

Quelques pas en direction du site de reconnaissance de l'ion sodium au sein des protéines de transports couplés

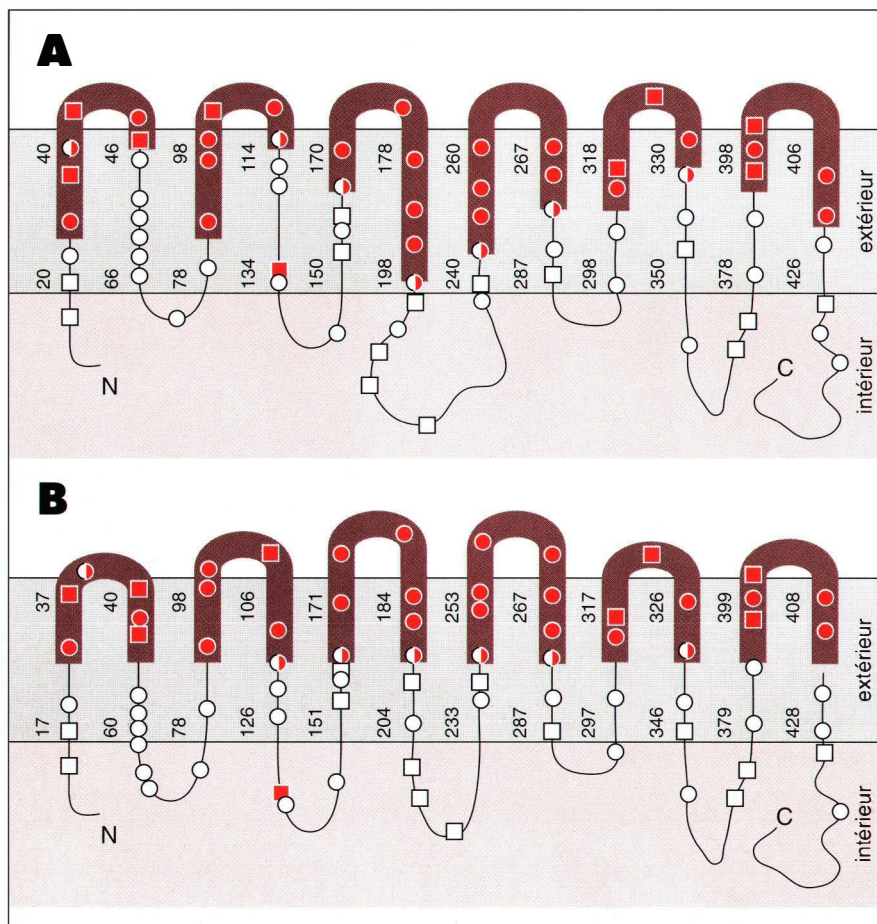
De nombreux laboratoires s'attachent à établir la structure, à l'échelle moléculaire, du ou des sites responsables de la translocation des ions et des molécules à travers les membranes cellulaires. Différentes classes de systèmes protéiques assurent ces transports. Parmi celles-ci, on trouve la classe des protéines de transport couplé, qui permettent de déplacer un ion ou une molécule

d'un compartiment à l'autre, contre un potentiel électrochimique défavorable. Ce mouvement se fait à la faveur de l'énergie dissipée par le déplacement simultané d'un ion, le plus souvent un ion Na⁺ ou un proton, co-transporté par la protéine sous l'effet d'un potentiel électrochimique favorable. Un tel mécanisme de conversion énergétique est commun à près de 70 membres de la

famille des Na⁺/co-transporteurs dont le co-transporteur Na⁺-glucose bien connu, caractéristique de l'intestin grêle et du tubule proximal du néphron. C'est sur la mélibiose perméase d'*Escherichia coli* que les études structurales sont les plus avancées.

La mélibiose perméase est une protéine membranaire qui permet l'accumulation intracellulaire de sucres (de la famille des α-D-galactopyranosides) co-transportant du sodium comme vecteur d'énergie [1]. C'est précisément le fait d'être activée par du sodium, qui plus est chez *E. coli*, qui lui confère un intérêt tout particulier, car elle offre la possibilité d'aborder l'étude structurale du site reconnaissant l'ion sodium en s'aidant des nombreux outils de biologie moléculaire disponibles chez cette espèce.

Figure 1. Révision du modèle de structure secondaire de la mélibiose perméase. En A est illustré le modèle initial établi sur la base des données du profil d'hydrophatie combinées à l'utilisation de la phosphatase alcaline selon un procédé de fusion au hasard [8], et en B le modèle révisé fondé sur les données obtenues par mutagenèse dirigée. Activité de la phosphatase alcaline: élevée, symboles pleins, basse, symboles vides. Cercles: données de Pourcher et al. [6], carrés: données de Botfield et al. [8]. Un résidu (134) situé du côté cytoplasmique de la membrane entre les hélices transmembranaires 4 et 5 devrait, d'après les données de Botfield, être localisé de l'autre côté de la membrane. La mutagenèse du résidu adjacent par l'équipe du CEA n'a pas confirmé cette donnée de Botfield.



Plusieurs équipes avaient déjà relevé un certain nombre de propriétés susceptibles de rendre compte des capacités de reconnaissance de la molécule pour l'ion sodium, notamment grâce à des données obtenues par mutagenèse dirigée [2-4] ou par l'analyse de molécules chimériques résultant de la fusion de domaines complémentaires de mélibiose perméases homologues [5]. Ces données suggèrent, entre autres, que certains résidus des hélices α du domaine hydrophobe aminoterminal seraient impliqués dans le processus et que certains résidus acides pourraient servir à la coordination du cation couplant.

