



HAL
open science

Etude par modélisation moléculaire des propriétés mécaniques d'un système membranaire : le canal mécanosensible MscL au sein de bicouches lipidiques modèles

Gaelle Debret

► **To cite this version:**

Gaelle Debret. Etude par modélisation moléculaire des propriétés mécaniques d'un système membranaire : le canal mécanosensible MscL au sein de bicouches lipidiques modèles. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2007. Français. NNT : . tel-00189606

HAL Id: tel-00189606

<https://theses.hal.science/tel-00189606>

Submitted on 21 Nov 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Diderot (Paris 7)

UFR de Biologie

Ecole Doctorale Inter///Bio

Doctorat

Analyse de Génome et Modélisation Moléculaire

Gaëlle DEBRET

Etude Par Modélisation Moléculaire des Propriétés Mécaniques d'un Système
Membranaire : Le Canal Mécanosensible MscL au sein de Bicouches
Lipidiques Modèles.

Directeur de Thèse : Pr Catherine Etchebest

Soutenue le 18 octobre 2007

Jury :

Annick Dejaegere	Rapporteur	Maitre de Conférence, Université Pasteur, Strasbourg
James Sturgis	Rapporteur	Professeur, Université de Méditerranée, Marseille
Monique Genest	Examineur	Directeur de Recherche CNRS, Orléans
Erick Dufourc	Examineur	Directeur de Recherche CNRS, Bordeaux
Alexandre Ghazi	Examineur	Directeur de Recherche CNRS, Orsay

Avant-propos

Ce mémoire constitue la partie principale du travail que j'ai effectué durant ma thèse. J'ai choisi ici de ne présenter que les résultats les plus pertinents, dans un souci de clarté.

De cette histoire commencée presque par hasard, je retire le plaisir de la découverte d'un domaine qui ne m'était pas familier et celui de m'être laissée guider par un sujet qui a évolué au gré des questions soulevées par de nouveaux résultats. Et, par ce que le sujet ne fait pas tout, je tiens à exprimer ici ma profonde gratitude à toutes les personnes qui ont accompagné de près ou de loin ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier Catherine Etchebest, ma directrice de thèse, pour m'avoir donné la possibilité de travailler avec elle sur ce sujet. Cathy, tu m'as donné ma chance et j'espère que tu ne le regrettes pas. Malgré l'imprévu et la reprise de la direction du laboratoire, tu as su me garder une bonne place dans ton emploi du temps, ce qui n'était vraiment pas évident. Merci pour ton humeur joyeuse, tes efforts constants, ta patience et ta confiance. Ces trois années à travailler ensemble ont été très enrichissantes scientifiquement mais aussi le plan personnel. J'espère que nous pourrons continuer à travailler ensemble.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury.

Un grand merci à Annick Dejaegere et James Sturgis pour avoir accepté de relire et de juger ce manuscrit. Sincèrement remerciements également à Monique Genest, Alexandre Ghazi et Erick Dufourc d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

Je tiens à rendre hommage au Pr Hazout qui nous a quitté au cours de ma thèse. Sa pédagogie et la passion qu'il mettait dans ses cours m'ont donné goût à la bioinformatique. Ses conseils et sa gentillesse m'ont beaucoup apporté.

L'ensemble de mes années de thèse se sont déroulées au sein de l'Equipe de Bioinformatique Génomique et Structurale. Aussi, merci à toutes les personnes du laboratoire de m'y avoir accueillie mais surtout de leur gentillesse, de leur intérêt et de leur soutien. Merci spécialement à Pat pour ses conseils et sa disponibilité et à Alex pour son intérêt et ses blagues toujours désopilantes. Merci à eux, pour ces discussions toujours stimulantes. Merci à Leslie, Anita et Pat de m'avoir donné l'occasion de travailler avec eux sur des sujets qui n'étaient pas les miens et m'ont ainsi permis d'appréhender d'autres problématiques.

Un grand merci aux "jeunes" du laboratoire, Gaëlle, Juliette, Jennifer, Leslie, Aurélie, Julien, Ludo, Cyril, Eric, pour leur soutien mais surtout pour les moments informels, vous êtes trop sympas! Merci spécialement à Julien qui a partagé mon bureau pendant 3 ans et qui m'a supportée tant bien que mal pendant tout ce temps. Hvala Anita for your support and your jokes. Thanks to have taught to us to speak a little better English and Croatian.

Je tiens également à remercier toutes les personnes de mon entourage, amis, famille, rencontres, qui m'ont supportée et m'ont permis de me détendre.

Finalement, merci à Fred pour tout et pour rien, merci d'être là, merci d'être toi.

Table des matières

I	Introduction	1
1	Systèmes membranaires	3
1.1	La membrane	3
1.1.1	Rôle	3
1.1.2	Caractéristiques	3
1.2	Les phospholipides	5
1.2.1	Caractéristiques	5
1.2.2	Dynamique	6
1.3	Les protéines membranaires	7
1.3.1	Généralités	7
1.3.2	Structure des protéines membranaires	7
1.3.3	Une catégorie de protéines membranaires: les canaux ioniques	9
1.4	Principes physiques gouvernant le comportement des systèmes membranaires . .	10
1.5	Simulation de systèmes membranaires	11
2	Les Canaux mécanosensibles	13
2.1	Mise en évidence	13
2.1.1	Détection	13
2.1.2	Identification moléculaire	13
2.2	Variabilité	14
2.3	Fonction des canaux mécanosensibles	15
2.4	Modes d'activation	15
2.4.1	Sensibilité à la tension	15
2.4.2	Comment s'effectue la transmission de la tension ?	16
3	Les canaux mécanosensibles bactériens	19
3.1	Mise en évidence et localisation	19
3.1.1	Mise en évidence	19
3.1.2	Localisation	20
3.2	Rôle des canaux mécanosensibles bactériens	20
3.3	Trois types de canaux mécanosensibles bactériens	21
3.3.1	Propriétés physiologiques	21
3.3.2	Propriétés structurales	21

4	Le canal MscL: de la séquence à la fonction	25
4.1	Identification et représentation	25
4.2	Propriétés de conductance	27
4.3	La structure du MscL	28
4.3.1	Vers sa structure	28
4.3.2	Les structures cristallographiques	28
4.3.3	Les modèles	31
4.3.4	Etat complètement fermé ?	32
4.4	Mécanisme d'ouverture	33
4.4.1	Modèle de Sukharev	33
4.4.2	Inclinaison des hélices	34
4.4.3	Courbure des hélices	34
4.4.4	Rotation des hélices TM1 autour de leur axe	35
4.4.5	Expansion du canal	35
4.4.6	Rôle de la région Nterminale	36
4.4.7	Rôle de la région Cterminale	37
4.4.8	Rôle de la boucle périplasmique	37
4.4.9	Mouvements asymétriques	38
4.4.10	Différences de mécanisme d'ouverture selon les espèces	38
5	Questions et objectif	39
II	Outils et Méthodologies	41
6	Modélisation par homologie	43
7	Mécanique moléculaire	45
7.1	Principe	45
7.2	Fonction d'énergie potentielle	45
7.3	Champs de force	46
7.4	Interactions longue distance	47
8	Dynamique moléculaire	49
8.1	Description	49
8.1.1	Equations du mouvement	49
8.1.2	Intégration des équations	49
8.1.3	Contraintes méthodologiques	50
8.2	Systèmes étudiés	52
8.2.1	Construction des membranes	52
8.2.2	Insertion du MscL dans les membranes	54
8.2.3	Simulations du MscL dans des membranes	55
8.2.4	Détails des simulations	56
8.3	Analyses	57

8.3.1	Analyse des propriétés des lipides	57
8.3.2	Analyse des propriétés de la protéine	58
9	Dynamique essentielle	63
9.1	Principe	63
9.2	Limites	64
9.3	Système analysé	64
9.3.1	Recouvrement	64
9.3.2	Participation	64
9.3.3	Collectivité	65
10	Dynamique vibrationnelle	67
10.1	Principe	67
10.2	Formalisme	67
10.3	Limitations	69
10.4	Méthode simplifiée de M. Tirion	69
III	Résultats	71
11	Dynamique des lipides	73
11.1	Comportement des membranes pures	73
11.2	Influence du canal MscL sur les bicouches lipidiques	75
11.2.1	Epaisseur membranaire	76
11.2.2	Paramètre d'ordre	77
11.2.3	Coefficient de diffusion	79
12	Epaisseur membranaire	81
12.1	Influence des bicouches lipidiques sur le canal MscL	81
12.1.1	Stabilité du MscL de <i>E. coli</i> dans du POPE	81
12.1.2	Changements conformationnels dans du DMPE	83
12.1.3	Inclinaison des hélices	84
12.1.4	Cassure des hélices	86
12.1.5	Rotation des hélices	87
12.1.6	Elargissement du canal	88
12.1.7	Profil du pore	88
12.1.8	Contributions énergétiques	89
12.1.9	Mouvements d'ouverture ?	89
12.1.10	Observations et choix des paramètres	91
12.2	Les Mouvements induits sont-ils intrinsèques ?	91
12.2.1	Analyse en composantes principales des trajectoires	91
12.2.2	Comparaison PCA - NMA	94

13	Espèce et mécanosensibilité	97
13.1	Stabilité du MscL de <i>M. tuberculosis</i> dans le POPE	97
13.2	Comportement du MscL de <i>M. tuberculosis</i> dans le DMPE	98
13.2.1	Comportement général	98
13.2.2	Inclinaison et hauteur des hélices	99
13.2.3	Rotation des hélices	101
13.2.4	Profil du pore	102
13.2.5	Différence de mécanosensibilité ?	102
13.3	Différences de séquence, de structure et de sensibilité	103
13.3.1	Séquences	103
13.3.2	Hydrophobicité et Flexibilité	104
13.3.3	Structures	106
13.3.4	Dynamique	107
13.3.5	Energie	109
14	Influence de la boucle périplasmique	113
14.1	Construction des canaux hybrides	113
14.2	Réaction au mésappariement hydrophobe	115
14.2.1	Comportement général	115
14.2.2	Mouvements directs d'adaptation aux lipides	116
14.2.3	Phénomènes induits	118
14.2.4	Boucle périplasmique	120
14.2.5	Une Inversion de la sensibilité ?	121
IV	Discussion et Conclusion	123
15	Discussion générale	125
15.1	Modèle structural et conditions de Simulation	125
15.1.1	Importance du modèle structural	125
15.1.2	Stabilité du modèle	125
15.1.3	Conditions de simulation	126
15.2	Influence de l'épaisseur membranaire	126
15.2.1	Mésappariement hydrophobe	126
15.2.2	Profil de pression latérale	127
15.3	Rôle de la boucle périplasmique	128
15.4	Mécanisme d'ouverture	128
16	Conclusions et perspectives	131
V	Annexes	149
.1	Introduction	151
.2	Modèle d'étude	152

.3	Méthodes existantes	152
.4	Méthode abordée	153
.4.1	Principe général	153
.4.2	Discussion	155
.5	Conclusion	156

Table des figures

1.1	Représentation d'une membrane avec ses différents constituants.	5
1.2	Diagramme de phase et types d'organisations principales prises par les phospholipides.	5
1.3	Un phospholipide, le POPC.	6
1.4	Formules des principaux dérivés d'acide phosphorique permettant la classification des phospholipides.	6
1.5	Structure d'une hélice α et d'un brin β	8
1.6	Topologie des protéines membranaires.	9
1.7	Représentation schématique des trois grandes familles de canaux ioniques.	10
1.8	Méthodes de simulation ordonnées en fonction de l'échelle de temps et de la taille des systèmes.	11
2.1	Schéma représentant la technique de patch-clamp.	14
2.2	Ouverture des Canaux MS en fonction de la pression et de la tension.	16
2.3	Deux modèles possibles d'activation des canaux MS.	16
2.4	Deux mécanismes possibles d'activation des canaux MS par déformation de la membrane.	17
3.1	Caractéristiques de <i>E. coli</i> . a) La bactérie vue au microscope électronique. b) Enveloppe des bactéries gram négatif.	19
3.2	Diversité structurelle et fonctionnelle des canaux MS bactériens.	22
3.3	Structure des canaux MscL et MscS.	23
4.1	Arbre phylogénétique des homologues du MscL.	27
4.2	Conductance représentative d'un canal MscL unique.	28
4.3	Topologie du canal MscL.	29
4.4	Première structure du MscL de <i>M. tuberculosis</i>	30
4.5	Représentation schématique du faisceau Cterminal.	30
4.6	Comparaison d'un monomère des deux structures cristallographiques du MscL.	31
4.7	Alignement de séquences des MscL de <i>M. tuberculosis</i> et <i>E. coli</i>	32
4.8	Les quatre structures du MscL.	32
4.9	Modèle d'ouverture du canal MscL.	34
4.10	Structure des hélices transmembranaires dans l'état ouvert.	35
4.11	Représentation des résidus bordant le pore.	36

4.12	Représentation schématique de l'élargissement du canal pendant l'ouverture.	36
6.1	Schématisation de la procédure de modélisation par homologie.	43
6.2	Alignements utilisés pour construire les protéines hybrides.	44
7.1	Représentation des paramètres pris en compte dans le calcul d'énergie.	45
7.2	Représentation des différents termes liés de la fonction d'énergie potentielle.	46
7.3	Représentation des termes non-liés de la fonction d'énergie potentielle.	47
8.1	Représentation schématique de l'algorithme <i>Leap frog</i>	51
8.2	Représentation des conditions périodiques aux limites en 2 dimensions.	52
8.3	Méthodes de couplage de la pression.	53
8.4	Représentation schématique des lipides simulés.	53
8.5	Représentation schématique de l'angle d'inclinaison.	59
8.6	Représentation schématique de la hauteur des hélices.	60
8.7	Représentation schématique de la hauteur des boucles périplasmiques.	60
8.8	Procédure de calcul et représentation schématique de l'angle de kink.	60
8.9	Représentation schématique de la rotation d'une hélice.	61
8.10	Détermination du rayon du pore.	62
9.1	Exemple d'ACP d'une trajectoire.	63
11.1	Représentation des systèmes lipidiques simulés.	74
11.2	Evolution de l'épaisseur des membranes au cours du temps.	76
11.3	Définition du bulk.	76
11.4	Paramètre d'ordre des lipides avec ou sans présence du canal.	78
11.5	Paramètre d'ordre des lipides en fonction du feuillet.	78
11.6	Paramètre d'ordre des lipides en fonction de la proximité au canal.	78
11.7	Diffusion des lipides.	79
12.1	Représentation de Eco-MscL dans du POPE en début et fin de simulation.	82
12.2	RMSd/f du MscL dans du POPE.	82
12.3	Structures Secondaires du MscL dans du POPE.	83
12.4	Représentation de Eco-MscL dans du DMPE en début et fin de simulation.	84
12.5	RMSd/f du MscL dans du DMPE.	84
12.6	Structures Secondaires du MscL dans du DMPE.	85
12.7	Représentation de l'angle de tilt.	85
12.8	Evolution de la hauteur des hélices transmembranaires.	86
12.9	Evolution de la cassure des hélices.	86
12.10	Rotation des hélices au cours du temps.	87
12.11	Evolution du diamètre du canal.	88
12.12	Evolution du profil du pore dans le DMPE.	89
12.13	Contributions énergétiques.	90
12.14	Participation des vecteurs propres au mouvement global	91
12.15	Mouvements associés au 1er vecteur propre dans le POPE.	92

12.16	Amplitude des mouvements associés aux vecteurs propres décrits.	93
12.17	Mouvements associés au 1er vecteur propre dans le POPE.	93
12.18	Recouvrement entre vecteurs propres dans le POPE et le DMPE.	94
12.19	Recouvrement entre vecteurs propres du POPE et modes normaux.	94
12.20	Recouvrement entre vecteurs propres du DMPE et modes normaux.	96
12.21	Mouvements recouvrants entre vecteurs propres du DMPE et modes normaux.	96
13.1	Représentation de Tb-MscL dans du POPE en début et fin de simulation.	98
13.2	Structures secondaires de Tb-MscL dans du POPE au cours du temps.	98
13.3	RMSd/f du Tb-MscL dans du POPE.	98
13.4	Représentation de Tb-MscL dans du DMPE en début et fin de simulation.	99
13.5	Structures secondaires de Tb-MscL dans du DMPE au cours du temps.	99
13.6	RMSd/f du Tb-MscL dans du DMPE.	100
13.7	Evolution de la hauteur et du tilt des hélices transmembranaires de Tb-MscL dans DMPE.	100
13.8	Courbures des hélices transmembranaires Tb-MscL dans du DMPE au cours du temps.	101
13.9	Rotation des hélices de Tb-MscL dans le DMPE au cours du temps.	101
13.10	Profil du pore de Tb-MscL dans le DMPE.	102
13.11	Structure du pore de Tb- et Eco-MscL dans le DMPE.	103
13.12	Alignement de séquence entre Tb- et Eco-MscL.	104
13.13	Mutations de Tb- et Eco-MscL.	105
13.14	Profil d'hydrophobicité des boucles de Tb- et Eco-MscL	106
13.15	Superposition entre un monomère de Eco- et de Tb-MscL.	107
13.16	Profils de fluctuation de Eco- et Tb-MscL.	107
13.17	Evolution des liaisons hydrogènes des boucles pour Eco- et Tb-MscL.	108
13.18	Variation d'énergie inter-résidus de Eco- et Tb-MscL.	110
13.19	Evolution de l'énergie entre têtes polaires de DMPE et résidus de Eco- et Tb-MscL.	111
14.1	Alignements utilisés pour construire les protéines hybrides.	113
14.2	Superposition entre monomères des canaux natifs et hybrides.	114
14.3	Structures des canaux hybrides.	115
14.4	Structures des canaux hybrides en début et fin de simulation dans le POPE.	116
14.5	Moyenne du RMSd sur les C α des canaux hybrides dans du POPE.	116
14.6	Structures des canaux hybrides en début et fin de simulation dans le DMPE.	117
14.7	Evolution des structures secondaires des hélices transmembranaires des canaux hybrides.	117
14.8	Evolution de la hauteur des hélices transmembranaires des canaux hybrides.	119
14.9	Evolution de l'inclinaison des hélices transmembranaires des canaux hybrides	119
14.10	Evolution de l'angle de cassure des hélices transmembranaires des canaux hybrides.	119
14.11	Evolution de la rotation azimuthale des hélices transmembranaires des canaux hybrides.	120
14.12	Evolution du profil du pore des canaux hybrides.	121

14.13	Profils de fluctuation des canaux hybrides.	122
14.14	Profils de fluctuation des canaux natifs.	122
15.1	Structure conique des lipides PE et profil de pression latérale d'une bicouche lipidique.	127
1	Les quatre structures du MscL.	151
2	Représentation de la structure du MscL utilisée lors de l'étude.	152
3	Structures intermédiaire et ouverte modélisées.	154
4	Evolution de la structure du MscL vers la carte de densité de l'état intermédiaire.	154
5	Exemples de structures obtenues en suivant les modes normaux vers un élargissement du pore.	156

Liste des tableaux

1.1	Echelle d'hydrophobicité des résidus.	8
3.1	Les trois familles de canaux MS bactériens.	21
4.1	Liste représentative de protéines MscL séquencées.	26
4.2	Caractéristiques principales des modèles et structures.	32
8.1	Fréquences vibratoires typiques dans les molécules.	51
8.2	Récapitulatif des simulations effectuées sur le MscL de <i>E. coli</i>	56
8.3	Définition des différents domaines du MscL.	58
11.1	Récapitulatif des paramètres pour les membranes de DMPC, DMPE et POPE. . .	74
11.2	Diffusion moyenne des lipides.	80
14.1	Récapitulatif des tendances observées pour les MscL natifs et hybrides dans du DMPE.	121

Première partie

Introduction

Chapitre 1

Systemes membranaires

1.1 La membrane

1.1.1 Rôle

La membrane plasmique est une structure fluide, interface entre les milieux extra- et intracellulaires, que la cellule peut ajuster de manière très spécifique pour répondre à ses besoins. Son rôle de moyen de communication avec le milieu externe en fait un des organites les plus importants dans la cellule. Elle constitue le seul organite dont la cellule ne peut se passer, même temporairement, ainsi que le seul que l'on ait réussi à reproduire partiellement.

En premier lieu, les membranes constituent une barrière sélective. Elles permettent de contrôler l'entrée et la sortie des différentes molécules et ions entre les différents milieux. Cela permet à la cellule d'avoir une composition propre.

Les bicouches lipidiques, structure de base des membranes, ne sont perméables qu'aux petites molécules hydrophobes (O_2 , N_2 , glycérol, etc), par diffusion simple. Mais elles servent de support à de nombreuses protéines transmembranaires ayant pour rôle de réguler les échanges (par exemple, les canaux ioniques pour les transferts d'ions, les aquaporines pour le transfert d'eau par osmose, etc). Le transport à travers les membranes de molécules plus grosses se fait par endocytose (vers l'intérieur) et exocytose (vers l'extérieur).

La membrane sert aussi de support au transfert d'information biologique. Cette information prend la forme d'une hormone, d'un sucre, d'une protéine, etc, captés par des récepteurs spécifiques. Cette reconnaissance enclenche un mécanisme de signalisation cellulaire aboutissant à une réaction de la cellule face au signal qu'elle a reçu.

1.1.2 Caractéristiques

La membrane est constituée de trois éléments de base dont les proportions diffèrent grandement selon les organismes : les lipides, les protéines et les glucides.

1. Les lipides constituant la membrane plasmique sont principalement des phospholipides.

Chez les eucaryotes, un composé aussi très représenté est le cholestérol, absent des membranes procaryotes. Les phospholipides sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire qu'elles peuvent être divisées en deux régions : hydrophobe et hydrophile. Dans la membrane, ces molécules vont former des bicouches, c'est-à-dire un empilement de deux feuillets, les parties hydrophobes au centre, entourées des parties hydrophiles, en contact avec l'eau. Cette organisation particulière est responsable de l'étanchéité de la membrane aux molécules solubles dans l'eau, qui constituent la majorité des molécules biologiques. C'est dans cette bicouche que vont être ancrés les protéines et les glucides permettant les échanges de la cellule avec l'extérieur.

2. Les protéines membranaires assurent la communication et donc les échanges entre milieu interne et externe à travers différentes fonctions :
 - en temps que canaux, elles permettent le passage de molécules polaires à travers la barrière lipidique ;
 - comme récepteurs, elles servent de site spécifique de fixation de molécules messagères comme les hormones ;
 - elles catalysent parfois des réactions enzymatiques.Elles participent aussi à la maintenance de la forme et de la stabilité de la membrane et servent de point d'ancrage à des structures extra- ou intracellulaire comme le cytosquelette.
3. Les derniers constituants de base des membranes sont les glucides. Ils forment à la surface de la membrane, du côté extracellulaire, des structures complexes et variées. Les glucides sont accrochés à la membrane de deux manières : i) ils sont fixés à des protéines et forment des glycoprotéines, ii) ils sont fixés aux lipides et forment des glycolipides. Les glucides interviennent à trois niveaux : i) grâce à leurs propriétés antigéniques, ils ont un rôle de reconnaissance, par exemple de groupe sanguin ; ii) parce qu'ils sont très polaires, ils contribuent à l'environnement local ; iii) ils renforcent la membrane.
4. On trouve, du reste, sur toutes les membranes externes des cellules, des résidus sucrés formant un *cell-coat*, un "manteau" de protection pour la cellule. Ces sucres (ou oses) se branchent de façon covalente sur les lipides et protéines de la membrane. Seulement un lipide sur dix est glycosilé alors que la grande majorité des protéines membranaires le sont.

Ces trois éléments (lipides, protéines, glucides) interagissent pour former un film relativement fluide, étanche qui isole la cellule du milieu mais lui permet d'interagir (fig. 1.1). On a longtemps pensé que cet ensemble formait une mosaïque fluide (Singer & Nicholson, 1972). Dans ce modèle, les protéines, de faible concentration, étaient dispersées. Elles étaient adaptées à des lipides ne subissant pas de perturbations et dont la surface était directement en contact avec l'eau (fig. 1.1).

Depuis quelques années, l'idée émergente est que les membranes ne seraient pas fluides dans le sens proposé dans le modèle. Elles seraient en fait découpées en régions de structures et de fonctions différentes (Engelman, 2005). Le concept des "*rafts*" est ainsi récemment apparu. Ce sont des domaines dans lesquels l'ordre des chaînes grasses des lipides et la composition protéique diffèrent de la membrane environnante (Hanzal-Bayer & Hancock, 2007). Le découpage de la membrane en régions bien distinctes module alors la fluidité de la membrane. Les lipides diffusent dans la membrane de manière très différente en fonction des régions et la direction des

mouvements n'est pas toujours libre (Kusumi *et al.*, 2005). Ils varient en épaisseur et en composition en fonction des régions mais aussi en fonction de l'épaisseur hydrophobe des protéines avec lesquelles ils sont en contact (Mitra *et al.*, 2004). Leur exposition au milieu aqueux est de plus limitée par l'encombrement des espèces ancrées dans la membrane (fig. 1.1).

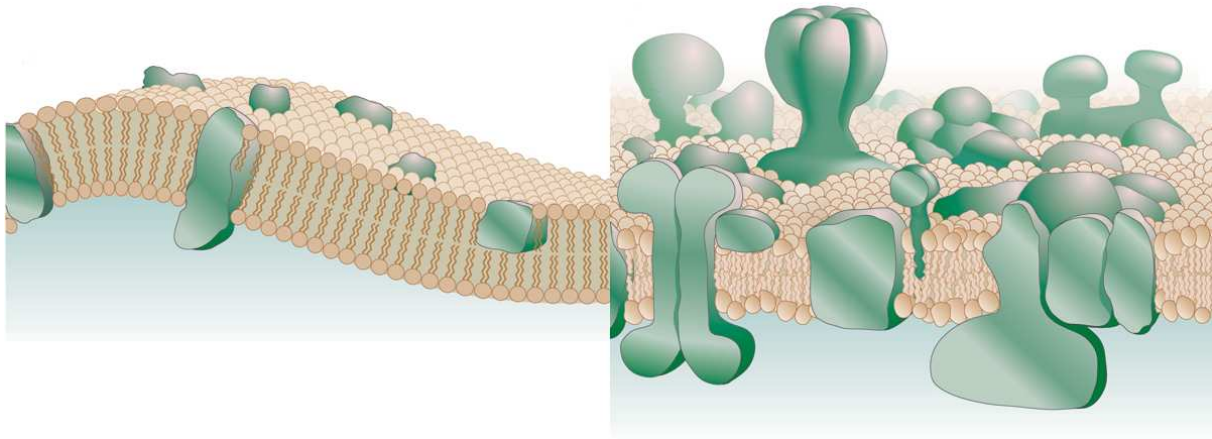


Fig. 1.1: Représentation d'une membrane avec ses différents constituants. A gauche, le modèle de mosaïque fluide. A droite, une version plus récente du modèle de membrane. (Extrait de Engelman (2005))

Les membranes sont donc des organites complexes, dont la composition est très variable d'une espèce à l'autre, d'un feuillet à l'autre dans une même bicouche, mais aussi d'une région à l'autre dans un même feuillet.

1.2 Les phospholipides

1.2.1 Caractéristiques

Les phosphoglycérides (ou phospholipides) sont les lipides les plus abondants dans les membranes biologiques. Ils s'associent en une organisation qui leur permet de limiter les contacts entre partie apolaire et eau. Le type d'organisation dépend des tailles relatives des parties hydrophile et hydrophobe et de la température. Ils peuvent prendre une organisation lamellaire, où les lipides s'agrègent en bicouches, une organisation hexagonale ou une organisation micellaire (fig. 1.2).

Leur structure de base est formée d'une partie apolaire (les chaînes hydrocarbonées) et d'une partie polaire (le phosphoglycérol), spatialement distinctes. Le phosphoglycérol est constitué, comme son nom l'indique, d'un glycérol et d'un dérivé de l'acide phosphorique (fig. 1.3).

La nature du dérivé de l'acide phosphorique permet la classification des phospholipides. Les plus représentés dans les membranes plasmiques sont la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI) (fig. 1.4).

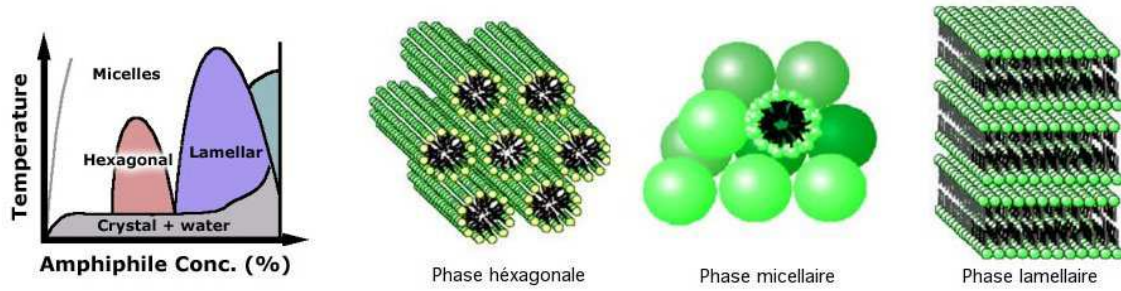


Fig. 1.2: Diagramme de phase et types d'organisations principales prises par les phospholipides.

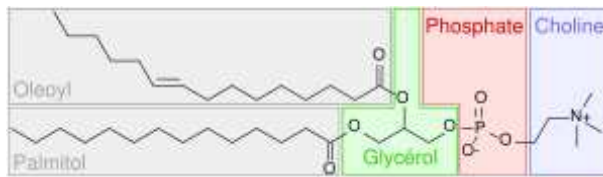


Fig. 1.3: Un phospholipide, le POPC.

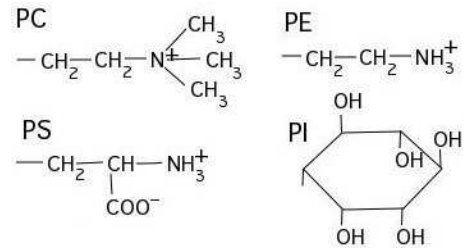


Fig. 1.4: Formules des principaux dérivés d'acide phosphorique permettant la classification des phospholipides.

1.2.2 Dynamique

Les lipides ne sont pas statiques dans les membranes, ils sont sujets à de nombreux mouvements. Notre compréhension de la dynamique des lipides est encore limitée. Si l'on ignore les mouvements qui n'induisent pas un transport de lipides comme l'oscillation ou la rotation autour de leur axe, les lipides sont sujets à trois types de mouvements différents : la diffusion latérale dans le plan de la membrane, la diffusion transversale d'un feuillet à l'autre, aussi appelée *flip-flop* et la diffusion de la membrane vers le milieu aqueux puis l'insertion dans une autre membrane (Holthuis & Levine, 2005).

Les lipides diffusent dans le plan de la membrane avec un coefficient de diffusion 10 à 100 fois supérieur à celui des protéines. Ils peuvent couvrir une aire de 0,1 à 1 $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ dans une cellule (Murase *et al.*, 2004). La diffusion des lipides n'est cependant pas gouvernée par des règles simples et elle peut varier d'un lipide à l'autre en fonction de sa nature et de son environnement. Dans les membranes modèles, le phénomène de *flip-flop* est très lent pour les lipides possédant une tête polaire et un peu plus rapide pour ceux n'en ayant pas (Bai & Pagano, 1997). Le temps de demie-vie est de la seconde à la minute pour les diacylglycérols ou le cholestérol et de l'ordre de l'heure ou du jour pour les phosphatidylcholines (PC). Cependant, un prérequis pour l'expansion des membranes telles que celle du réticulum-endoplasmique (RE) est que les lipides, qui sont produits dans le feuillet externe, puissent "flipper" à une vitesse proche de celle de production. Dans ce cas, les flipases RE (Buton *et al.*, 1996) permettent de catalyser la diffusion transversale d'un feuillet à l'autre. Dans le cas de la membrane plasmique qui doit garder une composition asymétrique, des flipases ATP-dépendantes permettent la translocation des PS et PE de la membrane externe vers la membrane interne (Seigneuret & Devaux, 1984). Un autre mécanisme de transport lipidique, appelé échange monomérique, est celui qui concerne

l'échange de lipides entre membranes par désorption d'un lipide vers le milieu aqueux puis réabsorption par une autre membrane. Cet échange est limité par l'étape de désorption. Il est assez rapide pour les lipides à chaîne unique (le temps de demie-vie est de l'ordre de la minute pour le lysophosphatidylcholine) mais très lent pour les lipides ayant deux longues chaînes grasses (le temps de demie-vie est de l'ordre de plusieurs jours pour les phosphatidylcholines). Un exemple d'échange monomérique bien étudié est le transfert de phosphatidylinositol (PI) du RE vers l'appareil de Golgi et la membrane plasmique (Whatmore *et al.*, 1999). Ce transport est médié par une protéine de transfert de lipides (LTP).

1.3 Les protéines membranaires

1.3.1 Généralités

Les protéines insérées dans la membrane, sont classées en deux groupes : les protéines intrinsèques, enchassées dans la membrane, et les protéines périphériques, interagissant faiblement avec la membrane, soit par liaisons électrostatiques, soit par l'intermédiaire d'autres protéines membranaires.

Les fonctions des protéines membranaires sont aussi variées que celle des protéines solubles : activités enzymatiques, fonctions structurales, moteurs moléculaires, etc. En raison de leur localisation spécifique à l'interface de deux compartiments différents, les protéines intégrales membranaires peuvent cependant avoir trois types de fonctions additionnelles tout à fait spécifiques :

- Le transport actif ou passif de molécules à travers la membrane. Le transport est dit passif lorsque le composé diffuse simplement d'un côté à l'autre de la membrane, comme la diffusion d'eau à travers les porines (Agré, 2006). Le transport est au contraire actif quand il est couplé à une utilisation d'énergie par la protéine membranaire (hydrolyse d'ATP, utilisation de la force proton-motrice). Le transport actif permet de transporter une molécule contre son gradient de concentration, comme par exemple la translocation d'ions Cl⁻ ou de vitamine B12 par les transporteurs ABC (Raaijmakers, 2007).
- La réception/transmission de signaux à travers la membrane, comme par exemple les récepteurs nicotiques (Cooke, 2007).
- Le (re)modelage et la fusion des membranes, comme les protéines de fusion des virus Ebola (Freitas *et al.*, 2007) ou HIV (Deng *et al.*, 2007).

1.3.2 Structure des protéines membranaires

La structure tridimensionnelle d'une protéine est stabilisée par un ensemble d'interactions non covalentes : interactions électrostatiques, liaisons hydrogène, interactions hydrophobes. La structure finale adoptée résulte d'un compromis entre ces interactions.

Les protéines membranaires sont constituées de domaines entièrement en contact avec un milieu polaire (eau environnante ou têtes des lipides) et de domaines en contact avec un milieu hydrophobe (chaînes grasses des lipides). Les règles qui gouvernent la structure tridimensionnelle (3D) des domaines hydrophiles sont celles qui gouvernent la structure 3D des protéines

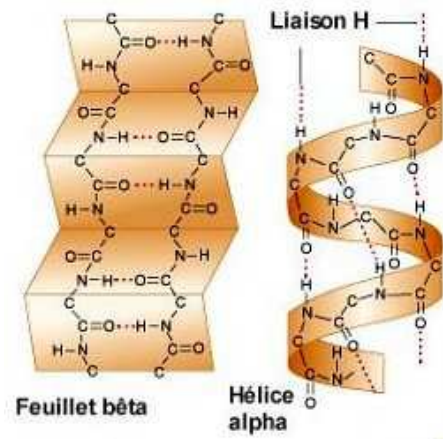


Fig. 1.5: Structure d'une hélice α et d'un brin β .

solubles : la chaîne polypeptidique se replie sur elle-même de sorte à exposer les résidus polaires vers l'extérieur tout en maintenant à l'intérieur de la protéine les résidus hydrophobes (table 1.1). Il n'en est pas de même pour les domaines hydrophobes : une structure stable minimise les interactions entre résidus polaires et environnement, ce qui implique que les résidus placés à l'extérieur soient plutôt hydrophobes. De plus, les groupements $C=O$ et $N-H$ de la liaison peptidique reliant deux résidus successifs ont eux-même un caractère polaire. Ils vont donc avoir tendance à s'éloigner du contact avec l'environnement, hydrophobe. Ceci passe par l'établissement de liaisons hydrogène entre ces deux groupements, conduisant à la formation de structures secondaires ordonnées : principalement des hélices α et brins β (fig. 1.5).

Résidus	Indice	Résidus	Indice	Résidus	Indice	Résidus	Indice
Ile (I)	+ 4.5	Met (M)	+ 1.9	Trp (W)	- 0.9	Gln (Q)	- 3.5
Val (V)	+ 4.2	Ala (A)	+ 1.8	Tyr (Y)	- 1.3	Asp (D)	- 3.5
Leu (L)	+ 3.8	Gly (G)	- 0.4	Pro (P)	- 1.6	Asn (N)	- 3.5
Phe (F)	+ 2.8	Thr (T)	- 0.7	His (H)	- 3.2	Lys (L)	- 3.9
Cys (C)	+ 2.5	Ser (S)	- 0.8	Glu (E)	- 3.5	Arg (R)	- 4.5

Tab. 1.1: Echelle d'hydrophobicité des résidus (Kyte & Doolittle, 1982).

Les protéines membranaires peuvent être classées en fonction des structures leur permettant d'interagir avec la membrane et la manière dont elles s'agencent. Les types de structures mises en jeu et leurs organisations sont regroupés sous le terme de topologie membranaire. Deux grandes catégories de topologie définissent les protéines membranaires (fig. 1.6) :

1. Les protéines de surface ou monotopiques. Ce sont des protéines en contact avec un seul des compartiments définis par la membrane. Les structures en contact avec la membrane peuvent être :
 - a. une ou plusieurs hélices α parallèles au plan de la membrane (de 1 à 3 par protéine). Ces hélices ont la particularité d'être amphipathiques, c'est à dire de présenter une face hydrophobe et une face hydrophile ;
 - b. des boucles hydrophobes ;

Les protéines monotopiques peuvent aussi se lier à la membrane grâce à des liaisons covalentes ou électrostatiques à des lipides (c.). Ces liaisons peuvent se faire directement avec des phospholipides ou par l'intermédiaire d'un ion (d.).

2. Les protéines transmembranaires ou polytopiques sont des protéines en contact avec les deux compartiments définis par la membrane. Les structures en contact avec la membrane peuvent être :

e. f. une ou plusieurs hélices α transmembranaires (de 1 à plus de 20 par protéine). Il s'agit de loin de la conformation transmembranaire la plus observée dans les structures résolues expérimentalement.

g. un tonneau β transmembranaire composé de 8 à 22 brins β (Schulz, 2000). Il est à noter que ces protéines ont un processus de repliement particulier qui, pour les porines par exemple, se ferait dans le périplasma avant d'être insérées dans les membranes.

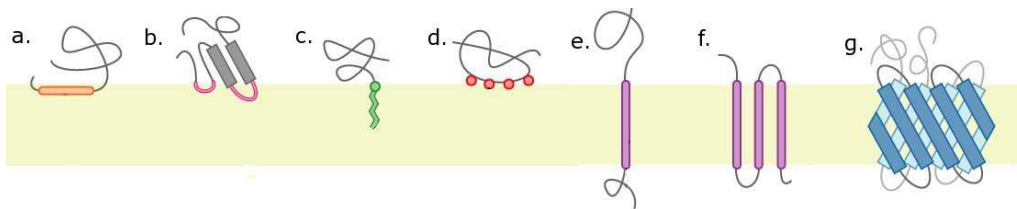


Fig. 1.6: Topologie des protéines membranaires.

Très peu de structures 3D de protéines membranaires à l'échelle atomique sont connues à ce jour. Par contre, leur séquence, généralement déterminée à partir de la séquence du gène correspondant, est connue dans un très grand nombre de cas et la topologie de ces protéines peut être déterminée relativement facilement.

1.3.3 Une catégorie de protéines membranaires : les canaux ioniques

Les canaux ioniques sont des protéines traversant la membrane de part en part, capables de former des pores à travers lesquels diffusent passivement de l'eau et des petites molécules hydrophiles (ions, métabolites) selon leur gradient électrochimique (transport passif). Ces canaux sont ubiquitaires, c'est-à-dire qu'ils sont présents dans toutes les cellules, au niveau de la membrane plasmique (et membrane endocellulaire chez les eucaryotes). Ils interviennent dans toutes les fonctions de base de la cellule : génèse du potentiel d'action dans les cellules excitables, transmission synaptique, exocytose, apoptose, etc.

Généralement, les canaux ioniques fluctuent entre deux états extrêmes : l'état ouvert et l'état fermé. Des stimuli spécifiques peuvent provoquer le changement d'état. On distingue trois familles (fig. 1.7) selon le type de stimulus :

- Les canaux voltage-dépendants : sensibles aux changements de potentiel transmembranaire.
- Les canaux ligand-dépendants : sensibles à la fixation d'un ligand.
- Les canaux mécanosensibles : répondant à un stress mécanique.

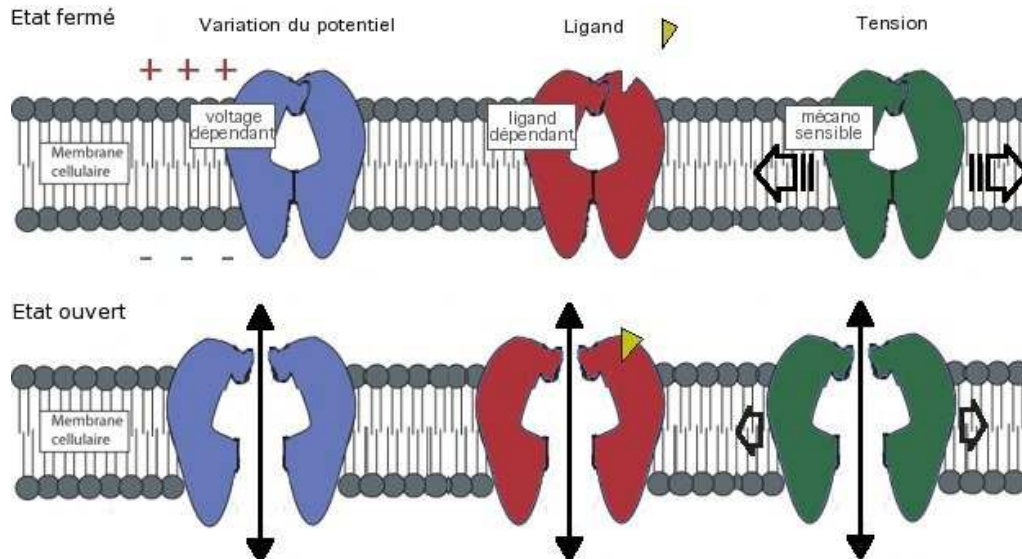


Fig. 1.7: Représentation schématique des trois grandes familles de canaux ioniques.

Ainsi les canaux sodique et potassique voltage-dépendants (Edwards & Weston, 1995) qui interviennent dans la mise en place du potentiel d'action des cellules excitables font partie de la première catégorie ; le récepteur nicotinique de l'acétylcholine de la jonction neuromusculaire (Albuquerque *et al.*, 1988) est un exemple de la deuxième, le canal mécanosensible bactérien de grande conductance (Sukharev *et al.*, 1994) illustre la troisième.

Pour certains de ces canaux, il a été possible de faire la relation entre leur séquence, leur structure, leur fonction et la nature des stimuli qui gouvernent leur activité. Les protéines sont extrêmement diverses et la catégorie des canaux ioniques présente une grande variabilité de sélectivité, de régulation, de pharmacologie ou de localisation. Malgré ces diversités, tous les canaux ioniques sont caractérisés par des segments transmembranaires qui s'organisent pour former un pore dans la membrane biologique à travers lequel diffusent des molécules hydrophiles.

1.4 Principes physiques gouvernant le comportement des systèmes membranaires

Durant les dernières années, il a été admis que le comportement des membranes biologiques était gouverné par des principes physiques se manifestant par certaines propriétés spécifiques. Parmi ces principes, l'élasticité membranaire semble jouer un rôle important dans les processus de bourgeonnement, fusion, fission et formation de pores.

L'hypothèse de l'adaptation hydrophobe est une des premières à avoir été proposée (Mouritsen & Blom, 1984; Sackmann, 1984). Selon cette hypothèse, le mésappariement hydrophobe affecte l'organisation des membranes et certaines fonctions biologiques, comme les voies de sécrétion de l'appareil de Golgi (Munro, 1995, 1998). L'adaptation hydrophobe semble aussi jouer un rôle dans la séquestration de protéines possédant de longues régions transmembranaires (McIntosh *et al.*, 2003) dans des domaines comme les rafts (Mukherjee & Maxfield, 2004). La manière dont

les membranes compensent le mésappariement hydrophobe implique des changements de structure et de dynamique de la membrane, à un niveau aussi bien microscopique que macroscopique (Mouritsen, 1998; de Planque & Killian, 2003) et peut affecter certaines fonctions biologiques (Lee, 1998, 2003).

De nombreuses expériences montrent que les changements membranaires induits par mésappariement hydrophobe résultent en une déformation de la membrane à proximité de l'interface protéine-lipides (Bryl & Yoshihara, 2001). Les protéines peuvent aussi préférer, sur des bases statistiques, être associées avec des lipides qui correspondent à leur surface hydrophobe (Fernandes *et al.*, 2003). De tels phénomènes peuvent induire la formation de domaines membranaires (Binder *et al.*, 2003).

Il existe aussi des phénomènes liés au mésappariement hydrophobe touchant les protéines. De nombreuses données expérimentales montrent une inclinaison et un recourbement de peptides ou de protéines pour s'adapter à une membrane trop fine (Strandberg *et al.*, 2004; Ozdirekcan *et al.*, 2005). Des inclinaisons de manière individuelle d'hélices formant une protéine ont aussi été observées (Lee, 2003), induisant des changements d'activité de la protéine.

