotation, γ , ϵ et c_{12} , sont représentées en rouge. Au niveau de F_0 , la rotation est entretenue par la translocation des protons qui se fixent de façon transitoire sur les groupements carboxylate d'un rotor, l'oligomère c_{12} . La rotation est unidirectionnelle par suite de l'asymétrie de son environnement [7]. Le mouvement est transmis à l'arbre rotatif γ qui constitue le rotor pour la partie F_1 . Au niveau de F_1 , la rotation active tour à tour les sous-unités β qui réalisent la synthèse endoénergétique d'ATP.

Ainsi le fonctionnement des trois sous-unités est soigneusement synchronisé [9-10], à l'instar de ce qui se passe dans un moteur d'automobile dans lequel les cycles des différents cylindres sont décalés**. A l'intérieur du site F_1 , l'axe γ est terminé par une sorte de doigt recourbé sur lequel chaque unité β vient tour à tour pousser pour faire tourner l'axe de 120° (figure 2). Dernier raffinement nécessaire, tout comme dans un moteur d'automobile à allumage commandé, la « mise à feu » séquentielle des unités β est assurée par un dispositif de synchronisation. Il s'agit

d'un ensemble de deux interrupteurs, l'un contrôlant la fixation d'ATP, l'autre la libération de phosphate. Ces *switchs* sont activés au moment nécessaire du cycle de rotation par un dispositif analogue à un arbre à cames [9, 10].

Construction d'un moteur rotatif biomoléculaire

Le but est de rendre le mouvement de rotation utilisable macroscopiquement. Ceci a nécessité la conjonction de plusieurs techniques de pointe relevant des biotechnologies et des nanotechnologies, afin d'isoler la partie active de la protéine et de lui fixer des éléments fabriqués [1, 2]. Dans un premier temps, les auteurs ont isolé les différentes sous-unités de la partie F_1 de la protéine qu'ils ont modifiée par mutagenèse diri-

gée, afin d'introduire un résidu cystéine à l'extrémité de l'axe γ (là où se trouve normalement le rotor de la partie F_0 dans la protéine naturelle, cf. figure 1), et d'attacher des brins à base d'histidine aux sous-unités β (figure 3). Après purification, le résidu cystéine a été couplé de manière covalente à de la biotine, en vue de l'assemblage ultérieur fondé sur l'affinité biotine/streptavidine.

De son côté, le support solide a été préparé par des techniques de nanolithographie, mettant en jeu la lithographie par faisceaux d'électrons, l'attaque sélective des zones irradiées, puis un dépôt de métal, ici le nickel. Ceci a permis d'obtenir, sur une surface de silice, des « poteaux » de 50 à 120 nm de diamètre et 200 nm de hauteur, dont la partie supérieure est constituée de nickel. Cette disposition permet d'éloigner le moteur moléculaire de la surface et d'éviter ainsi le frottement des parties mobiles sur cette surface. Enfin des « microbarreaux » ont été préparés, également par des techniques de nanolithographie. Il s'agit de barreaux de nickel de 150 nm de diamètre et 750 à 1400 nm de long, recouverts d'un peptide biotinylé.

L'assemblage final est fondé sur les interactions spécifiques entre d'une part les fragments histidine et le nickel bien décapé, et d'autre part la biotine et la streptavidine. Ainsi le traitement des supports par une solution d'ATP-ase modifiée conduit à la fixation sélective de celle-ci à l'extrémité des poteaux au bout d'environ 30 min. Après lavage, les supports sont traités par de la streptavidine, puis par les barreaux biotinylés, ce qui achève la construction (figure 4).

Observation de la rotation et performances mécaniques

L'observation de la rotation des barreaux se fait par microscopie optique. A cause des aléas de la fixation, qui peut se produire à différents niveaux du barreau de nickel, seul un petit nombre de systèmes (environ 1%) se met en rotation en présence d'ATP. Pour ceux-là, on observe une rotation continue dans le sens attendu d'après la structure de la protéine, c'est-à-dire inverse des

** Le moteur le plus proche au point de vue architecture serait un moteur à trois cylindres en étoile avec vilebrequin central. Il existe au moins deux réalisations de ce type: le moteur à explosions Walter 1925, et un moteur expérimental à cycle Stirling (Quiet Revolution Motor).