Cependant, l'interprétation de ces données ne repose que sur la structure secondaire de la molécule, déduite du profil d'hydropathie calculé à partir de la séquence primaire de la protéine qui ne permet qu'une prédiction de son organisation dans la membrane. Il était donc indispensable de vérifier la validité de cette structure. Une équipe du CEA vient d'effectuer une étude topologique de la mélibiose perméase [6] en utilisant des protéines de fusion, engendrées par le gène *phoA* codant pour la phosphatase alcaline [7]. Cette enzyme possède une séquence signal qui lui permet d'être exportée du cytoplasme, où elle est inactive, vers le périplasma où elle devient active par dimérisation. Quand la phosphatase alcaline dépourvue de son signal est alors fusionnée avec les fragments carboxyterminaux de la mélibiose, deux voies sont possibles :

– si le segment précédant le point de fusion est localisé dans le feuillet lipidique externe de la membrane, du côté périplasmique (comme celui portant le site 37 de la *figure 1B*), l'enzyme sera exportée vers le périplasma et deviendra donc active ;

– si elle est localisée dans le feuillet interne, du côté cytoplasmique (comme celui portant le site 17 de la même figure), elle ne sera pas exportée et restera donc inactive.

Jusqu'à présent, cette technique avait été utilisée pour conforter la structure secondaire de la mélibiose perméase de *E. coli* selon un procédé de fusion au hasard. Au cours de leur travail, Pourcher *et al.* [6] ont associé la mutagenèse dirigée pour introduire le gène *phoA* en des endroits stratégiquement importants de la molécule ; 57 sites au total ont été explorés.

Les résultats de ces expériences confirment l'existence dans la mélibiose perméase de douze segments transmembranaires ainsi que l'exactitude du modèle dérivé du profil d'hydropathie pour sept des douze segments. En revanche, pour cinq d'entre eux (en partant de l'extrémité aminotermine, H2, H4, H6, H7 et H10) le modèle a dû être reconsidéré. En particulier, la composition de la partie cytoplasmique de la boucle entre les segments H6 et H7 a été raccourcie de 14 résidus (*figure 1*). La modification de la distribution des résidus dans les segments H2 et H4 pourrait avoir des conséquences sur le plan fonctionnel car c'est précisément ces segments qui ont la plus grande densité de charges électriques. Parmi les résidus chargés, on compte les trois acides aspartiques qui pourraient intervenir lors de la reconnaissance cationique (D55 et D59 en H2 et D124 en H4). Dans le modèle révisé, ces trois acides aminés restent toujours localisés dans la membrane, mais ils seraient plus proches du cytoplasme qu'initialement prévu. Un quatrième acide aminé chargé négativement, un acide aspartique en position 19, serait à

présent localisé sur le nouveau modèle dans le segment transmembranaire H1 et pourrait compléter le réseau de coordination pour les cations. En contrepartie, on comprend que l'acide aspartique en position 35 (en H1) ne puisse jouer aucun rôle dans la fixation des cations [2, 3], sa nouvelle localisation l'éloignant des autres résidus acides, contrairement à ce qui avait été supposé à partir du seul profil d'hydropathie.

C.R.

1. Pourcher T, Bassilana M, Sarkar H, Kaback H, Leblanc G. The melibiose/Na⁺ symporter of *Escherichia coli*: kinetic and molecular properties. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1990; 326: 411-23.
2. Pourcher T, Zani M, Leblanc G. Mutagenesis of acidic residues in putative membrane-spanning segments of the melibiose permease of *Escherichia coli*. I. Effect on Na⁽⁺⁾-dependent transport and binding properties. *J Biol Chem* 1993; 268: 3209-15.
3. Zani M, Pourcher T, Leblanc G. Mutagenesis of acidic residues in putative membrane-spanning segments of the melibiose permease of *Escherichia coli*. II. Effect on cationic selectivity and coupling properties. *J Biol Chem* 1993; 268: 3216-21.
4. Zani M, Pourcher T, Leblanc G. Mutation of polar and charged residues in the hydrophobic NH₂-terminal domains of the melibiose permease of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1993; 269: 24883-9.
5. Hama H, Wilson H. Cation-coupling in chimeric melibiose carriers derived from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. The amino-terminal portion is crucial for Na⁺ recognition in melibiose transport. *J Biol Chem* 1993; 268: 10060-5.
6. Pourcher T, Bibi E, Kaback H, Leblanc G. Membrane topology of the melibiose permease of *Escherichia coli* studied by melB-phoA fusion analysis. *Biochemistry* 1996; 35: 4161-8.
7. Manoil C, Beckwith J. A genetic approach to analyzing membrane protein topology. *Science* 1986; 233: 1403-8.
8. Botfield M, Nuguchi K, Tsuchiya T, Wilson T. Membrane topology of the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1992; 267: 1818-22.

CONFÉRENCES-DÉBATS NEURO Actua '96

18 - 19 octobre - Palais des congrès de Paris

INSCRIPTIONS :

ORGAMEDIA, 36, RUE DE LABORDE - 75008 PARIS - Tél. : 45.22.10.18 - Fax : 42.94.91.77