1.5 Simulation de systèmes membranaires

La simulation numérique est utilisée pour étudier, dans des systèmes modèles, des phénomènes tels que la formation de domaines lipidiques, les changements de structures de protéines induits par les lipides, le changement d'organisation latérale de membrane induite par les protéines ou l'insertion de protéines dans les membranes. Elle sert aussi de support à des hypothèses conceptuelles comme le phénomène d'adaptation hydrophobe entre lipides et segments transmembranaires des protéines. Plusieurs types d'approches existent pour la modélisation de systèmes membranaires en fonction des phénomènes que l'on souhaite observer (fig. 1.8).

Des modèles précis de membranes de phospholipides pures sont essentiels pour comprendre les principes généraux de l'organisation membranaire. Des progrès significatifs dans ce domaine ont eu lieu ces dernières années. Plusieurs études ont permis de simuler des membranes contenant une centaine de lipides pendant plus de 100 ns, permettant de calculer des coefficients de diffusion latérale ou d'autres paramètres s'équilibrant plus rapidement (Anezo *et al.*, 2003). Des simulations de bicouches lipidiques de différentes tailles ont permis un premier regard sur des phénomènes tels que l'ondulation membranaire (Lindahl & Edholm, 2000). Des simulations de dynamique moléculaire ont également été utilisées pour étudier des processus à grande échelle comme l'agrégation de lipides, l'électroporation, le changement de phase ou la fusion. L'agrégation de phospholipides positionnés aléatoirement en bicouche prend quelques dizaines de nanosecondes (Marrink *et al.*, 2001), tandis que la formation de petites vésicules de phospholipides a été observée sur une simulation de 100 ns (de Vries *et al.*, 2004). La formation de pores sous l'influence d'un champ électrique ou d'un stress mécanique (Tieleman, 2006) ou des transitions de phase de lipides ont aussi pu être observées (Marrink & Tieleman, 2002). La simulation de membranes mixtes reste difficile en raison de temps d'équilibration très longs (de Vries *et al.*, 2004) mais des systèmes contenant généralement deux entités commencent à apparaître (Pandit *et al.*, 2003; Levadny & Yamazaki, 2005; Leekumjorn & Sum, 2006). La présence de cholestérol a été très étudiée et des simulations de quelques dizaines de nanosecondes commencent à donner

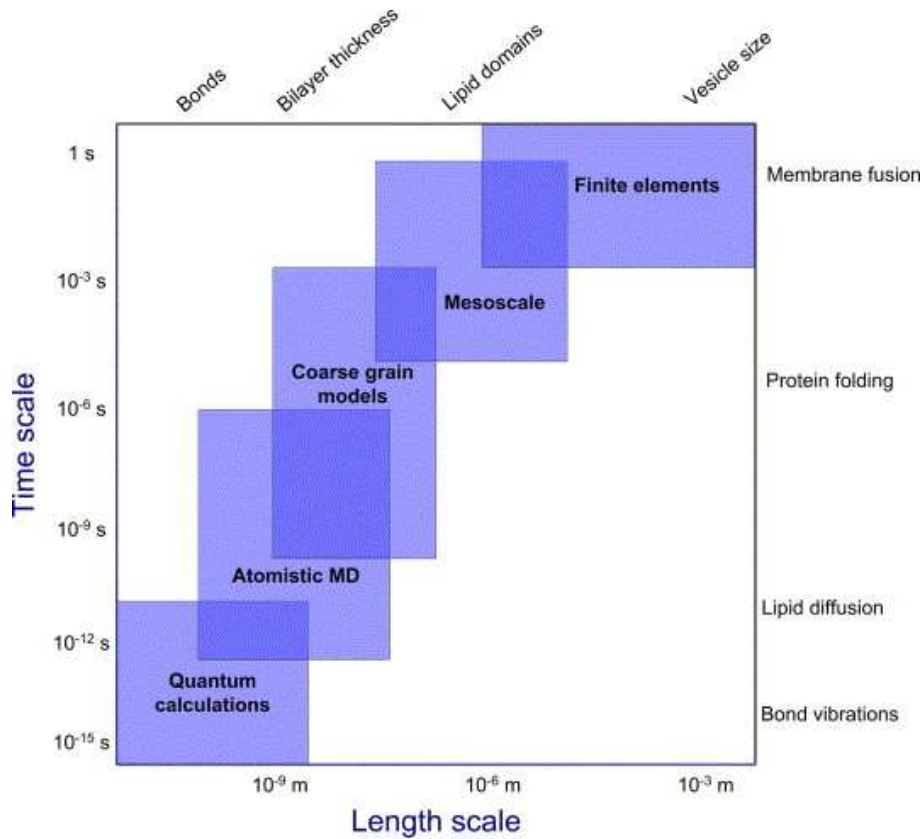


Fig. 1.8: Méthodes de simulation ordonnées en fonction de l'échelle de temps et de la taille des systèmes.

de bonnes informations sur ses interactions avec les phospholipides (Hofsass *et al.*, 2003). La détermination de structures tridimensionnelles de protéines membranaires est très difficile. Cependant, leur nombre augmente de plus en plus. L'accès à des structures de protéines membranaires et leur intérêt biologique ont fait exploser le nombre de simulations de dynamique moléculaire de système contenant une protéine et des lipides. La taille des systèmes simulés est généralement beaucoup plus grande que pour les membranes pures, limitant le temps de simulation à une dizaine de nanosecondes généralement. Les canaux ioniques représentent un défi pour la dynamique moléculaire car les interactions électrostatiques entre solvant, lipides et protéine doivent être très précises. Comme dans de nombreuses simulations, la différence entre l'échelle de temps observable et celle des phénomènes comme l'ouverture des canaux est un problème. La dynamique dirigée peut présenter une solution mais deux structures (états initial et final) sont nécessaires et le chemin exploré n'est pas forcément représentatif d'un chemin "naturel".

Les méthodes gros grains semblent être une voie prometteuse pour l'étude de phénomène à plus grande échelle. Elles peuvent être utilisées pour explorer de nombreux processus biologiques tels que les interactions protéine-protéine, lipide-protéine ou membrane-membrane. La fonction des protéines est fortement influencée par les interactions avec les lipides environnants (Dumas *et al.*, 1999) et une compréhension globale de ce phénomène n'est possible qu'à un niveau mésoscopique. Ainsi, pour de nombreuses propriétés membranaires, il n'est pas nécessaire de prendre en compte explicitement tous les atomes.

Les modèles gros grains ont été appliqués à de nombreux systèmes : la formation de bicouches à

partir de lipides disposés aléatoirement (Shelley *et al.* , 2001), la formation de domaines induits par le cholestérol (Murtola *et al.* , 2004), l'insertion de peptides dans les membranes (Moore *et al.* , 2001) ou la déformation de peptides en réaction, par exemple, au mésappariement hydrophobe (Bond *et al.* , 2007).

Chapitre 2

Les Canaux mécanosensibles

La mécanosensibilité est la capacité à traduire un stress mécanique en information intégrable par la cellule. Une grande variété de protéines est douée de cette caractéristique et réagit à des phénomènes tels que le gradient de pression osmotique, le flux de liquides, les vibrations, la pression ou la réorganisation des exo- et endosquelettes. La mécanosensibilité est une fonction que possèdent tous les organismes pour lesquels le mécanisme semble inchangé.

2.1 Mise en évidence

2.1.1 Détection

L'existence de canaux mécanosensibles a été évoquée après l'observation d'un changement de perméabilité de la membrane en réponse à l'application d'une pression dans les cellules excitables comme les fibres musculaires (Katz, 1950), les corpuscules de Pacini (Oseki & M, 1965) et les cellules sensorielles audio-vestibulaires (Hudspeth, 1983). La réponse au stress mécanique étant instantanée, les chercheurs ont postulé qu'il n'existait pas de messenger secondaire dans l'activation de ces canaux (Corey & Hudspeth, 1979).

En 1984, l'implication de canaux ioniques dans la réponse à un stress mécanique est observée pour la première fois par *patch-clamp* sur des cellules musculaires d'embryon de poulet (Guharey & Sachs, 1984). Cette technique consiste à enregistrer, grâce à une micropipette, le courant à travers un canal unique soumis à différents stimuli (fig. 2.1).

Des canaux mécanosensibles ont aussi été mis en évidence dans des cellules eucaryotes spécialisées telles que les cellules endothéliales, les cellules neuronales, mais aussi dans des cellules non spécialisées telles que *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, les protoplastes du tabac, les cellules embryonnaires de poisson ou l'archaebactérie *Haloferax volcanii* (Sackin, 1995; Hamill & Martinac, 2001).

2.1.2 Identification moléculaire

Un grand nombre de canaux mécanosensibles (MS) a été mis en évidence et caractérisé par des études électrophysiologiques. Mais il est rare que les canaux responsables des activités soient identifiés. Les techniques généralement utilisées pour identifier les canaux sont la purification grâce à un ligand spécifique ou, à partir d'un phénotype connu, d'identifier une éventuelle mu-

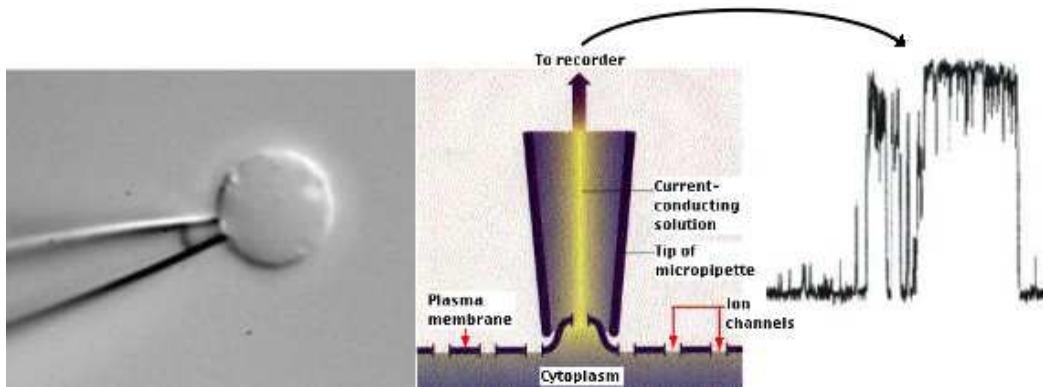


Fig. 2.1: Schéma représentant la technique de patch-clamp.

tation sur le canal ciblé. Dans le premier cas, il est rare de disposer de molécules agissant sur les canaux MS et on ne sait pas si elles agissent sur le canal lui-même ou sur son environnement. Dans le second cas, la fonction des canaux MS est hypothétique et les canaux sont actifs dans des conditions particulières, il est donc difficile de corrélérer un phénotype à l'absence d'un canal MS. Néanmoins, cette technique a pu être mise en œuvre dans le cas du canal MS potassique eucaryote TREK-1 (Fink *et al.*, 1996), du canal SI cationique chez le rat (Suzuki *et al.*, 1999) ou des canaux MscS (KefA et YggB) chez la bactérie (Levina *et al.*, 1999).

2.2 Variabilité

Les caractéristiques électrophysiologiques des canaux MS sont souvent les seules informations disponibles car rares sont ceux dont la séquence, la structure et/ou la fonction sont connues. Une classification fine de cette famille est donc impossible. Du point de vue de leur sélectivité, on distingue cinq types de canaux MS :

- Quatre types activés par un stress mécanique (SA ou *Stress Activated*) :
 - Les canaux SACat : perméables aux cations mono- et divalents, ils génèrent un courant calcique assez grand pour être observés en canal unitaire.
 - Les canaux SACm : perméables aux cations monovalents. On peut citer les canaux SAK sélectifs au potassium ou les SANa, sélectifs au sodium. Cette sous-famille est moins vaste que la première.
 - Les canaux SAan : perméables aux anions et généralement de grande conductance. Ils sont peu nombreux et souvent sujets à des régulateurs chimiques en plus de leur activation mécanique.
 - Les canaux SAns : non sélectifs, ils sont plus communs aux organismes unicellulaires comme la bactérie ou la levure.
- Les canaux SI (pour *Stress Inactivated*), inhibés par un stress mécanique. Peu fréquents par rapport aux canaux SA. Ils sont perméables aux ions K^+ et/ou Ca^{2+} . Leur activité peut aussi être modulée par des effecteurs chimiques.

2.3 Fonction des canaux mécanosensibles

La fonction des canaux MS est hypothétique, sauf dans le cas des canaux MS bactériens impliqués dans l'osmorégulation (cf chapitre 3). Ceci s'explique par plusieurs raisons :

- Peu de gènes codant pour des canaux MS ont été clonés.
- Lorsqu'ils le sont, l'inactivation de ces gènes conduit à la mort cellulaire, leur fonction ne peut donc pas être étudiée.
- Il n'existe pas d'inhibiteur spécifique des canaux MS.
- Il est parfois impossible de tester la mécanosensitivité *in vivo*, ce qui empêche la mise en évidence de la relation directe entre les canaux et la réponse au stimulus.

Toutefois, la fonction des différents canaux MS a pu être supposée à partir de leur localisation et de leur sélectivité. Quelques exemples peuvent être cités.

Les cellules de l'endothélium des vaisseaux sanguins subissent des contraintes de cisaillement générées par le flux sanguin. Le calcium entrant par les canaux MS pourrait entraîner la synthèse et la sécrétion de facteurs vasodilatateurs lorsque la pression et/ou le flux sanguin sont trop élevés (Lansman *et al.* , 1987). Dans les muscles lisses, le flux calcique MS pourrait provoquer la contraction musculaire (Kirber *et al.* , 1988). Le canal TREK-1 est impliqué dans la protection neuronale par efflux de potassium et donc hyperpolarisation (Maingret *et al.* , 1999). Certains canaux MS jouent aussi un rôle dans la proprioception (par exemple en traduisant les vibrations de soies chez la drosophile en signal électrique (Walker *et al.* , 2000)) ou dans le sens du toucher (Driscoll & Tavernarakis, 1997).

2.4 Modes d'activation

2.4.1 Sensibilité à la tension

Lorsque l'on applique une pression P sur la membrane, une tension T est générée. Les deux grandeurs sont liées par la *Loi de Laplace*, où r est le rayon de courbure de la membrane :

$$T = \frac{P \cdot r}{2} \quad (2.1)$$

L'hypothèse de sensibilité à la tension membranaire a été testée sur les canaux MS de *Saccharomyces cerevisiae* (Gustin *et al.* , 1988). Des sphéroplastes¹ géants de trois tailles différentes ont été générés et testés en *patch-clamp*. La pression, la surface et le rayon de chaque sphéroplaste ont été mesurés. Les courbes de probabilité d'ouverture en fonction de la pression sont dispersées selon la taille des sphéroplastes. D'une manière étonnante, les courbes se superposent lorsque la probabilité d'ouverture est exprimée en fonction de la tension (fig. 2.2). Ceci suggèrent que les canaux MS sont bien activés par la tension membranaire et non la pression.

Ces résultats ont été confirmés par Sokabe *et al.* (1991) à l'aide des clichés photographiques d'expériences de *patch-clamp*.

La question qui se pose alors est : "Comment la tension membranaire est-elle transmise aux

¹Cellule dans laquelle presque la totalité de la paroi cellulaire a été éliminée, généralement par traitement enzymatique. Elle acquiert alors une forme ronde.

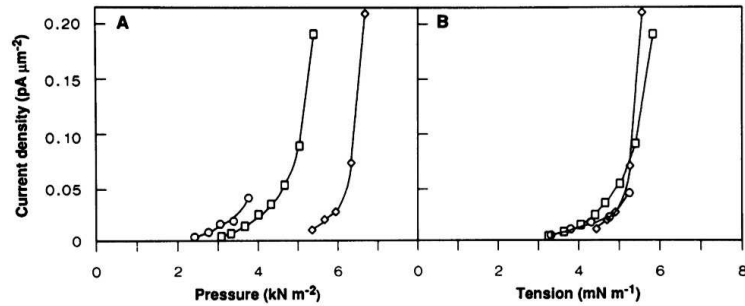


Fig. 2.2: Probabilité d’ouverture des canaux MS en fonction de la pression et de la tension (Extrait de Gustin *et al.* (1988)).

canaux MS ?” Dans le cas des canaux MS bactériens, en particulier le canal MscL, seule la bicouche lipidique suffit puisque leur activité est retrouvée après reconstruction dans des liposomes. Par contre, la présence d’endo- et d’exosquelette n’est peut-être pas anodine dans le cas des canaux MS comme ceux des muscles squelettiques. Deux hypothèses non exclusives ont donc été proposées : le “modèle direct” et le modèle des “molécules d’attache” (fig. 2.3).

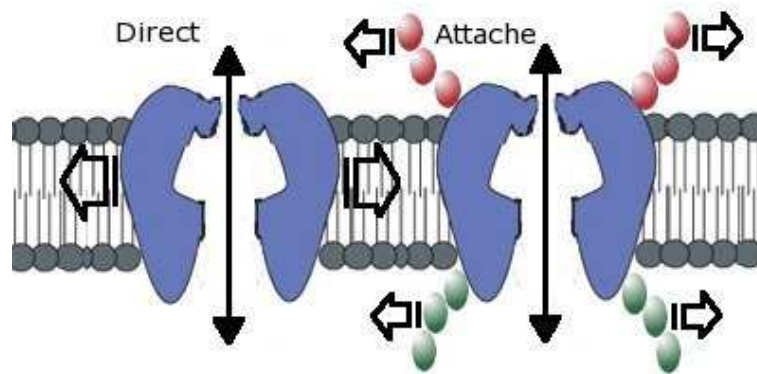


Fig. 2.3: Deux modèles possibles d’activation des canaux MS.

Dans le premier modèle, le système est restreint au canal et à la bicouche qui l’entoure. Le stress mécanique modifie les interactions entre les lipides et la protéine, ce qui entraîne des changements conformationnels ayant pour effet l’activation ou l’inactivation du canal. Ce modèle a été vérifié pour plusieurs canaux bactériens et d’archaébactéries.

Dans le second modèle, le système est plus complexe et contient les lipides, la protéine et des éléments tels que le cyto- ou l’exosquelette. Les cellules ciliées audiovestibulaires illustrent ce mode d’activation. Le stress mécanique modifie les interactions entre molécules d’attache et canal, entraînant des changements conformationnels qui activent ou inhibent le canal.

2.4.2 Comment s’effectue la transmission de la tension ?

L’ouverture des canaux mécanosensibles est initiée par la tension issue d’une déformation membranaire (par exemple, suite à un gonflement de la cellule). Afin de comprendre comment la tension était perçue par les canaux mécanosensibles, Perozo *et al.* (2002b) ont testé deux mécanismes comme déclencheur de l’ouverture de ces canaux : le coût énergétique d’un mésappariement hydrophobe entre protéine et bicouche lipidique et les conséquences géométriques

d'une courbure intrinsèque de la membrane (fig. 2.4). Les changements conformationnels induits sur le canal mécanosensible bactérien de large conductance (MscL) ont été évalués. Il apparaît qu'une courbure membranaire induite par des lysodérivés permet de capturer le canal dans une conformation totalement ouverte. Le mésappariement hydrophobe ne permet pas à lui seul d'ouvrir le canal mais une diminution de l'épaisseur membranaire diminue la barrière énergétique d'activation, stabilisant un intermédiaire structurellement distinct. Ils ont alors postulé que le mécanisme de mécanotransduction des canaux MS était défini par une asymétrie de la membrane à l'interface protéine-lipides.

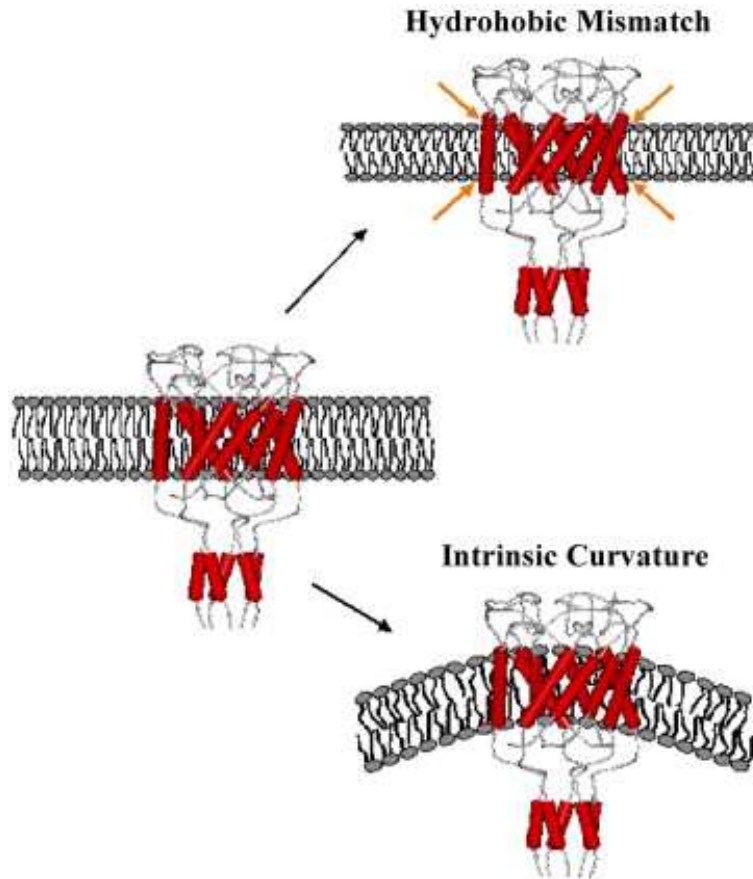


Fig. 2.4: Deux mécanismes possibles d'activation des canaux MS par déformation de la membrane (Extrait de Martinac (2005)).

Chapitre 3

Les canaux mécanosensibles bactériens

Les canaux MS de la bactérie *Escherichia coli* sont, à l'exception des porines, les premiers canaux ioniques bactériens étudiés. Ils jouent un rôle important dans l'osmorégulation et sont les seuls canaux MS dont la fonction a été clairement démontrée. Les canaux MS de *E. coli* sont les plus étudiés. Cet organisme fait aussi l'objet d'études génétiques et physiologiques approfondies. Son système mécanosenseur est donc le représentant de la classe des MS bactériens et constitue un modèle d'étude de la mécanosensibilité.

3.1 Mise en évidence et localisation

3.1.1 Mise en évidence

La taille des bactéries rend impossible l'étude en *patch-clamp in vivo* puisque la micropipette mesure $1\mu\text{m}$ de diamètre et que *E. coli* fait $2\mu\text{m}$ de long sur $1\mu\text{m}$ de diamètre (fig. 3.1.a). De plus, les bactéries gram négatif, auxquelles appartient *E. coli*, sont constituées de deux membranes et leur enveloppe est très complexe (fig. 3.1.b), ce qui rend la tâche d'autant plus difficile¹.

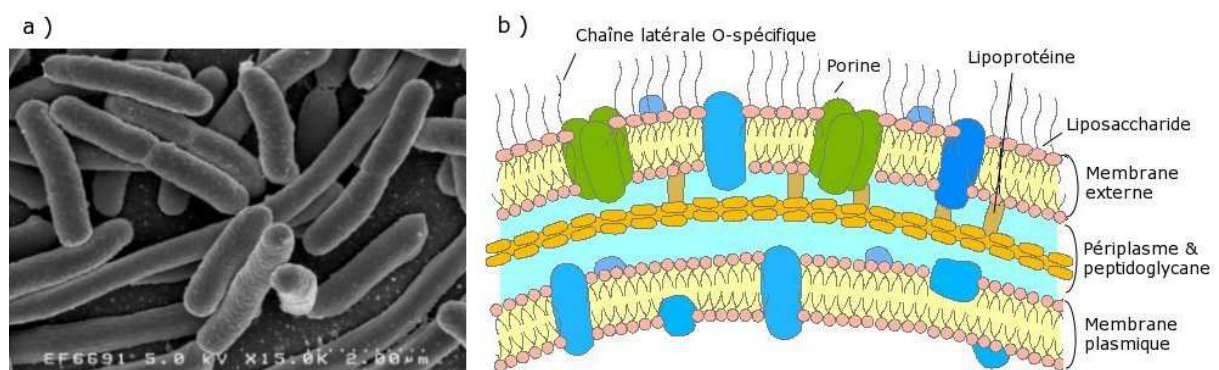


Fig. 3.1: Caractéristiques de *E. coli*. a) La bactérie vue au microscope électronique. b) Enveloppe des bactéries gram négatif.

Martinac *et al.* (1987) ont utilisé une approche intéressante pour contourner ce problème. Grâce à un traitement alliant antibiotiques pour rendre les bactéries filamenteuses, détergents

¹Les bactéries gram+ sont dépourvues d'enveloppe externe et ne sont donc entourées que d'une seule membrane

qui déstabilisent la membrane externe et lysozyme qui digère le peptidoglycane, ils ont réussi à construire des sphéroblastes géants (de 5 à 10 μm de diamètre) viables. L'étude en patch clamp de ces cellules a permis de mettre en évidence un premier canal MS faiblement anionique dont l'activité est augmentée par une dépression dans la pipette.

3.1.2 Localisation

Les auteurs ayant mis les canaux MS bactériens en évidence avaient supposé, sur la base de leurs propriétés électrophysiologiques proches de celles des porines, qu'ils se situaient dans la membrane externe (Martinac *et al.*, 1987). Ils ont par la suite confirmé cette hypothèse sur des sphéroblastes dont ni la membrane externe ni le peptidoglycane n'étaient altérés. Il semblait alors impossible que la membrane interne soit accessible (Buechner *et al.*, 1990).

Cependant, des canaux MS semblables ont été mis en évidence dans les protoplastes² de *Streptomyces faecalis*, une bactérie gram+, c'est à dire sans membrane externe, ce qui suggèrerait que les canaux MS se situent en fait dans la membrane interne.

Berrier *et al.* (1989) ont isolé les membranes externe et interne puis purifié chaque fraction membranaire. Chaque fraction a été fusionnée avec des liposomes et testée en *patch-clamp*. Des canaux MS de conductance variable ont été détectés essentiellement dans les fractions issues de la membrane interne. Ils ont par la suite confirmé leurs observations en mettant en évidence les activités MS dans des protoplastes obtenus par destruction de la membrane externe de sphéroblastes (Berrier *et al.*, 1996; Cui *et al.*, 1995). Finalement, le clonage du gène *mscL* (Sukharev *et al.*, 1994), la génération d'anti-corps et le marquage radio-actif du canal MscL (Hase *et al.*, 1997), ont permis de confirmer que les canaux MS se situaient bien dans la membrane interne des bactéries gram-.

3.2 Rôle des canaux mécanosensibles bactériens

Les bactéries subissent régulièrement des mouvements et des variations de milieu. Les changements brusques d'environnement extérieur mettent en danger leur survie. Ne pouvant fuir par chimiotactisme lors de ces variations brusques, elles n'ont d'autres solutions que de s'adapter. Les bactéries disposent pour cela d'un mécanisme interne d'osmorégulation (Csonka & Hanson, 1991) dans lequel sont impliqués les canaux MS.

En effet, lors d'un choc hypo-osmotique, c'est à dire lorsque la concentration du milieu externe est inférieure à celle de la cellule, l'eau entre dans la cellule, la pression et le volume augmentent dans la cellule entraînant une forte tension membranaire. Si des mesures ne sont pas prises, de telles forces peuvent conduire à la rupture de la membrane. Pour prévenir ce phénomène, les canaux MS agissent comme de véritables soupapes de sécurité permettant à l'eau et aux solutés de sortir du milieu interne et donc de restaurer l'équilibre.

²les protoplastes et sphéropastes sont des bactéries devenues ronds par digestion de la paroi. Les protoplastes ne possèdent qu'une membrane, les sphéropastes plusieurs.

3.3 Trois types de canaux mécanosensibles bactériens

Différents types de canaux MS ont été observés dans la membrane de *E.coli* (Berrier *et al.* , 1989, 1996; Oakley *et al.* , 1999). Selon leur conductance, trois types de canaux ont pu être identifiés (Sukharev *et al.* , 1994; Levina *et al.* , 1999). Les propriétés sont récapitulées dans le tableau 3.1 et seront développées dans la suite du paragraphe :

- les MscM (*Mechanosensitive channel with Mini conductance*),
- les MscS (*Mechanosensitive channel with Small conductance*),
- les MscL (*Mechanosensitive channel with Large conductance*).

famille	MscM	MscS	MscL
cinétique	lente	intermédiaire	rapide
conductance	0,1-0,4 nS	1 nS	3,5 nS
sélectivité	faiblement anionique	faiblement cationique	non sélectif
gènes	inconnu	<i>yggB</i> , <i>kefA</i>	<i>mscL</i>

Tab. 3.1: Les trois familles de canaux MS bactériens.

3.3.1 Propriétés physiologiques

Fonctionnellement, ces trois types de canaux (MscM, MscS et MscL) semblent faire partie d'une réponse graduée à des chocs osmotiques de différentes amplitudes. Ils agissent de manière complémentaire. En effet, une relation existe entre niveau de conductance et seuil de sensibilité mécanique (Berrier *et al.* , 1996) les MscM s'ouvrent en premier à faible tension, suivi par les MscS puis les MscL (fig. 3.2).

Le MscL est caractérisé par une conductance très élevée et un seuil d'activation proche de la limite lytique des membranes biologiques.

Le MscS est le produit de deux gènes distincts : i) *yggB* qui correspond au MscS à proprement parler et qui semble, au contraire du MscL, aussi voltage-dépendant (Martinac *et al.* , 1987; Sukharev *et al.* , 1997) ; ii) *kefA* dont le canal est connu sous le nom de MscK à cause des ions potassium qui régulent son activité. Ces deux canaux (MscS et MscK) ont la même conductance et le même seuil d'activation. Les canaux MscS sont responsables de la majorité de l'activité MscS, l'ouverture des canaux MscK étant très rare (elle ne nécessite pas seulement une tension membranaire mais aussi une concentration en ions potassium élevée) (Li *et al.* , 2002).

L'activité du MscM est caractérisée par une faible conductance mais son identité moléculaire n'a pas été déterminée.

Les canaux MscS et MscL jouent un rôle physiologique évident dans l'osmorégulation chez les procaryotes. En effet, des cellules dépourvues de ces deux canaux meurent lors d'un choc hypo-osmotique alors qu'elles deviennent résistantes lorsqu'on rétablit l'expression du MscL (Levina *et al.* , 1999; Nakamaru *et al.* , 1999).

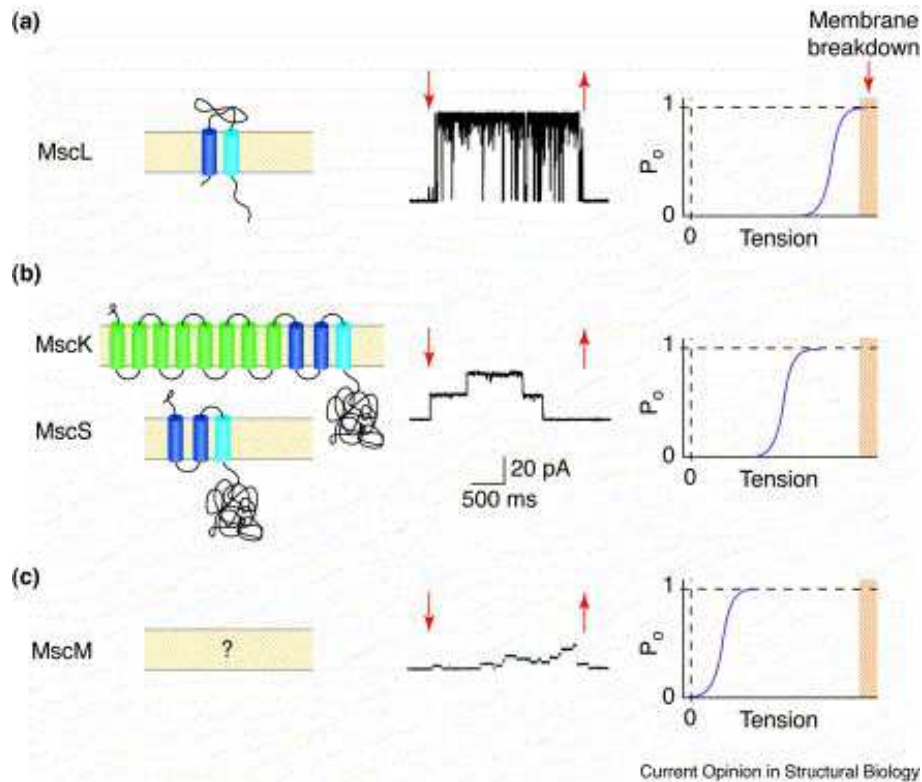


Fig. 3.2: Diversité structurelle et fonctionnelle des canaux MS bactériens. Chaque section illustre la topologie (à gauche), l'activité d'un canal unique (au milieu) et le niveau d'activation (à droite) (Extrait de Perozo & Rees (2003)).

3.3.2 Propriétés structurales

Les structures cristallographiques des canaux MscL de *Mycobacterium tuberculosis* dans l'état fermé et MscS de *Escherichia coli* dans l'état ouvert ont initialement été déterminées en 1998 et en 2002 (Chang *et al.*, 1998; Bass *et al.*, 2002) mais des améliorations ont été récemment apportées aux deux structures (Steinbacher *et al.*, 2007). Seules les nouvelles structures, résolues à 3,5 et 3,7 Å respectivement, seront donc décrites ici.

Les MscL et MscS sont présents respectivement sous forme de penta- et d'heptamères, le pore entourant l'axe de symétrie rotationnelle au centre de chacun des canaux (fig. 3.3). Bien qu'ils partagent une organisation divisée en domaines transmembranaires et cytoplasmiques, leurs repliements polypeptidiques sont bien distincts, indiquant qu'ils ne partagent pas d'ancêtre évolutif commun.

Chaque sous-unité du MscL présente une topologie simple composée de deux hélices transmembranaires (TM1 et TM2) et d'un domaine cytoplasmique (fig. 3.3). Dans l'ordre séquentiel, les douze premiers résidus (Nterminaux) adoptent un repliement en hélice α qui se positionne très probablement sur la surface cytoplasmique de la membrane. Il est à noter que le positionnement de cette région, non résolue dans la première structure cristallographique, va à l'encontre des hypothèses de rôle et de placement formulées auparavant (Sukharev *et al.*, 2001a). L'hélice TM1 borde le pore. Elle est reliée à la TM2 par une boucle périplasmique proche de deux brins

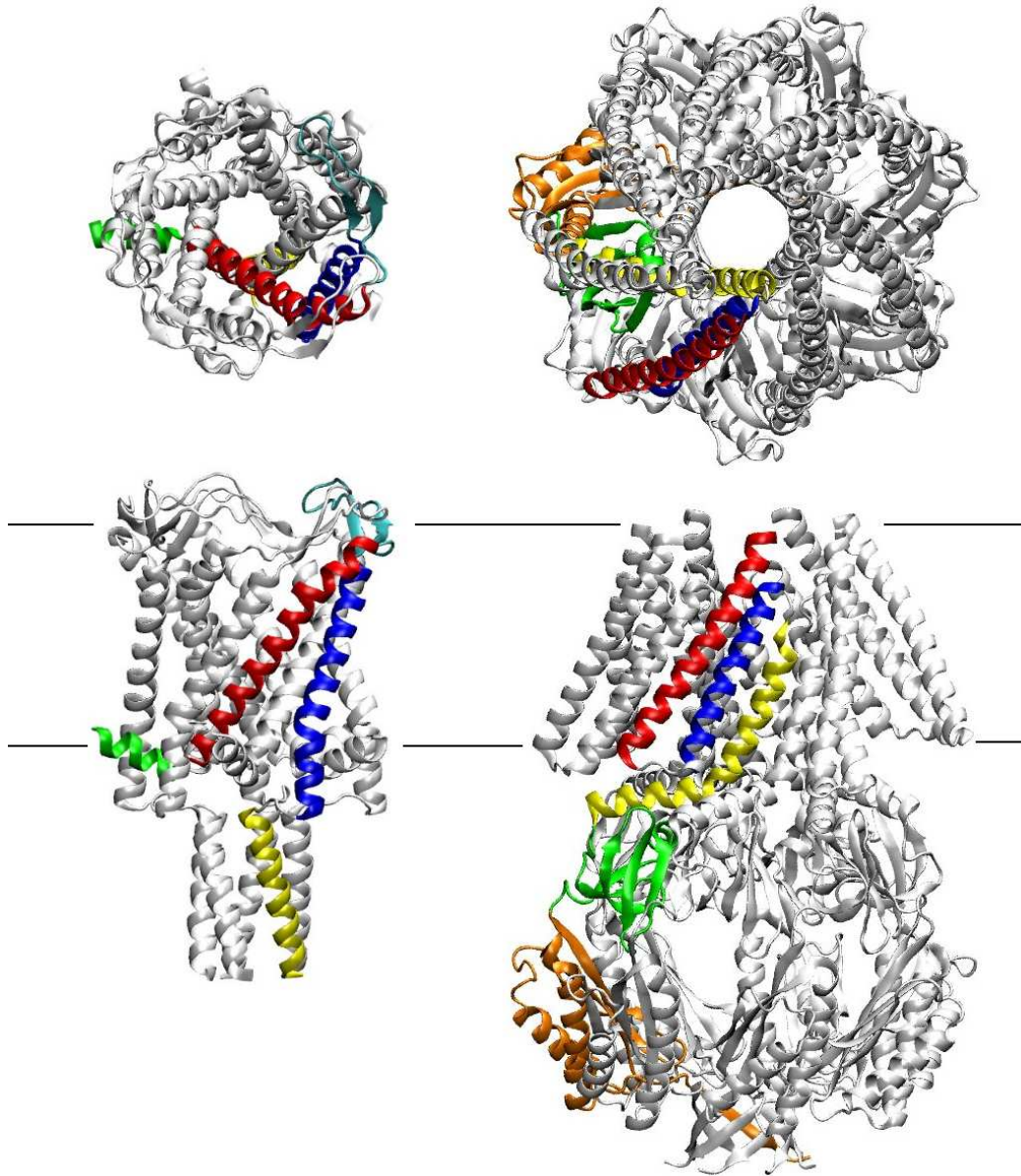


Fig. 3.3: Structure des canaux MscL (gauche) et MscS (droite). En haut, vue du dessus (côté périplasmique). En bas, vue de côté. La représentation est de type cartoon. Le placement de la membrane est indiqué sur les vues de côté. La coloration est faite par région sur un monomère. MscL : en vert, hélice Nterminale, en rouge la TM1, en bleu la TM2 et en jaune l'hélice Cterminale. MscS : en rouge la TM1, en bleu la TM2, en jaune la TM3, en vert le domaine β -milieu et en orange le domaine Cterminal.

β antiparallèles. L'hélice TM2, au contact des lipides, retransverse la membrane vers le cytoplasme où les hélices Cterminales s'arrangent en faisceau.

Bien que l'arrangement du domaine transmembranaire du MscS soit aussi relativement simple, le repliement du domaine Cterminal est beaucoup plus complexe que celui du MscL (fig. 3.3).

Chaque sous-unité est composée de trois hélices transmembranaires. Contrairement au MscL, l'extrémité Nterminale est périplasmique. Les hélices TM1 sont en contact avec les lipides, les TM3 forment le pore. L'hélice TM3 est connectée au domaine cytoplasmique qui renferme en son centre une cavité de plus de 40 Å de diamètre, connectée au cytoplasme par plusieurs ouvertures. Cette cavité est formée de deux domaines de chaque sous-unité, appelées β -milieu et Cterminal. Le domaine β -milieu est organisé en feuillet β connecté à celui des sous-unités adjacentes pour former une structure en feuillet β étendue tout autour de la protéine. Cette organisation est similaire à celle de la protéine Sm impliquée dans le traitement des ARNm (Mura *et al.*, 2003). Le domaine Cterminal est constitué de brin β et d'hélices α organisés de la même manière que les ferredoxines selon la classification SCOP (Murzin *et al.*, 1995). L'assemblage heptamérique complet est connecté en Cterminal par un β -barrel à sept brins contenant un brin de chaque sous-unité.

Chapitre 4

Le canal MscL : de la séquence à la fonction

Le canal mécanosensible bactérien de grande conductance (MscL) joue un rôle prépondérant dans la régulation osmotique et agit comme une véritable soupape de sécurité préservant la cellule de la lyse lors de chocs hypo-osmotiques. C'est le premier canal mécanosensible cloné (Sukharev *et al.*, 1994) et le premier dont la structure a été résolue (Chang *et al.*, 1998). Sa séquence polypeptidique ne présentait aucune homologie avec une protéine dont la structure était connue (Sukharev *et al.*, 1994). L'intérêt qu'il a suscité a permis de collecter de nombreuses données expérimentales sur sa localisation, son mode d'action et sa cinétique. Sa localisation dans la membrane et les données accumulées semblent en faire un modèle d'étude idéal de la mécanotransduction à travers les bicouches lipidiques. Comprendre les forces et mécanismes moléculaires gouvernant les interactions entre bicouche lipidique et canal pourrait aider à comprendre et à construire un modèle général pour les protéines activées par stimulus mécanique.

4.1 Identification et représentation

Le MscL a d'abord été observé chez *E. coli* par Berrier *et al.* (1989). Ils ont isolé les membranes interne et externe, les ont fusionnées avec des liposomes et les ont étudiées par patch-clamp. Des canaux MS d'exceptionnellement grande conductance ont été détectés, essentiellement dans les structures dérivant de la membrane interne. Cette localisation dans la membrane interne a ensuite été confirmée par l'utilisation d'anti-corps anti-MscL (Blount *et al.*, 1996b).

Sukharev *et al.* (1993) ont montré que l'activation de la réponse à un stimulus mécanique du MscL ne nécessitait pas d'intermédiaire. Le MscL, après extraction de sa membrane par l'action de détergents et reconstitution dans des liposomes, conserve son activité. Le MscL est donc fonctionnel dans un système simple composé uniquement du canal lui-même, de lipides et d'eau. Aucune autre molécule n'est nécessaire. De plus, il est résistant aux détergents, ce qui a permis sa purification et son clonage (Sukharev *et al.*, 1994). Une seule espèce moléculaire a été identifiée. Il s'agit donc d'un homo-multimère. Le séquençage de cette molécule et la génération de primers a permis l'identification du gène *mscL* dans la banque génomique de *E. coli*. Il a alors été

montré que le gène *mscL* est nécessaire et suffisant pour l'activité MscL (Sukharev *et al.*, 1994). Lorsque le *mscL* chromosomique est inactivé, l'activité MscL est perdue. La réintroduction de ce gène par plasmide permet de restaurer une activité MscL comparable à celle de la souche sauvage.

Seules des données phylogénétiques limitées ont été publiées sur la famille du canal MscL (Saier *et al.*, 1999). Actuellement, plusieurs homologues du MscL existent à travers divers microorganismes. Les membres séquencés de la famille du MscL proviennent de bactéries, d'archaebactéries et d'un champignon. Une liste non exhaustive des organismes est présentée dans le tableau 4.1 et leur phylogénie dans la figure 4.1.

Abbrev.	Organisme	Taille	Abbrev.	Organisme	Taille
	Gram négative			Gram positive	
Aac	<i>Acetobacter aceti</i>	153	Bsu	<i>Bacillus subtilis</i>	130
Bha	<i>Bartonella henselae</i>	137	Blo	<i>Bifidobacterium longum</i>	168
Bba	<i>Ddellovibrio bacteriovorus</i>	144	Chi	<i>Clostridium histolyticum</i>	133
Bpe	<i>Bordetella pertussis</i>	152	Cgl	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	135
Bja	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	157	Dra	<i>Deinococcus radiodurans</i>	128
Bme	<i>Brucella militensis</i>	138	9to	<i>Frankia sp.</i>	222
Bma	<i>Burkholderia mallei</i>	143	Gka	<i>Geobacillus kaustophilus</i>	131
Ccr	<i>Caulobacter crescentus</i>	139	Lxx	<i>Leifsonia xyli</i>	145
Eca	<i>Erwinia carotovora</i>	137	Lmo	<i>Listeria monocytogenes</i>	128
Eli	<i>Escherichia coli</i>	136	Mle	<i>Mycobacterium leprae</i>	154
Fnn	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	142	Mtu	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	151
Gsl	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	143	Mga	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	223
Gox	<i>Gluconobacter oxydans</i>	181	Mmo	<i>Mycoplasma mobile</i>	151
Hin	<i>Haemophilus influenzae</i>	128	Nfa	<i>Nocardia farcinica</i>	135
Msm	<i>Mannheimia succiniciproducens</i>	138	Oih	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	130
Nha	<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	139	Pac	<i>Propionibacterium acnes</i>	122
Pmu	<i>Pasteurella mutocida</i>	133	Sau	<i>Staphylococcus aureus</i>	120
9lt	<i>Pelobacter propionicus</i>	145	Sco	<i>Streptomyces coelicolor</i>	156
Pae	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	137	Tt8	<i>Thermus thermophilus</i>	124
Par	<i>Psychrobacter arcticum</i>	145		Chlorobi	
Rso	<i>Ralstonia solanacearum</i>	141	Cte	<i>Chlorobium tepidum</i>	151
Ro1	<i>Rhizobium loti</i>	157		Bacteroidetes	
Ro2	<i>Rhizobium loti</i>	144	Bfn	<i>Bacteroides fragilis</i>	146
Ro3	<i>Rhizobium loti</i>	140	Pgi	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	139
Ro4	<i>Rhizobium loti</i>	87		Archaebactéries	
Rme	<i>Rhizobium meliloti</i>	142	Mac	<i>Methanosarcina acetivorans</i>	101
Sty	<i>Salmonella typhimurium</i>	137	Mhj	<i>Methanospirillum hungatei</i>	108
Sjb	<i>Synechococcus sp.</i>	132		Fungi	
Sy3	<i>Synechocystis sp.</i>	145	Ncr	<i>Neurospora crassa</i>	373
Vch	<i>Vibro cholerae</i>	136			
Xac	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	143			
Xfa	<i>Xylella fastidiosa</i>	134			
Yps	<i>Yersina pseudotuberculosis</i>	137			

Tab. 4.1: Liste représentative de protéines MscL séquencées.