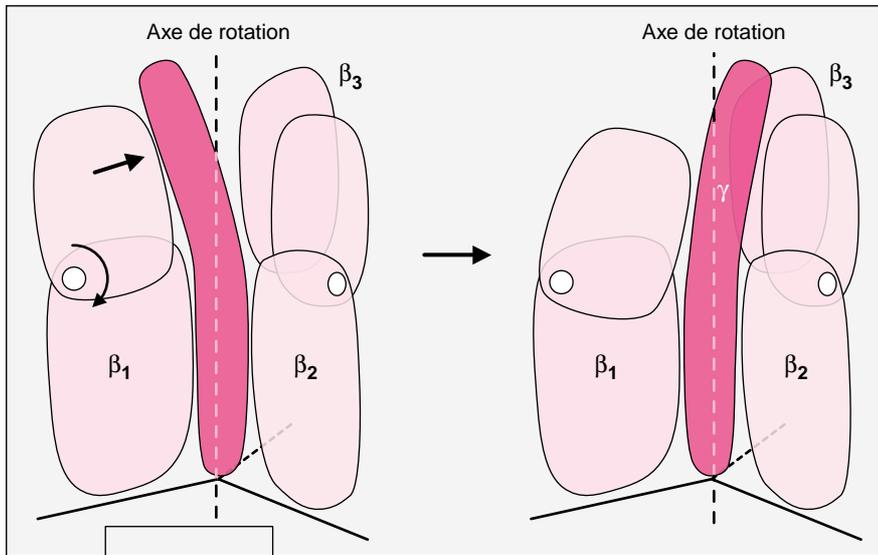


Figure 2. Principe de fonctionnement du moteur F_1 , montrant l'axe γ , tourné successivement par les unités β . (Noter que, dans cette figure, comme dans les suivantes, l'unité F_1 a été représentée retournée par rapport à la figure 1.) Dans chaque unité β , l'hydrolyse de l'ATP entraîne un mouvement de flexion de la partie supérieure qui appuie sur la terminaison recourbée de l'axe γ . Ceci fait tourner l'axe γ d'un tiers de tour, et le met dans la position d'être poussé par l'unité suivante, β_2 , laquelle poussera à son tour vers β_3 . Comme dans un moteur d'automobile, il y a une synchronisation précise des opérations des trois actionneurs.

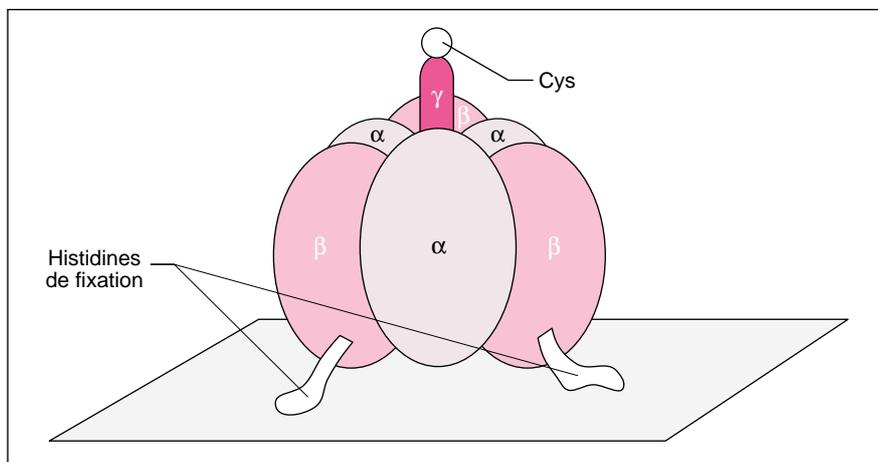


Figure 3. Schéma des zones de modification génétique de la partie F_1 . Les sous-unités β ont été équipées de « pattes » de fixation à base d'histidine (histidine tags), qui présentent une forte affinité pour les surfaces de nickel bien décapées. L'extrémité de l'axe γ (là où se trouve le rotor c_{12} dans la protéine naturelle) a été équipée d'un groupement cystéine.

aiguilles d'une montre [3]. Cette rotation, à raison de quelques tours par seconde, est stoppée par addition d'azoture de sodium (NaN_3), un inhibiteur de l'ATP-ase, et cesse lorsque la concentration en ATP devient trop faible. Il ne fait donc aucun doute que la rotation est liée à

l'utilisation de l'ATP comme carburant.

Notons qu'en 1997, dans une expérience similaire, Noji *et al.*, avaient déjà équipé l'axe γ d'un filament d'actine porteur d'une sonde fluorescente, et observé la rotation par microscopie à épifluorescence [11].