Comme attendu, les protéines des archaebactéries et des champignons sont les membres les plus divergents de la famille, aussi bien en taille qu'en séquence. Toutefois, le MscL fongique possède 33 % d'identité et 56 % de similarité avec celui de la bactérie *Clostridium perfringens* et celui de l'archaebactérie *Methanospirillum hungatei* a 40 % d'identité et 60 % de similarité avec celui de *Lactococcus lactis* (matrice de substitution BLOSSUM 62 (Henikoff & Henikoff, 1993)). Le MscL est présent en copie unique dans de nombreuses bactéries. *Rhizobium loti* est la seule bactérie à posséder plusieurs paralogues du canal (Pivetti *et al.*, 2003).

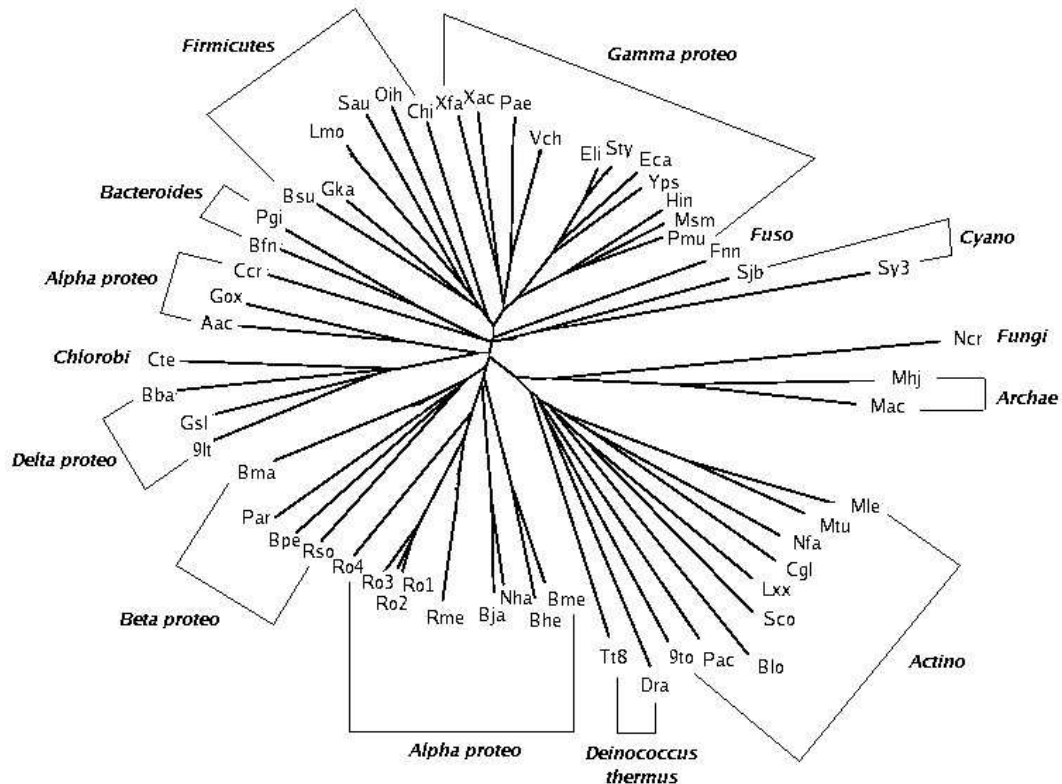


Fig. 4.1: Arbre phylogénétique des homologues du MscL. Les abréviations sont indiquées dans le tableau 4.1. ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) a été utilisé pour générer l'alignement multiple sur lequel est basé l'arbre.

L'activité de 8 homologues du MscL (4 gram-, 3 gram+ et 1 cyanobactérie) a été testée (Moe *et al.*, 1998). Cette étude a montré que les homologues du MscL étaient tous mécanosensibles et que leurs conductance, sensibilité et cinétique étaient similaires. La fonction de ces canaux doit donc être conservée d'un organisme à l'autre.

4.2 Propriétés de conductance

Le canal MscL a une conductance extrêmement élevée ($3,6nS$ dans $200mM$ de KCl et $40mM$ de $MgCl_2$) et est non-sélectif.

L'analyse cinétique et thermodynamique du canal MscL dans des liposomes a donné des informations importantes sur les transitions d'ouverture du canal. Sukharev *et al.* (1999) ont identifié trois conductances intermédiaires, impliquant trois sous-états putatifs, dépendants des forces appliquées, entre l'état fermé et l'état complètement ouvert. Plus récemment, les auteurs ont suggéré qu'il y aurait en fait 4 états intermédiaires et un état alternatif de l'état ouvert (Chiang *et al.*, 2004). Les états de sous-conductance sont de 22%, 45%, 70% et 93% relativement à la conductance du canal totalement ouvert (fig.4.2). Il s'agit d'intermédiaires le long du chemin d'ouverture du canal. La forme alternative à l'état ouvert présente une cinétique différente et ne serait pas un intermédiaire le long du chemin d'ouverture mais un état final en lui-même. Sa conductance est de 78% relativement à l'état complètement ouvert.

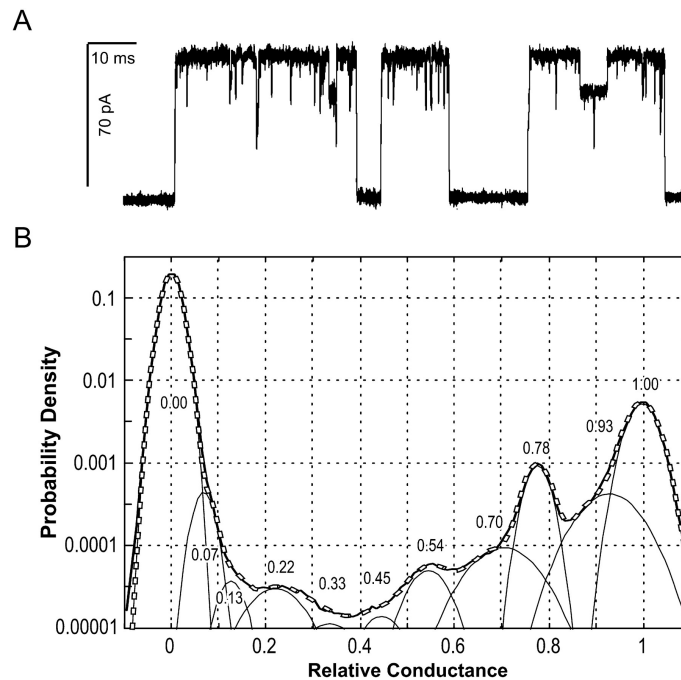


Fig. 4.2: Conductance représentative d'un canal MscL unique. A) Fragment de 150 ms d'un enregistrement de 5 min *in situ*. La ligne du bas correspond au canal fermé, celle du haut au canal ouvert, les pics internes aux intermédiaires de conductance. B) Histogramme d'amplitude sur les 5 min d'enregistrement. Les pics numérotés montrent les états de sous-conductance relative au canal totalement ouvert. (Extrait de Chiang *et al.* (2004))

4.3 La structure du MscL

4.3.1 Vers sa structure

Depuis 1996, on sait que le canal MscL possède deux hélices transmembranaires (TM1 et TM2) reliées par une boucle périplasmique et des extrémités C- et Nterminales cytoplasmiques (fig. 4.3) (Blount *et al.*, 1996a) mais la question du nombre de sous-unités reste ouverte. Certaines expériences de cross-linking, de fusion de deux sous-unités (Blount *et al.*, 1996a), de cristallisation 2D (Saint *et al.*, 1998) suggèrent une structure hexamérique. Cette hypothèse est supportée par l'estimation de la taille du pore en fonction de la conductance du canal (Cruickshank *et al.*, 1997). D'autres expériences vont à l'encontre de cette hypothèse sans pour autant indiquer le nombre de sous-unités formant le complexe (Hase *et al.*, 1997). Enfin, l'extraction et migration du canal natif suggèrent une organisation pentamérique (Sukharev, 1999).

La résolution de la structure cristallographique du canal de *M. tuberculosis* a permis de répondre à cette question et de déterminer que cinq monomères constituaient le canal (Chang *et al.*, 1998).

4.3.2 Les structures cristallographiques

La première structure d'un canal mécanosensible

La structure du canal MscL de *M. tuberculosis* (Chang *et al.*, 1998) représentée sur la figure 4.4 est la première structure cristallographique obtenue d'un canal mécanosensible. Elle a été résolue à 3,5 Å dans l'état fermé. Le canal MscL de *M. tuberculosis* est un homopentamère. Sa

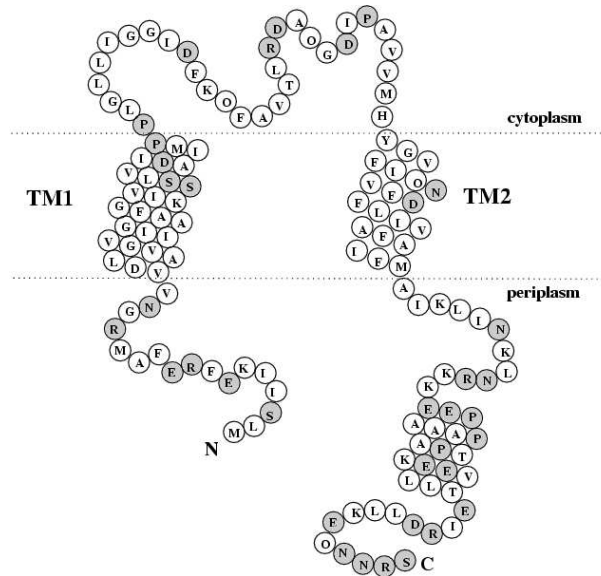


Fig. 4.3: Topologie du canal MscL.

hauteur globale est de 85 Å et son diamètre de 50 Å. Chaque monomère est constitué de 151 acides aminés et la structure a été déterminée pour les résidus 10 à 118. Les cinq sous-unités sont arrangées autour d'un pore central. Le domaine Nterminal n'a pas été résolu. Le domaine Cterminal est replié en hélice α dont l'assemblage entre les monomères forme un faisceau d'hélices de 18 Å de diamètre dans le prolongement de l'axe du pore. La région transmembranaire a une hauteur de 50 Å et est définie pour chaque monomère par deux hélices transmembranaires reliées par une large boucle périplasmique : l'hélice TM1 forme la couronne interne et définit le pore et l'hélice TM2 forme la couronne externe au contact des lipides. L'hélice TM1 est inclinée de 37° par rapport à l'axe du pore, l'hélice TM2 de 28°. Il n'y a pas de contact entre TM2 adjacentes mais les hélices TM1 d'une sous-unité sont intercalées entre les hélices TM1 et TM2 de la sous-unité voisine. Le diamètre interne du pore varie de 18 Å du côté périplasmique à 2 Å dans la région de constriction autour de Val21 du côté cytoplasmique.

Du fait des conditions expérimentales durant la fabrication des cristaux (pH acide, utilisation de détergent, structure hors membrane, etc) et de l'absence de détermination de la structure de certains résidus, notamment le domaine Nterminal, plusieurs points concernant cette structure ont été discutés.

La structure cristallographique révèle un domaine Cterminal formant un faisceau pentamérique. En raison du pH acide, les hélices α ont une orientation non usuelle dans laquelle les résidus hydrophobes sont à l'extérieur tandis que les résidus chargés sont à l'intérieur du faisceau. Anishkin *et al.* (2003) ont proposé un modèle de la région Cterminale de *E. coli* basée sur la protéine pentamérique COMP (fig. 4.5). Cette conformation satisfait mieux les critères d'hydrophobicité, avec les résidus aliphatiques à l'intérieur du faisceau. La stabilité de cette conformation est plus importante, ce qui est confirmé par des simulations de dynamique moléculaire du canal entier (Bilston & Mylvaganam, 2002) ou de la région Cterminale seule (Elmore & Dougherty, 2001).

La structure du domaine Nterminal n'a pas été résolue dans la structure cristallographique.

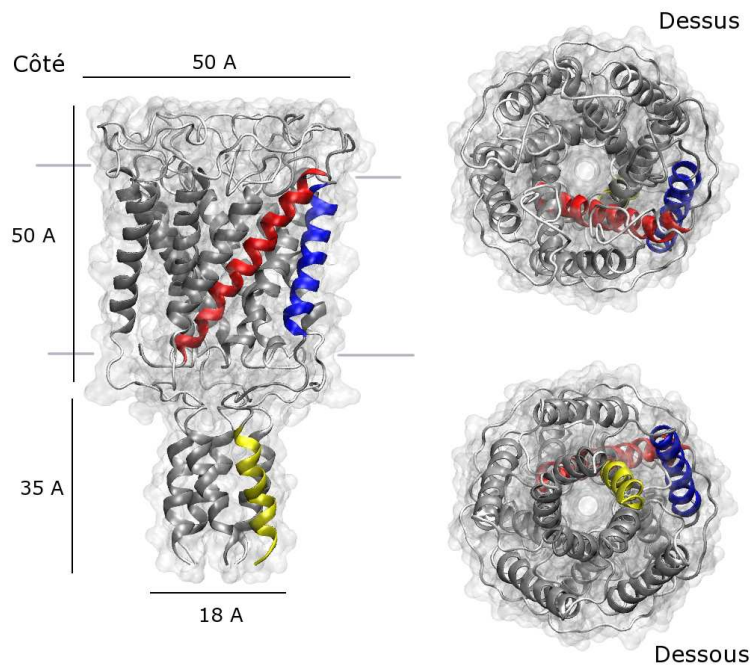


Fig. 4.4: Première structure du MscL de *M. tuberculosis*. La représentation est de type cartoon. Sur un monomère, l'hélice TM1 est colorée en rouge, la TM2 en bleu et l'hélice Cterminale en jaune. La surface est superposée en transparence.

Cette région est très conservée mais très peu sensible aux mutations, délétions ou insertions. D'après Sukharev *et al.* (2001a), elle se replierait en hélice α et formerait un faisceau dans le prolongement du pore et agirait comme une seconde barrière pour l'ouverture du pore (la première barrière étant la zone de constriction hydrophobe autour de V21). Ce postulat est basé sur le fait que cette zone est prédite en hélice amphipathique par les méthodes de prédiction bioinformatique et qu'une deuxième barrière, non présente dans la structure cristallographique, est nécessaire pour expliquer la cinétique d'ouverture. Elle est appuyée par des expériences de mutagenèse sur le MscL de *E. coli* (Anishkin *et al.*, 2005).

Un autre point de discussion porte sur la longueur des hélices transmembranaires, beaucoup plus longues dans le modèle du MscL de *E. coli* proposé par Sukharev *et al.* (2001b) et basé sur des critères comme la prédiction de structures secondaires, la formation de pont salin entre

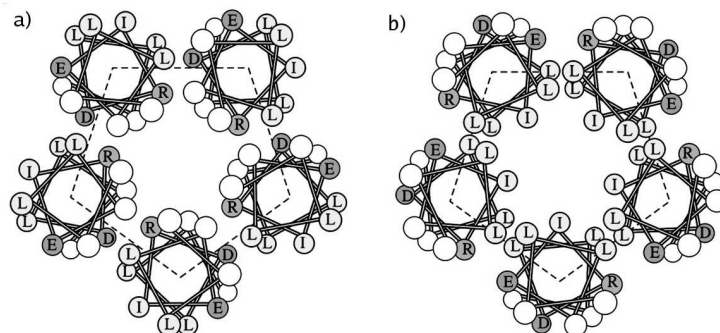


Fig. 4.5: Représentation schématique du faisceau Cterminal. a) Dans la structure cristallographique, b) Dans le modèle construit d'après COMP.

résidus chargés ou la formation de liaisons hydrogènes pour former des structures secondaires pour les segments en contact avec les chaînes des lipides ou l'interaction entre résidus conservés.

Une nouvelle structure plus détaillée

Il y a quelques mois, une nouvelle structure a été obtenue, à partir des mêmes données cristallographiques (Steinbacher *et al.*, 2007). La carte de densité a été clarifiée par l'utilisation d'une symétrie non-cristallographique d'ordre 5 et l'élimination du bruit créé par le solvant. La description de cette structure est donnée dans la section 3.3.2. Bien qu'étant très proche de la première structure, elle présente des différences notables (fig. 4.6). La structure du domaine Nterminal a été résolue. Il s'agit, comme l'avait prédit Sukharev *et al.* (2001a) d'une hélice amphipathique mais positionnée à l'interface entre membrane et cytoplasme. Toutefois, ce placement pourrait, comme l'orientation du faisceau Cterminal, être lié aux conditions cristallographiques (au pH acide par exemple). Les hélices transmembranaires sont plus longues mais leur orientation reste semblable. Enfin, la boucle périplasmique contient deux brins β anti-parallèles et 6 résidus du faisceau Cterminal ont été remplacés.

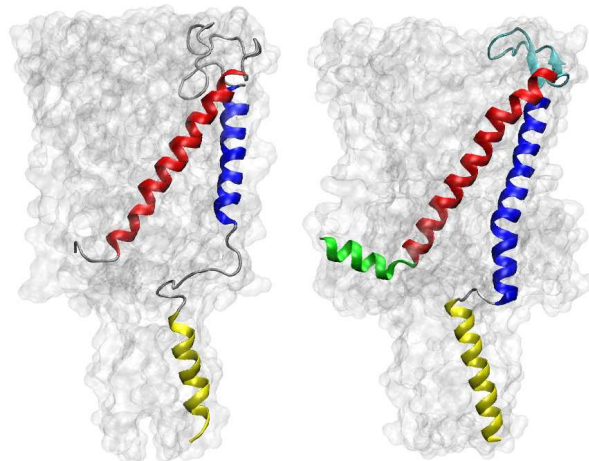


Fig. 4.6: Comparaison d'un monomère des deux structures cristallographiques du MscL de *M. tuberculosis*. Sur la figure de gauche, la première structure obtenue, sur celle de droite la nouvelle. L'hélice Nterminale est représentée en vert, l'hélice TM1 en rouge, l'hélice TM2 en bleu et l'hélice Cterminale en jaune. La surface de la protéine est ajoutée en transparence.

4.3.3 Les modèles

Bien que la structure du MscL ait été obtenue pour *M. tuberculosis*, la plupart des expériences ont été menées sur le canal de *E. coli*. Pour mieux corrélérer les données expérimentales et structurales, deux modèles ont été proposés pour la structure du MscL de *E. coli* : le premier, proposé par Sukharev *et al.* (2001a), est basé sur des critères de prédiction de structure secondaire et de contraintes de liaisons entre résidus chargés et/ ou conservés ; le second, proposé au sein du laboratoire par Valadié *et al.* (2003), a été construit par modélisation par homologie (l'alignement utilisé est présenté en figure 4.7). La figure 4.8 présente ces modèles, les structures cristallographiques étant données pour une meilleure comparaison.

TbMscL	10	ARGNIVDLAVAVVIGTAFTALVTKFTDSIITPLINRI--GVNAQSDVGILRIGIGGGQTI	67
		:**:*:**:* :*:*** :*: * :*: :*: :*: :*: :*	
EcoMscL	13	-RGNVVDLAVGVIIIGAAFVKIVSSLVADIIMPPLGLLIGGIDFKQFAVTLRDAQGDIPAV	71
TbMscL	68	DL--NVLLSAAINFFLIAFAVYFLVVLPLYNTLRKKGE-VEQPGDT-QVLLTEIR	118
		: :*:*** :*:**:*:*****: :* :*** * :*: * :*****	
EcoMscL	72	VMHYGVFIQNVDFLIVAFALFMAIKLINKLNRKKEEPAAAPAPTKEEVLLTEIR	127

Fig. 4.7: Alignement de séquences des MscL de *M. tuberculosis* et *E. coli* utilisé par Valadié *et al.* (2003) pour construire le modèle.

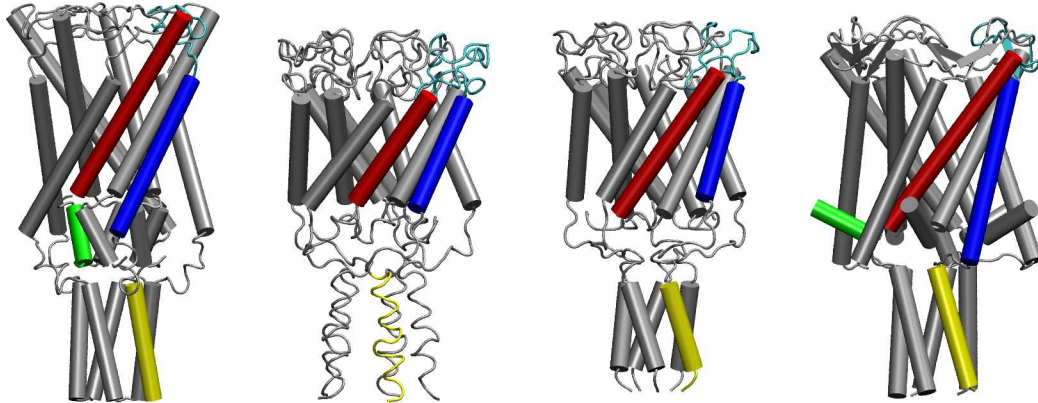


Fig. 4.8: Les quatre structures du MscL. De gauche à droite : modèle de Sukharev *et al.* (2001a), modèle de Valadié *et al.* (2003), première et seconde structures cristallographiques. La représentation est de type cartoon de VMD (Dalke & Schulten, 1997). Pour un monomère, le domaine Nterminal est en vert, l'hélice TM1 en rouge, la TM2 en bleu, la boucle périplasmique en cyan et le domaine Cterminal en jaune.

Le modèle de Sukharev *et al.* (2001b,a) se rapproche de la seconde structure cristallographique tandis que le modèle de Valadié *et al.* (2003) est proche de la première structure cristallographique. Les principales caractéristiques des différents modèles et structures sont données dans le tableau 4.2.

	Modèles <i>E. coli</i>				Structures <i>M. tuberculosis</i>			
	Sukharev		Valadié		1ère		2ème	
Boucle Nter	au dessus		plonge		plonge		au dessus	
Cter	hélices en faisceau		-		-		hélices séparées	
Ω	faisceau OK		faisceau hélicoïdale		faisceau inverse		faisceau inverse	
	143°		134°		141°		134°	
	TM1	TM2	TM1	TM2	TM1	TM2	TM1	TM2
Longueur	36	31	20	21	19	22	34	32
τ	32°	28°	37°	34°	37°	28°	37°	24°

Tab. 4.2: Caractéristiques principales des modèles et structures. Ω correspond à l'angle que font les hélices TM1 et TM2 d'un même monomère entre elles, τ à l'angle d'inclinaison (ou tilt) des hélices. La longueur des hélices est exprimée en nombre de résidus.

La principale différence entre ces modèles réside dans la longueur des hélices transmembranaires. Toutefois, le placement de ces hélices dans la membrane reste le même, suggérant des interactions semblables avec les lipides.

4.3.4 Etat complètement fermé ?

Les deux structures cristallographiques du canal présentent une région de constriction de plus de 2 Å de diamètre. La structure est postulée pour être dans un état fermé ou presque fermé.

Deux études de mutagénèse proposent que dans l'état complètement fermé, G26 et non V23 chez *E. coli* formerait le point de constriction du canal (Levin & Blount, 2004; Iscla *et al.*, 2004). Cette glycine est très conservée au sein des espèces et pourrait aussi donc correspondre au point de constriction chez *M. tuberculosis*. Dans ce cas, le point de constriction serait plus éloigné du cytoplasme et le vestibule serait plus petit.

Une observation supportant cette hypothèse réside dans le fait qu'il faudrait tourner les hélices dans le sens inverse des aiguilles d'une montre pour obtenir cette structure complètement fermée à partir des structures cristallographiques, ce qui correspondrait à une rotation inverse par rapport à celle supposée pour l'ouverture du canal (voir plus bas, section 4.4.4).

4.4 Mécanisme d'ouverture

La question principale soulignée par la construction de modèles de mécanismes d'ouverture du MscL est : "Comment la protéine se réarrange-t-elle pour obtenir une telle conductance lorsque la tension membranaire induit l'ouverture?".

Dans la publication de la structure cristallographique du canal, les auteurs donnaient un modèle grossier dans lequel les hélices TM1 se séparaient (Chang *et al.*, 1998). Pour former un pore de plus de 30 Å de diamètre, les dix hélices transmembranaires devaient border la lumière du pore. Ce modèle a été soutenu par d'autres travaux (Batiza *et al.*, 1999; Yoshimura *et al.*, 1999). Cependant, de plus récentes données suggèrent que ce modèle est incorrect. Parmi ces données, Park *et al.* (2004) ont séparé le canal en deux moitiés TM1 et TM2 exprimées séparément. Les TM1 forment des canaux s'ouvrant spontanément, les TM2 sont complètement silencieuses en patch-clamp. Seules les TM1 forment donc le pore et les TM2 sentent la tension membranaire mais n'interviennent pas dans la formation du pore. Les deux moitiés associées forment un canal fonctionnel mais plus sensible à la tension, ce qui indique un rôle important de la boucle périplasmique dans la sensibilité à la tension.

4.4.1 Modèle de Sukharev

Le modèle d'ouverture de Sukharev *et al.* (2001b,a)¹ propose un mécanisme dans lequel seules les hélices TM1 forment le pore. Le mouvement d'ouverture s'accompagne d'une augmentation de l'angle de tilt des hélices, reproduisant le mode d'ouverture d'un diaphragme d'appareil photo, suivi d'un élargissement du rayon du canal. La région Nterminale, non résolue dans la structure cristallographique se replie dans ce modèle en hélice sous l'axe du pore et agit comme une seconde barrière. Le faisceau d'hélices Cterminales se dissocie dans les premières étapes

¹Il est important de bien distinguer le modèle structural de Sukharev décrit dans la section 4.3.3 du modèle d'ouverture décrit ici, qui pourrait s'appliquer aux différentes structures résolues ou modélisées du canal.

de l'ouverture pour venir se placer à l'interface de la membrane sous les hélices transmembranaires. Récemment, des modifications ont été apportées au modèle quant à la dynamique de cette région Cterminale, qui, dans le nouveau modèle, formerait aussi un faisceau d'hélices dans la structure ouverte et agirait comme un filtre pour les grosses molécules (Anishkin *et al.*, 2003). Ce modèle tient compte de la réorientation des hélices du faisceau d'hélices (fig. 4.5), formant des interactions beaucoup plus stables. Il est décrit dans la figure 4.9.

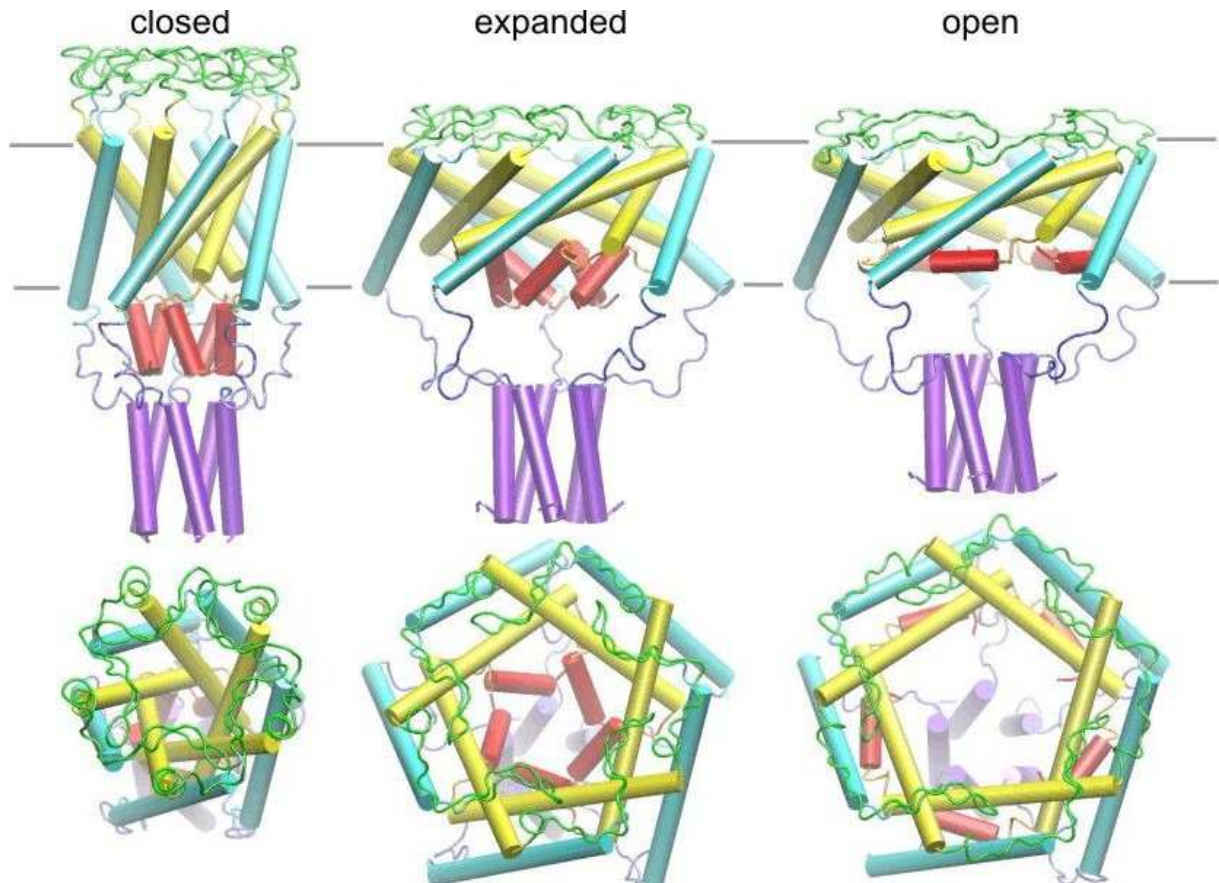


Fig. 4.9: Modèle d'ouverture du canal MscL proposé par Sukharev *et al.* (2001b,a); Anishkin *et al.* (2003) : à gauche, le modèle du MscL de *E.coli* fermé, au milieu étendu et à droite ouvert. Les images du haut montrent le canal vu de profil, celles du bas, le canal vu du côté périplasmique.

4.4.2 Inclinaison des hélices

Plusieurs études ont confirmé l'idée que l'inclinaison des hélices TM1 augmentait pour mener à la formation du pore. Perozo *et al.* (2002a) ont utilisé des lysophospholipides pour ouvrir le canal *in vitro* et les aspects structuraux du canal ont été déterminés par SDSL (*Site Directed Spin-Labeling*) et EPR (*Electron Paramagnetic Resonance*). Les caractéristiques des hélices transmembranaires et la structure déduite (fig. 4.10) sont en accord avec l'inclinaison et des hélices et l'élargissement du diamètre du canal. Chiang *et al.* (2005) ont muté des résidus stratégiques pour diminuer la possibilité des hélices de s'incliner. La cinétique d'ouverture est alors largement ralentie, appuyant l'hypothèse d'une inclinaison des hélices lors de l'ouverture du canal.

De nombreuses simulations de dynamique moléculaire et des analyses de modes normaux, sur les canaux de *M. tuberculosis* (Elmore & Dougherty, 2001; Gullingsrud *et al.*, 2001; Valadié

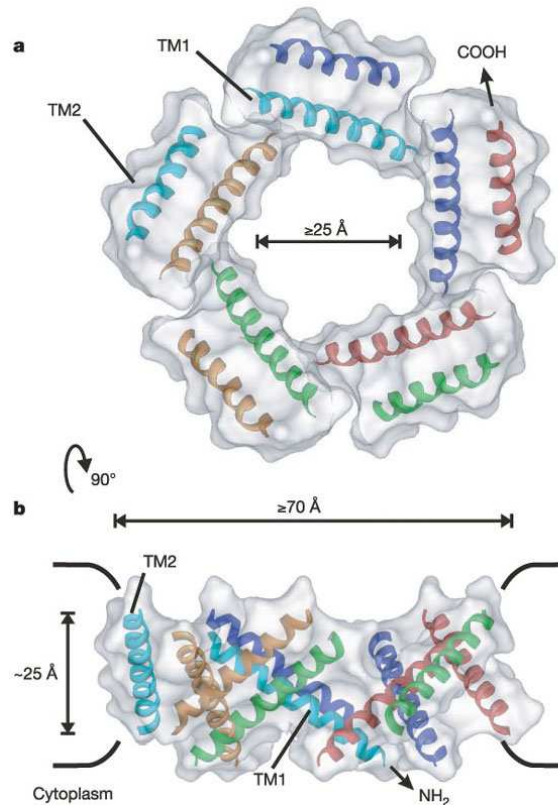


Fig. 4.10: Structure des hélices transmembranaires dans l'état ouvert (Extrait de Perozo *et al.* (2002a). a) Vue périplasmique, b) Vue de côté.

et al., 2003; Colombo *et al.*, 2003) et de *E. coli* (Gullingsrud & Schulten, 2003; Valadié *et al.*, 2003) confirment que l'ouverture du canal s'accompagne d'une inclinaison des hélices.

4.4.3 Courbure des hélices

L'analyse en modes normaux du MscL (Valadié *et al.*, 2003) souligne le fait que les hélices transmembranaires, considérées comme des corps rigides dans le modèle de Sukharev, peuvent subir des déformations. Le mouvement d'ouverture en iris induirait une cassure autour de la région de constriction. Cette observation est supportée par d'autres études *in silico* (Kong *et al.*, 2002; Elmore & Dougherty, 2003). De plus, ce phénomène est caractéristique des protéines membranaires (Sansom & Weinstein, 2000) et est toujours observé pour le MscL dans des régions fortement conservées. Ceci suggère que la cassure des hélices pourrait jouer un rôle important dans le mécanisme d'ouverture du MscL (Valadié *et al.*, 2003; Tieleman *et al.*, 2001).

4.4.4 Rotation des hélices TM1 autour de leur axe

Le modèle de Sukharev *et al.* (2001b) prédit une rotation très faible des hélices TM1 lors de l'ouverture du pore.

Le modèle issu des expériences de SDSL et de EPR par Perozo *et al.* (2002a) suggère une rotation horaire de 110° lors de l'ouverture.

Bartlett *et al.* (2004), grâce à des expériences de SCAM (*Scanning Cysteine Accessibility Mutagenesis*) identifiant les résidus exposés au milieu aqueux dans les états fermé et ouvert, ont

Ce phénomène de forte expansion dans le plan de la membrane semble caractéristique des canaux mécanosensibles, sachant qu'il est retrouvé pour le canal mécanosensible de faible conductance MscS (Akitake *et al.*, 2005). Apparemment, les autres canaux n'obéiraient pas au même mécanisme d'ouverture (par exemple, NaChR (Unwin, 1995) ou Kv (Glauner *et al.*, 1999)).

4.4.6 Rôle de la région Nterminale

Le modèle d'ouverture du MscL proposé par Sukharev *et al.* (2001b) suggère un état dit "étendu", correspondant à un canal où la région transmembranaire est similaire à la structure ouverte mais où le faisceau d'hélices Nterminales bouche le pore, agissant comme une seconde barrière. Ce modèle est basé sur le fait que le rayon du canal augmente avant l'ouverture (Sukharev *et al.*, 1999). Des expériences de mutagenèse corroborent cette hypothèse (Sukharev *et al.*, 2001b).

Plusieurs expériences mettent en question cette hypothèse. De grands changements de cinétique observés lors de substitutions de résidus de l'hélice TM1 suggèrent fortement que la séparation des hélices TM1 et non du faisceau Nterminal est associée à l'ouverture complète du canal (Blount & Moe, 1999; Yoshimura *et al.*, 1999; Moe *et al.*, 2000). De plus, aucune des mutations effectuées dans cette région ne mène à un changement de fonction du canal (Maurer & Dougherty, 2003). Finalement, la nouvelle cristallisation du canal (Steinbacher *et al.*, 2007) montre des hélices TM1 à l'interface entre membrane et solvant se situant sous les hélices transmembranaires, allant à l'encontre de l'hypothèse d'une seconde barrière formée par un faisceau d'hélices Nterminales.

D'un point de vue théorique, les avis divergent aussi quant au rôle de cette région. Partant du modèle du MscL de *E. coli* proposé par Sukharev *et al.* (2001b,a), Gullingsrud & Schulten (2003) observent une ouverture complète du pore sans rupture du faisceau d'hélices Nterminal, alors que Kong *et al.* (2002) observent une ouverture simultanée des deux régions.

4.4.7 Rôle de la région Cterminale

Le modèle d'ouverture actualisé du MscL proposé par Anishkin *et al.* (2003) suggère des liaisons suffisamment fortes dans le faisceau d'hélices Cterminales pour le garder assemblé dans la structure ouverte du canal. Il agirait alors comme un filtre bloquant le passage de grosses molécules.

Cette hypothèse est là encore fortement controversée. Les mesures de conductance suggèrent un pore de l'ordre de 30 à 40 Å (Cruickshank *et al.*, 1997), ce qui n'est pas compatible avec un tel modèle. De plus, Ajouz *et al.* (1998); Berrier *et al.* (2000) ont suggéré que le canal laissait passer de petites protéines telles que la thioredoxine, le DnaK ou le facteur d'élongation Tu, ce qui a été confirmé par la suite (Ewis & Lu, 2005; van den Bogaart *et al.*, 2007). Si le faisceau d'hélices est vraiment assemblé dans la structure ouverte, il paraît impossible que de telles molécules passent par le MscL.

Des expériences de mutagenèse et de protéolyse ont mis en évidence que la délétion de cette région au delà du résidu 110 (chez *E. coli*) n'altérerait pas le mécanisme d'ouverture (Blount *et al.*, 1996c) mais diminuait le seuil de sensibilité du canal (Ajouz *et al.*, 2000). Kloda *et al.*

(2006) ont mis en évidence un cluster de résidus chargés RKKxE, conservé au sens des espèces, essentiel dans la fonction du canal (situé en amont du résidu 110 chez *E. coli*) et permettant la sensation du pH environnant. Ils ont montré que la structure de la région Cterminale changeait en fonction du pH, ce qui entraînait un changement de sensibilité du canal.

Ces différentes expériences précisent le rôle de la région Cterminale, mais sa dynamique lors de l'ouverture reste encore inconnue. Il est cependant important de noter qu'elle ne joue pas un rôle prépondérant et que sa délétion au delà du résidu sus-mentionné n'altère pas la fonction, ni le mécanisme global d'ouverture du canal.

4.4.8 Rôle de la boucle périplasmique

La boucle périplasmique du MscL possède beaucoup de résidus Glycine, qui lui confèrent une grande flexibilité. Celle-ci a été observée par dynamique moléculaire (Meyer *et al.* , 2006). Des substitutions dans cette région influencent la sensibilité du canal (Ou *et al.* , 1998; Maurer *et al.* , 2000; Tsai *et al.* , 2005). Un clivage de cette boucle ou la séparation des hélices TM1 et TM2 (Park *et al.* , 2004) donnent des canaux beaucoup plus faciles à ouvrir (Ajouz *et al.* , 2000). Ces résultats suggèrent que la boucle périplasmique agirait comme un ressort maintenant le canal dans son état fermé et permettrait la transmission de la tension membranaire des hélices TM1 vers les hélices TM2.

4.4.9 Mouvements asymétriques

Le modèle de Sukharev *et al.* (2001b) propose un mouvement simultané des cinq sous-unités, maintenant une symétrie radiale tout au long de l'ouverture du canal.

Certaines expériences tendent à remettre en question cette symétrie. Tout d'abord, les expériences de dynamique moléculaire montrent des mouvements asymétriques lors de l'ouverture du canal (Bilston & Mylvaganam, 2002; Kong *et al.* , 2002; Colombo *et al.* , 2003). L'analyse de modes normaux de la protéine (Valadié *et al.* , 2003) suggère pour certains modes une symétrie 3-2 du canal, c'est à dire des mouvements coordonnés touchant deux ou trois des cinq monomères et allant donc à l'encontre d'une symétrie radiale. De plus, des expériences de mutagenèse V15C chez *M. tuberculosis* (Moe *et al.* , 2000) et N15C chez *E. coli* (Iscla *et al.* , 2007) permettent de capturer le canal respectivement dans un état ouvert et de transition. Du fait de la position de ces résidus sur l'hélice, seuls des mouvements asymétriques leur permettraient d'interagir.

4.4.10 Différences de mécanisme d'ouverture selon les espèces

Le mécanisme d'ouverture décrit correspond à celui du MscL de *E. coli*. Bien que la plupart des caractéristiques puissent s'appliquer de la même manière au canal de *M. tuberculosis*, certaines différences existent entre les deux espèces.

Les substitutions dans la zone de constriction sont moins dramatiques chez *M. tuberculosis* que chez *E. coli*. Par exemple, la mutation de Ala 20 (analogue de G22) entraîne un phénotype normal (Ajouz *et al.* , 2000). La région de constriction est présente mais insuffisante pour ex-

plier la barrière énergétique qui doit être franchie pour ouvrir le canal. Une autre barrière pourrait exister : la liaison hydrogène entre R45 et Q51 pour laquelle aucun équivalent n'a été trouvé pour *E. coli* (Moe *et al.* , 2000; Maurer *et al.* , 2000).

Nous avons vu que les hélices agissaient comme des ressorts maintenant le canal fermé (section 4.4.8). La boucle périplasmique pourrait donc permettre de gérer le niveau de sensibilité du canal à la tension (Ajouz *et al.* , 2000). La sensibilité du canal à la tension est deux fois plus grande pour *E. coli* que pour *M. tuberculosis* (qui est donc deux fois plus dur à ouvrir) (Sukharev *et al.* , 1999; Moe *et al.* , 2000) et les plus grandes différences entre les deux homologues sont observées dans cette région. De plus, la mutation de résidus impliqués dans des liaisons hydrogènes de la boucle de *M. tuberculosis* résulte dans des phénotypes GOF (*Gain Of Function*, c'est à dire dont la sensibilité est plus grande) (Maurer *et al.* , 2000) mais aucune interaction analogue n'a pu être observée pour *E. coli*. Ceci suggère donc un mécanisme d'action de la boucle différent entre les deux organismes.

Chapitre 5

Questions et objectif

Les connaissances actuelles sur le canal mécanosensible bactérien de grande conductance MscL permettent une description schématique de son mécanisme d'ouverture : i) augmentation de l'inclinaison des hélices transmembranaires entraînant une diminution de la hauteur du canal dans la membrane, ii) élargissement du diamètre global du canal. Mais comme nous l'avons vu précédemment, de nombreux points restent encore controversés ou inconnus.

Expérimentalement, l'étude des protéines membranaires est très complexe. Elles sont difficiles d'accès et leur isolement est compliqué par le fait qu'elles s'aggrègent lorsqu'elles sont sorties de leur milieu. De plus, elles forment souvent de gros complexes, posant des problèmes techniques laborieux et coûteux.

Une alternative réside dans les méthodes *in silico*. La dynamique moléculaire est une approche par laquelle les interactions à un niveau atomique et la mobilité des structures sont évaluées dans différentes conditions. Etant purement théorique, cette approche nécessite un recoupement avec des résultats expérimentaux mais elle permet de les valider, de les préciser ou d'apporter de nouvelles voies de recherche en proposant de nouvelles hypothèses. Toutefois, des limitations existent aussi pour cette approche. En raison de la taille des systèmes simulés et du temps nécessaire pour calculer une trajectoire, seuls des phénomènes rapides (en général, de l'ordre de la dizaine de nanosecondes) peuvent être observés. La mise en oeuvre de moyens d'accélération de la dynamique est alors nécessaire.

L'objectif de mon travail a consisté à étudier la dynamique du canal mécanosensible MscL au sein de différentes bicouches lipidiques modèles et de comprendre les interactions permettant de transmettre l'information de la bicouche au canal ainsi que son mécanisme d'ouverture à un niveau atomique, autrement dit le pourquoi et le comment de tels changements conformationnels.

Au début de ce travail, beaucoup de données expérimentales, que ce soit d'électrophysiologie, de mutagenèse ou de protéolyse avaient été effectuées sur le MscL de *E. coli*. Il était donc important d'effectuer les simulations sur une structure de ce canal, afin de pouvoir confronter les résultats obtenus aux résultats expérimentaux. La seconde structure cristallographique du canal de *M. tuberculosis* n'existait pas encore. Le modèle structural de Sukharev, construit à partir de contraintes liées au modèle de mécanisme d'ouverture, était assez éloigné de la structure cristal-

lographique disponible alors, malgré une identité de séquence significative. Le modèle structural construit par homologie au sein du laboratoire par Hélène Valadié semblait donc le meilleur modèle pour cette étude.

La première étape pour comprendre les interactions entre le canal et les lipides environnants ainsi que le mécanisme d'ouverture du canal a été d'étudier les propriétés de dynamique du MscL dans des membranes d'épaisseur variable. Ce travail était fortement basé sur le fait qu'une diminution de l'épaisseur membranaire permet d'obtenir un intermédiaire structural le long du chemin d'ouverture, diminuant la barrière énergétique d'activation. Nous avons effectivement réussi à obtenir et caractériser cet intermédiaire.

Sachant que le canal MscL de *M. tuberculosis* est deux fois plus difficile à ouvrir que celui de *E. coli*, la deuxième étape était de savoir si un tel intermédiaire pouvait être retrouvé pour le MscL de *M. tuberculosis* et, le cas échéant, caractériser les différences et ressemblances dans les interactions et mécanismes menant à cette structure. Nous n'avons obtenu aucune structure correspondant à un intermédiaire lors de ces simulations et avons donc essayé de comprendre ce qui expliquait cette différence.

La troisième et dernière étape consistait à valider l'hypothèse selon laquelle cette différence de sensibilité était liée aux boucles périplasmiques. Nous avons donc créé des canaux hybrides en échangeant leurs boucles et les avons étudiés.

Les méthodes employées et le détail de ces travaux sera présenté dans la suite de ce manuscrit.

Dans la prochaine partie, je détaillerai donc les différentes méthodes et outils utilisés lors de cette étude.

Les résultats seront ensuite présentés en quatre chapitres : les deux premiers correspondant à la première étape de ce travail, c'est à dire la dynamique du MscL de *E. coli* dans différentes membranes, présenté sous deux angles différents : la dynamique des lipides et la dynamique du canal. Les deux autres chapitres correspondent aux deux autres étapes de ce travail : la différence avec le MscL *M. tuberculosis* et les canaux hybrides issus de ces deux organismes. Dans chaque chapitre, les résultats seront analysés et discutés.

Les conclusions générales et les perspectives seront développées dans la dernière partie.

Deuxième partie

Outils et Méthodologies

Chapitre 6

Modélisation par homologie

La modélisation par homologie permet de construire la structure tridimensionnelle (3D) d'une protéine à partir de sa séquence. Elle est basée sur le fait que les structures 3D sont mieux conservées que les séquences d'une espèce à l'autre (Chothia & Lesk, 1986). Deux protéines ayant un taux d'identité suffisamment fort partagent donc des structures tridimensionnelles similaires. Si l'on dispose d'une protéine dont la structure est connue et dont la séquence est proche de notre protéine d'intérêt (ou protéine "cible"), il est possible d'en modéliser la structure à partir de l'alignement entre les deux séquences.

Il existe plusieurs approches pour, partant d'un support, élaborer une structure. Néanmoins, la plus efficace et la plus utilisée actuellement est celle proposée par Sali *et al.* (1995), qui se base sur la satisfaction de contraintes issues du support choisi.

Le principe de la méthode utilisée est résumé dans la figure 6.1. La qualité de la structure dépend de la qualité de la ou des structure(s) modèle(s) ainsi que de la qualité de l'alignement fourni.

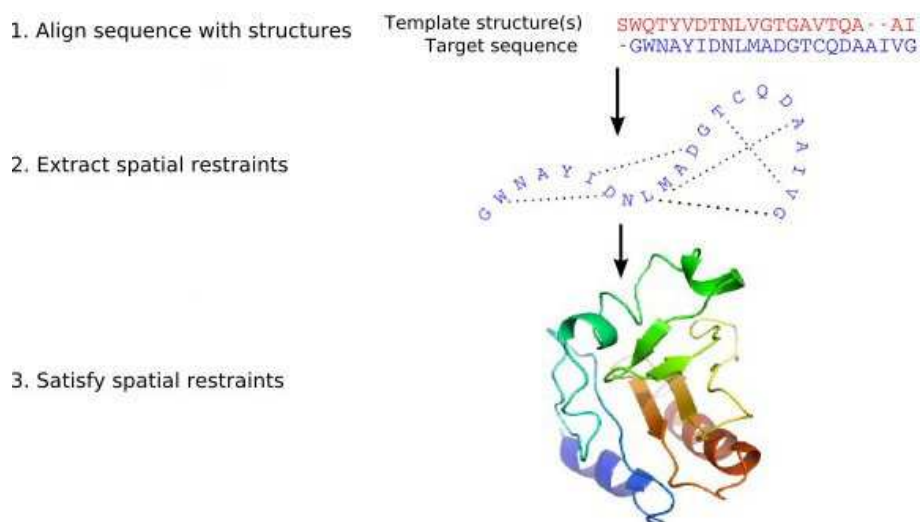


Fig. 6.1: Schématisation de la procédure de modélisation par homologie (Extrait de Fiser & Sali (2003)).

Les régions structurellement conservées sont directement modélisées à partir des coordonnées atomiques de la protéine connue. La difficulté réside dans les zones d'insertion/délétion et dans les boucles, très flexibles. Afin d'explorer au mieux l'espace conformationnel, plusieurs modèles vont être générés et classés selon une fonction objectif. Cette fonction permet de juger si le

modèle satisfait correctement les contraintes imposées au système. Il s'agit en fait d'une combinaison entre l'énergie interne de la protéine et l'énergie due aux contraintes imposées par la conformation du support. Les paramètres utilisés pour calculer cette énergie sont ceux de CHARMM (Brooks *et al.*, 1983). Plus sa valeur est faible, plus le modèle satisfait donc les contraintes imposées.

Nous avons utilisé la modélisation par homologie afin de construire la structure d'un monomère de chacune des protéines hybrides constituées de la boucle périplasmique du MscL de *E. coli* avec le reste du canal de *M. tuberculosis* et vice-versa. Les alignements utilisés sont donnés dans la figure 6.2. Les structures sélectionnées seront détaillées dans le chapitre 14.

<i>TbMscLH</i>	10	ARGNIVDLAVAVVIGTAFTALVTKFTDDIIMPPLGLLIGGIDFKQFAVTLRDAQGDIPAV	69
<i>EcoMscLH</i>	13	-RGNVVDLAVGVIIGA AFGKIVSSLVASIITPLINRI--GVNAQSDVGILRIGIGGGQTI	69
<i>TbMscL</i>	10	ARGNIVDLAVAVVIGTAFTALVTKFTDSIITPLINRI--GVNAQSDVGILRIGIGGGQTI	67
<i>EcoMscL</i>	13	-RGNVVDLAVGVIIGA AFGKIVSLVADIIMPPLGLLIGGIDFKQFAVTLRDAQGDIPAV	71
<i>TbMscLH</i>	70	VMHYGVLLSAAINFFLIAFAVYFLVVL PYNTRKKGE-VEQPGDT-QVVLLTEIR	122
<i>EcoMscLH</i>	70	DL--NVFIQNVDFLIVAF AIFMAIKLINKLN RKKEEPAAA PAPTKEEVLLTEIR	123
<i>TbMscL</i>	68	DL--NVLLSAAINFFLIAFAVYFLVVL PYNTRKKGE-VEQPGDT-QVVLLTEIR	118
<i>EcoMscL</i>	72	VMHYGVFIQNVDFLIVAF AIFMAIKLINKLN RKKEEPAAA PAPTKEEVLLTEIR	127

Fig. 6.2: Alignements utilisés pour construire les protéines hybrides. En rouge, la séquence provenant de *E. coli*, en noir celle de *M. tuberculosis*.

Les monomères ont été assemblés par superposition aux monomères de la structure cristallographique. Les chaînes latérales des structures modélisées ont été remplacées grâce au programme SCWRL (Canutescu *et al.*, 2003). Les mauvais contacts entre monomères ont été retirés par minimisation d'énergie dans Gromacs.

Chapitre 7

Mécanique moléculaire

7.1 Principe

La mécanique moléculaire a pour objectif d'approximer l'énergie d'une molécule en appliquant les lois de la mécanique (on parle de méthode empirique). Elle permet de calculer des propriétés structurales et thermodynamiques associées à une ou plusieurs molécule(s). Les atomes y sont représentés comme des masses ponctuelles chargées. L'énergie potentielle est en général exprimée comme une somme de contributions internes, entre atomes liés chimiquement, et externes, entre atomes non liés.

7.2 Fonction d'énergie potentielle

Son rôle est de reproduire les interactions du système aussi fidèlement que possible. Le plus souvent, elle s'exprime comme la somme de différentes contributions (fig. 7.1) :

$$E_{tot} = \underbrace{E_{liaison} + E_{valence} + E_{diedre} + E_{impropre}}_{E_{liee}} + \underbrace{E_{vdW} + E_{elec}}_{E_{non-liee}} \quad (7.1)$$

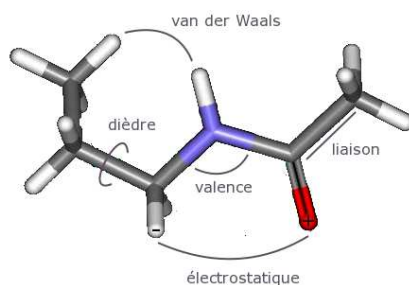


Fig. 7.1: Représentation des paramètres pris en compte dans le calcul d'énergie.

Les interactions entre atomes liés représentent l'énergie covalente du système. Elle s'applique aux atomes distants d'au plus trois liaisons. Les interactions entre atomes non-liés comprennent les interactions électrostatiques et de Van der Waals. Elles s'appliquent aux atomes distants de plus de trois liaisons. Le terme dit "impropre" permet de garder certains atomes, comme ceux des cycles par exemple, dans un même plan.

7.3 Champs de force

Le champs de force désigne un ensemble de paramètres décrivant chaque atome et permettant de résoudre l'expression analytique de l'énergie potentielle du système (E_{tot}). Il existe de nombreux champs de force et de nombreuses manières de définir l'énergie potentielle. Dans Gromacs, elle est calculée à partir de la position des atomes, exprimée en fonction des longueurs de liaison (b), des angles de valence (Θ), des angles dièdres (Φ), d'angles impropres (ω) et des distances interatomiques (r_{ij}). Cette expression permet de se placer dans un repère interne à la protéine dans lequel son orientation et sa position dans l'espace ne sont pas prises en compte. La position d'un atome est exprimée en fonction de la position des autres atomes. La description est alors dite en coordonnées "relatives".

L'énergie potentielle (dans Gromacs) est définie de la manière suivante :

$$\begin{aligned}
 E_{tot} = & \sum k_b(b - b_0)^2 \\
 & + \sum K_\Theta(\Theta - \Theta_0)^2 \\
 & + \sum K_\omega(\omega - \omega_0)^2 \\
 & + \sum K_\Phi(1 + \cos(n\Phi - \delta))^2 \\
 & + \sum_i \sum_{j>i} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \\
 & + \sum_i \sum_j \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{\epsilon_r r_{ij}}
 \end{aligned} \tag{7.2}$$

Les termes associés aux liaisons covalentes et aux angles sont décrits par des potentiels harmoniques et rendent compte du coût énergétique de déformation des liaisons ou des angles par rapport à des valeurs idéales, de référence (fig. 7.2).

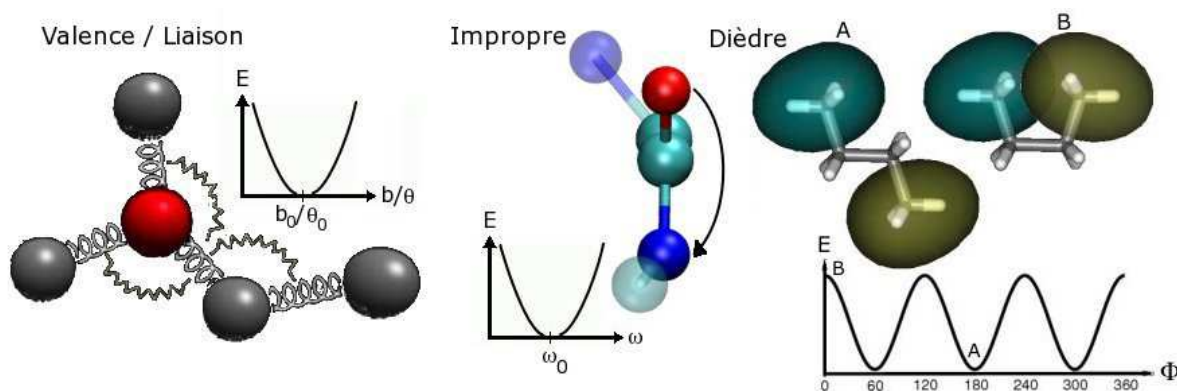


Fig. 7.2: Représentation des différents termes liés de la fonction d'énergie potentielle.

Les interactions électrostatiques décrivent les interactions entre particules chargées. L'intensité de la force électrique d'interaction est proportionnelle à la valeur de chacune des charges et inversement proportionnelle au carré de la distance qui les sépare. Le terme associé aux interactions de types électrostatiques est de type coulombien (fig. 7.3).

Les interactions de Van der Waals correspondent aux forces dites de dispersion. Même pour une distribution en moyenne neutre des charges, il existe des fluctuations temporaires (sur des temps très courts) de la distribution électronique auxquelles s'associent des moments dipolaires instantanés. Par effet d'induction, ces dipôles génèrent autour d'eux des dipôles induits. Les dipôles instantanés et les dipôles qu'ils induisent s'attirent selon une loi en $\frac{1}{r^6}$. Cependant, cette attraction est compensée par une répulsion très forte à plus courte distance, qui s'explique par la difficulté de faire s'interpénétrer les nuages électroniques de chaque atome. Les deux interactions se combinent dans un potentiel dit de Lennard-Jones (fig. 7.3).

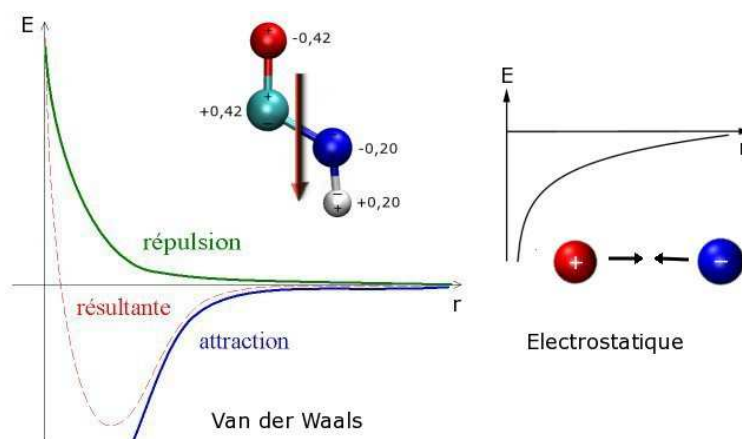


Fig. 7.3: Représentation des termes non-liés de la fonction d'énergie potentielle.

7.4 Interactions longue distance

Le nombre d'interactions entre paires d'atomes augmente exponentiellement avec la taille du système. A longue distance, les interactions entre atomes sont négligeables, les énergies d'interaction électrostatique et de Van der Waals étant proches de 0 (fig. 7.3). Afin de limiter les temps de calcul, les interactions entre atomes distants de plus d'une certaine valeur peuvent ne pas être prises en compte.

La méthode la plus simple, dite de "cut-off", consiste à utiliser une valeur seuil au delà de laquelle on considère les interactions comme nulles. Pour éviter de créer des brusques variations de forces dues au fait que le potentiel est discontinu, on peut multiplier les termes d'interactions non-liées par une fonction dite de « switch » ou ajouter au terme une fonction dite de « shift ». Dans ces méthodes, les plus connues sont le *reaction-field* ou RF (Tironi *et al.*, 1995) et la sommation d'Ewald (M & D, 1987). L'idée physique du RF est que les charges en dehors du cut-off forment un continuum avec une constante diélectrique donnée. Les charges à l'intérieur du cut-off vont polariser le continuum et créer ainsi un champ de réaction ("reaction-field"). La sommation d'Ewald consiste, quant à elle, à traiter le système comme s'il s'agissait d'un quasi-cristal et d'effectuer des sommes par maille. L'algorithme le plus connu et utilisé pour la sommation d'Ewald est le *particle mesh Ewald* ou PME (Cheatham *et al.*, 1995).

Chacune de ces méthodes présente des avantages et inconvénients dont il faut tenir compte lors du choix de la méthode utilisée.

De manière générale, la méthode de cut-off est beaucoup plus rapide que les autres. Cependant, elle entraîne certains artéfacts. Par exemple, pour les lipides, elle entraîne une diminution de l'aire par lipide et une augmentation du paramètre d'ordre des chaînes acyles (Patra *et al.* , 2003). Toutefois, les artéfacts, bien que ne disparaissant pas, sont diminués pour des valeurs de cut-off suffisamment grandes (de l'ordre de 1,8 nm).

La méthode PME, quant à elle, est beaucoup plus lente. Elle traite globalement mieux les interactions à longue distance mais entraîne aussi quelques artéfacts. Par exemple, la périodicité artificielle créée affecte l'équilibre conformationnel : les peptides et protéines se stabilisent dans la conformation la plus compacte (Hunenberger & McCammon, 1999). Le PME influence aussi l'épaisseur membranaire (Cordomi *et al.* , 2007).

Le choix de la méthode électrostatique est donc très dépendant de la taille et de la nature du système ainsi que des propriétés auxquelles on s'intéresse.

Chapitre 8

Dynamique moléculaire

8.1 Description

La dynamique moléculaire est une méthode qui permet de décrire *in silico* l'évolution d'un système moléculaire au cours du temps en intégrant les équations du mouvement de Newton pour chacun des atomes le constituant. Les déplacements subis par les atomes sont la conséquence de leur propre énergie cinétique ainsi que des forces exercées par les atomes environnants.

8.1.1 Equations du mouvement

La dynamique moléculaire permet de calculer la force exercée sur chaque atome et fournit différentes informations sur la trajectoire (vitesse et position des atomes). La force $F_i(t)$ qui s'exerce sur un atome i de coordonnées $r_i(t)$ au temps t est déterminée par dérivation de la fonction énergie potentielle V :

$$F_i(t) = -\frac{\delta V}{\delta r_i(t)} \quad (8.1)$$

$$F_i = m_i \frac{\delta^2 r_i}{\delta t^2}, i = 1, \dots, N. \quad (8.2)$$

En considérant un pas de temps très court, on peut intégrer les équations de mouvement et obtenir une trajectoire de chaque atome en fonction du temps.

8.1.2 Intégration des équations

L'algorithme utilisé pour intégrer les équations du mouvement dans Gromacs est l'algorithme *Leap Frog*, aussi appelé *Saute Mouton* (Hockney & Goel, 1974). Le principe est de déterminer les valeurs que l'énergie potentielle va prendre au cours du temps.

Connaissant la position et la vitesse de chaque atome au temps t , on détermine ces valeurs au temps $t + \Delta t$. Δt doit permettre de décrire les phénomènes physiques des molécules tels que les vibrations de liaisons. Plus le Δt est petit, moins on introduit d'erreur, mais plus le temps de calcul est long. Il faut donc trouver un compromis entre précision et rapidité (voir section 8.1.3). L'algorithme de *Leap frog* est basé sur celui de Verlet (Verlet, 1967).

L'algorithme de Verlet est dérivé de deux développements en série de Taylor :

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + v_i(t)\Delta t + \frac{F_i(t)}{2m_i}(\Delta t)^2 + \frac{\delta^3 r}{\delta t^3} + O[(\Delta t^4)] \quad (8.3)$$

$$r_i(t - \Delta t) = r_i(t) - v_i(t)\Delta t + \frac{F_i(t)}{m_i}(\Delta t)^2 - \frac{\delta^3 r}{\delta t^3} + O[(\Delta t^4)] \quad (8.4)$$

Sommés, ils permettent d'obtenir l'algorithme de propagation des positions suivant :

$$r_i(t + \Delta t) + r_i(t - \Delta t) = 2r_i(t) + \frac{F_i(t)}{m_i}(\Delta t)^2 + O[(\Delta t^4)] \quad (8.5)$$

Soustraites, ils permettent d'obtenir l'expression des vitesses :

$$v_i(t) = \frac{r_i(t + \Delta t) - r_i(t - \Delta t)}{2\Delta t} + O((\Delta t)^2) \quad (8.6)$$

Dans le cas de l'algorithme de *Leap frog*, les positions sont obtenues pour des intervalles de temps entiers. Les vitesses, quant à elles, sont calculées pour des intervalles de temps demi-entiers. Dans ce cas, on peut définir les vitesses comme :

$$v_i(t + \frac{\Delta t}{2}) = \frac{r_i(t + \Delta t) - r_i(t)}{\Delta t} \quad (8.7)$$

$$v_i(t - \frac{\Delta t}{2}) = \frac{r_i(t) - r_i(t - \Delta t)}{\Delta t} \quad (8.8)$$

Ce qui permet d'exprimer les positions de la manière suivante :

$$r_i(t \pm \Delta t) = r_i(t) \pm v_i(t + \frac{\Delta t}{2})\Delta t \quad (8.9)$$

On obtient alors pour les vitesses :

$$v_i(t + \frac{\Delta t}{2}) = v_i(t - \frac{\Delta t}{2}) + \frac{F_i(t)}{m_i}\Delta t \quad (8.10)$$

Pratiquement, possédant la vitesse au temps $t - \frac{\Delta t}{2}$, on calcule celle au temps $t + \frac{\Delta t}{2}$. Pour ce pas d'intégration, il est possible de calculer les vitesses courantes au temps t :

$$v_i(t) = \frac{v_i(t - \frac{\Delta t}{2}) + v_i(t + \frac{\Delta t}{2})}{2} \quad (8.11)$$

On peut alors calculer les positions des atomes au temps t , etc (fig. 8.1)

8.1.3 Contraintes méthodologiques

Mouvements rapides.

Afin de minimiser l'erreur lors de l'intégration des équations du mouvement, il faut que le pas de temps soit au moins 10 à 20 fois inférieur aux fréquences de vibrations les plus élevées (table 8.1). Le fait de bloquer certaines vibrations de haute fréquence à température ambiante

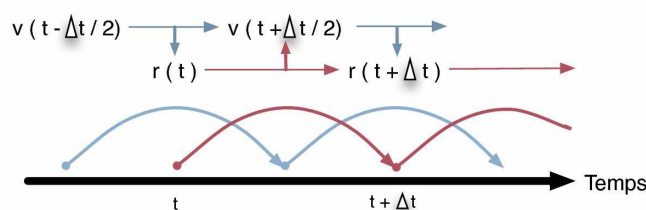


Fig. 8.1: Représentation schématique de l'algorithme *Leap frog*

type de liaison	type de vibration	fréquence (cm^{-1})
C-H, O-H, N-H	étirement	3000-3500
C=C, C=O	étirement	1700-2000
H-O-H	flexion	1600
C-C	étirement	1400-1600
C-C-C	flexion	800-1000
O-H...O	libration	400-700
O-H...O	étirement	50-200

Tab. 8.1: Fréquences vibratoires typiques dans les molécules.

permet d'augmenter le pas d'intégration. Le pas utilisé se situe alors généralement entre 1 et 2 fs (femtosecondes).

Vitesses initiales

La particularité de l'algorithme *Leap frog* est qu'il est nécessaire de connaître les vitesses au temps $t = t_0 - \frac{\Delta t}{2}$. Si ces données ne sont pas disponibles, des vitesses initiales aléatoires vont être générées à partir d'une loi de distribution de Maxwell pour une température T donnée.

Conditions périodiques

En dynamique moléculaire, le système simulé est de dimensions finies. Toutes les molécules de l'environnement sont contenues dans "une boîte". La taille finie du système pose des problèmes d'effets de bords à l'interface avec le vide environnant. Les molécules en périphéries de la boîte ne subissent pas le même environnement que le reste des molécules. Pour minimiser ces effets de bord, des conditions périodiques aux limites sont utilisées afin de simuler un environnement infini. La boîte contenant le système est entourée de chaque côté par une réplique d'elle-même (fig. 8.2). Tout ce qui se passe dans la boîte initiale est recopié simultanément dans les répliques. Ceci permet, par exemple, qu'une molécule à l'extrême gauche interagisse avec une molécule à l'extrême droite. Les calculs ne sont effectués que dans la boîte centrale mais les interactions avec les boîtes répliquées sont prises en compte.

Contrôle de la pression et de la température

Afin de mimer au mieux les systèmes biologiques, la température et la pression sont gardées constantes. Le volume est alors la grandeur thermodynamique qui varie. De nombreuses méthodes,

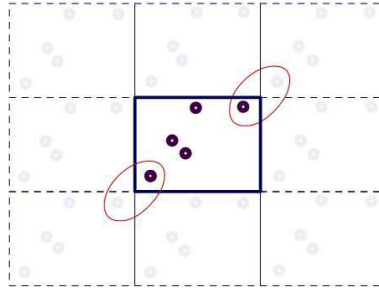


Fig. 8.2: Représentation des conditions périodiques aux limites en 2 dimensions.

dépendantes du programme de dynamique moléculaire utilisé, existent. Dans Gromacs, on utilise un bain thermique (Berendsen *et al.*, 1984) afin de garder la température et la pression autour de valeurs prédéfinies. Les équations du mouvement sont modifiées suite à la relaxation de la pression et/ou de la température instantanées ($P_i(t)$ ou $T_i(t)$) vers une valeur de référence P ou T . En ajustant les coordonnées atomiques et la taille de la boîte de simulation, la pression et la température se voient modifiées, tendant vers la valeur de référence :

$$\frac{dP_i(t)}{dt} = \frac{P - P_i(t)}{\tau_P} \quad (8.12)$$

$$\frac{dT_i(t)}{dt} = \frac{T - T_i(t)}{\tau_T} \quad (8.13)$$

Il existe plusieurs méthodes de couplage de la pression : isotropique, semi-isotropique et anisotropique (fig. 8.3). Dans la méthode isotropique, la régulation de la pression selon les axes X, Y et Z est couplée. Généralement, cela mène à des changements très faibles dans la taille de la boîte contenant le système étudié. Lors de la simulation de systèmes membranaires, il est important de noter que cette méthode ne permet que très peu de changements de l'aire de la membrane. La méthode semi-isotropique permet des fluctuations de l'aire de la membrane, la régulation de la pression n'étant couplée que selon les axes X et Y. C'est la méthode la plus appropriée pour les systèmes membranaires. La dernière méthode, anisotropique, ne couple aucune direction de régulation de la pression. Cette méthode permet elle aussi des fluctuations de l'aire de la membrane mais peut entraîner de fortes déformations du système.

8.2 Systèmes étudiés

8.2.1 Construction des membranes

Les deux types de lipides étudiés sont le POPE (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidyl-ethanolamine, ou C16 :0-C18 :1-PE), et le DMPE (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidyl-ethanolamine, ou C14 :0-PE). Les chaînes acyles du POPE font donc 16 et 18 carbones de long, celles de DMPE 14 carbones (fig. 8.4). Les chaînes acyles du DMPE, contrairement à la chaîne C18 du POPE, ne contiennent aucune insaturation.

Pour le POPE, nous avons utilisé une membrane pré-équilibrée, de 340 lipides et 6729 molécules d'eau, mise à disposition par P. Tieleman¹.

¹<http://www.ucalgary.ca/~tieleman/download.html>

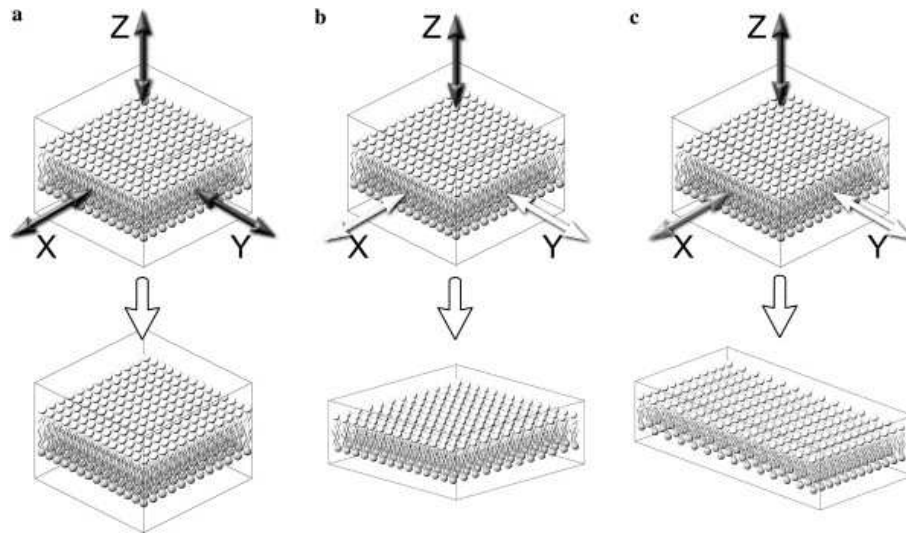


Fig. 8.3: Méthodes de couplage de la pression : a) isotropique, b) semi-isotropique, c) anisotropique (Extrait de Kandt *et al.* (2007).

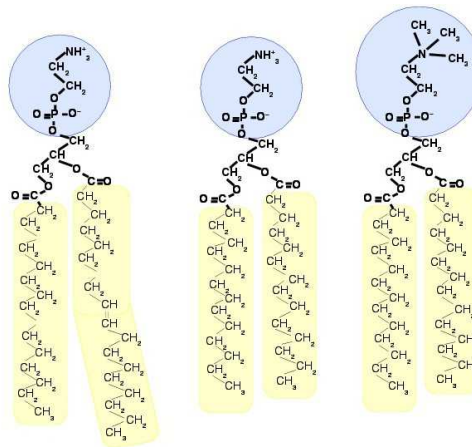


Fig. 8.4: Représentation schématique des lipides simulés. De gauche à droite : POPE, DMPE et DMPC.

Pour le DMPE, ni paramètres, ni système pré-équilibré n'étaient disponibles. Nous avons donc construit le lipide à partir des chaînes grasses de DMPC ou C14 :0-PC (fig. 8.4) et des têtes polaires de POPE. Nous avons utilisé un système pré-équilibré de 128 DMPC et 3655 molécules d'eau, mis à disposition par P. Tieleman. Les têtes polaires phosphatidylcholine (PC) ont été retirées et remplacées par des phosphatidylethanolamine (PE), de telle sorte que les longueurs de liaisons et les contraintes stériques soient respectées. Ce système a été utilisé comme structure de base.

Après minimisation d'énergie et une première simulation de 1 ns à 300 K avec couplage semi-isotropique à la pression, le système ne présente plus les ondulations de grande amplitude observables en début de simulation.

La température de fusion du DMPC se situe à 296,8 K, celle du POPE à 299,3 K. Bien que le DMPE soit plus court que le POPE et que leurs têtes polaires soient identiques, il ne présente

aucune insaturation, sa température de fusion est donc supérieure $(324,2 \text{ K})^2$. Pour cette raison, la température du système est élevée à 330 K et la simulation continuée pour 1 ns avec toujours un couplage semi-isotropique à la pression.

Les systèmes ainsi obtenus de POPE, DMPE et DMPC ont été simulés pendant 5 ns. Les résultats des analyses effectuées seront décrits dans le chapitre suivant.

Les minimisations d'énergie et simulations ont toutes été réalisées avec Gromacs 3.2.1 (Van Der Spoel *et al.*, 2005). La pression (isotropique pour les simulations de production de 5ns) et la température sont gardées constantes en utilisant les algorithmes de Berendsen avec des constantes de couplage de 0,1 ps. Pour garder une continuité avec les simulations avec le canal inséré dans les membranes, un traitement de type cut-off (de 18 Å) est utilisé pour calculer les interactions électrostatiques. Deux simulations supplémentaires de 2 ns du système DMPE ont été réalisées pour vérifier que ces paramètres n'affectaient pas trop le système : une avec un couplage de la pression semi-isotropique, le second avec un traitement électrostatique de type reaction-field (RF).

8.2.2 Insertion du MscL dans les membranes

MscL de *E. coli*

La structure utilisée est celle du modèle construit au sein du laboratoire par Valadié *et al.* (2003). Des études de mutagenèse sur le canal MscL de *E. coli* (Eco-MscL) ont montré qu'une délétion après le résidu 110 n'affectait pas le comportement global du canal (Blount *et al.*, 1996c). Afin de conserver un système fonctionnel et réduire le nombre d'atomes, chaque monomère a été tronqué après le résidu 110. Pour neutraliser le système, 5 contre-ions Cl⁻ ont été ajoutés. Le canal a été solvaté puis simulé 1 ns à 300 K avec de fortes contraintes sur la position des atomes. Seules les molécules d'eau, les boucles péripasmiques et les chaînes latérales de hélices TM1 étaient libres de bouger. Seule l'eau en contact des boucles et des hélices TM1 est conservée à la fin de la simulation. Cette procédure permet d'obtenir une structure solvatée du canal dans un temps relativement court.

Les structures de membranes de POPE et DMPE ont été récupérées à la fin des 5 ns de simulation de membranes pures. Les systèmes ont été élargis selon l'axe Z avec des molécules d'eau pour s'adapter à la taille du canal. Le système contenant du DMPE a été réduit à une boîte de dimensions 45Å, 45Å, 66Å et dupliqué dans le plan XY pour obtenir un total de 272 lipides.

La structure du canal solvatée a été superposée à chacune des membranes de telle sorte que les résidus L86 et I87 se situent à l'interface entre les feuillettes (Perozo *et al.*, 2001). Les lipides et l'eau chevauchant le canal ou ayant de mauvais contacts ont été retirées.

Le système final POPE Eco-MscL contient 260 lipides, 18408 molécules d'eau et 5 ions Cl⁻. le système DMPE Eco-MscL contient quant à lui 180 lipides, 16350 molécules d'eau et 5 ions Cl⁻. Au total, les systèmes représentent respectivement 73434 et 62020 atomes.

²The Lipid Data Bank - <http://lipidat.chemistry.ohio-state.edu/LDB/>

MscL de *M. tuberculosis*

Il a été montré que le motif fonctionnel important du domaine Cterminal était le motif RKKxE (Kloda *et al.*, 2006), ce qui expliquait le fait que le domaine Cterminal ne soit délété qu'après le résidu 110 chez *E. coli*. L'équivalent du résidu 110 chez *M. tuberculosis* est le résidu 103, qui se situe après le motif fonctionnel RKKxE. Le canal de *M. tuberculosis* a donc été tronqué après le résidu 103. Pour neutraliser le système, 10 contre-ions Cl⁻ ont été ajoutés. La procédure d'insertion dans les membranes est différente. Les canaux de *E. coli* et *M. tuberculosis* ayant des structures transmembranaires très similaires, le canal de *M. tuberculosis* a été superposé à la structure de *E. coli* déjà placée dans la membrane, en vérifiant que les résidus L81 et I82 se situaient bien à l'interface entre les deux feuilletts. Les molécules d'eau ont ensuite été ajoutées en vérifiant bien qu'aucune ne se plaçait dans la membrane. Le système final POPE Tb-MscL contient 260 lipides, 21861 molécules d'eau et 10 ions Cl⁻. le système DMPE Eco-MscL contient quant à lui 180 lipides, 16340 molécules d'eau et 10 ions Cl⁻. Au total, les systèmes représentent respectivement 83578 et 61775 atomes.

MscL hybrides

Les canaux hybrides sont constitués pour Tb_{Eco} -MscL du canal de *M. tuberculosis* avec les boucles périplasmiques de *E. coli* et pour Eco_{Tb} -MscL du canal de *E. coli* avec les boucles périplasmiques de *M. tuberculosis*. La procédure pour l'insertion et l'hydratation est la même que pour le MscL de *M. tuberculosis*.

Les systèmes finaux sont constitués :

- pour POPE Tb_{Eco} -MscL de 260 lipides, 21798 molécules d'eau, pour un total de 83624 atomes.
- pour DMPE Tb_{Eco} -MscL de 180 lipides, 15551 molécules d'eau, pour un total de 59643 atomes.
- pour POPE Eco_{Tb} -MscL de 260 lipides, 16982 molécules d'eau, 15 ions Cl⁻, pour un total de 68951 atomes.
- pour DMPE Eco_{Tb} -MscL de 180 lipides, 14298 molécules d'eau, 15 ions Cl⁻, pour un total de 55659 atomes.

8.2.3 Simulations du MscL dans des membranes

MscL de *E. coli*

De nombreuses simulations du MscL de *E. coli* ont été réalisées dans des membranes de POPE et de DMPE, avec des traitements électrostatiques, des températures, des contraintes, etc différents. L'ensemble de ces simulations est résumé dans le tableau 8.2.

Au début des recherches sur le MscL au sein du laboratoire, les puissances de calculs à disposition ne permettaient pas d'utiliser des méthodes telles que le reaction-field ou le particle-mesh ewald. De plus, à ce moment, les simulations de systèmes membranaire, et plus particulièrement du MscL, étaient assez régulièrement effectuées en utilisant un traitement électrostatique de type cut-off et/ou un couplage à la pression isotropique (Elmore & Dougherty, 2001; Gullingsrud *et al.*, 2001). Dans un souci d'homogénéité, les simulations ont par la suite été effectuées en utilisant

lipide	electrostatique	pression	temperature	nb	temps	contraintes
POPE	cut-off	isotropique	300 K	3	5 ns	-
	reaction-field	semiisotropique	300 K	1	5 ns	-
DMPE	cut-off	isotropique	330 K	3	4 ns	-
			330 K	1	5 ns	position Nter distance i-i+4 TM protéine puis relaxe
			330 K	1	10 ns	
			330 K	1	2 + 5 ns °	
	reaction-field	semiisotropique	300 K	2	4 ns	-
			300/330 K*	1	4.5 ns	-
			330 K	1	5 ns	-

Tab. 8.2: Récapitulatif des simulations effectuées sur le MscL de *E. coli*. * : Lipides à 330 K, le reste du système à 300 K. ° : la protéine est contrainte durant 2ns, puis les contraintes sont relâchées et le système simulé pendant 5ns.

le même protocole. Toutefois, lorsque les puissances de calculs disponibles ont augmenté, plusieurs simulations testant différents paramètres ont été effectuées. Ceci permettait de valider les résultats et vérifier que les paramètres n'affectaient pas trop le système. Les résultats étant similaires d'une simulation à l'autre, les résultats décrits proviennent des simulations cut-off + isotropiques, plus nombreuses.

MscL de *M. tuberculosis*

Afin de permettre d'effectuer des comparaisons, le MscL de *M. tuberculosis* a été simulé principalement en cut-off, isotropique. Dans ces conditions, 3 simulations de 5 ns avec des vitesses initiales différentes ont été réalisées pour chaque système. Une simulation supplémentaire de 5ns pour chaque système en reaction-field semiisotropique a été réalisée afin de vérifier l'influence des choix des paramètres.

MscL hybrides

Pour les mêmes raisons que précédemment, les simulations ont été effectuées en cut-off isotropique. Dans ces conditions, une simulations de 4 ns a été réalisée pour chaque système.

8.2.4 Détails des simulations

Toutes les minimisations d'énergie et les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées avec Gromacs 3.2. Nous avons utilisé les paramètres pour les lipides de Berger *et al.* (1997) et ceux du champ de force Gromacs (ffgmx) pour la protéine et l'eau. Les liaisons ont été contraintes avec l'algorithme Lincs (Hess *et al.*, 1997), permettant d'augmenter le pas d'intégration à 2 fs. L'algorithme Shake (Berendsen *et al.*, 1995) a été utilisé à la place de Lincs lorsque des distances étaient contraintes. Les structures ont été sauveées toutes les picosecondes. La pression a été gardée constante avec une constante de couplage de 0.1 ps. La température a été couplée séparément pour la protéine, les lipides, le solvant et les ions avec une constante de couplage de 0.1 ps (Berendsen *et al.*, 1984). Pour l'électrostatique, aussi bien pour le cut-off que pour le reaction-field, les rayons de Van der Waals étaient de 1.8 nm, ceux de coulomb de 1.0 nm.

8.3 Analyses

8.3.1 Analyse des propriétés des lipides

Epaisseur membranaire

L'épaisseur totale membranaire est définie comme la distance entre les centres de masse des atomes P de chaque feuillet, projetée sur l'axe Z. Cette grandeur a été calculée pour différents groupes de lipides en fonction de leur distance à la protéine. On définit comme lipide proche du canal, ceux dont le phosphate se situe à moins de 30 Å dans le plan X-Y du centre de masse de la protéine. La liste des lipides appartenant à ce groupe est mise à jour à chaque pas de temps.

Le centre de masse d'un groupe d'atomes donné est défini par :

$$C_m = \frac{1}{N} \sum_i^N m_i r_i \quad (8.14)$$

Avec m_i et r_i les masse et position en coordonnées cartésiennes de l'atome i .

Paramètre d'ordre

Le paramètre d'ordre des chaînes acyles permet d'obtenir une information concernant leur dynamique. Plus précisément, il permet de quantifier la position et l'ordre des groupes méthylène. Il est donné par :

$$\langle S_n \rangle = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \theta_n - 1 \rangle \quad (8.15)$$

Avec θ_n l'angle entre la normale au plan de la membrane et le vecteur normal au plan P défini par les vecteurs C-H du n^{ieme} carbone. $\langle S_n \rangle$ est moyenné sur le temps et sur les atomes équivalents des différents lipides.

Le paramètre d'ordre est de 0.5 lorsque la chaîne est trans (étendue) et perpendiculaire à la normale. Il est de 1 lorsque la chaîne est trans et parallèle à la normale à la membrane et de 0 lorsque le groupe méthylène ne présente pas d'orientation préférentielle.

Coefficient de diffusion

La fluidité de la membrane a pour conséquence un déplacement des lipides dans le plan de la bicouche. Le coefficient de diffusion associé est noté D_L . Cette valeur est calculée grâce à la relation d'Einstein. Elle est donnée par :

$$D_L = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{\langle |r(t) - r(0)|^2 \rangle}{4t} \quad (8.16)$$

Avec $r(t/0)$ la position en coordonnées cartésiennes du centre de masse du lipide dans le plan X-Y. La diffusion est proportionnelle ici à $\frac{1}{4t}$ car on se trouve dans un plan, un système à deux dimensions. Pour l'eau par exemple, qui diffuse dans un système en 3 dimensions, la diffusion aurait été exprimée en $\frac{1}{6t}$.

Un problème est rencontré avec cette méthode. Les simulations se font sur des temps trop courts

pour permettre d'approximer la valeur tendant à l'infini. Les valeurs sont donc sur-évaluées. Il est toutefois possible de les comparer entre elles pour des temps de simulation similaires.

8.3.2 Analyse des propriétés de la protéine

La définition utilisée des différents domaines de la protéine est donnée dans le tableau 8.3.

protéine	TM1	boucle	TM2
Eco-MscL	21-40	41-76	77-97
Tb-MscL	21-40	41-70	71-90
$Eco_{Tb} - MscL$	21-40	41-72	73-93
$Tb_{Eco} - MscL$	21-40	41-74	75-94

Tab. 8.3: Définition des différents domaines du MscL. Eco/Tb-MscL : MscL de *E. coli* / *M. tuberculosis*, $Eco_{Tb} - MscL$: MscL de *E. coli* avec les boucles périplasmiques du canal de *M. tuberculosis*. $Tb_{Eco} - MscL$: MscL de *M. tuberculosis* avec les boucles périplasmiques du canal de *E. coli*.

Déviation

Le *RMSd* (*Root Mean Square Deviation* ou écart quadratique moyen) permet de mesurer la déviation d'une structure par rapport à une structure de référence (dans notre cas, la structure initiale à $t=0$ ps), une fois superposées. Il est donné par la formule :

$$RMSd = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i(t) - r_i(ref))^2} \quad (8.17)$$

Avec N le nombre d'atomes du système, $r_i(t)$ la position de l'atome i au temps t . La moyenne du RMSd correspond à la somme des valeurs de RMSd obtenues pour un temps t divisée par le nombre de simulations.

Fluctuations

Le *RMSf* (*Root Mean Square Fluctuation*) permet de mesurer la fluctuation de chaque atome au sein d'une structure autour de sa position moyenne. Il est donné par la formule :

$$RMSf_i = \sqrt{\frac{1}{N_t} |r_i(t) - \langle r_i \rangle|^2} \quad (8.18)$$

avec $r_i(t)$ la position de l'atome i au temps t et $\langle r_i \rangle$ la position moyenne de l'atome i sur l'intervalle de temps simulé.

La moyenne du RMSf correspond à la somme des valeurs de RMSf obtenues pour un atome i divisée par le nombre de simulations.

Structures secondaires

Les structures secondaires sont le premier niveau d'organisation de la protéine. Elles sont le témoin de son architecture et peuvent évoluer au cours du temps. Le programme DSSP (Kabsch & Sander, 1983), que nous utilisons, est basé sur la reconnaissance de motifs de liaisons

hydrogène, par exemple entre les résidus i et $i + 4$ pour l'hélice α (voir fig. 1.5). Cette méthode présente l'avantage d'être rapide et de ne dépendre que d'un seul paramètre : la présence ou non de liaison hydrogène. On considère qu'il existe une liaison hydrogène si la distance entre un donneur et un accepteur de liaison hydrogène (les atomes N et O respectivement dans les structures secondaires) sont à moins d'une certaine distance (3.2 Å). Toutefois, les angles ϕ et ψ connectant les atomes de la chaîne peptidique peuvent correspondre à une structure secondaire donnée sans formation (temporairement) de liaison hydrogène. Dans ce cas, la méthode utilisée ne permet pas la reconnaissance de la structure secondaire.

Inclinaison des hélices

L'inclinaison des hélices dans la membrane permet d'évaluer la réponse du canal à un mésappariement hydrophobe. L'angle associé correspond à l'angle formé entre l'axe d'inertie de l'hélice (\vec{h}) et la normale à la membrane (\vec{m}) (fig. 8.5) :

$$\tau = \arccos\left(\frac{\vec{h} \cdot \vec{m}}{|\vec{h}| |\vec{m}|}\right) \quad (8.19)$$

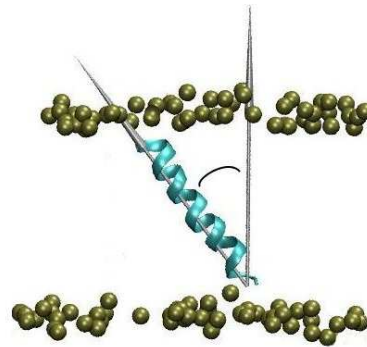


Fig. 8.5: Représentation schématique de l'angle d'inclinaison.

L'inclinaison moyenne correspond à la somme des valeurs d'angle d'inclinaison obtenues pour une hélice h à un temps t divisée par le nombre de simulations et de monomères.