Toutefois dans l'expérience de Montemagno *et al.*, les caractéristiques géométriques du système sont mieux définies. D'une part, certains éléments comme le barreau sont rigides, d'autre part, le moteur est éloigné de la surface, ce qui évite le frottement du barreau. La connaissance des dimensions du système et l'observation précise du mouvement permettent alors d'établir un bilan énergétique, à partir d'équations de mécanique classique.

Ainsi en utilisant la longueur des barreaux, leur vitesse de rotation, leur espacement par rapport à la surface, et la viscosité du milieu, le couple de freinage est évalué à environ 20 pN.nm pour des barreaux de 750 nm (tournant en moyenne à 8 tours/s) et environ 19 pN.nm pour des barreaux de 1400 nm (tournant en moyenne à 1,1 tour/s). L'énergie mise en jeu sur un tour, obtenue en multipliant par 2π , est donc sensiblement constante, de l'ordre de 120 pN.nm, ce qui correspond à 17 kcal une fois rapporté à l'unité usuelle, c'est-à-dire la mole. Sachant que l'hydrolyse de trois molécules d'ATP libère dans les conditions de l'expérience $3 \times 7,3$ soit 21,9 kcal/mole, le rendement de conversion de l'énergie chimique en énergie mécanique ressort à environ 80 % [1]. Ce rendement correspond à une énergie dissipée immédiatement dans les frottements. On ignore pour l'instant quel serait le rendement de production d'une énergie mécanique utilisable de manière pratique. A noter enfin que ces estimations montrent un couple moteur pratiquement indépendant de la vitesse de rotation.

Perspectives

Il existe actuellement un grand intérêt pour les nanotechnologies, c'est-à-dire l'ensemble des techniques visant à explorer le monde à l'échelle du nanomètre, mais aussi à intervenir à cette échelle [12]. La miniaturisation des mouvements mécaniques participe de cette quête. Ainsi les progrès de la microfabrication électronique permettent d'usiner à la surface d'une plaquette de silicium des petits rotors et des engrenages d'une dizaine de μm , commandés électriquement [13]. Plus bas en

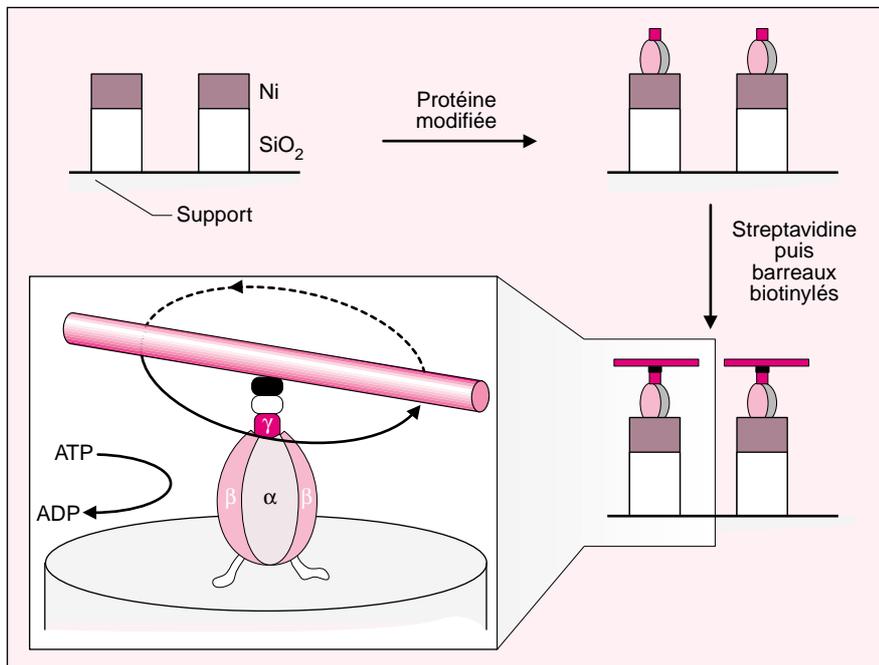


Figure 4. Principe de construction du moteur biomoléculaire équipé d'un «microbarreau». Les étapes de construction des « poteaux » de silice recouverts de nickel ne sont pas représentées, mais font appel à des techniques classiques de l'industrie électronique. La protéine modifiée se fixe grâce à l'interaction spécifique histidine/nickel. Puis, sur l'axe γ terminé par une cystéine, on fixe successivement la streptavidine et enfin le barreau biotinylé. À noter que le diamètre du poteau résulte d'un compromis: trop petit, le rendement de fixation est trop faible; trop grand, il y a fixation de plusieurs moteurs. Le schéma n'est pas à l'échelle: dans la réalité, le diamètre du poteau est à peu près 10 fois celui de la protéine.

taille, se trouvent les moteurs rotatifs des flagelles, dont le diamètre est de l'ordre de 20 nm [6]. Le moteur à ATP est la plus petite machine fonctionnelle produisant un mouvement de rotation, puisque son diamètre avoisine 8 nm. Enfin, à l'échelle des petites molécules, on trouve des rotors moléculaires de 1,5 nm de diamètre, dont le mouvement sous l'effet de l'agitation thermique a été observé par microscopie à effet tunnel, mais dont on ne sait pas encore contrôler le sens de rotation [14].