Hauteur des hélices et de la boucle

L'angle d'inclinaison des hélices ne permet pas une comparaison aisée à l'épaisseur membranaire, ni au positionnement des boucles périplasmiques. Pour cette raison, nous avons aussi calculé leur hauteur, ces deux valeurs étant corrélées.

La hauteur ζ des hélices est définie comme la somme des vecteurs connectant les résidus des extrémités de chaque hélice (définis table 8.3), projeté sur la normale à la membrane (\vec{m}) (fig. 8.6).

La hauteur des boucles, quant à elle, correspond au vecteur (\vec{B}) entre son centre de masse et le centre de masse des résidus des extrémités cytoplasmiques des hélices transmembranaires (Ncap-TM1 et Ccap-TM2), projeté sur la normale à la membrane (fig. 8.7).

$$\vec{H} = \frac{1}{N_{mono}} \sum_h^{N_{mono}} \vec{h} \quad (8.20)$$

$$\zeta = \frac{\vec{H} \cdot \vec{m}}{|\vec{m}|} \quad (8.21)$$

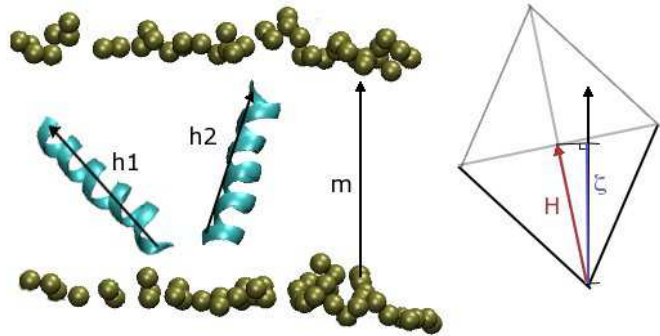


Fig. 8.6: Représentation schématique de la hauteur des hélices.

$$\vec{B} = \frac{1}{N_{boucle}} \sum_i^{N_{boucle}} m_i r_i \quad (8.22)$$

$$- \frac{1}{N_{helices}} \sum_j^{N_{helices}} m_j r_j$$

$$\zeta = \frac{\vec{B} \cdot \vec{m}}{|\vec{m}|} \quad (8.23)$$

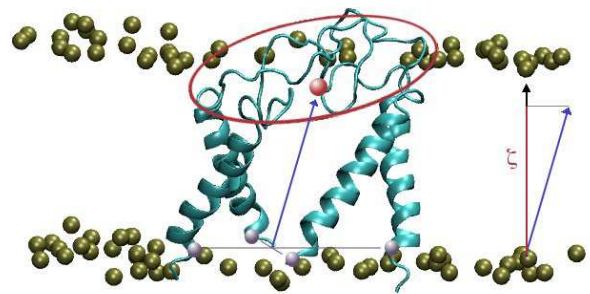


Fig. 8.7: Représentation schématique de la hauteur des boucles périplasmiques.

Courbure des hélices

Les hélices ne sont pas des corps rigides. Afin d'évaluer leur flexibilité, l'angle de courbure (ou de kink) est calculé à chaque pas de temps.

Pour ce faire, on procède, pour chaque hélice, à chaque pas de temps, de la manière suivante :

pour chaque résidu de l'hélice:
 prendre ce résidu comme pivot
 calculer l'axe d'inertie des deux sous-hélices
 calculer l'angle formé entre les deux vecteur
 garder l'angle maximal et le résidu correspondant

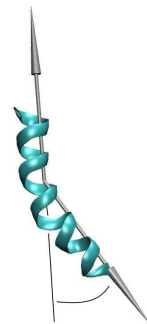


Fig. 8.8: Procédure de calcul et représentation schématique de l'angle de kink.

La courbure moyenne correspond à la somme des valeurs d'angle de courbure obtenues pour une hélice h à un temps t divisée par le nombre de simulations et de monomères.

Rotation des hélices

Les hélices sont stabilisées par des liaisons hydrogènes qui maintiennent sa structure. L'angle formé entre les résidus est très fortement contraint. C'est pourquoi il est possible de déterminer l'angle de rotation d'une hélice comme l'angle de rotation d'un de ses résidus. Le vecteur de référence est le vecteur passant par le centre d'inertie de l'hélice et par le C α du résidu représentatif. L'angle de rotation est défini comme l'angle formé par ce vecteur au temps t et t_0 (fig. 8.9).

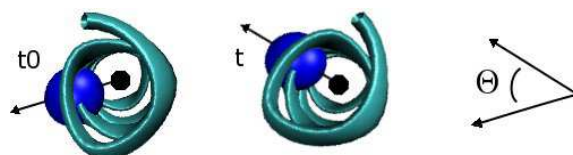


Fig. 8.9: Représentation schématique de la rotation d'une hélice.

La rotation moyenne correspond à la somme des valeurs de rotation obtenues pour une hélice h à un temps t divisée par le nombre de simulations et de monomères.

Diamètre du canal

Le diamètre du canal au cours du temps est défini comme son rayon de gyration dans le plan X-Y. Celui-ci permet de définir l'étendue spatiale du canal dans le plan de la membrane. Il correspond à la distance moyenne pondérée des atomes au centre de masse. Il est donné par la formule :

$$Rg = \frac{1}{N \sum_i^N m_i} \sum_i^N (m_i \sqrt{(r_i - \langle r \rangle)^2}) \quad (8.24)$$

Profil du pore

L'analyse de la géométrie du pore a été réalisée grâce au logiciel Hole (Smart *et al.*, 1996). Le principe consiste à trouver, pour une sphère de diamètre variable, le meilleur chemin pour traverser le canal.

Soit un point p_0 initial choisi par l'utilisateur et se trouvant dans le pore. Soit un vecteur \vec{v} définissant approximativement l'axe du pore et passant par p_0 , également défini par l'utilisateur. Pour chaque plan p orthogonal à \vec{v} et distant du plan précédent d'une certaine valeur (généralement 2,5Å), calculer $R(p)$ le rayon maximal de la sphère dont le centre appartient à p pour lequel il n'y a pas de recouvrement avec les rayons de van der Waals des atomes environnants (fig. 8.10). $R(p)$ est donné par la formule :

$$R(p) = \min_i^N [|X_i - c(p)| - vdW_i] \quad (8.25)$$

Avec X_i la position de l'atome i de rayon de van der Waals vdW_i et $c(p)$ le centre de la sphère.

Le résultat obtenu est une succession de sphères, définies par leur centre et leur rayon. Le profil du pore représenté est donc en fait un assemblage de ces sphères.

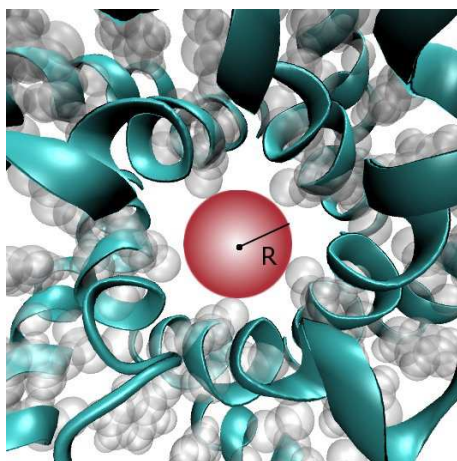


Fig. 8.10: Représentation schématique de la détermination de la sphère maximale dans la procédure de Hole.

Chapitre 9

Dynamique essentielle

9.1 Principe

La dynamique essentielle (Amadei *et al.* , 1993; Hayward *et al.* , 1995; Chen *et al.* , 2005) permet une analyse statistique de la trajectoire de dynamique moléculaire. Elle permet d'extraire des informations sur la collectivité des mouvements des atomes qu'une dynamique moléculaire classique ne permet pas d'obtenir.

De manière générale, cette analyse consiste à rechercher des variables collectives au sein d'un système. Par une analyse en variance-covariance, une relation entre les variables est établie. Elle met en avant les corrélations qui peuvent exister et caractérise ainsi les mouvements collectifs au sein du système.

Il s'agit en fait d'une analyse en composantes principales (ACP) de la trajectoire.

Une structure de la protéine à un instant t est considérée comme un point dans un espace à $3N$ dimensions, N étant le nombre d'atomes du système. L'ACP est une méthode mathématique d'analyse des données qui consiste à rechercher les directions de l'espace qui représentent le mieux les corrélations entre ces points. Dans notre cas, elle permet de rechercher les mouvements corrélés décrivant au mieux la trajectoire (pour exemple, voir fig. 9.1).

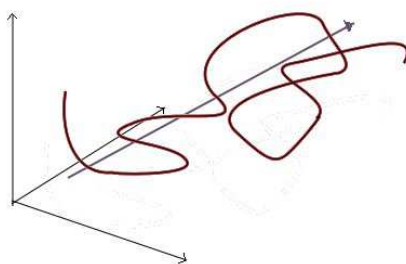


Fig. 9.1: Exemple d'ACP d'une trajectoire d'une molécule constituée d'un atome, l'espace est donc en 3 dimensions. La ligne rouge présente la trajectoire. La flèche présente la direction décrivant au mieux la trajectoire.

En pratique, une trajectoire de dynamique est représentée par k structures instantanées. Chacune de ces structures correspond à un point dans un espace à $3N$ dimensions. La matrice

de variance-covariance de cette distribution représente les fluctuations de la protéine. Les axes principaux qui diagonalisent la matrice de variance-covariance sont déterminés. Ils correspondent aux mouvements collectifs de plus grande variance.

9.2 Limites

Plusieurs problèmes ont été soulevés par rapport à cette méthode (Hess, 2000, 2002). Le premier est de savoir si les vecteurs propres calculés sont correctement définis, c'est à dire s'ils rendent bien compte de la dynamique propre de la protéine. Pour cela, l'espace conformationnel doit être suffisant.

Le second problème est l'identification des vecteurs rendant compte de la dynamique propre du système. En effet, il est important de distinguer les mouvements propres à la molécule de ceux liés aux mouvements browniens diffusifs de la protéine. Hess a montré que si un vecteur propre décrit une fonction cosinus, il semble qu'il ne décrive que des mouvements de diffusion aléatoire qui bruitent les mouvements intrinsèques de la protéine. Ce mode ne sera alors pas pris en compte dans l'analyse.

9.3 Système analysé

Il a été montré que l'ACP sur la trajectoire des $C\alpha$ était suffisant pour déterminer les mouvements principaux (Kolafa *et al.*, 2000). De plus, dans le cas du lysozome, ceci permet de décrire 90% du mouvement global avec les 20 premiers vecteurs propres alors que 35 étaient nécessaires en utilisant tous les atomes (Amadei *et al.*, 1993). La majorité des mouvements de grande amplitude est donc associée aux premiers vecteurs propres et un jeu de données relativement simple (les $C\alpha$) est suffisant pour décrire ces mouvements.

L'analyse en composantes principales a donc été réalisée sur les positions des $C\alpha$ provenant des trajectoires concatenées dans du POPE (15 ns, 15000 structures) et dans du DMPE (12 ns, 12000 structures). Nous avons vérifié que les mouvements décrits par les vecteurs propres ne correspondaient pas à des diffusions aléatoires (Hess, 2002).

9.3.1 Recouvrement

Nous avons comparé les mouvements décrits par les ACP dans les deux milieux, et chacun d'eux avec les mouvements issus de l'analyse en modes normaux. Pour cela, le recouvrement entre chaque vecteur (vecteur propre ou mode) a été calculé. Il permet de quantifier le degré de similitude entre deux directions définies par deux vecteurs \vec{a} et \vec{b} . Ce recouvrement est défini selon Marques & Sanejouand (1995) par :

$$I = \frac{|\sum_{i=1}^{3N} a_i b_i|}{\sqrt{\sum_{i=1}^{3N} a_i^2 \sum_{i=1}^{3N} b_i^2}} \quad (9.1)$$

9.3.2 Participation

Afin de déterminer l'importance de chaque vecteur propre dans le mouvement global du système, leur contribution aux fluctuations observées a été calculée. Elle est définie comme le recouvrement entre le vecteur considéré et le vecteur reliant la conformation initiale à une conformation dite finale. cette dernière est une conformation moyenne des structures finales des simulations prises en compte dans le calcul de l'ACP. La participation est exprimée en pourcentage, 100% représentant des directions identiques.

9.3.3 Collectivité

La collectivité κ d'un vecteur permet de mesurer les mouvements collectifs d'un vecteur donné, c'est à dire la proportion d'atomes significativement affectés. Elle est donnée par la formule (Bruschweiler, 1995) :

$$\kappa = \frac{1}{N} \exp - \sum_{i=1}^N \alpha A_i^2 \log \alpha A_i^2 \quad (9.2)$$

Avec A_i l'amplitude de déplacement et α un facteur de normalisation tel que $\sum \alpha A_i^2 = 1$. La collectivité est maximale pour une valeur de 1 et minimale pour une valeur de $\frac{1}{N}$.

Chapitre 10

Dynamique vibrationnelle

10.1 Principe

La théorie des modes normaux est basée sur l'approximation harmonique de la fonction d'énergie potentielle autour d'une conformation d'énergie minimale et permet de résoudre analytiquement les équations du mouvement.

Chaque atome d'un système est soumis à des vibrations autour de sa position d'équilibre et peut donc être assimilé à un oscillateur. Il existe des interactions entre ces oscillateurs qui, si elles sont importantes, peuvent provoquer des mouvements collectifs au sein de la structure. Le mouvement global du système est exprimé comme une superposition de variables collectives (oscillateurs), appelés modes normaux de vibrations. La diagonalisation de la matrice contenant les dérivées secondes de l'énergie (le Hessien) permet d'obtenir les modes normaux de vibration d'un système.

Cette méthode permet de caractériser les déplacements atomiques en termes de directions de mouvements associés à des fréquences. Le mouvement global résulte de la superposition de ces différents modes de déplacement atomique. Les modes de basse fréquence représentent des mouvements collectifs, les modes de haute fréquence des mouvements très localisés d'atomes.

10.2 Formalisme

Pour de petits déplacements autour d'un point de référence, l'énergie potentielle V peut être développée en série de Taylor :

$$V = V_0 + \sum_{i=1}^{3N} \left(\frac{\delta V}{\delta r_i} \right)_0 (r_i - r_i^0) + \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^{3N} \left(\frac{\delta^2 V}{\delta r_i \delta r_j} \right)_0 (r_i - r_i^0)(r_j - r_j^0) + \dots \quad (10.1)$$

avec r_i et r_i^0 les coordonnées de l'atome i déplacées et de référence.

Si V_0 est minimale, on peut poser :

$$\left(\frac{dV}{dr_i} \right)_0 = 0 \quad (10.2)$$

De plus, si les déplacements du système sont suffisamment petits, les termes d'ordre supérieur à 2 peuvent être négligés. V peut alors être approximé de la manière suivante :

$$V = \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^{3N} k_{ij} (r_i - r_i^0)(r_j - r_j^0) \quad (10.3)$$

avec k_{ij} la constante de force entre les atomes i et j . Si on approxime V sous forme matricielle, on a :

$$V = \frac{1}{2} r^t F r \quad (10.4)$$

avec F la matrice des constantes de force k_{ij} , r la matrice des positions atomiques et r^t sa transposée. La théorie des modes normaux (Goldstein, 1950) repose sur l'hypothèse que l'énergie potentielle V a la forme décrite précédemment.

Par ailleurs, l'énergie cinétique K peut aussi être exprimée sous la forme matricielle :

$$K = \frac{1}{2} \dot{r}^t H \dot{r} \quad (10.5)$$

avec H la matrice des dérivés secondes de l'énergie cinétique par rapport aux vitesses et \dot{r} la matrice des vitesses des atomes.

Si les expressions matricielles des énergies potentielle et cinétique sont introduites dans l'équation de Lagrange, alors l'équation du mouvement s'écrit :

$$H \ddot{r} + F r = 0 \quad (10.6)$$

avec \ddot{r} le vecteur de dérivés secondes des positions atomiques par rapport au temps. Une solution de cette équation est :

$$r = A q \quad (10.7)$$

avec q les nouvelles coordonnées normales qui s'expriment sous la forme :

$$q_k = C_k \cos(\omega_k t + \phi_k) \quad (10.8)$$

C_k , ϕ_k et ω_k sont respectivement l'amplitude, la phase à l'origine et la fréquence angulaire du mode de vibration k . Chaque coordonnée peut alors être écrite sous la forme suivante :

$$r_i = \sum_{k=1}^{3N} C_k a_{ik} \cos(\omega_k t + \phi_k) \quad (10.9)$$

a_{ik} est un élément de la matrice A définissant la direction le long de laquelle tous les atomes vibrent en phase avec la même fréquence. Dans un repère où les coordonnées cartésiennes sont masses pondérées, la matrice A contient les vecteurs propres de la matrice F . Ce type de solution signifie que chacune des coordonnées r_i oscille autour de sa position d'équilibre r_i^0 , son mouvement global résultant de la superposition de $3N$ modes de vibration.

10.3 Limitations

Différentes limitations existent pour l'approche classique des modes normaux : la minimisation d'énergie du système et la diagonalisation de la matrice des dérivées secondes de l'énergie. Dans le cas de la minimisation d'énergie, le problème reside dans le fait que la surface d'énergie présente de nombreux minima locaux. Pour passer d'un minimum à l'autre, il est nécessaire de franchir une barrière énergétique. Il n'est donc pas garanti que le système soit minimisé correctement.

Le problème de diagonalisation est lié à la taille du système. Pour une protéine constituée de N atomes, la taille de la matrice est de $3N \times 3N$ avec $3N$ le nombre de degrés de liberté du système. Se pose alors le problème de l'espace mémoire nécessaire qui croît exponentiellement. Différentes méthodes permettant de s'affranchir du deuxième facteur limitant ont été développées :

- la première est de diagonaliser la matrice itérativement (Perahia & Mouawad, 1995),
- la seconde est de considérer les acides aminés comme des corps rigides pour les mouvements de basse fréquence, permettant de diminuer le nombre de degrés de liberté (Tama *et al.* , 2000).

D'autres approches permettent de contourner les deux problèmes à la fois, en simplifiant l'expression du potentiel utilisé pour le calcul d'énergie et en simplifiant la représentation de la protéine à une particule par acide aminé (Bahar *et al.* , 1997; Tirion, 1996; Hinsen & Kneller, 1999).

10.4 Méthode simplifiée de M. Tirion

La méthode simplifiée de Tirion (1996) est une des méthodes permettant de contourner les deux problèmes de l'analyse en modes normaux que sont la minimisation d'énergie et la diagonalisation de la matrice Hessienne.

Dans cette approche, le potentiel semi-empirique classique utilisé dans les champs de force classiques est remplacé par un potentiel à simple paramètre. Ce potentiel est appelé potentiel de Hook et est donné par la formule :

$$E_p = \sum_{d_{ij}^0 < R_c} c(d_{ij} - d_{ij}^0)^2 \quad (10.10)$$

où d_{ij} est la distance entre deux atomes i et j et d_{ij}^0 la distance dans la structure de référence. c est une constante identique pour toutes les paires d'atomes et référant à la constante de force de la fonction d'énergie potentielle. R_c est le paramètre de cut-off choisi au delà duquel les interactions ne sont plus prises en compte.

L'utilisation d'un potentiel de Hook permet de ne pas minimiser la structure de référence. De plus, ce modèle est associé à une représentation simplifiée de la protéine, seuls les $C\alpha$ sont considérés. Cette description est suffisante pour l'étude des mouvements de la chaîne principale de gros systèmes protéiques mais ne permet pas de décrire les mouvements de très haute fréquence correspondant aux oscillations rapides d'atomes.

Troisième partie

Résultats

Chapitre 11

Influence du canal MscL sur les différentes bicouches lipidiques

Durant cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés aux mécanismes d'ouverture du MscL et à sa dynamique c'est pourquoi les chapitres suivants y seront dédiés. Toutefois, l'influence que ce canal peut avoir sur les membranes qui l'entourent est un aspect très intéressant qui permet de mieux comprendre les interactions qui peuvent exister entre la protéine et les lipides et donc ce qui régit l'ouverture du MscL. Nous avons ici étudié des membranes pré-équilibrées de POPE et de DMPE contenant ou non le canal de *E. coli*.

Dans un premier temps, comme point de repère, nous décrirons les propriétés des membranes simulées en absence de canal puis nous analyserons, dans un second temps, les modifications de propriétés des lipides induites lors des simulations avec le MscL ancré dans ces membranes.

11.1 Comportement des membranes pures

L'exploration de l'influence des lipides sur le MscL requiert des systèmes membranaires fiables. Les membranes ont donc été simulées seules dans un premier temps. Trois systèmes ont été considérés ici : des membranes de POPE, DMPE et DMPC (fig. 11.1).

Le POPE est le lipide composant principalement les membranes plasmiques de *E. coli*, il a donc été choisi pour mimer la membrane native du canal lorsqu'aucune contrainte n'est appliquée. Sa tête polaire est une éthanolamine, ses chaînes acyles sont des C18 :1, C16, c'est à dire composées de 18 et 16 carbones, la première chaîne présentant une insaturation. La membrane étudiée est constituée de 340 lipides, répartis également entre feuillet interne et externe.

Les études menées par Perozo *et al.* (2002b) montrent que des lipides C14 permettent d'obtenir une structure intermédiaire du MscL le long du chemin d'ouverture. Le DMPE présente la même tête polaire que le POPE mais des chaînes grasses C14. Il est donc le lipide le plus adapté pour étudier l'influence de la diminution d'épaisseur membranaire sur le MscL. La membrane étudiée ici est composée de 128 lipides de DMPE répartis également entre les deux feuillets. Pour ce système, la température de transition de phase est de 324,2 K. La membrane a donc été simulée à 330 K. Une simulation témoin à 300 K a aussi été réalisée.

Comme nous ne disposions pas de structure ni de topologie pour le DMPE, nous l'avons construit à partir des têtes polaires de POPE et des chaînes acyles du DMPC (voir section 8.2.1). La mem-

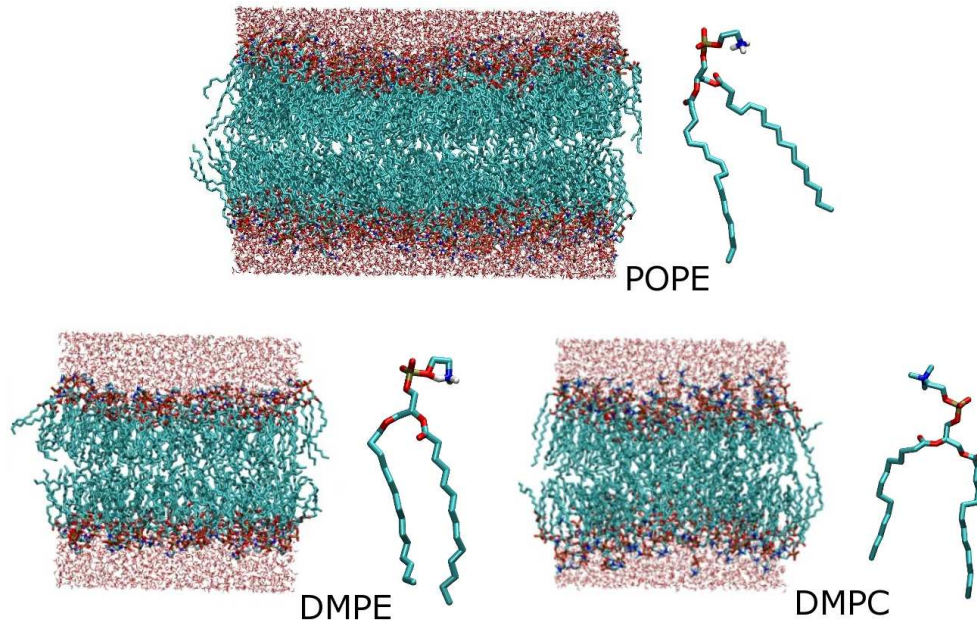


Fig. 11.1: Représentation des systèmes lipidiques simulés. Les lipides sont représentés en type “licorice” l’eau en type “ligne”.

brane de DMPC a donc été utilisée comme témoin pour les propriétés du DMPE. La membrane simulée est elle aussi constituée de 128 lipides également répartis entre les deux feuillets.

Le tableau 11.1 récapitule un certain nombre des paramètres qui ont été vérifiés sur les simulations effectuées sur ces systèmes lipides+eau.

	T (K)	A_L^{calc} (\AA^2)	A_L^{exp} (\AA^2)	d_N^{calc} (\AA)	d_P^{calc} (\AA)	d_{bil}^{exp} (\AA)	d_{C1}^{calc} (\AA)	d_{C2}^{calc} (\AA)	d_{lipo}^{exp} (\AA)
DMPC	300	61.6	62.6	37.5	36.2	35.7	26.6	27.9	23.1
DMPE	300	57.6	56.6	35.2	35.2	36.3	26.2	27.6	28.8
DMPE	330	58.6	-	35.3	35.4	-	26.2	27.9	-
POPE	300	53.2	56.0	43.8	44.1	41.8	34.9	36.2	30.1

Tab. 11.1: Récapitulatif des paramètres pour les membranes de DMPC, DMPE et POPE. A_L aire par lipide, D_L coefficient de diffusion des lipides, d_X distance entre atomes X (N, P, C1 ou C2) de chaque feuillet, d_{bil} épaisseur membranaire et d_{lipo} épaisseur hydrophobe de la membrane.

Le premier point à noter est que la température n’a pas de grande influence sur le DMPE, les distances entre les deux feuillets ne varient pas entre les simulations à 300K et à 330K. Seule l’aire par lipide, déterminée en divisant la surface de la membrane par le nombre de lipides constituant un feuillet, augmente légèrement avec la température. Ceci peut s’expliquer par le fait que les temps de simulation sont trop courts pour pouvoir observer des changements de phase des lipides. Leurs propriétés restent donc similaires dans cette échelle de temps.

Pour le POPE et le DMPC, on peut observer que l’aire par lipide est légèrement sous-estimée (Rand & Parsegian, 1988, 1989). Au contraire, l’aire par lipide de DMPE est sur-estimée. Nous avons utilisé une méthode isotropique de couplage de la pression. Cette méthode ne permet pas de grande variation de l’aire dans le plan de la membrane et ne permet pas de spécifier

une tension de surface (Kandt *et al.*, 2007). Toutefois, nous sommes partis du principe que les membranes mises à disposition (DMPC et POPE) étaient déjà prééquilibrées et donc que l'aire par lipide n'avait pas à évoluer. Dans le cas du DMPE, l'aire, bien que légèrement surestimée est proche des valeurs expérimentales. Cette surestimation pourrait être liée au couplage isotropique à la pression lors de la phase de production, l'aire de la membrane ne pouvant pas excessivement varier. Cependant, la phase de production est précédée de 2ns en semi-isotropique d'équilibrage permettant d'adapter la taille de la boîte correspondant initialement à du DMPC aux nouveaux lipides de DMPE. De plus, lors de la simulation de 2ns supplémentaires de DMPE effectuée avec un couplage semi-isotropique, l'aire par lipide ne variait quasiment pas.

Plusieurs distances ont été calculées pour estimer l'épaisseur des bicouches lipidiques simulées. Les distances entre premiers carbones des chaînes grasses permettent d'estimer l'épaisseur hydrophobe des membranes, les distances entre azotes ou phosphates permettent d'estimer l'épaisseur totale de la membrane.

L'épaisseur hydrophobe calculée ne varie que très peu entre DMPE et DMPC et est inférieure d'environ 8Å à celle de POPE. La différence d'épaisseur membranaire totale, quant à elle, reste de 8Å entre DMPE et POPE mais passe à 6Å entre POPE et DMPC. Ceci en raison de la différence d'encombrement stérique des têtes polaires, plus grosses pour PC que pour PE. L'utilisation de la méthode du cut-off joue probablement un rôle dans la surestimation de l'épaisseur hydrophobe (en augmentant l'ordre des chaînes acyles, celles-ci sont plus étendue et donc plus longues). Toutefois, nous nous intéressons principalement à la différence d'épaisseur membranaire entre POPE et DMPE. Celle-ci doit être suffisante pour permettre un mésappariement hydrophobe une fois le canal inséré et ainsi entraîner des changements conformationnels. Bien que l'épaisseur du POPE ne soit pas identique aux valeurs expérimentales, sa différence avec le DMPE permet d'espérer un mésappariement hydrophobe suffisant.

Les résultats sont ici globalement en accord avec les résultats expérimentaux bien que certaines différences soient observables. De plus, la différence d'épaisseur hydrophobe entre POPE et DMPE est suffisante pour induire un mésappariement hydrophobe, phénomène auquel nous nous intéressons.

11.2 Influence du canal MscL sur les bicouches lipidiques

Les propriétés des membranes de POPE et de DMPE correspondent à nos critères : elles présentent une différence d'épaisseur hydrophobe suffisante. Le canal y a donc été inséré. Dans la membrane de POPE, le MscL reste stable, tandis que dans la membrane de DMPE, la hauteur du canal diminue et son diamètre augmente. Ces changements de structure seront détaillés dans le chapitre suivant. Dans le présent chapitre, nous allons décrire l'influence de la présence du MscL sur les bicouches lipidiques.

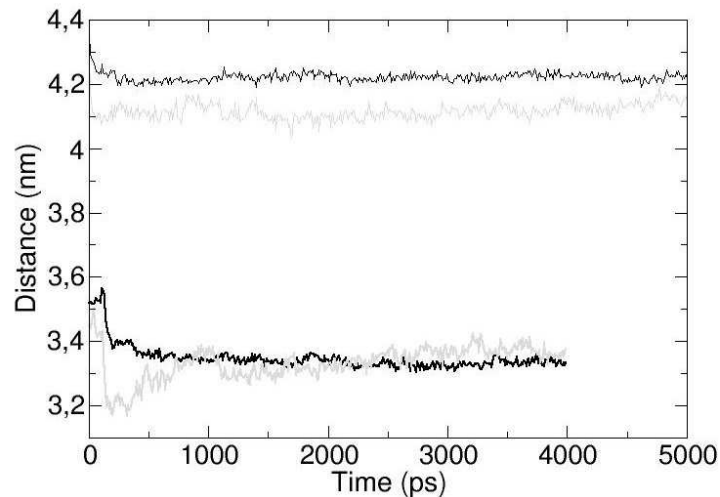


Fig. 11.2: Evolution de l'épaisseur des membranes de POPE et de DMPE, en présence du canal, au cours du temps. En noir le bulk, en gris les lipides proches du canal. Les courbes sur 5ns représentent le POPE, celles sur 4ns le DMPE. Les valeurs moyennes sur les différentes simulations en cut-off isotropique des systèmes lipides+MscL sont représentées ici.

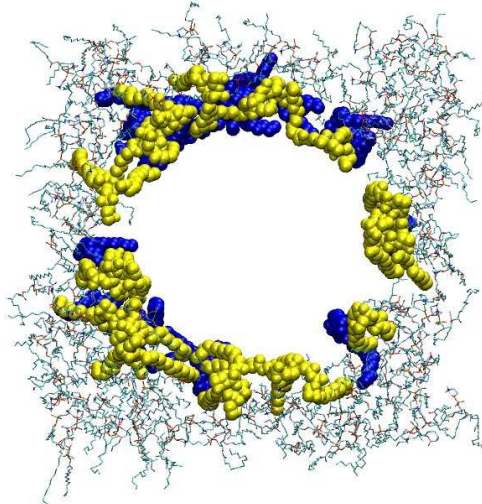


Fig. 11.3: Définition des zones "bulk" et "proche" représentées sur la membrane de DMPE. Les lipides proches sont représentés en Van-der-Waals, bleu et jaune en fonction du feuillet, les lipides du bulk sont représentés en type "line" coloré en fonction du type d'atome.

11.2.1 Epaisseur membranaire

Nous verrons dans le prochain chapitre que l'épaisseur membranaire influe sur la structure du canal qui tend, dans certains cas, à ajuster sa hauteur hydrophobe à celle des lipides. Nous avons vérifié ici si l'inverse était vrai en évaluant l'épaisseur membranaire au cours du temps, dans le bulk et pour les lipides proches du canal (fig. 11.2). Nous avons choisi de déterminer comme lipides "proches" les lipides dont la tête polaire était à moins de 30\AA dans le plan de la membrane du centre de masse du canal (fig. 11.3). La liste des lipides de cette zone est mise à jour à chaque pas de temps, permettant de connaître tout au long de la trajectoire les lipides proches du canal.

Pour la membrane de POPE, on observe que son épaisseur est stable tout au long des simulations. Les lipides proches du canal sont moins épais que ceux du bulk, ce qui correspond à une

légère invagination. Nous avons vu (section 11.1) que l'épaisseur du POPE était légèrement surestimée, elle est donc légèrement supérieure à l'épaisseur d'une membrane physiologique pour le MscL de *E. coli*. Dans ce cas, les interactions favorables entre têtes polaires de lipides et boucles périplasmiques et les interactions défavorables entre chaînes grasses et parties polaires du canal semblent être en faveur d'un réarrangement conformationnel de la membrane plutôt que du canal.

Pour la membrane de DMPE, on observe une diminution d'épaisseur du bulk de 1Å au début de la simulation puis cette valeur reste stable. Pour les lipides proches du canal, l'épaisseur subit une diminution plus importante dans un premier temps (3 Å) puis elle remonte progressivement pour atteindre, au bout d'1 ns, la même épaisseur que le bulk. Lorsque la hauteur du canal diminue, les lipides proches vont d'abord suivre le mouvement pour ensuite reprendre une épaisseur homogène dans toute la membrane. Les interactions défavorables entre chaînes grasses et parties hydrophiles du canal sont en faveur d'un changement conformationnel du canal. Cependant, les interactions favorables entre les têtes polaires et les résidus de la boucle périplasmique vont dans un premier temps impliquer un suivi de la diminution d'épaisseur du canal par la membrane. Puis ces interactions vont être contrebalancées et la membrane va reprendre son épaisseur, limitant ainsi les contacts entre chaînes grasses et parties hydrophiles de la protéine.

11.2.2 Paramètre d'ordre

Nous avons ensuite regardé si le canal influait sur le paramètre d'ordre des lipides (fig. 11.4). Ce paramètre a été calculé en ne tenant pas compte de la première nanoseconde de simulation, afin de ne pas tenir compte du biais induit par l'adaptation des lipides au vide laissé lors de l'insertion du canal.

Pour le POPE, en l'absence du canal, la valeur oscille autour de 0,25 pour la chaîne sn1 et entre 0,28 et 0,30 pour sn2 du côté de la tête polaire. Elle diminue jusqu'à 0,15 et 0,18 à la fin des chaînes. Plus cette valeur est élevée plus la chaîne est ordonnée. Les résultats semblent donc qualitativement en accord avec ce que l'on sait des paramètres d'ordre des lipides. Les chaînes sont plus désordonnées au centre de la bicouche, là où elles ont le plus de liberté de mouvement. La diminution du paramètre d'ordre observée en milieu de chaîne est associée à la double liaison. Les profils ainsi que l'ordre de grandeur sont tout à fait comparables aux valeurs obtenues par simulation (Leekunjorn & Sum, 2007).

Pour le DMPE, en l'absence du canal, l'ordre des chaînes sn1 et sn2 est identique et se situe entre 0,22 du côté des têtes polaires et 0,10 à la fin des chaînes. Les valeurs sont inférieures à celles du POPE, ce qui est en accord avec le fait que des chaînes grasses plus courtes sont plus mobiles. Le profil est toutefois similaire à la chaîne sn2 du POPE, elle aussi saturée. L'ordre de grandeur ainsi que le profil sont en accord avec les valeurs obtenues pour le DMPC qui possède les mêmes chaînes grasses (Sonne *et al.*, 2007).

En présence du canal, on observe une diminution globale du paramètre d'ordre de 0,05 quel que soit le lipide ou la chaîne acyle considéré. Le canal introduit donc un désordre dans les li-

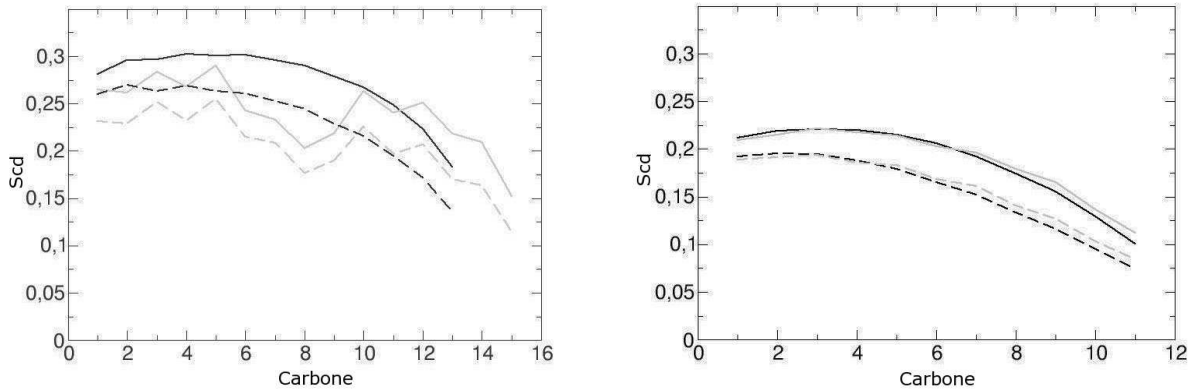


Fig. 11.4: Paramètre d'ordre des lipides avec ou sans présence du canal, à gauche, POPE, à droite DMPE. En gris, la chaîne sn1, en noir sn2. Pour les membranes pures, les courbes sont pleines, pour les membranes en présence du MscL, les courbes sont en pointillés.

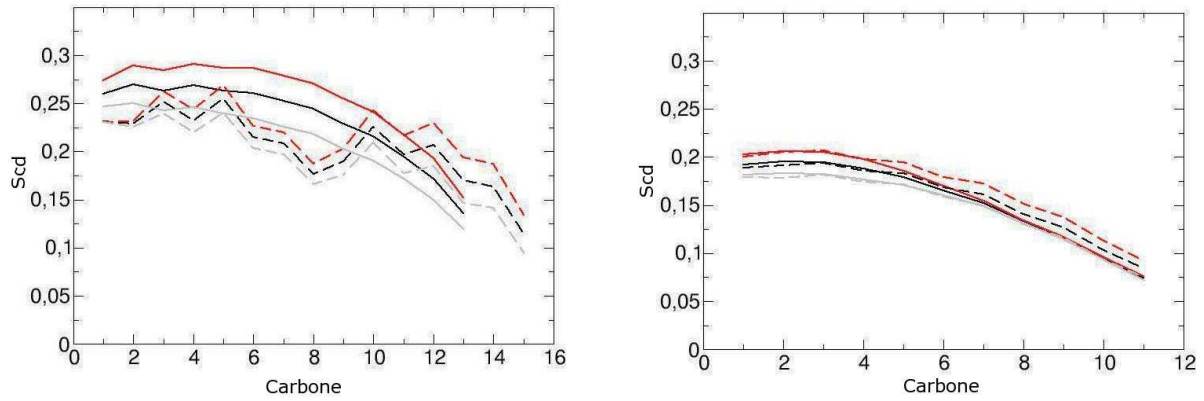


Fig. 11.5: Paramètre d'ordre des lipides en fonction du feuillet, à gauche, POPE, à droite DMPE. En pointillés, la chaîne sn1, en lignes pleines sn2. En noir, l'ensemble des lipides, en rouge le feuillet externe, en gris le feuillet interne.

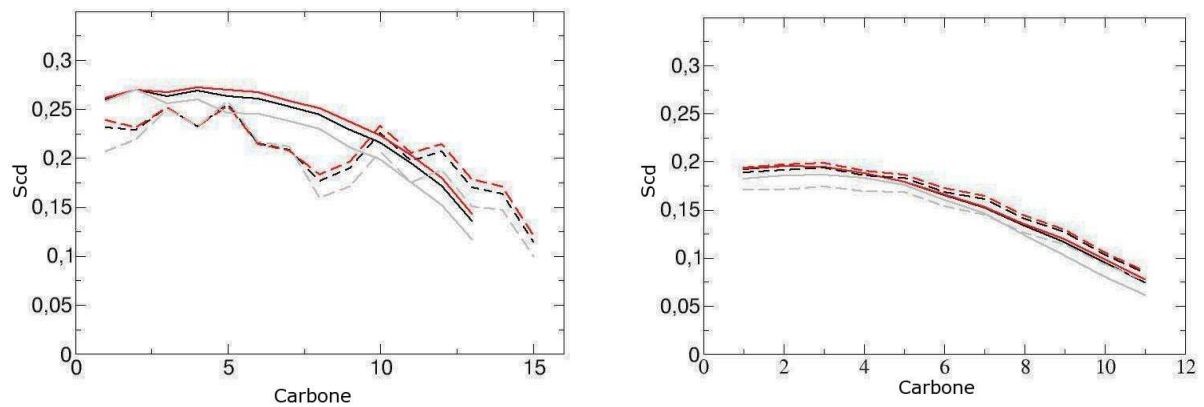


Fig. 11.6: Paramètre d'ordre des lipides en fonction de la proximité au canal, à gauche, POPE, à droite DMPE. En pointillés, la chaîne sn1, en lignes pleines sn2. En noir, l'ensemble des lipides, en rouge le bulk, en gris les lipides proches du canal.

pides, quel que soit leur longueur de chaîne. Cette observation est très intéressante car contraire à ce que l'on aurait pu attendre. En effet, on a tendance à penser que les lipides prendraient une conformation particulière pour interagir avec la protéine et seraient donc plus ordonnés. Ce qui est d'autant plus remarquable, c'est que si l'on regarde le paramètre d'ordre par feuillet (fig. 11.5), on s'aperçoit que l'insertion de la protéine n'affecte quasiment que le feuillet interne, les valeurs pour le feuillet externe étant similaires aux valeurs pour des membranes pures (dont les feuillets interne/externe sont indistingables par leur composition mais aussi par leur ordre). Ceci peut s'expliquer par l'asymétrie de structure du canal au sein de la membrane, par exemple par la boucle périplasmique en contact avec le feuillet externe uniquement. Les contacts avec les deux feuillets ne sont alors pas similaires.

Il est également probable que le canal affecte aussi différemment les lipides qui lui sont proches et les lipides du bulk, les interactions courte distance étant plus fortes. La définition des lipides proches est approximative dans ce cas, car elle est déterminée une seule fois sur la structure initiale. Or les lipides diffusent dans la membrane, ils ne restent pas au contact du canal tout au long de la simulation. Toutefois, on peut voir que le canal affecte différemment les lipides de ces zones (fig. 11.6). Ce phénomène est plus important dans la membrane de POPE que dans celle de DMPE. La présence de la protéine induit plus de désordre pour les lipides qui lui sont proches, spécialement au niveau des extrémités des chaînes grasses, que pour ceux du bulk.

11.2.3 Coefficient de diffusion

Nous nous sommes aussi intéressés à la diffusion des lipides. Est-ce que la présence de la protéine affecte cette diffusion, par exemple, en créant des contacts avec les lipides proches, limitant ainsi leurs mouvements dans le plan de la membrane? Afin d'être sûr de ne pas tenir compte du temps nécessaire aux lipides pour s'adapter au vide laissé autour de la protéine lors de son insertion, la première nanoseconde de simulation n'est pas prise en compte dans les calculs. La figure 11.7 présente un exemple, pour chaque membrane contenant le canal, des coefficients de diffusion par lipide. Il permet de mettre en évidence les différences de diffusion d'un lipide à l'autre au sein d'une même membrane. La table 11.2 présente les valeurs moyennes de diffusion pour différents groupes de lipides définis plus haut.

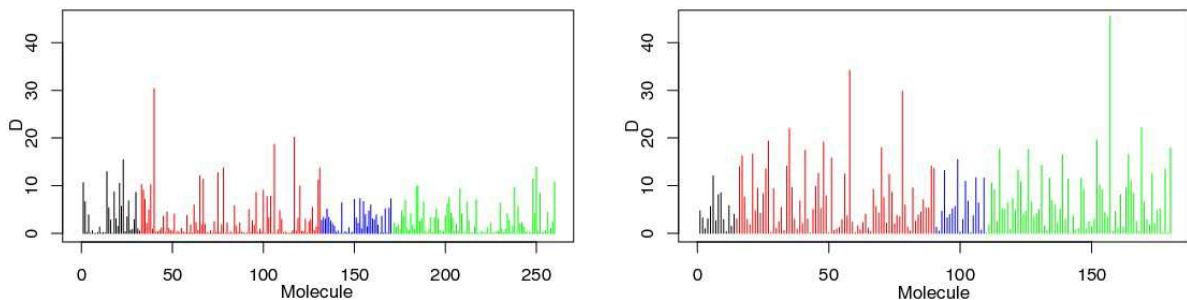


Fig. 11.7: Coefficient de diffusion des lipides ($10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) à gauche pour le POPE, à droite pour le DMPE. En noir, les lipides proches du canal du feuillet externe, en rouge le bulk du feuillet externe, en bleu les lipides proches du canal du feuillet interne, en vert le bulk du feuillet interne. Les valeurs sont données pour une simulation de chacun des systèmes.

	POPE	DMPE		POPE	DMPE
pure	1.67	4.17	totale	3.14	6.71
externe	2.83	7.24	ext. proche	2.81	6.31
interne	2.46	5.91	ext. bulk	2.83	7.41
proche	2.52	5.67	int. proche	2.28	5.20
bulk	2.69	6.78	int. bulk	2.53	6.10

Tab. 11.2: Coefficient de diffusion des lipides ($10^{-5}cm^2.s^{-1}$). Les valeurs moyennes sur l'ensemble des lipides du groupe et sur les différentes simulations sont données.

La première remarque est que les valeurs de coefficient de diffusion observées sont bien supérieures aux valeurs mesurées pour des systèmes modèles : pour une bicouche pure de DMPC en phase gel, le coefficient de diffusion est de $5.10^{-8}cm^2.s^{-1}$ (Shechter, 2000), soit 10^3 fois inférieur à ce que l'on observe. Ce problème de diffusion a déjà été soulevé dans de précédentes études (Tieleman *et al.*, 1997; Lindahl, 2001) et est lié à un temps de simulation trop court. Cette mesure permet néanmoins d'évaluer des différences de comportement entre deux membranes pour des temps de simulation identiques.