Le moteur à ATP fascine les scientifiques, car il illustre le mariage possible entre les techniques adaptées à l'étude de la matière vivante et celles adaptées à la matière inerte. Par ailleurs son alimentation est très simple puisqu'elle est assurée par la seule présence en solution d'une molécule riche en énergie, ce qui lui confère une certaine autonomie de

fonctionnement dans des dispositions géométriques variées. Bien sûr se pose le problème de la dénaturation de l'ATP-ase, mais celui-ci n'est pas critique à l'échelle de quelques heures. Une fois passé l'émerveillement devant cette réalisation, que pourrait-on faire avec un tel moteur? Une première classe d'applications serait d'utiliser ces moteurs rotatifs pour produire des flux de liquides, c'est-à-dire agir comme des pompes, afin de trier et séparer de grosses molécules. Les moteurs seraient fixés à demeure sur des structures artificielles usinées de manière à définir des conduits, portes, récipients, etc. Une deuxième catégorie serait d'assurer la propulsion d'un mobile autonome, une sorte de mini sous-marin. Il suffirait pour cela de tailler des hélices avec un « pas » (dans l'expérience de Montemagno *et al.*, les barreaux sont l'équivalent

d'hélices en drapeau). Notons que les moteurs rotatifs assurent déjà la propulsion de certaines bactéries par mise en rotation de leurs flagelles [6]. Cependant, les moteurs rotatifs des flagelles et les bactéries sont de gros objets par rapport à ceux que l'on pourrait ainsi concevoir à partir du moteur à ATP. Or il existe une demande et des projets, parfois très futuristes, pour réaliser de tels mobiles qui serviraient de vecteurs pouvant se déplacer dans des cellules pour y effectuer diverses tâches, détecter des substances, délivrer des médicaments, etc. [15]. La validité à cette échelle des équations de mécanique et de microfluidique permet d'aborder des problèmes comme celui du couple de renversement, cet effet bien connu des pilotes d'avion, qui fait que leur aéronef tend à tourner dans un sens opposé à l'hélice (un effet également observé sur les bactéries à flagelle rotatif). Comme à l'échelle macroscopique, on peut envisager de le compenser par un dessin asymétrique du mobile. Une autre solution, inspirée de l'aéronautique, consisterait à utiliser deux hélices, l'une à l'avant l'autre à l'arrière, donc contrarotatives dans un repère absolu.

L'association entre les techniques de nanomécanique (les objets « durs », de forme bien définie) et de biotechnologie (les objets « mous », aux formes fluctuantes, susceptibles d'être produits en très grand nombre) n'a pas fini de nous étonner. D'une manière générale, c'est tout un domaine foisonnant de réalisations, dont certaines seront jugées folles, qui vient de s'ouvrir.

RÉFÉRENCES

1. Soong RK, Bachand GD, Neves HP, Olkhovets AG, Craighead HG, Montemagno CD. Powering an Inorganic Nanodevice with a Biomolecular Motor. *Science* 2000; 290: 1555-8.
2. Montemagno C, Bachand G. Constructing nanomechanical devices powered by biomolecular motors. *Nanotechnology* 1999; 10: 225-31.

RÉFÉRENCES

3. Voir aussi l'animation sur le site <http://falcon.aben.cornell.edu/News2.htm>
4. Abrahams JP, Leslie AGW, Lutter R, Walker JE. Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 1994; 370: 621-8.
5. Gresser MJ, Myers JA, Boyer PD. Catalytic site cooperativity of beef-heart mitochondrial-F₁ adenosine-triphosphatase. Correlations of initial velocity, bound intermediate and oxygen-exchange measurements with an alternating 3-site model. *J Biol Chem* 1982; 257: 2030-8.
6. Garrett RH, Grisham CM. *Biochimie*, 2^e éd., Paris: DeBoeck Université, 2000: 561-3.
7. Elston T, Wang H, Oster G. Energy transduction in ATP synthase. *Nature* 1998; 391: 510-3.
8. Boyer PD. What makes ATP synthase spin? *Nature* 1999; 402: 247-9.

9. Wang H, Oster G. Energy transduction in the F₁ motor of ATP synthase. *Nature* 1998; 396: 279-82.

10. Voir aussi l'animation du modèle moléculaire de ce moteur sur le site http://www.cnr.berkeley.edu/~hongwang/Project/ATP_synthase/

11. Noji H, Yasuda R, Yoshida M, Kinosita K. Direct observation of the rotation of F₁-ATPase. *Nature* 1997; 386: 299-302.

12. Observatoire Français des Techniques Avancées. *Rapport Arago 26, Nanocomposants et Nanomachines*. Paris: Tec et Doc, Lavoisier, 2001.

13. Howe RT, Muller RS, Gabriel KJ, Trimmer WSN. Silicon micromechanics. Sensors and actuators on a chip. *IEEE Spectrum* 1990; 27: 29.

14. Gimzewski JK, Joachim C, Schlittler RR, Langlais V, Tang H, Johannsen I. Rotation of a single molecule within a supramolecular bearing. *Science* 1998; 281: 531-3.

15. Freitas RA. Exploratory design in medical nanotechnology. A mechanical artificial

red cell. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Immob Biotech* 1998; 26: 411-30. Voir aussi de nombreuses références sur le site <http://www.foresight.org/Nanomedicine>.

Jean-Pierre Launay
Christian Joachim

Équipe « Électronique Moléculaire », CEMES/Cnrs, UPR 8011, 29, rue Jeanne-Marvig, 31055 Toulouse Cedex 4, France.

TIRÉS À PART

J.P. Launay.

■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **Syndécan: un protéoglycane qui trahit son camp.** Les protéoglycans (PG), composés d'une partie protéique et de chaînes de glycosaminoglycans sulfatés, dont l'héparane sulfate (HS), sont peu médiatiques. Et pourtant, leurs fonctions dans l'organisme sont aussi multiples qu'essentiels. M. Bernfield, qui a identifié il y a plus de 20 ans le syndécan-1, un PGHS très abondant à la surface des cellules épithéliales [1], nous démontre aujourd'hui son implication dans la dissémination de la bactérie à Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa* [2]. Les souris dépourvues de syndécan (*synd*^{-/-}), apparemment normales, ne développent aucune infection après instillation nasale de *Pseudomonas*, alors qu'elles sont aussi sensibles que les souris sauvages lorsque la bactérie est inoculée par voie intrapéritonéale. Or, le syndécan-1 n'est pas le site d'attachement de la bactérie sur les cellules épithéliales. En revanche, on sait que, en cas

d'agression, les cellules relarguent le domaine extracellulaire du PGHS, qui devient détectable dans les sécrétions trachéales ou les exsudats de blessures cutanées chez l'homme. De fait, l'administration aux souris *synd*^{-/-}, avec la bactérie, du PGHS soluble ou de l'héparine, restaure la susceptibilité à l'infection. C'est la partie HS qui est active, et elle augmente même la virulence de l'infection chez les souris normales. Aussi rusé que ses compères pour tromper l'hôte, c'est *Pseudomonas* lui-même, par le biais d'un de ses facteurs de virulence, LasA 1, qui stimule le clivage de ce même syndécan-1 à la surface des cellules infectées, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Il est probable que *Staphylococcus aureus* utilise la même ruse. Par quel mécanisme le syndécan-1 soluble augmente-t-il la virulence de *Pseudomonas*? il ne s'agit probablement pas d'un effet direct sur la bactérie, mais plutôt de la neutralisation, par le PG, de molé-

cules importantes dans la défense antimicrobienne pulmonaire, comme les peptides cationiques antimicrobiens de la famille des cathélicidines, ou les surfactants de la famille des « collectines ». Un article d'un autre groupe corrobore ces données en montrant le lien entre l' α -défensine et une forme soluble de dermatan sulfate, un autre GAG [3]. Quelle parade trouver? Inhiber le clivage de PGHS par des inhibiteurs de métalloprotéinases peut être risqué compte tenu des fonctions tissulaires très variées de ces enzymes; contrer l'héparane sulfate par le sulfate de protamine, un antidote connu de héparine, ou le dissoudre par l'héparitinase?

[1. Bernfield M, et al. *Ann Rev Biochem* 1999; 68: 729-77.]

[2. Park PW, et al. *Nature* 2001; 411: 98-102.]

[3. Schmidtchen A, et al. *Mol Microbiol* 2001; 39: 708-13.]