Ce que l'on peut observer dans ce cas, c'est que le canal, n'a pas le même effet sur les lipides qui lui sont proches que sur le bulk, ni le même effet sur les lipides des deux feuilletts. Dans des systèmes modèles purs, la diffusion est identique d'un feuillet à l'autre (Shechter, 2000). Comme pour le paramètre d'ordre, cette différence peut s'expliquer par l'asymétrie de structure du canal au sein de la membrane ainsi que par des interactions courte distance plus fortes.

La présence du MscL perturbe donc la structure des membranes qui l'entourent. La balance entre changements conformationnels et interactions polaire-apolaire mène, en fonction du type de lipide, soit à un changement structural de la membrane, entraînant une augmentation de sa fluidité, soit à un changement structural de la protéine.

Chapitre 12

Influence de l'épaisseur membranaire sur la dynamique du canal MscL de *E. coli*

Dans ce chapitre, nous verrons l'influence de l'épaisseur membranaire sur la structure du canal mécanosensible MscL. Nous avons ici étudié le canal de *E. coli* dans des membranes pré-équilibrées de POPE et de DMPE. Ce travail est basé sur les résultats de Perozo *et al.* (2002b), selon lesquels la diminution d'épaisseur membranaire permet d'obtenir un intermédiaire structural le long du chemin d'ouverture et de diminuer la barrière énergétique d'ouverture. Deux grands axes ont été utilisés ici pour répondre à deux questions : “Quels sont les effets de la membrane sur le canal ?” et “Les mouvements induits sont-ils intrinsèques ?”. Ce chapitre est donc découpé en deux grandes parties.

Dans la première partie, le comportement de la structure modèle proposée par Valadié *et al.* (2003), insérée dans les membranes, sera détaillé. Il est à noter qu'une partie des résultats présentés ici reprend des simulations effectuées par Hélène Valadié lors de sa thèse (Valadié, 2003) et par Andreas Stadler, stagiaire au laboratoire (Stadler, 2003).

Dans la seconde partie, les mouvements principaux obtenus par analyse en composante principale des ces trajectoires seront comparés aux mouvements obtenus par analyse de mode normaux de la structure du canal.

L'ensemble du travail présenté ici a donné lieu à un article¹.

12.1 Influence des bicouches lipidiques sur le canal MscL

12.1.1 Stabilité du MscL de *E. coli* dans du POPE

Le MscL, privé du domaine Cterminal, a été simulé dans une membrane équilibrée de POPE. Le positionnement de la protéine dans la membrane, initialement défini par les résidus L86 et I87 à l'interface entre les deux feuillets, reste stable tout au long des simulations (fig. 12.1). Les contacts entre les têtes polaires des lipides et les boucles périplasmiques et les extrémités

¹Debret, G, Valadié, H, Stadler, A M, & Etchebest, C. 2007. New insights of membrane environment effects on MscL channel mechanics from theoretical approaches, *Proteins*, (In press)

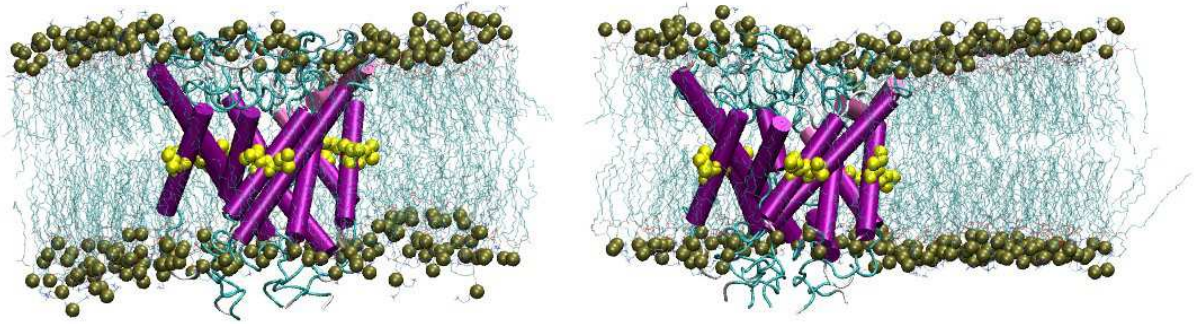


Fig. 12.1: Eco-MscL dans POPE en début ($t=0\text{ps}$) et fin ($t=5\text{ns}$) d'une simulation. La protéine est représentée en type cartoon, colorée selon sa structure secondaire. Les résidus L86 et I87 sont représentés en Van-der-Waals jaune. Les lipides sont en transparence et les atomes P sont en Van-der-Waals.

N- et Cterminales sont conservées tout au long des simulations. La région transmembranaire ne subit pas de réarrangement significatif. Ces différents points confirment un placement approprié de la protéine par rapport à la membrane et au solvant.

Les caractéristiques étant similaires d'une simulation à l'autre, seules les moyennes pour les différents paramètres seront décrites par la suite.

La structure du canal reste relativement stable durant les simulations, comme l'illustre le RMSd des atomes $C\alpha$ (fig. 12.2.a). Après 3,5 ns, le RMSd atteint un plateau de 3,8 Å. Chaque région de la protéine contribue différemment à cette valeur : comme attendu, les boucles périplasmiques contribuent à la majeure partie de la déviation (3,5 Å), tandis que les hélices TM1 et TM2 ne dévient que de 2,5 Å de la conformation initiale. De telles valeurs de RMSd ont déjà été observées pour le MscL de *M. tuberculosis* (Gullingsrud *et al.*, 2001; Elmore & Dougherty, 2001) et pour d'autres protéines membranaires (Capener *et al.*, 2000; Sotomayor & Schulten, 2004), dans des environnements membranaires, utilisant différents protocoles. Les écarts-type (non représentés) sont faibles, c'est à dire que les valeurs sont stables d'une simulation à l'autre.

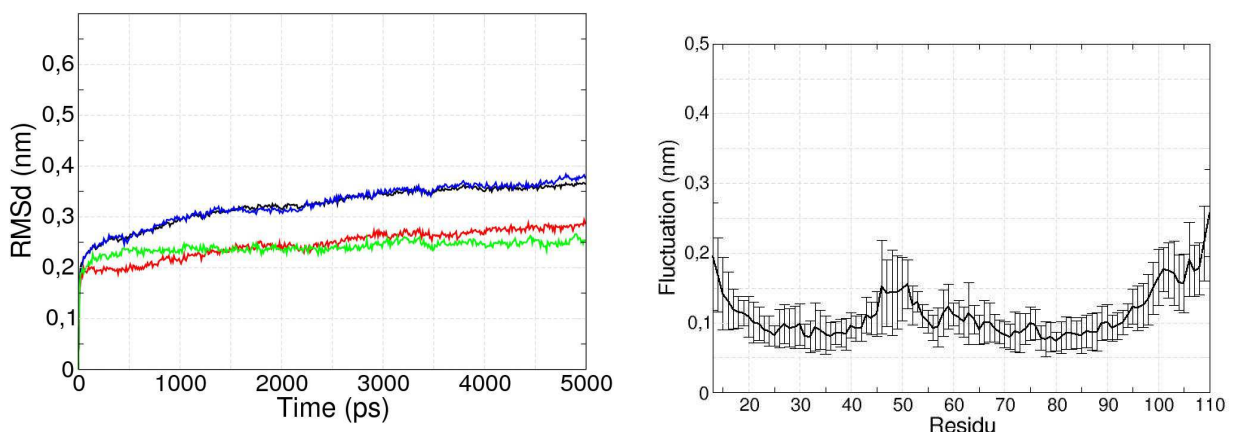


Fig. 12.2: a) Moyenne du RMSd sur les $C\alpha$ du MscL dans du POPE. En noir, sur l'ensemble de la protéine, en bleu les boucles périplasmiques, en rouge les hélices TM1 et en vert les hélices TM2. b) RMSF sur les $C\alpha$ du MscL dans du POPE. La moyenne sur les simulations et les monomères est représentée avec les déviations standards.

La figure 12.2.b montre le profil de fluctuations du canal. On observe des différences d'amplitude montrant une perte de symétrie du canal. Toutefois, les profils restent les mêmes pour les différents monomères. Les fluctuations les plus significatives se situent essentiellement au niveau de la partie Ncap de la boucle périplasmique et des extrémités N- et Cterminales.

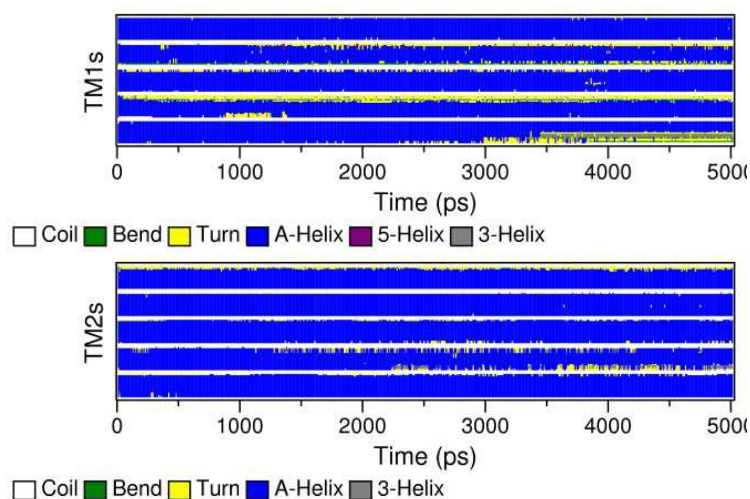


Fig. 12.3: Représentation des structures secondaires de hélices TM1 et TM2 du MscL au cours du temps dans une des simulations dans du POPE.

L'analyse des structures secondaires (fig. 12.3) au cours de la simulation confirme la stabilité des hélices transmembranaires, qui restent largement repliées en hélices α . Quelques pertes de structure secondaire peuvent parfois être tout de même observées dans les extrémités des hélices, probablement en raison de l'absence d'ancrage due à l'absence de structures N- et Cterminales.

Ces analyses montrent que malgré de légers réarrangements, la structure reste stable dans une membrane de POPE. Le choix d'une membrane de POPE pour mimer l'environnement du canal était donc justifié. Ces résultats confirment aussi la stabilité du modèle construit.

12.1.2 Changements conformationnels dans du DMPE

Le canal a été placé dans la membrane suivant le même protocole que dans POPE. Quelque soient les simulations, les deux résidus de référence L86 et I87 restent globalement au centre de la membrane (fig. 12.4).

Un grand nombre de simulations a été réalisé sur ce système pour évaluer l'influence putative des conditions de simulation sur les résultats, menant à plus de 50 ns de temps cumulé. Même si des différences existent entre les simulations, le comportement global du système reste similaire. Comme précédemment, les moyennes sont donc présentées ici.

Contrairement aux simulations dans le POPE, de larges réarrangements structuraux peuvent être observés dans le DMPE, comme l'indiquent les valeurs de RMSd sur les $C\alpha$ (fig. 12.5.a) atteignant plus de 6 Å. L'analyse des contributions de chaque domaine confirme les différences avec les simulations dans du POPE. Les déviations sont plus grandes pour chaque domaine et spécialement pour les hélices transmembranaires. Le profil de fluctuation le long de la séquence (fig. 12.5.b) montre un profil similaire à celui dans le POPE mais avec des valeurs plus impor-

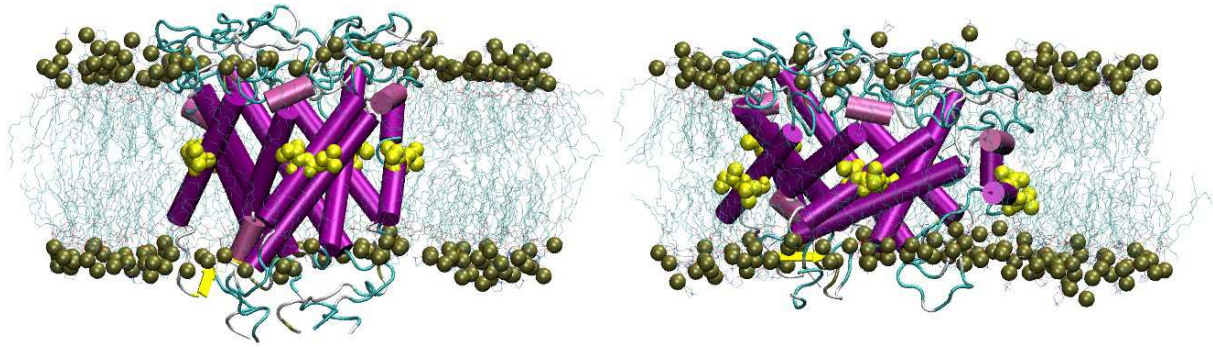


Fig. 12.4: Eco-MscL dans DMPE en début ($t=0\text{ps}$) et fin ($t=4\text{ns}$) d'une simulation. La protéine est représentée en type cartoon, colorée selon sa structure secondaire. Les résidus L86 et I87 sont représentés en Van-der-Waals jaune. Les lipides sont en transparence et les atomes P sont en Van-der-Waals.

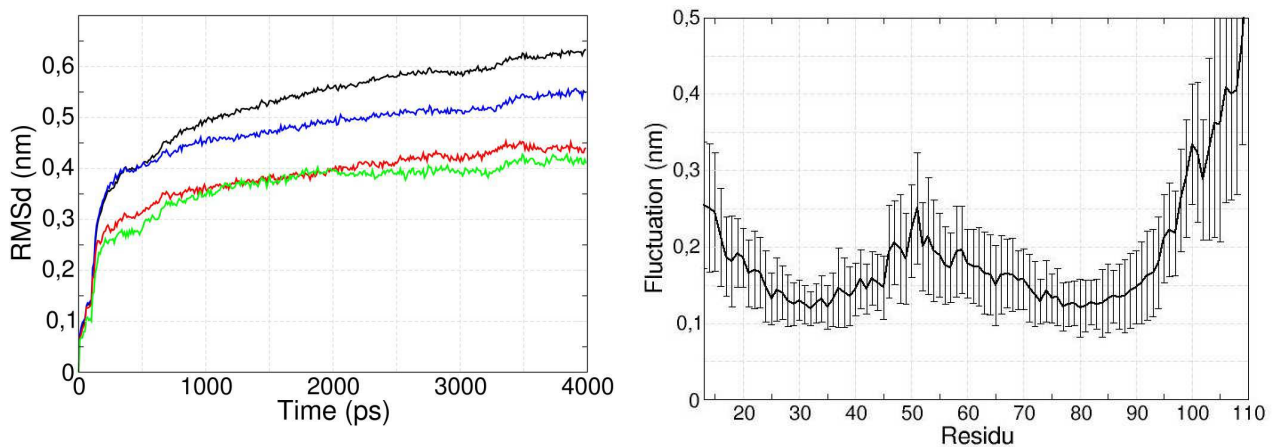


Fig. 12.5: a) Moyenne du RMSd sur les $C\alpha$ du MscL dans du DMPE. En noir, sur l'ensemble de la protéine, en bleu les boucles périplasmiques, en rouge les hélices TM1 et en vert les hélices TM2. b) RMSF sur les $C\alpha$ du MscL dans du DMPE. La moyenne sur les simulations et les monomères est représentée avec les déviations standards.

tantes. La variabilité de fluctuation d'un monomère est aussi plus importante que dans le POPE, appuyant d'autant plus la perte de symétrie du canal.

Ces grands changements structuraux viennent clairement du changement d'environnement, et donc de la diminution d'épaisseur membranaire. Certaines régions de la protéine sont soumises à des environnements physico-chimiques différents. Par exemple, les extrémités des hélices transmembranaires sont en contact avec un milieu polaire. Ceci va entraîner des mouvements au sein de la structure pour réduire ces contacts défavorables. Il faut noter que la majorité des structures secondaires est conservée malgré des cassures localisées principalement au centre des TM1 (fig. 12.6), indiquant une perturbation des liaisons hydrogènes, concomittant avec la formation d'un coude au sein de l'hélice (voir section 12.1.4).

12.1.3 Inclinaison des hélices

Nous avons analysé différents critères géométriques pour mieux comprendre la nature des modifications entraînées par la diminution d'épaisseur membranaire. L'angle d'inclinaison des

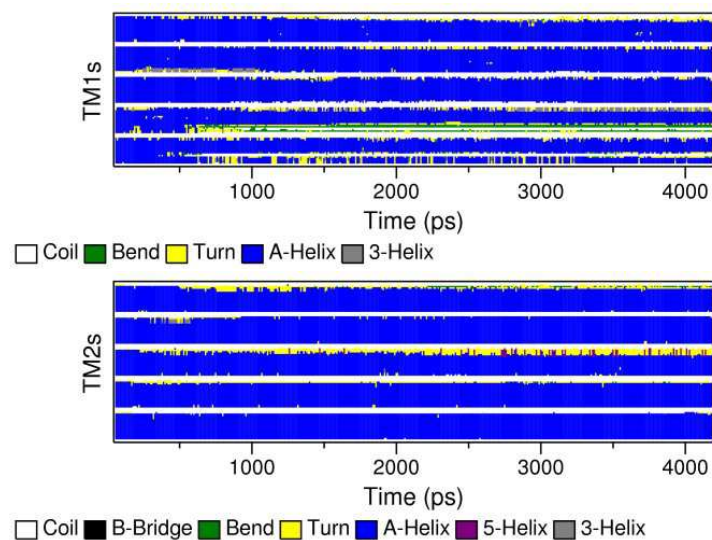


Fig. 12.6: Représentation des structures secondaires de hélices TM1 et TM2 du MscL au cours du temps dans une des simulations dans du DMPE.

hélices (ou tilt) est défini comme l'angle entre la normale à la membrane et l'axe d'inertie de l'hélice considérée (fig. 12.7). Il est connu que ce critère est lié à l'épaisseur membranaire (Park & Opella, 2005). En effet, l'angle moyen de tilt augmente fortement de 35° à 50° pour les TM1 et de 35° à 45° pour les TM2 dans le DMPE.

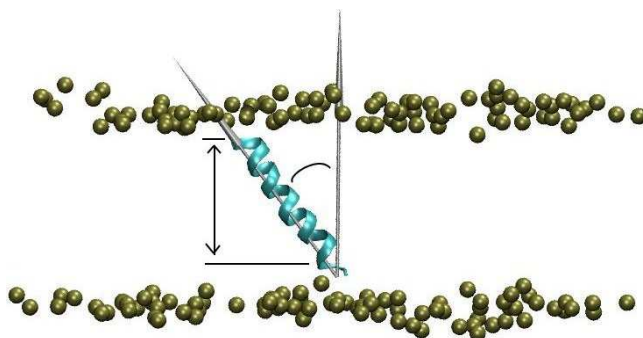


Fig. 12.7: Représentation de l'angle d'inclinaison et de la hauteur des hélices.

Pour nous permettre de mieux corrélérer cette valeur à l'épaisseur membranaire et pouvoir observer le positionnement des boucles périplasmiques, nous avons choisi de représenter la hauteur des hélices transmembranaires, c'est à dire la distance entre les extrémités de l'hélice projetée sur la normale à la membrane (fig. 12.8).

Dans le POPE, la hauteur des hélices transmembranaires ainsi que le positionnement de la boucle et l'épaisseur de la membrane sont stables au cours du temps et peu de variations sont observables d'une simulation et d'un monomère à l'autre.

Dans le DMPE, la hauteur des hélices transmembranaires diminue fortement ($\sim 3\text{\AA}$) dans les premiers instants de la simulation. La distance de la boucle par rapport aux extrémités opposées des hélices transmembranaires diminue aussi fortement. Ceci est lié à un abaissement de leur point d'ancrage, lié à l'inclinaison des hélices mais aussi d'un changement conformationnel au sein même de la boucle.

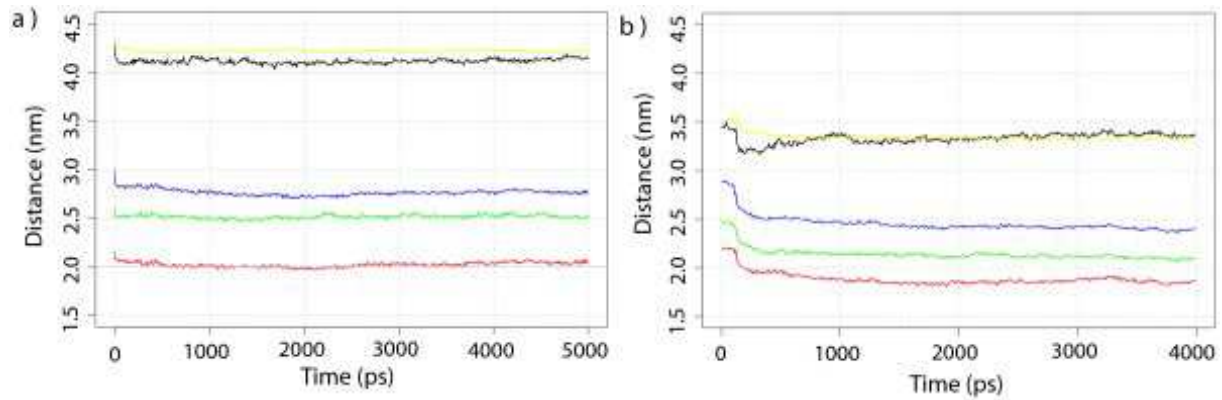


Fig. 12.8: Evolution de la hauteur des hélices transmembranaires, du positionnement de la boucle et de l'épaisseur membranaire au cours des simulations a) dans du POPE, b) dans du DMPE. Les valeurs moyennes sur les simulations sont représentées ici. En noir les lipides au contact du canal, en jaune les lipides du bulk, en bleu la boucle périplasmique, en rouge les hélices TM1 et en vert les hélices TM2.

12.1.4 Cassure des hélices

Les angles de tilt décrits ci-dessus sont calculés en considérant les hélices comme des corps rigides et en calculant l'axe d'inertie du cylindre ainsi formé. Il en est de même pour la hauteur des hélices. Les hélices sont en fait flexibles et déformables. La plupart des déformations sont liées à des cassures locales au niveau des structures secondaires. L'angle formé au sein de l'hélice a donc été calculé (fig. 12.9)

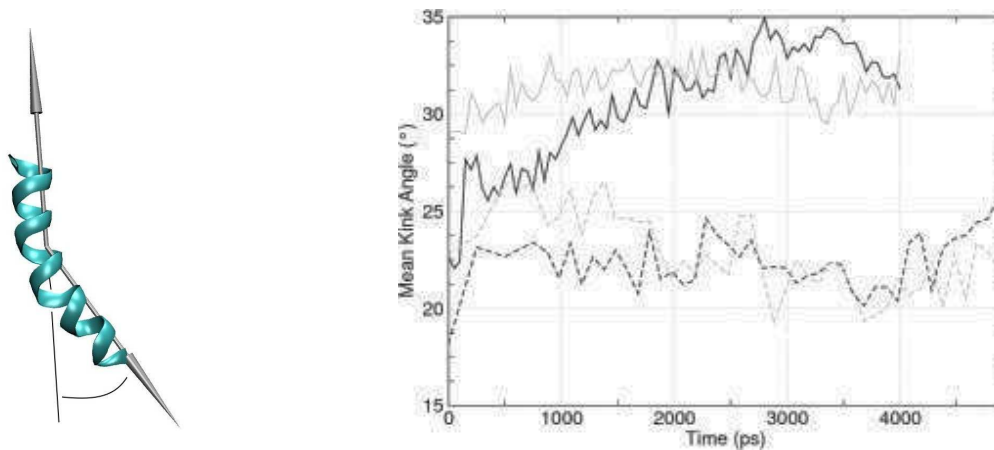


Fig. 12.9: Evolution de l'angle de cassure des hélices transmembranaires. Les valeurs moyennes sur les monomères et simulations sont présentées. En pointillé : dans le POPE, en lignes pleines : dans le DMPE. En noir : hélices TM1, en gris : hélices TM2.

Un coude peut être observé tout au long des simulations, aussi bien dans le POPE que dans le DMPE pour les hélices TM1 et TM2. Dans le POPE, les valeurs d'angle restent assez stables au cours du temps, ne dépassant pas 25° . Dans le DMPE, les valeurs des angles sont supérieures à celles du POPE (supérieure de 10° en fin de simulations), mais ce qui est le plus notable est l'augmentation significative pour les hélices TM1. Une grande différence entre POPE et DMPE réside aussi dans la variabilité. La valeur d'angle de kink peut atteindre jusqu'à 68° pour certains monomères dans les simulations dans du DMPE.

Lorsque l'on regarde le positionnement du point cassure des hélices, on s'aperçoit qu'il se situe au niveau de G30 dans plus de 70% des cas. Ce résidu très flexible se situe à côté du résidu fonctionnellement important K31 (Blount *et al.*, 1997; Levin & Blount, 2004; Li *et al.*, 2004) et est lui-même sujet à de nombreuses mutations entraînant un changement de phénotype.

La question que l'on peut se poser est "cette pliure des hélices entraîne-t-elle une cassure des liaisons hydrogènes au sein des hélices?". Lorsque l'on regarde l'évolution des structures secondaires au cours du temps (fig. 12.3 et 12.6), on s'aperçoit que quel que soit la membrane (POPE ou DMPE) les hélices TM2 ne subissent pas de cassure des liaisons hydrogènes, ce qui n'est pas le cas pour les TM1. Nous définirons donc comme courbure de l'hélice une déformation n'entraînant pas de cassure dans le faisceau de liaison hydrogène, en opposition à cassure de l'hélice lorsque des cassures du faisceau de liaisons hydrogènes peuvent être observées. On observe au cours des simulations une courbure des hélices TM2 et une cassure des hélices TM1, ce qui est en accord avec les observations de Valadié *et al.* (2003). Les changements conformationnels des hélices transmembranaires, permettant de minimiser les contact défavorables entre extrémités des hélices et milieu polaire, sont donc une association entre inclinaison et pliure des hélices entraînant une diminution de leur hauteur au sein de la membrane.

12.1.5 Rotation des hélices

Les hélices TM2 ne subissent pas de cassure des liaisons hydrogènes. Bien que subissant une courbure, leur structure reste donc très stable et solide. En terme de rotation autour de l'axe d'inertie, elles peuvent donc être considérées comme un bloc unique subissant une même rotation axiale. En ce qui concerne les TM1, la cassure des liaisons hydrogènes de certaines de hélices permet une relative indépendance de rotation axiale entre les deux sous-hélices situées de part en part du point de cassure. Les hélices TM1 sont donc considérées comme deux blocs distincts (Ncap-TM1 et Ccap-TM1).

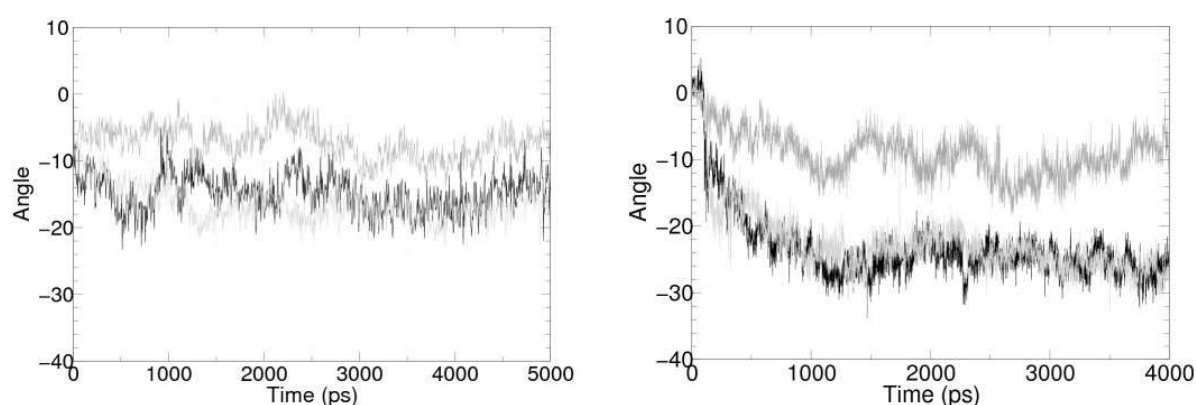


Fig. 12.10: Rotation des hélices au cours du temps dans le POPE (gauche) et le DMPE (droite). En gris foncé : V23 (Ncap-TM1), en noir : L36 (Ccap-TM1), en gris clair : I87 (TM2). Les valeurs moyennes sur les simulations et monomères sont représentées.

La rotation axiale d'un résidu appartenant à chacun des blocs prédéterminés a été calculée (fig. 12.10). Dans le POPE, on observe une rotation horaire de 10° des hélices transmembranaires (légèrement moins pour l'hélice Ncap-TM1) dans les tous premiers temps de la simulation puis

leur orientation reste stable au cours de la simulation. Dans le DMPE, on observe une rotation progressive sur la première nanoseconde de 30° de l'hélice TM2 et de l'hélice Ccap-TM1. La rotation de l'hélice NcapTM1 est plus faible ($\sim 10^\circ$). Il y a donc bien indépendance de mouvement entre les deux parties de l'hélice TM1, ce qui pourrait expliquer l'absence de changements de résidus exposés à la lumière du pore dans la partie supérieure de l'hélice TM1, associé à un changement dans la partie inférieure, observés par les expériences de SCAM (Bartlett *et al.*, 2004).

Les résultats obtenus ici soutiennent l'hypothèse de Perozo *et al.* (2002a) selon laquelle les hélices subiraient une rotation horaire lors de l'ouverture bien que les valeurs d'angle observées soient bien inférieures à celles obtenues expérimentalement lors d'une ouverture complète du canal.

12.1.6 Elargissement du canal

Les mouvements subis par les hélices transmembranaires affectent les dimensions du canal. Son rayon de gyration dans le plan de la membrane (fig. 12.11) augmente de plus de 12% dans le DMPE mais reste stable dans le POPE. Cet élargissement global est en accord avec un mouvement d'ouverture similaire à celui proposé par Sukharev *et al.* (2001b) bien que celui que nous observons soit très en deçà de ce qui serait nécessaire pour obtenir un canal complètement ouvert.

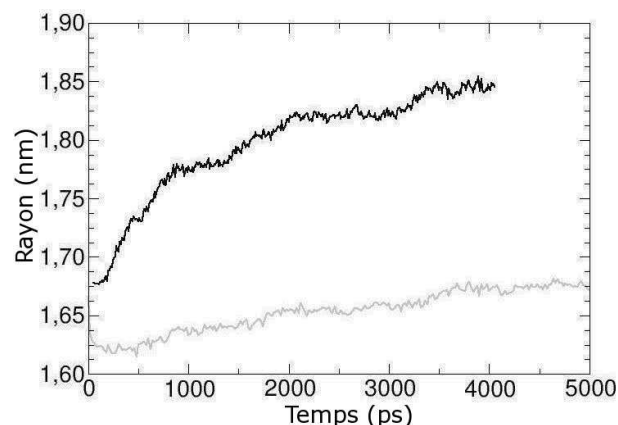


Fig. 12.11: Evolution du rayon de gyration du canal dans le plan de la membrane. Les valeurs données sont des moyennes sur les simulations : en gris dans le POPE, en noir dans le DMPE.

12.1.7 Profil du pore

L'ensemble des résultats précédents (inclinaison, rotation et cassure des hélices, diminution de la hauteur du canal et élargissement de son diamètre) vont dans le sens d'un mouvement d'ouverture du canal. La question que l'on se pose alors est "Le canal est-il ouvert?". D'une manière très intéressante, bien que les paramètres étudiés précédemment évoluaient de manière similaire d'une simulation à l'autre, le profil du pore obtenu en fin de chacune de ces simulations est très différent (fig. 12.12). Dans deux cas sur trois, le diamètre minimal du pore diminue très légèrement et la région de constriction se rapproche de l'extrémité cytoplasmique du pore. Dans

la dernière simulation, la région de constriction s'élargit pour conduire à un pore de diamètre similaire ($\sim 8 \text{ \AA}$) sur toute sa hauteur.

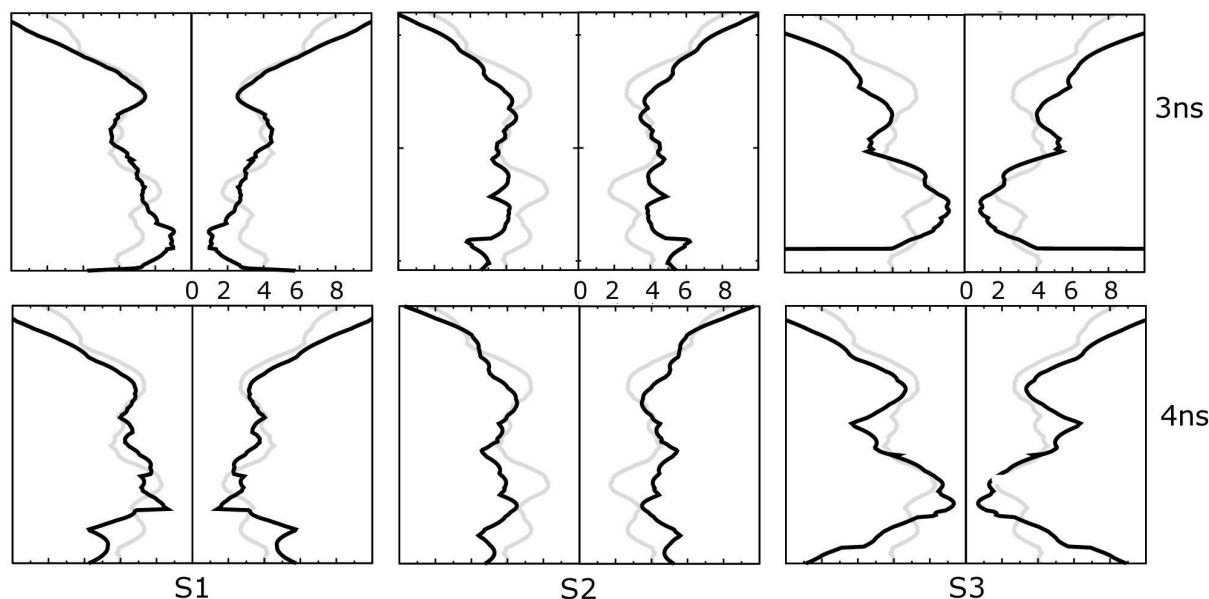


Fig. 12.12: Evolution du profil du pore dans le DMPE. Trois exemples sont présentés ici, en noir, le profil en fin de simulation, en gris celui en début de simulation, en haut à 3 ns, en bas à 4 ns.

12.1.8 Contributions énergétiques

La figure 12.13 présente les énergies entre les différents domaines de la protéine entre eux et avec l'environnement. Bien que les valeurs ne soient pas comparables car les systèmes sont différents, on peut analyser les tendances et les profils de variation.

Dans le POPE, après les 500 ps, la plupart des termes sont extrêmement stables, particulièrement les contributions internes qui stabilisent la structure du canal (TM1-TM1, TM1-TM2, TM1-boucle, TM2-TM2, TM2-boucle et boucle-boucle). Seuls les termes liés à l'interaction avec l'environnement augmentent légèrement. L'environnement s'adapte progressivement au canal sans perturber sa structure. Ceci confirme la stabilité de la structure et la validité du modèle. Dans le DMPE, malgré les changements conformationnels observés, les interactions qui stabilisent le canal sont maintenues. En particulier les interactions entre les domaines transmembranaires sont relativement stables. Les changements principaux sont liés aux termes impliquant la boucle périplasmique. Par contre, de grands changements sont observés pour les interactions entre le canal et la membrane, tout au long des simulations. Les interactions entre la membrane et les régions transmembranaires ou les boucles sont renforcées au détriment des interactions avec le solvant. Les interactions entre solvant et hélice TM1 restent stables, l'ouverture du pore et l'enfouissement du canal dans la membrane se compensant dans le terme énergétique.

12.1.9 Mouvements d'ouverture ?

Bien que la structure proposée dans le modèle d'ouverture du canal de Sukharev *et al.* (2001b) soit différente de la structure utilisée ici, les mouvements décrits sont similaires : in-

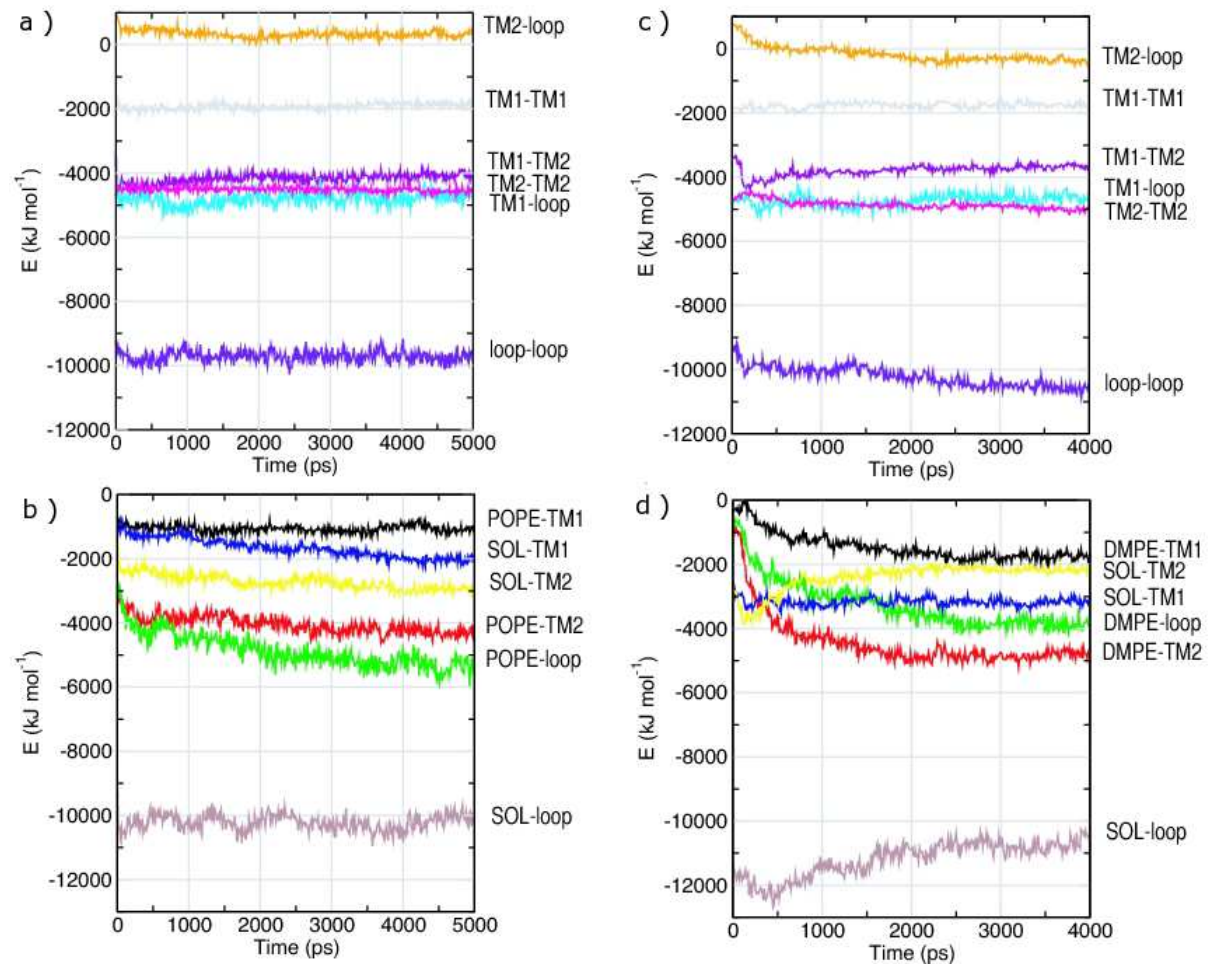


Fig. 12.13: Evolution des énergies moyennes d'interaction le long des simulations de POPE (gauche) et DMPE (droite). a), c) interactions entre sous-domaines, b), d) interactions entre sous-domaines et environnement. Les moyennes sont faites sur les monomères et simulations.

clinaison des hélices, élargissement du diamètre global du canal, ouverture du pore composé uniquement des hélices TM1. Toutefois, les résultats obtenus ici sont en faveur d'une rotation des hélices, comme le suggèrent Perozo *et al.* (2002a). De plus, la cassure de certaines hélices transmembranaires soutient l'hypothèse des hélices non corps rigide soutenue par Valadié *et al.* (2003). Les contributions énergétiques ainsi que les fortes déviations observées dans les boucles périplasmiques suggèrent une importance de cette région dans la dynamique du canal, qui n'est pas du tout mise en évidence dans le modèle d'ouverture proposé mais qui a été soulignée à de nombreuses reprises (Park *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2006).

Les mouvements que nous observons dans la membrane de DMPE sont donc des mouvements d'ouverture mais ne permettent pas d'obtenir un canal complètement ouvert. La structure obtenue est un intermédiaire structural le long du chemin d'ouverture. Nous avons donc réussi à reproduire les effets d'une diminution d'épaisseur membranaire décrits expérimentalement par Perozo *et al.* (2002b), mais avec un niveau de résolution plus élevé.

Elmore & Dougherty (2003) avaient déjà tenté de simuler le canal dans des membranes d'épaisseur variable, mais n'avaient pas réussi à obtenir de mouvements d'ouverture. Cependant, ils étudiaient le canal de *M. tuberculosis*, incluant le domaine cytoplasmique et avaient choisi de simuler une

diminution graduelle de la membrane, diminuant progressivement au cours des simulations la taille des chaînes grasses des lipides. Le fait que le canal de *E. coli* soit plus facile à ouvrir (Maurer *et al.*, 2000) et que nous ayons simulé dans des membranes pré-équilibrées, se rapprochant plus des conditions expérimentales (Perozo *et al.*, 2002b), sont deux explications possibles des différences de résultats observés.

12.1.10 Observations et choix des paramètres

On peut se demander dans quelle mesure le choix des paramètres de simulation influencent les résultats observés. Nous avons effectué de nombreuses simulations dans différentes conditions (modification des vitesses initiales, de la température, des contraintes de structures secondaires, du traitement électrostatique, du couplage à la pression). Dans tous les cas, nous observons des résultats similaires et les conclusions quant à la réponse au mésappariement hydrophobe sont semblables. La différence observée entre ces simulations est le temps nécessaire pour atteindre un plateau mais les tendances et amplitudes sont similaires. Le choix des paramètres n'a donc pas d'influence sur les conclusions tirées.

12.2 Les Mouvements induits sont-ils intrinsèques ?

12.2.1 Analyse en composantes principales des trajectoires

L'analyse en composantes principales permet de souligner les mouvements concertés de grande amplitude. Les différentes trajectoires dans chaque environnement ont été concaténées et analysées de cette façon. Nous nous sommes intéressés aux déplacements des C α pour mieux comprendre les mouvements globaux.

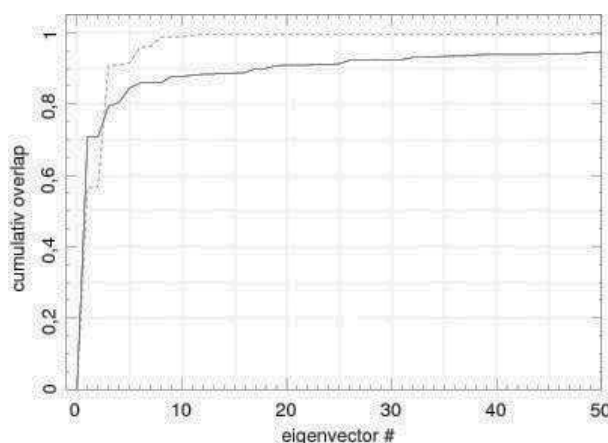


Fig. 12.14: Participation cumulée des vecteurs propres issue de l'analyse en composantes principales au mouvement global dans les trajectoires, dans le POPE (lignes pleines) et dans le DMPE (pointillés).

Dans le POPE, les 10 premiers vecteurs propres de l'analyse en composantes principales contribuent à plus de 85% du mouvement global, la plus grande contribution étant due au premier vecteur, qui concentre plus de 70% du mouvement total de la protéine (fig. 12.14). Les mouvements associés à ce vecteur concernent principalement les extrémités N- et Cterminales,

ainsi que les boucles périplasmiques dans une moins grande mesure (fig. 12.15). Les hélices transmembranaires restent très stables. Ceci illustre que sur cette échelle de temps, le MscL ne présente pas de grands mouvements concertés dans le POPE.

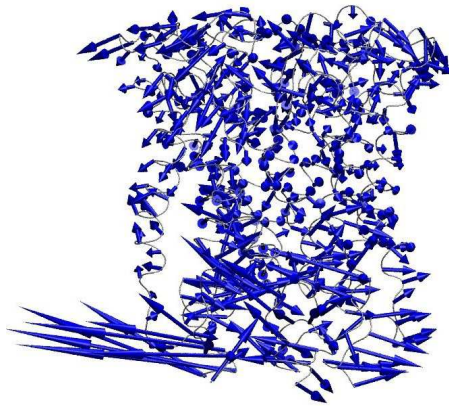


Fig. 12.15: Mouvements associés au 1er vecteur propre dans le POPE. La structure du canal est représentée en tubes gris et les mouvements sont représentés par des flèches indiquant la direction et proportionnelles à l'amplitude. Vue de côté et de dessous (côté cytoplasmique).

Dans le DMPE, 98% du mouvement global peut être décrit avec seulement 4 vecteurs propres, les vecteurs 1 et 3 contribuant respectivement à 55% et 35%. L'amplitude de mouvement associée avec ces deux vecteurs est légèrement plus grande que celle du premier vecteur issu de l'analyse en composantes principales des trajectoires dans du POPE (fig. 12.16) et largement plus grande que les suivants.

Malgré le fait que les régions concernées par les mouvements dans les premiers vecteurs propres de POPE et DMPE (c'est à dire les extrémités N- et Cterminales et moindrement les boucles périplasmiques) soient les mêmes, le type de mouvements est différent. Dans le DMPE, les extrémités cytoplasmiques montent vers la membrane tandis que les boucles descendent et tendent à s'enfouir à l'intérieur du pore (fig. 12.17). Contrairement au POPE, les régions transmembranaires subissent des directions de mouvement vers l'extérieur et semblent engendrer une inclinaison des hélices (les extrémités cytoplasmiques remontent les périplasmiques descendent). Les mouvements mènent principalement à une compression verticale grâce à une inclinaison des hélices et un élargissement dans le plan de la membrane du canal. Ceci illustre le fait que les déformations touchant le canal sont principalement des mouvements d'ouverture.

Dans le but de mieux caractériser les similarités et les différences de comportement dans chaque environnement, nous avons comparé les directions de mouvements en projetant les vecteurs propres calculés dans le POPE (POPE-PCA) et dans le DMPE (DMPE-PCA). De grandes valeurs de projection indiquent des similarités dans les mouvements concertés du canal dans les deux membranes. Aussi, nous pouvons déduire quels sont les mouvements associés putativement intrinsèques, c'est à dire ne dépendant pas de l'environnement.

La figure 12.18.a montre les valeurs de projection entre les 30 premiers vecteurs propres. Le plus grand recouvrement est de 0,33 et est obtenu entre DMPE-PCA v3 (3ème vecteur propre) et POPE-PCA v4 (4ème vecteur propre). Leur collectivité est respectivement de 43% et 46%, c'est à dire que la moitié des résidus est significativement affectée. Les mouvements décrits sont assez similaires (fig. 12.18.b) et correspondent à un enfouissement des boucles associé à un tilt

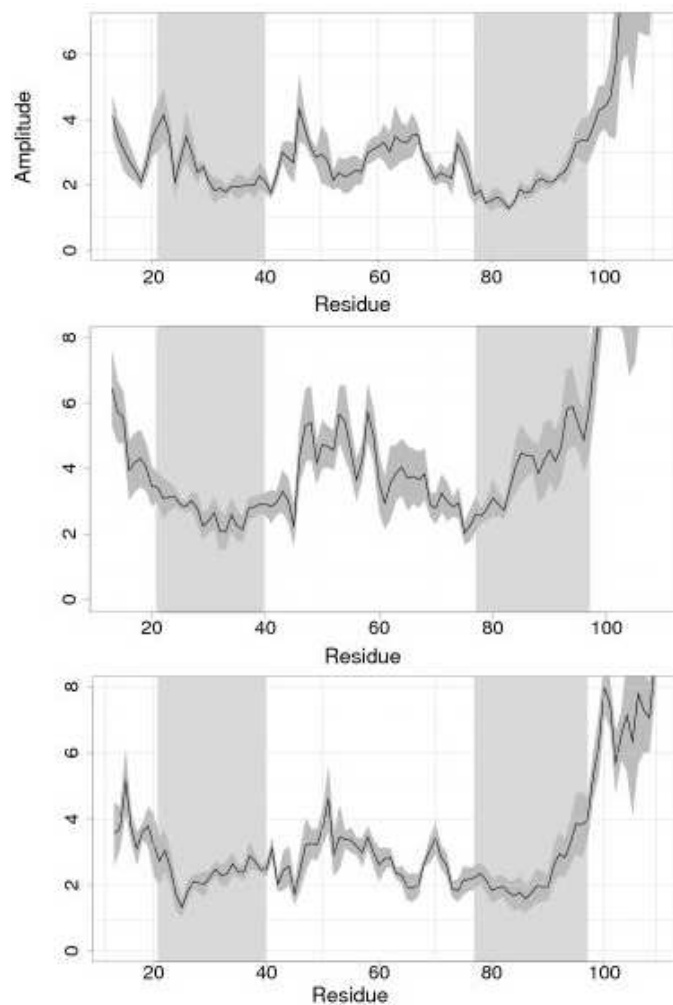


Fig. 12.16: Amplitude des mouvements associés aux vecteurs propres décrits, c'est à dire (de haut en bas), POPE-v1, DMPE-v1 et DMPE-v3. La moyenne sur les monomères ainsi que la variance sont représentées. La position des hélices TM est indiquée en grisé.

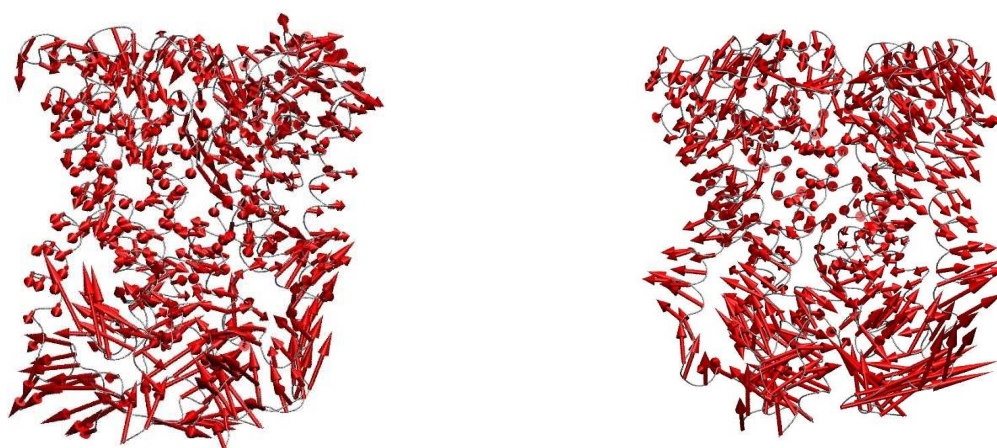


Fig. 12.17: Mouvements associés au 1er (gauche) et 3ème (droite) vecteurs propres dans le DMPE. Les mouvements par des flèches indiquant la direction et proportionnelles à l'amplitude. Vue de côté et de dessous (côté cytoplasmique).

des hélices transmembranaires et à une montée des extrémités Cterminales vers le centre de la membrane. De tels mouvements sont présents dans les deux systèmes mais son amplifiés dans le

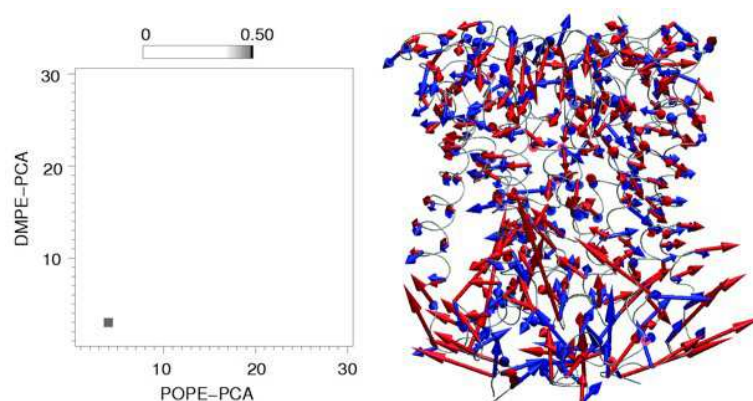


Fig. 12.18: a) Recouvrement entre vecteurs propres issus des trajectoires de POPE et de DMPE. Seuls les recouvrements supérieurs à 0,30 sont représentés. b) Représentation des mouvements associés à POPE-PCA v4 (bleu) et DMPE-PCA v3 (rouge), les deux vecteurs propres ayant un recouvrement supérieur à 0,30.

DMPE (l'amplitude dans le DMPE est à peu près trois fois supérieure à celle dans le POPE). On n'observe pas, outre ces deux vecteurs propres, de recouvrement significatif entre POPE-PCA et DMPE-PCA. Il y a donc une différence significative entre les deux environnements. Ceci confirme le rôle important des lipides dans la dynamique du MscL.

12.2.2 Comparaison PCA - NMA

Nous avons ensuite voulu comparer les résultats obtenus précédemment dans le laboratoire par analyse en modes normaux de la structure (Valadié *et al.*, 2003) et ceux issus de l'analyse en composantes principales. La projection des modes a donc été effectuée sur les vecteurs propres issus des deux systèmes.

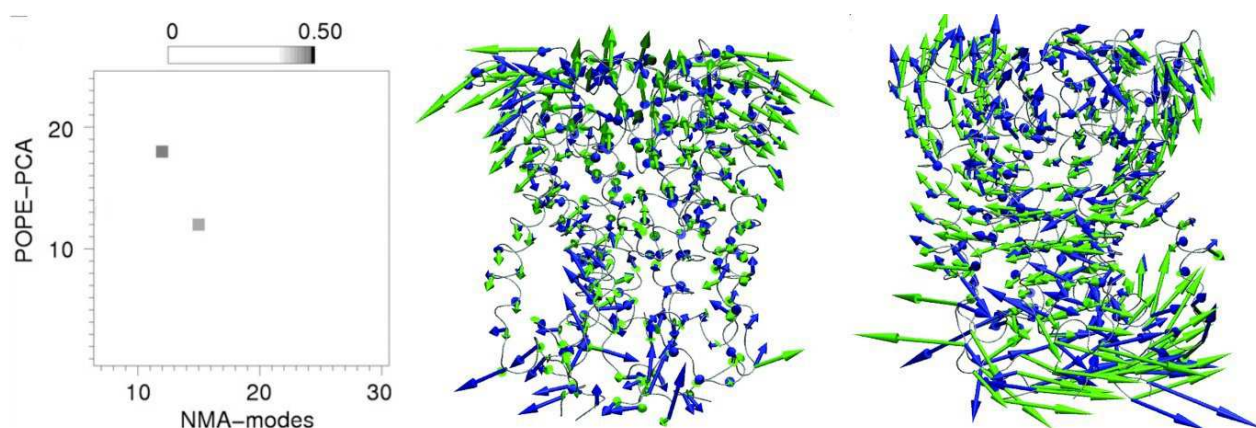


Fig. 12.19: a) Recouvrement entre vecteurs propres issus des trajectoires de POPE et modes issus de l'analyse en modes normaux. Seuls les recouvrements supérieurs à 0,30 sont représentés. b) et c) Représentation des mouvements associés à POPE-PCA v8 (bleu) et NMA v12 (vert) d'une part et POPE-PCA v12 et NMA v15 d'autre part, les vecteurs propres ayant des recouvrements supérieurs à 0,30.

Pour POPE-PCA, seulement deux vecteurs propres présentent un recouvrement significatif avec les modes (fig. 12.19.a) : POPE-PCA v8 avec NMA v12 et POPE-PCA v12 avec NMA

v15 ont un recouvrement respectivement de 36,5% et 39,5%. Les mouvements associés avec ces vecteurs sont représentés dans les figures 12.19.b/c. Bien que présentant plus de bruit dans le POPE, les mouvements présentent des directions similaires. Pour POPE-PCA v8 et NMA v12, les mouvements se situent principalement au niveau des boucles périplasmiques qui pour deux monomères sur cinq rentrent dans le pore et pour les trois autres se rabattent sur les côtés du canal. Pour POPE-PCA v12 et NMA v15, on peut observer dans les deux cas des rotations similaires des moitiés cytoplasmiques et périplasmiques du canal dans des directions opposées, respectivement dans le sens anti-horaire et horaire. Les mouvements décrits ici ne permettent pas d'atteindre un état ouvert du canal. Ces résultats sont donc en accord avec le fonctionnement mécanique du canal qui nécessite une tension pour s'ouvrir.

Un plus grand nombre de vecteurs propres de DMPE-PCA présentent une similarité significative avec les modes NMA (fig 12.20). Cinq recouvrements de plus de 0,33 sont retrouvés : DMPE-PCA v1, v3, v10, v17 et v20 avec NMA v7, v27, v16, v22 et v13 respectivement (fig. 12.21). Le plus grand recouvrement est de 0,49 pour DMPE-PCA v3 et NMA v27. Les mouvements associés correspondent à une compression et un élargissement du canal ainsi qu'une légère inclinaison des hélices (voir plus haut et section 12.2.1). Le recouvrement suivant est 0,35 et correspond aux vecteurs DMPE-PCA v1 et NMA v7. Les mouvements décrits ici correspondent aussi à une compression du canal mais l'inclinaison des hélices est plus importante et on peut aussi observer des mouvements entraînant la cassure des hélices transmembranaires au niveau du milieu du canal (niveau du kink observé pendant les simulations).

De manière très intéressante, les modes concernés par ces deux plus grands recouvrements sont des modes symétriques. De plus, les modes de plus faible recouvrement (DMPE-PCA v10 et v20 avec NMA v16 et v13 de recouvrement 0,33, DMPE-PCA v17 avec NMA v22 de recouvrement 0,32) correspondent à des mouvements de plus faible collectivité, ne touchant principalement que les extrémités cytoplasmiques ou les boucles périplasmiques et n'affectant que peu les parties transmembranaires.

Le fait que le recouvrement entre le premier mode de NMA (v7, les six premiers correspondant à des mouvements de rotation et translation globaux de la protéine) et le premier vecteur propre de DMPE-PCA est intéressant et important. Cela signifie que la réponse du canal au changement d'épaisseur membranaire n'est pas artéfactuelle mais est vraiment due à la structure elle-même. En comparaison du POPE, l'environnement de DMPE permet d'amplifier les vibrations intrinsèques de la protéine et de la conduire dans un état approprié le long du chemin d'ouverture.

Cette comparaison entre mouvements harmoniques et anharmoniques permet de montrer que la membrane influence la structure du canal mais ne modifie pas son comportement mécanique naturel. Elle ne fait qu'amplifier des mouvements spécifiques. Elle permet aussi de valider l'approximation faite dans la méthode Tirion (1996), utilisée ici pour calculer les modes normaux. Cette méthode arrive à reproduire des mouvements décrits par des simulations tout atome tenant compte de l'environnement.

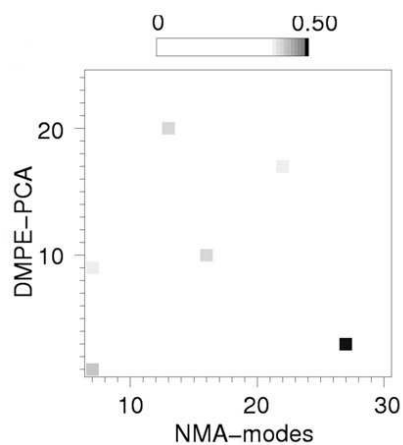


Fig. 12.20: Recouvrement entre vecteurs propres issus des trajectoires de DMPE et modes issus de l'analyse en modes normaux. Seuls les recouvrements supérieurs à 0,30 sont représentés.

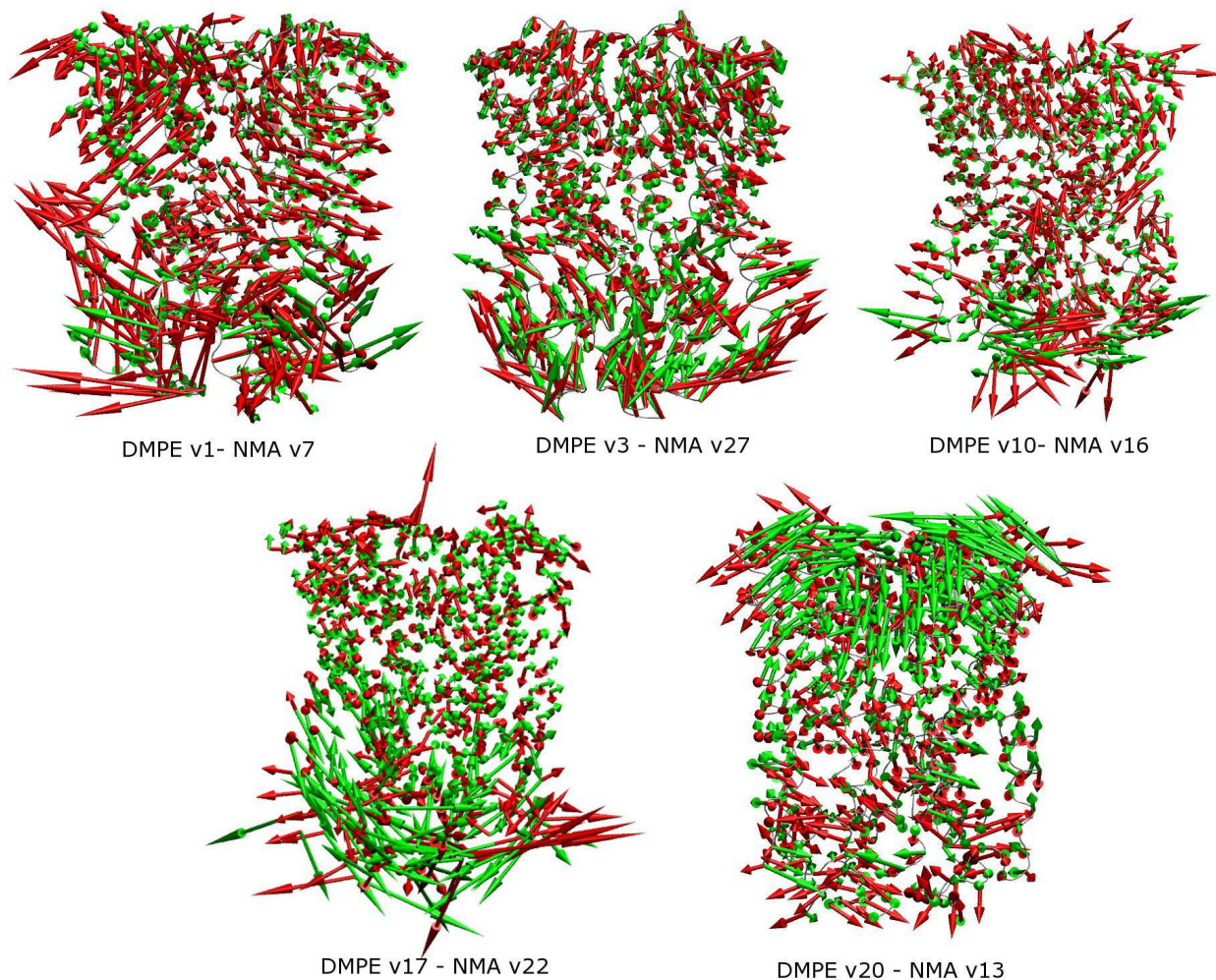


Fig. 12.21: Représentation des mouvements associés à DMPE-PCA (rouge) et NMA (vert) ayant des recouvrements supérieurs à 0,30.

Chapitre 13

Différences de mécanosensibilité en fonction de l'espèce

La tension nécessaire pour ouvrir le canal MscL de *M. tuberculosis* est deux fois plus grande que celle pour ouvrir *E. coli* (Maurer *et al.*, 2000). Perozo *et al.* (2002b) ont montré qu'un mésappariement hydrophobe permettait d'obtenir une structure du MscL intermédiaire le long du chemin d'ouverture. Les résultats que nous obtenons sur le MscL de *E. coli* sont en accord avec cette observation. Or, Elmore & Dougherty (2003) n'ont pas pu obtenir *in silico* de structure intermédiaire de *M. tuberculosis* dans des membranes présentant un mésappariement hydrophobe. Il se pourrait, que la différence de sensibilité au mésappariement hydrophobe observée soit liée à la différence de mécanosensibilité. Nous avons donc étudié le MscL de *M. tuberculosis* dans les mêmes conditions que celui de *E. coli* afin de tester l'influence des paramètres et conditions de simulation de la membrane sur la réponse du MscL et comprendre les différences d'observations de Elmore & Dougherty (2003). Ceci permettait, de plus, de caractériser le cas échéant la structure de l'intermédiaire de *M. tuberculosis* ou au contraire d'analyser les différences de séquence et/ou de structure pouvant expliquer les différences de comportement.

Le travail présenté dans ce chapitre donnera lieu à un article en cours de rédaction.

13.1 Stabilité du MscL de *M. tuberculosis* dans le POPE

Le MscL de *M. tuberculosis* délété après le résidu 103 a tout d'abord été simulé dans une membrane de POPE afin de tester sa stabilité et ainsi valider la structure et les conditions de simulation utilisées.

Le canal reste extrêmement stable tout au long des simulations (fig. 13.1). Les résidus L81 et I82 restent à l'interface entre les feuillettes, les contacts des boucles périplasmiques et des extrémités N- et Cterminales avec les lipides restent inchangés et les structures secondaires restent très stables (fig. 13.2). Aucun changement conformationnel important n'est donc induit par la membrane. Même si la composition membranaire chez *M. tuberculosis* est différente de celle de *E. coli*, il semble que Tb-MscL s'accommode aisément de tels lipides.

Cette grande stabilité est confirmée par le RMSd et le RMSf des atomes C α (fig. 13.3). Les hélices transmembranaires ne bougent que très peu, la majorité des mouvements se situant au niveau de la boucle périplasmique.

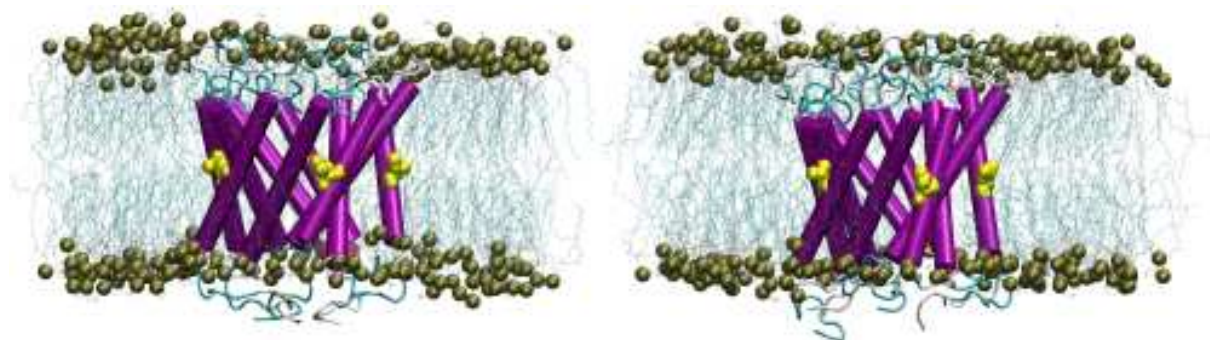


Fig. 13.1: Tb-MscL dans POPE en début ($t=0\text{ps}$) et fin ($t=5\text{ns}$) d'une simulation. La protéine est représentée en type cartoon, colorée selon sa structure secondaire. Les résidus L81 et I82 sont représentés en Van-der-Waals jaune. Les lipides sont en transparence et les atomes P sont en Van-der-Waals.

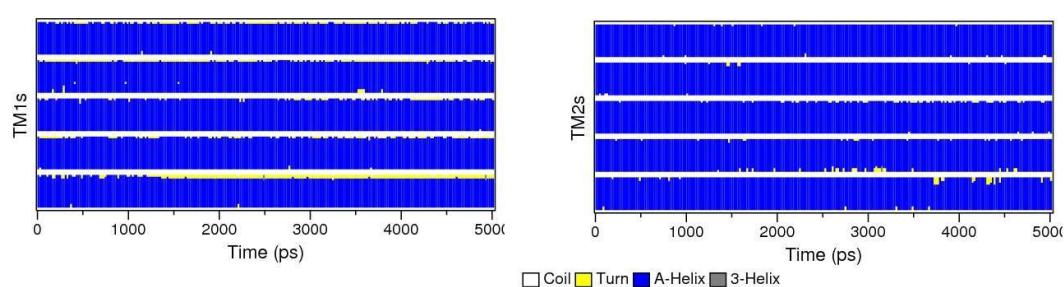


Fig. 13.2: Représentation des structures secondaires des hélices TM1 et TM2 du MscL de *M. tuberculosis* au cours d'une simulation dans du POPE.

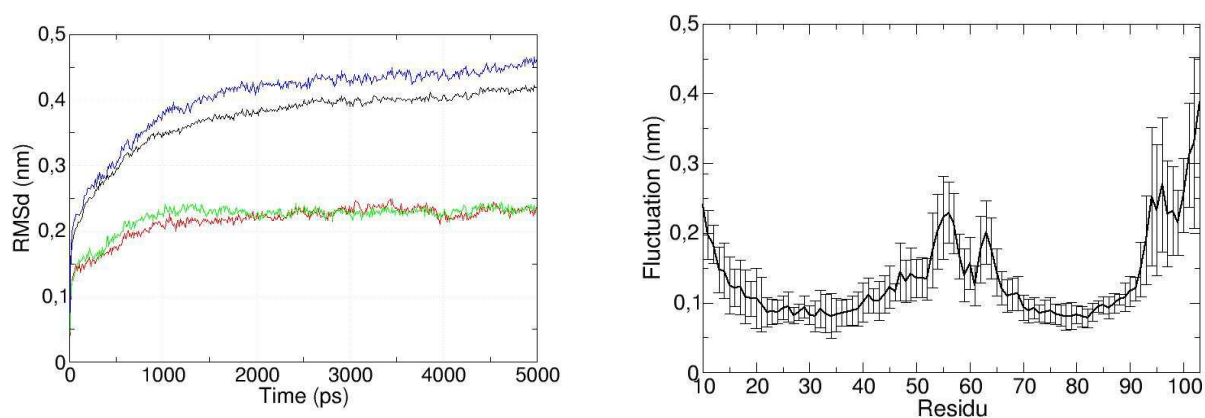


Fig. 13.3: a) Moyenne du RMSd sur les $C\alpha$ du Tb-MscL dans du POPE. En noir, sur l'ensemble de la protéine, en bleu les boucles périplasmiques, en rouge les hélices TM1 et en vert les hélices TM2. b) RMSf sur les $C\alpha$ du Tb-MscL dans du POPE. La moyenne sur les simulations et les monomères est représentée avec les déviations standards.

13.2 Comportement du MscL de *M. tuberculosis* dans le DMPE

13.2.1 Comportement général

Comme pour les simulations dans le POPE, la position des résidus L81 et I82 du Tb-MscL a été suivie au cours des simulations. Le positionnement par rapport à la membrane reste identique

sur l'ensemble des trajectoires. De plus, contrairement au Eco-MscL, le Tb-MscL semble rester stable tout au long des simulations (fig. 13.1). L'agencement et les structures secondaires des hélices transmembranaires (fig. 13.5) ne sont quasiment pas modifiés. Les boucles périplasmiques et les extrémités N- et Cterminales restent en contact avec le solvant malgré des réorganisations.

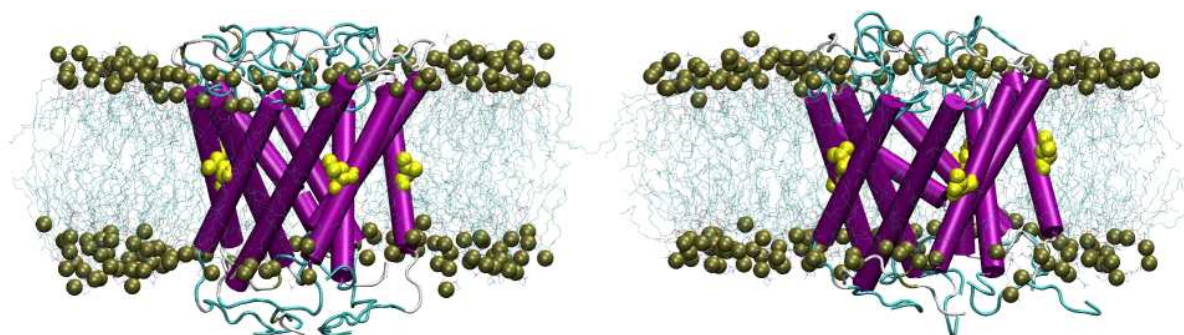


Fig. 13.4: Tb-MscL dans DMPE en début ($t=0\text{ps}$) et fin ($t=5\text{ns}$) d'une simulation. La protéine est représentée en type cartoon, colorée selon sa structure secondaire. Les résidus L81 et I82 sont représentés en Van-der-Waals jaune. Les lipides sont en transparence et les atomes P sont en Van-der-Waals.

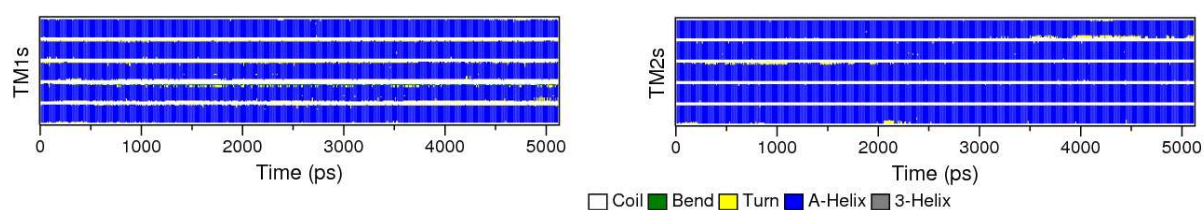


Fig. 13.5: Représentation des structures secondaires des hélices TM1 et TM2 du MscL de *M. tuberculosis* au cours du temps dans une simulation dans du DMPE.

La stabilité de la structure est confirmée par le RMSd et le RMSf des $C\alpha$. Le RMSd pour les hélices transmembranaires est identique à celui obtenu dans le POPE. Seul le RMSd des boucles périplasmiques augmente pour atteindre un plateau à près de 6\AA . Ces valeurs sont identiques à celles précédemment obtenues pour des simulations du Tb-MscL (Gullingsrud *et al.*, 2001; Elmore & Dougherty, 2001). Les profils de fluctuations confirment cette observation. Les plus grandes fluctuations se situent dans les boucles périplasmiques et dans les extrémités N- et Cterminales tandis que les hélices transmembranaires ne fluctuent que très peu. Les déviations standards très faibles montrent que ceci est vrai pour tous les monomères dans chacune des simulations.

13.2.2 Inclinaison et hauteur des hélices

Ces premières observations montrent que la structure du Tb-MscL ne semble pas être modifiée au cours des simulations. Les hélices transmembranaires restent très stables, aussi bien en terme de structure que de déplacement. On ne s'attend donc pas à observer de changement dans l'inclinaison des hélices transmembranaires.

En effet, l'inclinaison des hélices transmembranaires reste assez stable au cours du temps (fig.

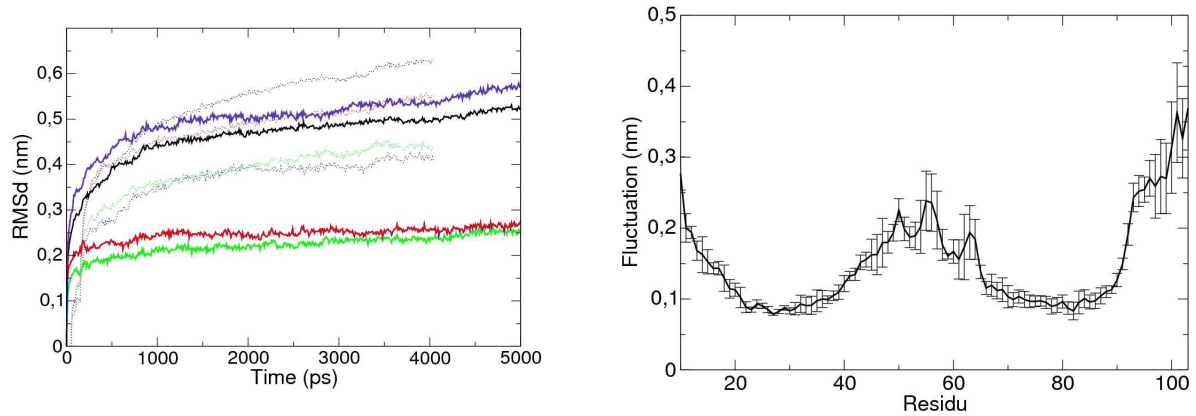


Fig. 13.6: a) Moyenne du RMSd sur les $C\alpha$ du Tb-MscL dans du DMPE. En noir, sur l'ensemble de la protéine, en bleu les boucles périplasmiques, en rouge les hélices TM1 et en vert les hélices TM2. En pointillé, est rappelé l'équivalent pour Eco-MscL dans du DMPE. b) RMSf sur les $C\alpha$ du Tb-MscL dans du DMPE. La moyenne sur les simulations et les monomères est représentée avec les déviations standards.

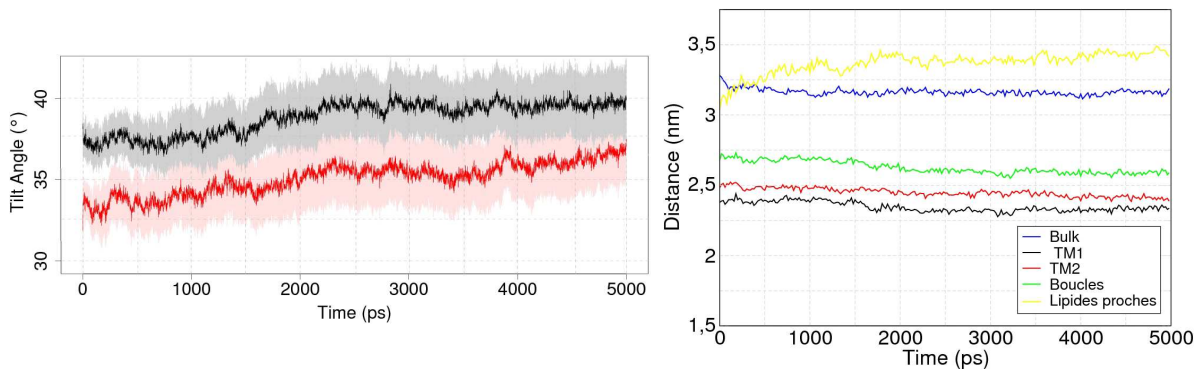


Fig. 13.7: Evolution du tilt (gauche) et de la hauteur (droite) des hélices transmembranaires au cours des simulations de Tb-MscL dans du DMPE. La hauteur de la boucle et de l'épaisseur membranaire sont aussi représentées. Les valeurs moyennes sur les simulations sont représentées ici.

13.7), augmentant très légèrement de 3° et passant ainsi de 34° à 37° pour les TM2 et de 37° à 40° pour les TM1.

En terme de hauteur (cf section 8.3.2), les hélices transmembranaires restent aussi très stables. Leur hauteur moyenne diminue de 1\AA , passant de 24\AA à 23\AA pour les TM1, de 25\AA à 24\AA pour les TM2. Nous avons vu précédemment que la hauteur des hélices était liée à leur inclinaison mais aussi à leur courbure. Cette faible diminution de hauteur implique donc aussi une absence de courbure des hélices transmembranaires, ce qui a été confirmé par le calcul de l'angle de kink (fig. 13.8) ainsi que par l'absence de cassure dans le faisceau de liaisons hydrogène (fig. 13.5).

La hauteur des boucles périplasmiques diminue de la même manière que celle des hélices transmembranaires. Elles ne subissent donc pas de changement conformationnel entraînant leur enfouissement. La diminution de leur hauteur est, semble-t-il, liée à la diminution de hauteur des hélices transmembranaires.

Le canal Tb-MscL, au contraire de Eco-MscL reste donc très stable dans une membrane de DMPE et ne subit pas de changement conformationnel consécutif à des interactions potentiel-

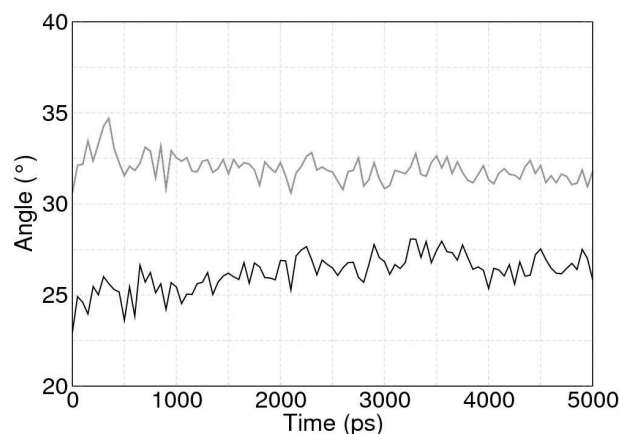


Fig. 13.8: Courbures des hélices transmembranaires Tb-MscL dans du DMPE au cours du temps. En noir, les TM1, en gris, les TM2.

lement défavorables des régions hydrophobes avec le milieu polaire. Il ne semble donc pas subir de mouvements pouvant conduire à un intermédiaire structural le long du chemin d'ouverture.

En outre, un phénomène très intéressant peut être observé au niveau de l'épaisseur membranaire. En effet, celle-ci reste stable dans le bulk tandis qu'elle augmente de plus de 4Å au contact du canal, entraînant la formation d'un bourgeon limitant les interactions entre résidus hydrophobes et milieu polaire. Dans ce cas, au contraire du canal Eco-MscL, la balance énergétique semble être en faveur d'un réarrangement conformationnel de la membrane plutôt que du canal.

13.2.3 Rotation des hélices

Dans le DMPE, les hélices transmembranaires du Tb-MscL ne subissent pas de cassure des liaisons hydrogènes (fig. 12.6) ni de courbure importante, leur structure reste donc très stable et solide. En terme de rotation autour de l'axe d'inertie, elles peuvent donc être considérées comme des corps rigides. La rotation axiale de chaque hélice a été calculée à partir de la rotation d'un de ses résidus (fig. 13.9).

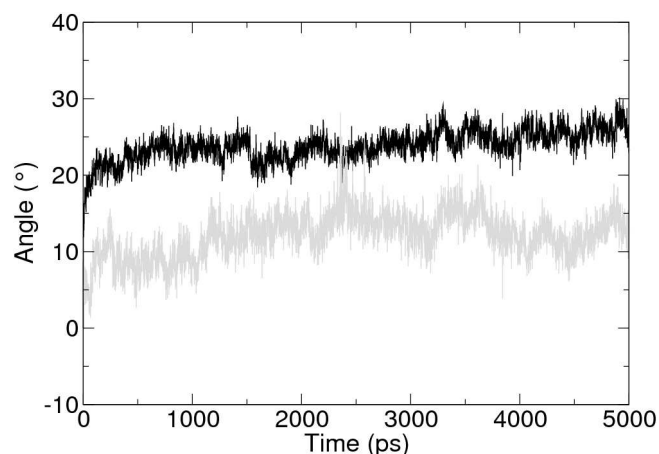


Fig. 13.9: Rotation des hélices de Tb-MscL au cours du temps dans le DMPE. En noir : F34 (TM1), en gris : L81 (TM2). Les valeurs moyennes sur les simulations et monomères sont représentées.

On observe une légère rotation anti-horaire de 10° des hélices TM2 et une rotation plus importante (de l'ordre de 25°) des hélices TM1.

Deux points sont à noter ici. Tout d'abord, les valeurs d'angle de rotation sont, pour les TM2, identiques à celles d'Eco-MscL dans le POPE et pour les TM1, identiques à celles d'Eco-MscL dans le DMPE. Mais le point le plus important est que la rotation s'effectue dans le sens opposé à celui de Eco-MscL.

Les expériences menées par Perozo *et al.* (2002b), pour différentes épaisseurs de membranes et pour des membranes courbées, montrent parmi les changements conformationnels, des rotations horaires des hélices transmembranaires. Ces rotations pourraient être concomitantes au mécanisme d'ouverture. De plus, il a été postulé que la structure cristallographique du Tb-MscL ne décrivait pas un état complètement fermé et que cet état serait obtenu par rotation anti-horaire des hélices (Levin & Blount, 2004; Bartlett *et al.*, 2004). Les résultats obtenus ici appuient donc l'hypothèse selon laquelle le Tb-MscL dans le DMPE ne subirait pas de mouvements d'ouverture.

13.2.4 Profil du pore

Si, comme le suggère la rotation anti-horaire des hélices et l'absence de mouvements de grande amplitude, le Tb-MscL a tendance à se refermer, on s'attend à voir le diamètre du pore diminuer et le point de constriction se rapprocher du côté périplasmique.

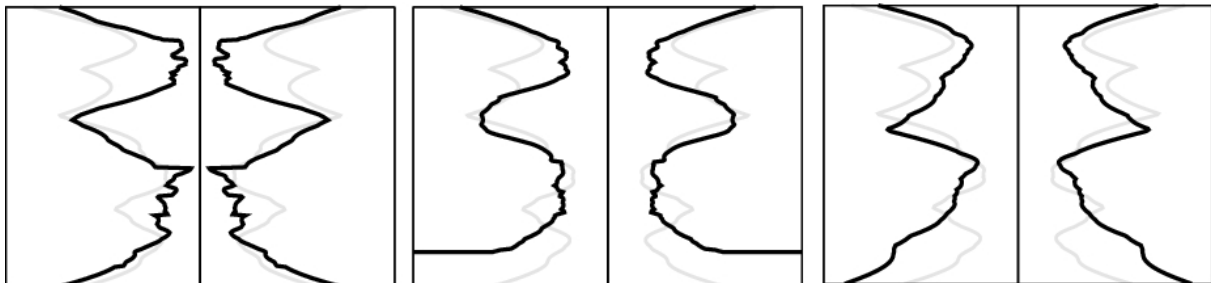


Fig. 13.10: Profil du pore de Tb-MscL dans le DMPE. Trois exemples sont présentés ici, en noir, le profil en fin de simulation, en gris celui en début de simulation.

Tout comme pour Eco-MscL, bien que le comportement des hélices transmembranaires soit très similaire d'une simulation à l'autre, le profil du pore obtenu à la fin de chacune de ces simulations est très différent (fig. 13.10). Ceci s'explique par la flexibilité des chaînes latérales. Toutefois, dans deux simulations sur trois, le diamètre minimal du pore reste inchangé. Dans la dernière simulation, il diminue. De plus, on peut observer que dans les trois simulations, la zone de constriction se rapproche légèrement du côté périplasmique. Finalement, une diminution de la taille de la cavité du côté périplasmique a lieu dans les trois simulations. Un exemple de la structure du pore est donnée en figure 13.11.

Ces résultats sont donc en accord avec un mouvement allant vers une fermeture totale du Tb-MscL.

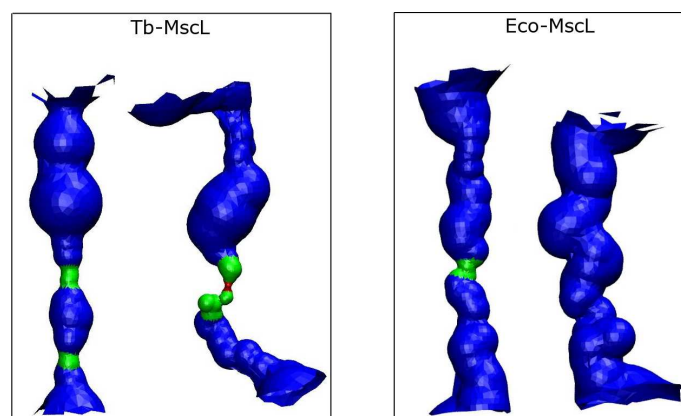


Fig. 13.11: Structure du pore de Tb- et Eco-MscL dans le DMPE en début et fin de simulation. La structure de Eco-MscL est donnée à titre indicatif. En bleu, sont représentées les zones accessibles au solvant, en vert les zone intermédiaires et en rouge les zones complètement constrictes.

13.2.5 Différence de mécanosensibilité ?

L'ensemble des résultats obtenus sur le Tb-MscL dans une membrane de DMPE montrent que le canal reste stable dans un état quasi-fermé. Un mouvement allant vers la fermeture complète du canal peut être postulé.

Le Tb-MscL a déjà été simulé dans des membranes d'épaisseur variable (Elmore & Dougherty, 2003). Les auteurs n'avaient alors pas réussi à obtenir de structure intermédiaire le long du chemin d'ouverture. Dans des lipides C14 (de longueur identique au DMPE), ils observaient un bourgeonnement de la membrane proche du canal afin de limiter les interactions défavorables entre résidus hydrophobes et milieu polaire, une constriction du pore, une courbure et pas d'inclinaison des hélices transmembranaires. Ces résultats sont en accord avec nos observations et nous permettent de tirer deux conclusions majeures. Tout d'abord, cela permet de valider les résultats obtenus et de confirmer que les observations ne sont pas liées aux choix des paramètres de simulation. Ensuite, ceci confirme le fait que Eco-MscL et Tb-MscL ne se comportent pas de la même manière dans des membranes identiques. Leur différence de sensibilité à un mésappariement hydrophobe *in silico* est à mettre en relation avec leur différence de sensibilité à la tension (Maurer *et al.*, 2000). Le Tb-MscL semble posséder des propriétés contraignant plus son ouverture que Eco-MscL.

13.3 Différences de séquence, de structure et de sensibilité

Nous avons montré ici une différence de sensibilité structurale de Eco- et Tb-MscL à l'épaisseur de la membrane. La question qui se pose alors est "Quelles sont les différences entre les deux canaux permettant d'expliquer leur différence de comportement vis à vis de la membrane?"

13.3.1 Séquences

Bien que clairement homologues, les séquences du MscL de *M. tuberculosis* et *E. coli* sont relativement différentes. L'alignement choisi pour la comparaison est celui utilisé par Valadié *et al.* (2003) pour construire le modèle de la structure de *E. coli* (fig. 13.12). Les séquences présentent

37% d'identité et 72% de similitude. Le taux d'identité au niveau des hélices transmembranaires est de 30% et le taux de similitude de 87%. Les boucles périplasmiques présentent la plus grande variabilité.

```

Tb-MscL   10  ARGNIVDLAVAVVIGTAFTALVTKFTDSIITPLINRI--GVNAQSDVGILRIGIGGGQTI   67
          ***:*****:*:**:**  :*:::  :** *  ::  :  *::  ::  :  **  : *  ::
Eco-MscL  13  -RGNVVDLAVGVIIGAAGFKIVSSLVADIIMPPLGLLIGGIDFKQFAVTLRDAQGDIPAV   71

Tb-MscL   68  DL--NVLLSAAINFFLIAFAVYFLVLPYNTLRKKGE-V   103
          :  :*:::  ::*:::***:::  : *  :  *** *  :
Eco-MscL  72  VMHYGVFIQNVFDFLIVAFATFMAIKLINKLNRKKEEPA   110

```

Fig. 13.12: Alignement entre les séquences du MscL de *E. coli* et *M. tuberculosis*. En rouge sont indiqués les résidus de la TM1, en bleu ceux de la boucle périplasmique, en vert ceux de la TM2. Les '*' indiquent les identités, les ':' indiquent les similitudes.

D'autres analyses sur un ensemble de séquences du MscL provenant de différents organismes (Maurer *et al.*, 2000) montrent que les MscL de *E. coli* et *M. tuberculosis* appartiennent aux sous-familles les plus divergentes. Là encore, les régions transmembranaires sont très conservées, la boucle étant la région la plus divergente. Il semble donc probable que cette différence de mécanosensibilité s'explique par une différence de séquence ou de structure de la boucle périplasmique.

La plupart des études de mutagenèse (Blount *et al.*, 1996b; Ou *et al.*, 1998; Maurer *et al.*, 2000; Maurer & Dougherty, 2001, 2003; Shapovalov *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Levin & Blount, 2004; Yoshimura *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2005; Kloda *et al.*, 2006) ont été réalisées sur le MscL de *E. coli* (fig. 13.13).

Maurer *et al.* (2000) ont émis l'hypothèse que, les séquences étant similaires au niveau des régions transmembranaires, les mutations affectant Eco-MscL dans cette région, affectaient aussi les résidus équivalents chez Tb-MscL.

Il n'en est pas de même pour la boucle périplasmique. Cette région est très peu conservée et de nombreux résidus d'une espèce n'ont pas d'équivalent dans l'autre espèce. En particulier, chez *M. tuberculosis*, les deux résidus R45 et Q51, qui interagissent dans la structure cristallographique à travers une liaison hydrogène, présentent de nombreuses mutations GOF (*Gain Of Function*, c'est à dire que les canaux ne s'ouvrent plus, ou plus difficilement) et ne possèdent pas d'équivalent chez *E. coli*. Il a, en outre, été postulé que cette interaction pouvait servir de barrière énergétique pour l'ouverture du Tb-MscL (Maurer *et al.*, 2000). Chez *E. coli*, on retrouve deux résidus (Q65 et V72) conservés au sein des espèces, présentant plusieurs mutations LOF (*Lost Of Function*, c'est à dire que les canaux s'ouvrent spontanément, ou du moins plus facilement) et dont aucun équivalent n'existe chez *M. tuberculosis*. Ces résidus pourraient avoir un lien avec la différence de sensibilité entre les MscL de *E. coli* et *M. tuberculosis*.

Au niveau de la séquence, la plus grande différence entre les deux espèces étudiées se situe donc au niveau de la boucle périplasmique, que ce soit en terme de longueur, de composition ou d'interactions. L'hypothèse que nous avons posée était donc que la région expliquant la différence de sensibilité était la boucle. Cette hypothèse est soutenue par de nombreuses données

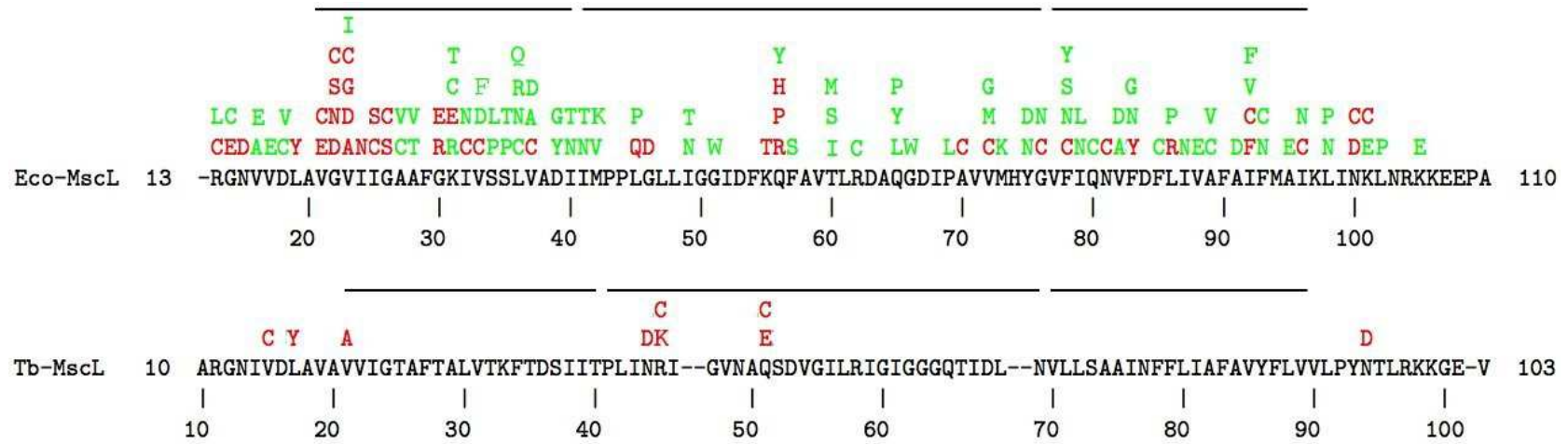


Fig. 13.13: Alignement entre les séquences du MscL de *E. coli* et *M. tuberculosis*. En rouge sont indiquées les mutations GOF, en vert les mutations LOF.

expérimentales (Ajouz *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2004). Nous nous sommes donc intéressés plus particulièrement aux différences de structure et de dynamique que pouvait présenter cette région.

13.3.2 Hydrophobicité et Flexibilité

Les profils d'hydrophobicité des deux boucles périplasmiques (fig. 13.14) ont été comparés. Cette comparaison permet de mettre en évidence une opposition de phase entre les deux profils. Quel que soit l'alignement, cette opposition de phase sera retrouvée. Il s'agit donc d'une différence réelle entre Eco- et Tb-MscL. La dynamique de la boucle ne sera donc pas la même en réponse au milieu environnant.

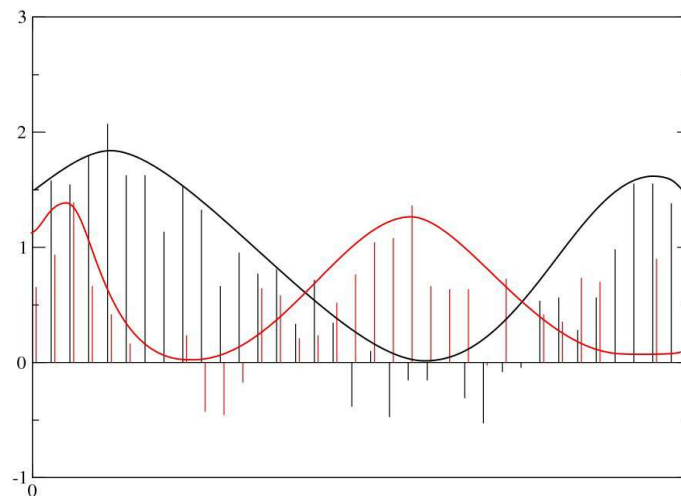


Fig. 13.14: Profil d'hydrophobicité des boucles de Tb- (rouge) et Eco-MscL (noir). Les résultats de chaque boucle sont présentés en fonction de l'alignement et non en fonction de la séquence. Le profil a été calculé avec les paramètres de Kyte et Doolittle sur une fenêtre de 11 résidus.

Chez Tb-MscL, les résidus de la boucle proche des hélices transmembranaires (et particulièrement des TM2 en contact avec les lipides) sont moins hydrophobes que ceux de Eco-MscL. Dans ce cas, les interactions de la boucle périplasmique avec le solvant sont plus favorables pour Tb- que pour Eco-MscL. A l'inverse, pour Eco-MscL, les interactions avec les chaînes grasses des lipides sont plus favorables et moins favorables avec le solvant.

Ces résultats permettent de soutenir l'hypothèse selon laquelle les boucles périplasmiques joueraient un rôle important dans la sensibilité des canaux.

13.3.3 Structures

La structure du Eco-MscL ayant été construite par homologie à celle de Tb-MscL, leurs structures sont très proches (fig. 13.15). Le RMSd sur les $C\alpha$ est de 2,13Å sur les 94 résidus alignés. La boucle de Eco-MscL est plus longue que celle de Tb-MscL mais la seule considération de leurs structures ne permet pas, au premier abord, d'expliquer leur différence de sensibilité.

Au sein des boucles, les deux espèces présentent chacune deux liaisons hydrogène impliquant des résidus éloignés en terme de séquence. Toutefois, les résidus concernés ne sont pas les mêmes.

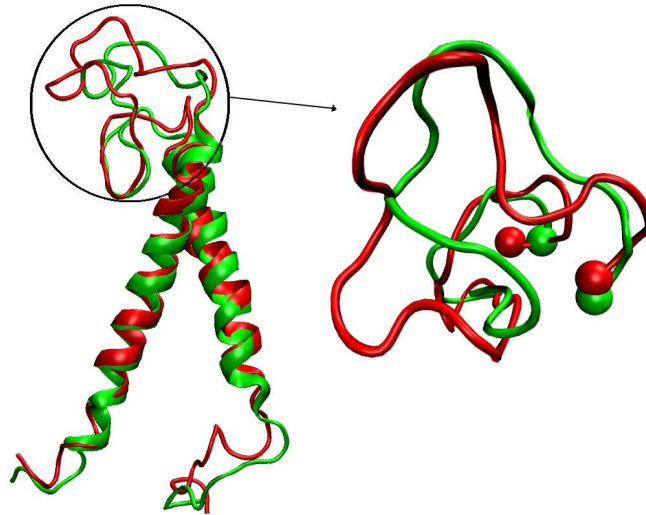


Fig. 13.15: Superposition entre un monomère de Eco- (rouge) et de Tb-MscL (vert) et agrandissement vu du côté périplasmique de la zone de la boucle. Les sphères représentent les C α des premiers et derniers résidus.

Pour Eco-MscL, on peut noter que Q65 est lié à I41 situé en Ncap, proche de TM1. Q65 joue un rôle important dans le mécanisme d'ouverture du canal (Tsai *et al.*, 2005). De plus, les mutations sur Q65 et I41 entraînent des phénotypes LOF. Il n'existe pas d'équivalent pour cette liaison chez Tb-MscL. Toutefois, le résidu avec lequel il est aligné chez Tb-MscL est I61 qui forme quant à lui, des liaisons hydrogènes avec des N69 situé en Ccap, proche de TM2.

Alors que Q65 est lié à un résidu proche de la TM1 dans Eco-MscL, I61 est lié à un résidu proche de la TM2. Cette différence pourrait jouer un rôle dans l'explication de la différence de sensibilité entre les deux canaux.

13.3.4 Dynamique

La dynamique de la boucle périplasmique au cours du temps permet d'identifier des résidus ou des régions dont le comportement particulier peut souligner leur importance dans la dynamique globale du canal.

Lorsque l'on regarde les profils de fluctuation (rappelés dans la figure 13.16), que ce soit dans le POPE ou dans le DMPE, plusieurs observations peuvent être faites.

Tout d'abord, on retrouve chez Eco-MscL un découpage de la boucle périplasmique en deux régions distinctes : la partie Ncap qui fluctue beaucoup et la partie Ccap qui fluctue beaucoup moins. Ces deux zones sont inversées chez Tb-MscL : dans le POPE une zone Ncap qui fluctue assez peu et une zone Ccap qui fluctue beaucoup. Ensuite, on retrouve, pour Eco- et Tb-MscL, les deux mêmes résidus avec de fortes fluctuations dans le POPE et le DMPE. Ces résidus, correspondent à des glycines (G46 et G51 pour Eco-MscL et G55 et G63 pour Tb-MscL). Un troisième pic est observable dans le DMPE correspondant au résidu A50. Ces résidus sont par leur nature très flexibles, ces fortes fluctuations ne sont donc pas nécessairement surprenantes. Ces observations permettent une fois encore de souligner les différences et ressemblances entre les boucles périplasmiques des deux canaux mais ne permettent pas de formuler d'hypothèse

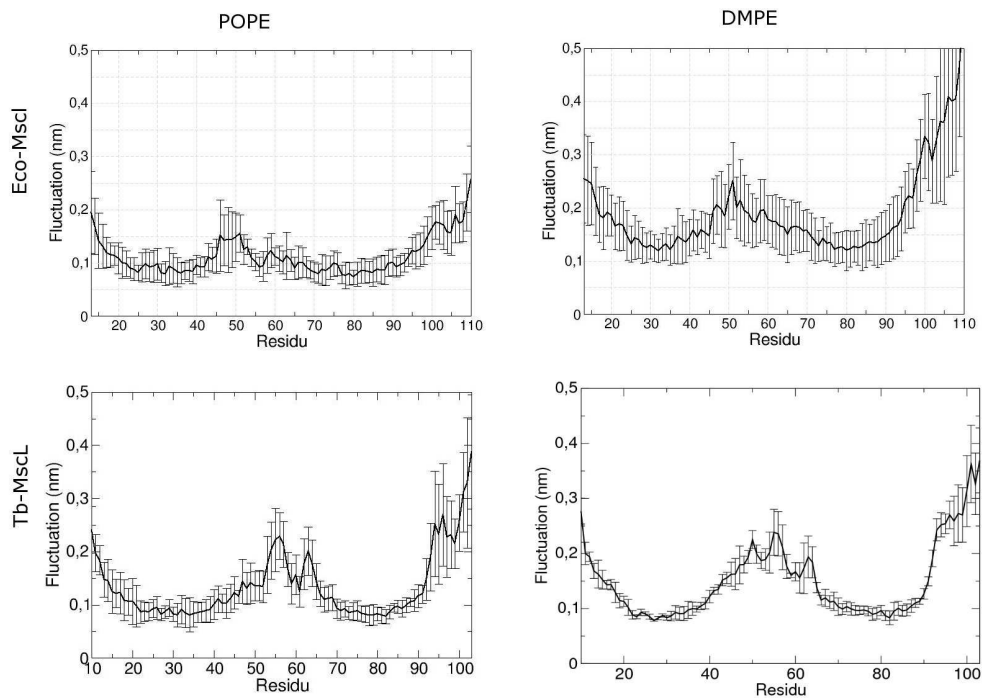


Fig. 13.16: Profils de fluctuation de Eco- et Tb-MscL.

quant à leur implication dans la différence de sensibilité.

Par contre, en ce qui concerne les résidus fluctuant le moins, on retrouve Q65 chez Eco-MscL et I61 chez Tb-MscL. Ils forment des liaisons hydrogènes avec les extrémités des hélices transmembranaires, plus stables. Ces résidus joueraient donc un rôle de levier qui pourrait contrôler la sensibilité.

Le nombre total de liaison hydrogènes au sein des boucles est équivalent entre les deux canaux (fig. 13.17). Il est donc difficile de discerner le rôle global des liaisons hydrogènes dans la sensibilité, même s'il paraît clair qu'elles participent à la rigidification de la boucle et impliquent donc une résistance au mouvement d'ouverture.

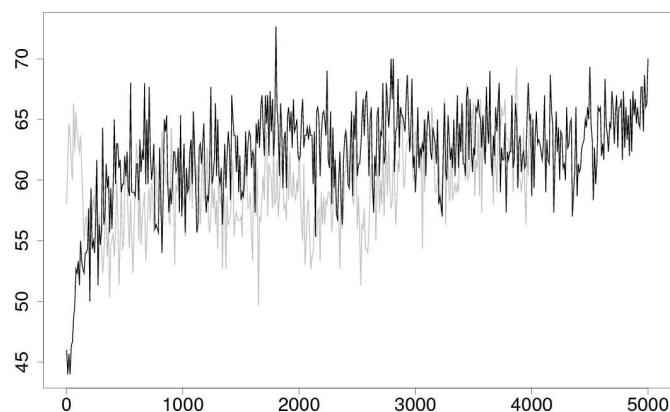


Fig. 13.17: Evolution du nombre moyen de liaisons hydrogènes des boucles périplasmiques pour Eco- (gris) et Tb-MscL (noir).

La liaison R45-Q51 n'est pas conservée chez Tb-MscL. Pourtant le canal reste fermé. Cette observation remet en question l'hypothèse selon laquelle cette liaison pourrait servir de barrière énergétique à franchir pour l'ouverture du canal (Maurer *et al.*, 2000).

13.3.5 Energie

Energie entre résidus

Nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à l'évolution de l'énergie entre les différents résidus de chacun des canaux Tb- et Eco-MscL (fig. 13.18). Ce que l'on observe tout d'abord, c'est que l'énergie du Tb-MscL ne varie quasiment pas entre le début et la fin des simulations pour l'ensemble des paires de résidus. La variation d'énergie reste nulle pour les régions transmembranaires. On observe une légère diminution d'énergie pour un ensemble de paires de résidus, situées exclusivement au niveau de la boucle périplasmique et des extrémités N et Cterminales. Les différentes régions sont très bien délimitées en terme de variation d'énergie. Au contraire, pour Eco-MscL, l'ensemble des paires de résidus voient leur énergie légèrement diminuer. Aucune limite claire n'apparaît entre les différentes régions.

En terme de variation d'énergie d'interaction, une grande différence existe entre les canaux de Tb- et de Eco-MscL. Ces observations confirment, de plus, la grande stabilité de la structure de Tb-MscL dans le DMPE.

De manière plus précise, de grandes variations d'énergie sont observables pour quelques paires de résidus. Chez Tb-MscL, ces résidus sont essentiellement localisés au niveau de la boucle périplasmique ou des extrémités périplasmiques des hélices transmembranaires. Au niveau de la boucle périplasmique, un faisceau d'interactions entre résidus chargés se renforce au cours du temps : une grande diminution d'énergie s'effectue entre les résidus R45-D68-R58-D53. L'importance de la boucle est donc là encore soulignée. Chez Eco-MscL, les variations fortes d'énergie se situent principalement au niveau des extrémités cytoplasmiques. Aucun motif, résidu ou interaction prédominant ne peut être mis en évidence.

Le faisceau formé au niveau de la boucle périplasmique de Tb-MscL se renforce très nettement au cours de la simulation. Il pourrait contraindre fortement la boucle périplasmique, limitant ainsi les mouvements de l'ensemble de la protéine.

Energie entre résidus et environnement

Nous avons vu que chez Tb-MscL, un réseau d'interactions pourrait stabiliser la boucle périplasmique. D'autres interactions entre le canal et son environnement pourraient stabiliser sa structure. La figure 13.19 présente l'énergie d'interaction au cours du temps des résidus des deux protéines avec l'environnement.

Avec les têtes polaires de lipides, l'énergie est quasiment nulle pour les résidus des hélices transmembranaires, les extrémités Nterminales et une partie des résidus de la boucle, que ce soit pour Eco- ou pour Tb-MscL. Pour les deux canaux, des interactions favorables se forment pour les

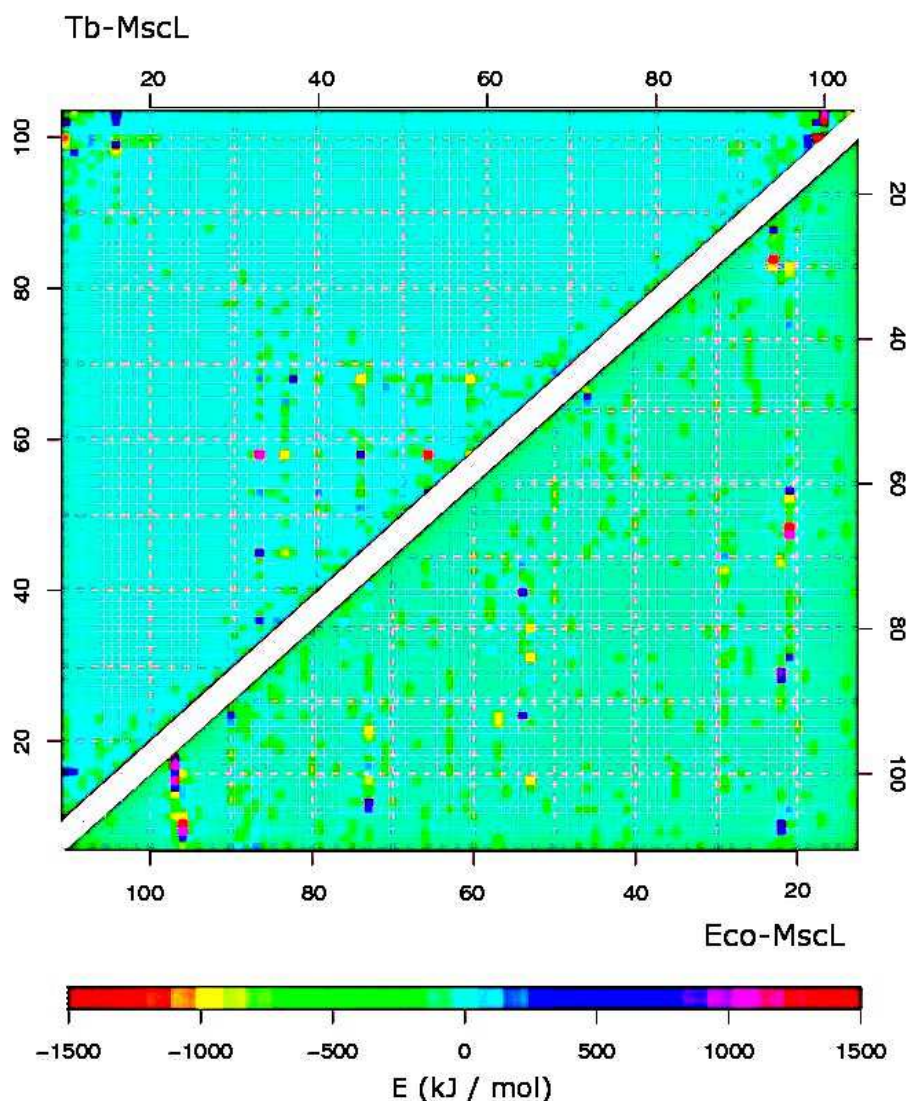


Fig. 13.18: Variation d'énergie inter-résidus, entre $t=0\text{ps}$ et $t=4\text{ns}$ pour Eco-MscL et $t=5\text{ns}$ pour Tb-MscL. Les valeurs présentées sont la somme des énergies sur chaque monomère, moyennée sur les simulations de chaque système.

15 résidus situés en Ncap (proche des TM1) de la boucle périplasmique. Chez Tb-MscL, seul un résidu voit son énergie d'interaction avec les lipides fortement diminuer. Il s'agit de D68. Au contraire, pour Eco-MscL, plusieurs résidus présentent de fortes diminutions d'énergie d'interaction avec les têtes polaires : D39, Q56 et K97. Les résidus D39 et K97 sont situés au niveau des extrémités des hélices transmembranaires. Cette diminution d'énergie est concomitante avec l'inclinaison des hélices.

Avec les chaînes grasses, aucune variation forte d'énergie n'est observée.

Pour Eco-MscL, trois résidus de la boucle présentent des interactions fortes avec le solvant : Q65, R62 et Q56. Mais aucune de ces énergies ne varie significativement au cours du temps. Enfin, de manière très intéressante chez Tb-MscL, les résidus présentant une diminution forte

d'énergie d'interaction avec le solvant sont R45, D53, R58 et D68. Une hypothèse est alors que ces résidus vont former des interactions très favorables entre eux et avec le solvant. Ces interactions ne sont pas compensées, le canal reste donc fermé. Les interactions défavorables créées par le mésappariement hydrophobe, vont quant à elles être compensées en entraînant un bourgeonnement de la membrane autour du canal.

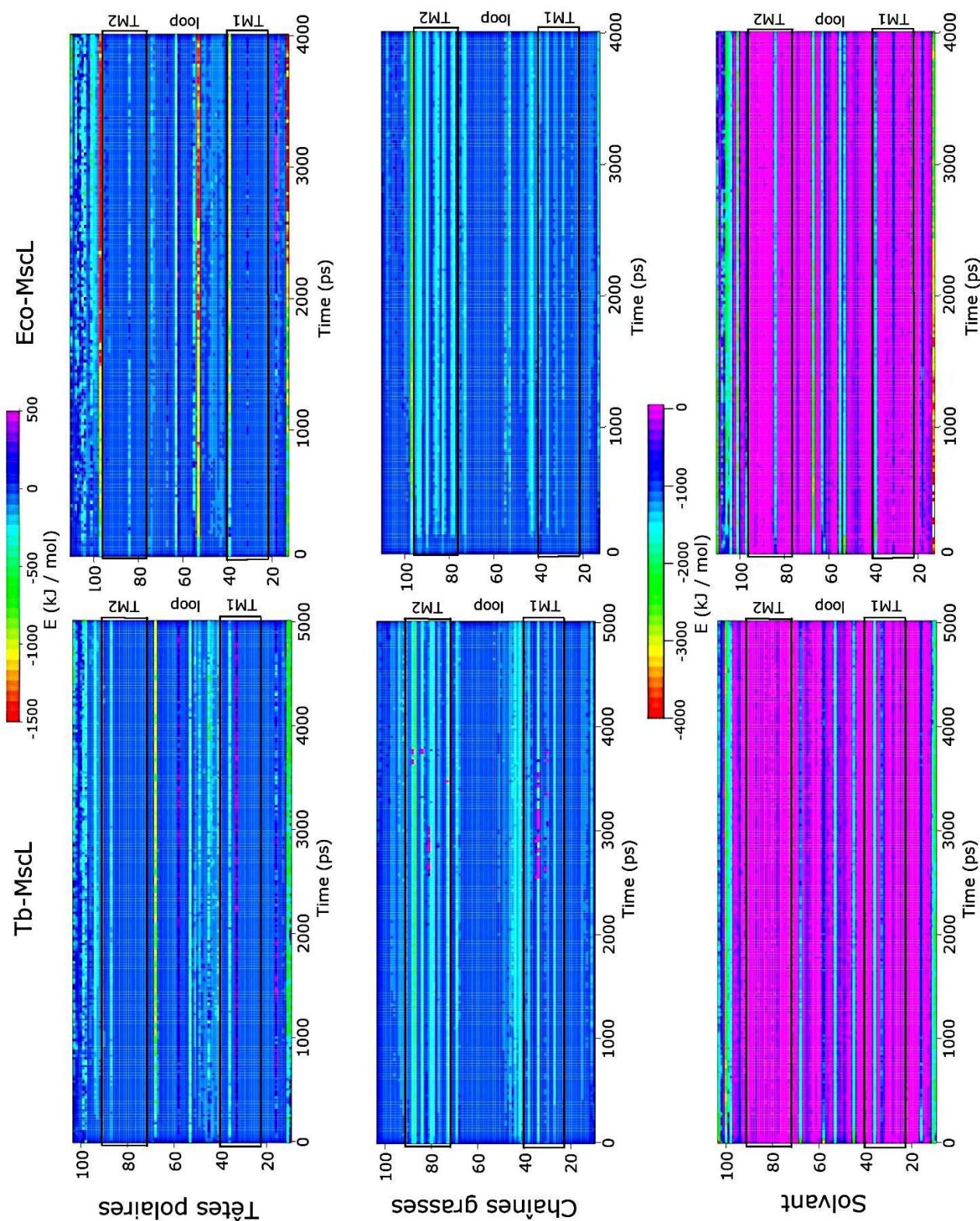


Fig. 13.19: Evolution de l'énergie totale entre têtes polaires de DMPE et résidus de Eco- (en haut) et Tb-Mscl (en bas). Les valeurs présentées sont la somme des énergies sur chaque monomère, moyennée sur les simulations de chaque système.

Chapitre 14

Influence de la boucle périplasmique

Afin de confirmer le rôle prépondérant de la boucle périplasmique dans la sensibilité du MscL au mésappariement hydrophobe, nous avons échangés les boucles périplasmiques des canaux Eco- et Tb-MscL. Nous avons simulé ces nouveaux canaux hybrides dans les mêmes conditions que précédemment et avons évalué leur réponse à la diminution d'épaisseur membranaire. L'analyse du comportement des canaux hybrides permet de préciser l'importance de chaque région et éventuellement de les corrélés au phénomène de sensibilité.

Le travail présenté ici n'est qu'un travail préliminaire et de plus amples investigations seraient nécessaires. Toutefois, les résultats semblent très intéressants et prometteurs.

Une partie de ce travail est basé sur les résultats obtenus par Lilian Olivieri lors de son stage au sein du laboratoire (Olivieri, 2006).

14.1 Construction des canaux hybrides

Les séquences des boucles périplasmiques ont été échangées entre les canaux Eco- et Tb-MscL (fig.14.1).

<i>TbMscLH</i>	10	ARGNIVDLAVAVVIGTAFTALVTKFTDDIIMPPLGLLIGGIDFKQFAVTLRDAQGDIPAV	69
<i>EcoMscLH</i>	13	-RGNVVDLAVGVIIIGAAFVKIVSSLVASIITPLINRI--GVNAQSDVGILRIGIGGGQTI	69
<i>TbMscL</i>	10	ARGNIVDLAVAVVIGTAFTALVTKFTDSIITPLINRI--GVNAQSDVGILRIGIGGGQTI	67
<i>EcoMscL</i>	13	-RGNVVDLAVGVIIIGAAFVKIVSSLVADIIMPPLGLLIGGIDFKQFAVTLRDAQGDIPAV	71
<i>TbMscLH</i>	70	VMHYGVLLSAAINFFLIAFAVYFLVLPYNTLRKKGE-VEQPGDT-QVLLTEIR	122
<i>EcoMscLH</i>	70	DL--NVFIQNVDFDLIVAFVAFVMAIKLINKLNKKEEPAAAPAPTKEEVLLTEIR	123
<i>TbMscL</i>	68	DL--NVLLSAAINFFLIAFAVYFLVLPYNTLRKKGE-VEQPGDT-QVLLTEIR	118
<i>EcoMscL</i>	72	VMHYGVFIQNVDFDLIVAFVAFVMAIKLINKLNKKEEPAAAPAPTKEEVLLTEIR	127

Fig. 14.1: Alignements utilisés pour construire les protéines hybrides. En rouge, la séquence provenant de *E. coli*, en noir celle de *M. tuberculosis*. *TbMscLH* : Tb-MscL avec les boucles périplasmiques de Eco-MscL (par la suite appelé *Tb_{Eco}-MscL*) ; *EcoMscLH* : Eco-MscL avec les boucles périplasmiques de Tb-MscL (par la suite appelé *Eco_{Tb}-MscL*).

Cent structures, pour un monomère de chaque protéine hybride, ont été modélisées grâce au programme Modeller (Fiser & Sali, 2003) à partir de l'alignement donné figure 14.1.

Afin de discriminer les différents modèles, nous nous sommes servis de la fonction objectif de Mo-

deller qui combine l'énergie interne de la protéine et l'énergie due aux contraintes imposées à la protéine par la conformation du support. Plus celle-ci est faible, plus les contraintes géométriques sont respectées et donc meilleur est le modèle. Nous disposons de structures de Eco-MscL et de Tb-MscL natifs. Nous avons donc, pour chaque résidu de la séquence de chacun des hybrides, au moins un résidu identique dans une structure de référence. L'ensemble des structures modélisées était donc très proches des structures initiales. Nous avons vérifié que les structures modèles sélectionnées présentaient bien la même orientation d'hélice transmembraire que les canaux natifs, que les boucles et les extrémités N- et Cterminales adoptaient une conformation proche de celle des canaux natifs et que la zone de constriction était bien présente au niveau des résidus V23 ou V21.

Les structures sélectionnées sont représentées figure 14.2. Les régions transmembranaires sont similaires, la différence se situant au niveau de la longueur de la boucle périplasmique. Le RMSd sur les résidus alignés entre Eco-MscL natif et Eco_{Tb} -MscL est de 2,9Å. Entre Tb-MscL natif et Tb_{Eco} -MscL, il est de 1,7Å.

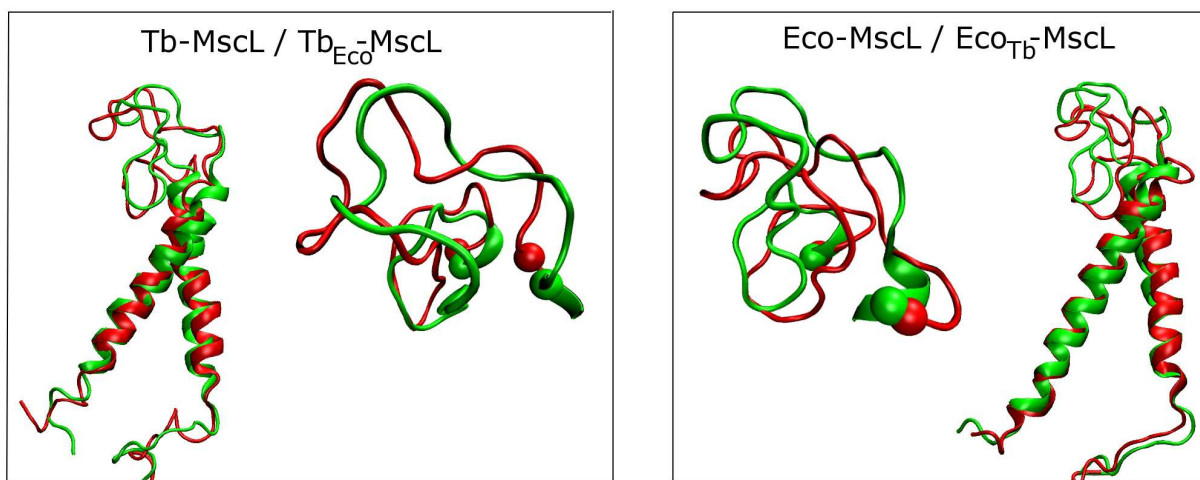


Fig. 14.2: Superposition entre monomères des canaux natifs et hybrides. Eco_{Tb} -MscL : boucles de Tb-MscL avec le reste de la structure de Eco-MscL, Tb_{Eco} -MscL : boucles de Eco-MscL avec le reste de la structure de Tb-MscL.

Les monomères ont ensuite été superposés à ceux des canaux natifs afin de reconstituer le pentamère et les chaînes latérales repositionnées avec SCWRL (Canutescu *et al.*, 2003). Les structures ainsi formées ont été minimisées pour éviter les mauvais contacts. Les canaux hybrides obtenus sont représentés figure 14.3.

Afin de tester leur stabilité, les canaux hybrides ont été simulés dans des membranes de POPE (fig.14.4). Les canaux restent stables tout au long des simulations (fig.14.5). Les différentes analyses ne sont pas détaillées ici. Toutefois, nous avons pu observer que les structures secondaires sont bien conservées, l'inclinaison des hélices transmembranaires et le diamètre du pore restent globalement constants. On peut donc considérer que les structures sont globalement stables et que les changements conformationnels observés dans le DMPE correspondent bien à des mouvements induits par le mésappariement hydrophobe et non par l'instabilité des structures.

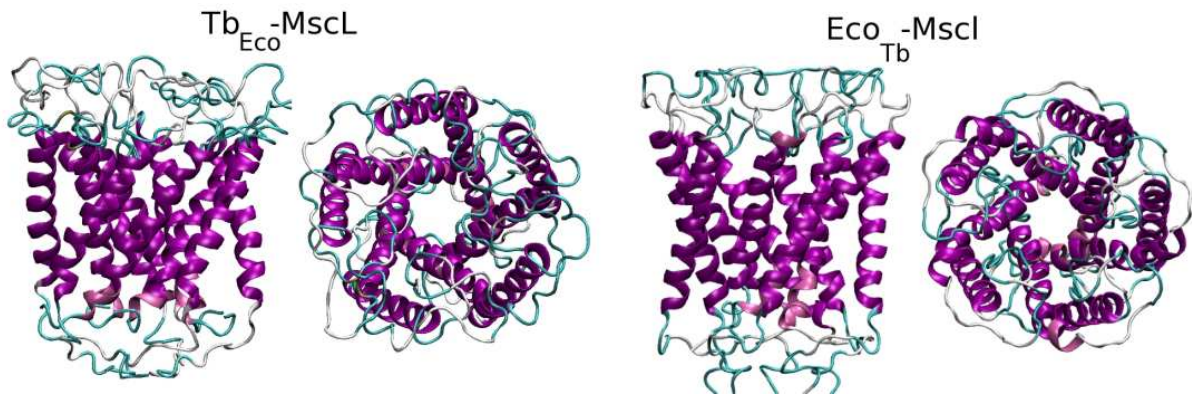


Fig. 14.3: Structures des canaux hybrides construits.

14.2 Réaction au mésappariement hydrophobe

14.2.1 Comportement général

Les deux canaux hybrides Tb_{Eco} -MscL (Tb-MscL avec les boucles périplasmiques de Eco-MscL) et Eco_{Tb} -MscL (Eco-MscL avec les boucles périplasmiques de Tb-MscL) ont été simulés dans des membranes de DMPE durant 4 ns, afin de tester si l'échange de boucles périplasmiques entraînait un changement de sensibilité au mésappariement hydrophobe.

Comme pour les autres canaux, la position des résidus I81 et L82 d'une part, et I86 et L87 d'autre part, a été suivie au cours du temps. Le positionnement de ces résidus par rapport à la membrane reste globalement identique sur l'ensemble des trajectoires.

Les deux canaux ne semblent pas réagir, de premier abord, de la même manière au mésappariement hydrophobe (fig. 14.6). Tb_{Eco} -MscL semble légèrement s'élargir. Les hélices s'inclinent, les boucles s'enfouissent totalement dans les têtes polaires. Ce comportement semble similaire à celui de Eco-MscL natif. Pour Eco_{Tb} -MscL, le comportement est inverse et similaire à celui de Tb-MscL natif. Le diamètre du canal semble diminuer et les hélices se redresser. Les boucles périplasmiques se situent toujours, en fin de simulation, au dessus des têtes polaires, en contact avec le solvant.

Cette première analyse visuelle des structures semble en accord avec le fait que l'échange des boucles périplasmiques entre les canaux entraîne un "échange" de sensibilité vis à vis du mésappariement hydrophobe. Les résultats soutiendraient alors l'hypothèse selon laquelle la boucle périplasmique est une région clé dans le phénomène de sensibilité à la membrane du canal MscL. Toutefois, des analyses plus approfondies sont nécessaires pour soutenir ces observations.

L'évolution des structures secondaires des hélices transmembranaires des deux canaux hybrides au cours du temps est présentée figure 14.7. Dans les deux cas, les structures hélicoïdales des TM2 sont très bien conservées au cours du temps. En ce qui concerne les TM1, on peut observer quelques pertes de structure en α -hélice, mais les structures secondaires restent tout de même bien conservées.

Ces résultats soutiennent la validité des structures modèles qui, bien que subissant des chan-

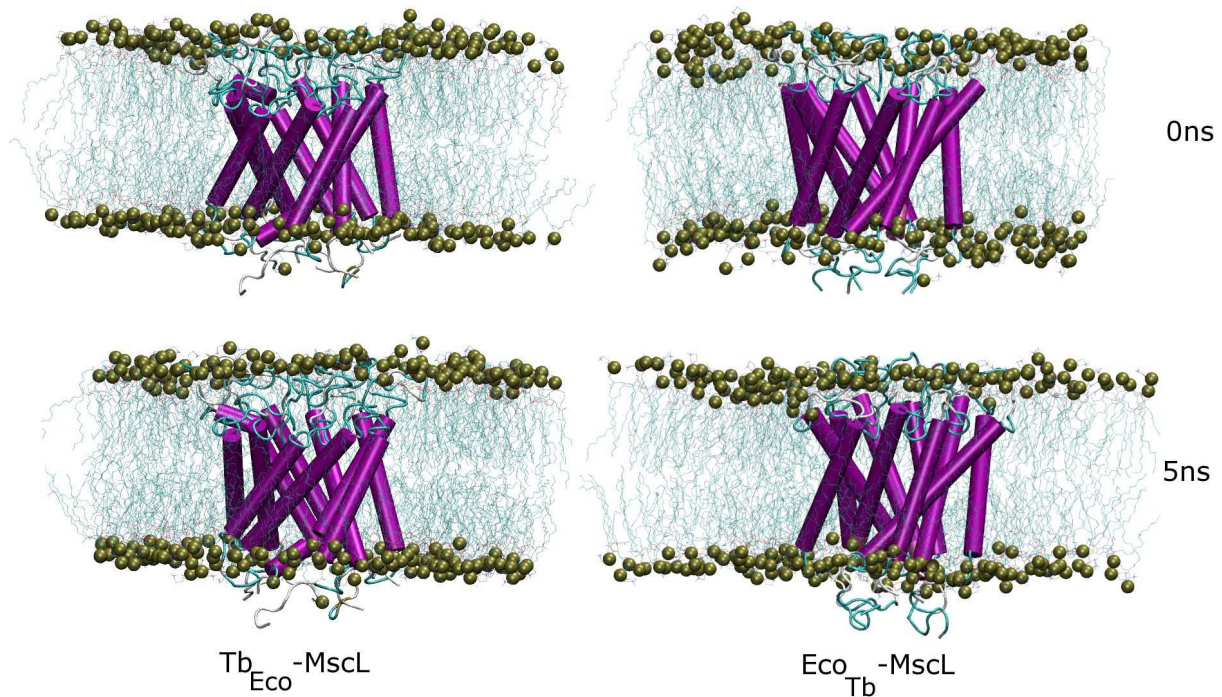


Fig. 14.4: Structures des canaux hybrides en début et fin de simulation dans le POPE.

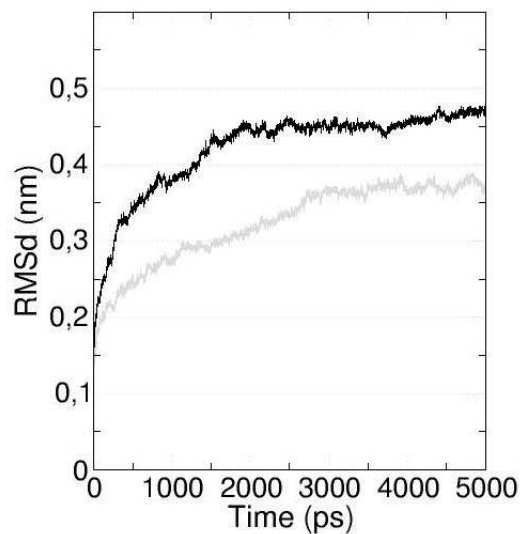


Fig. 14.5: Moyenne du RMSd sur les $C\alpha$ des canaux hybrides dans du POPE. En noir, Eco_{Tb} -MscL, en gris Tb_{Eco} -MscL.

gements conformationnels liés au mésappariement hydrophobe, restent stables en terme d'architecture. L'apparition d'une cassure dans le faisceau de liaisons hydrogène d'une TM1 de Tb_{Eco} -MscL pourrait être concomittante avec une courbure des hélices TM1.

14.2.2 Mouvements directs d'adaptation aux lipides

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux mouvements directs d'adaptation au mésappariement hydrophobe des canaux, en particulier l'inclinaison des hélices transmembranaires et l'enfouissement des boucles périplasmiques.

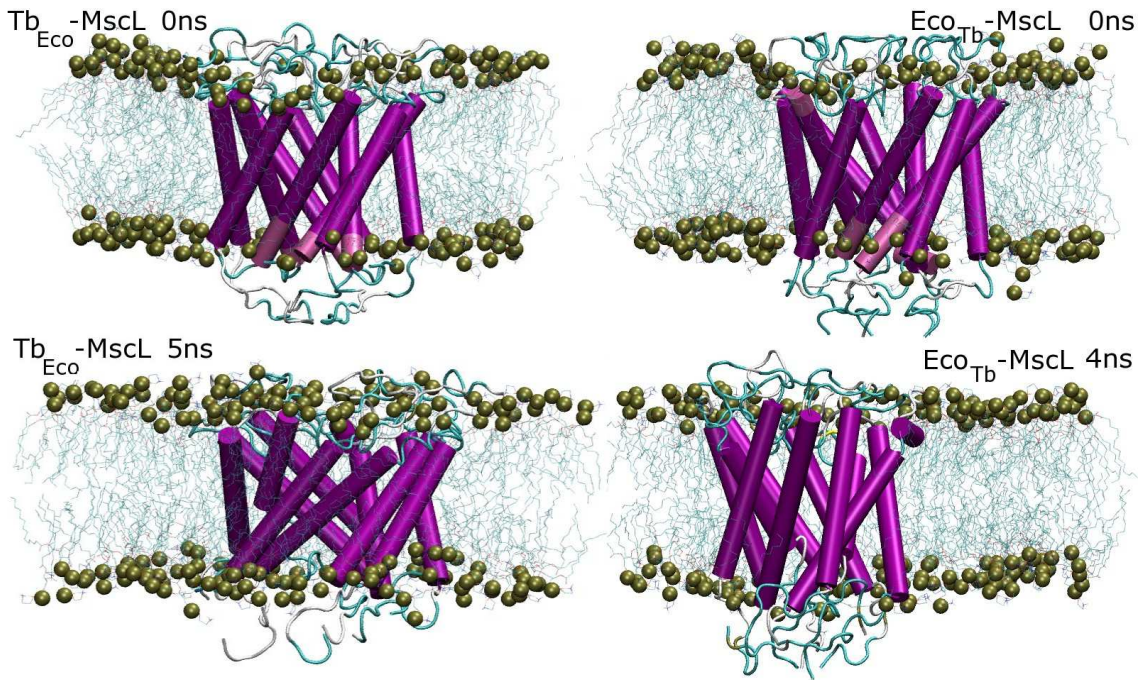


Fig. 14.6: Structures des canaux hybrides en début et fin de simulation dans le DMPE.

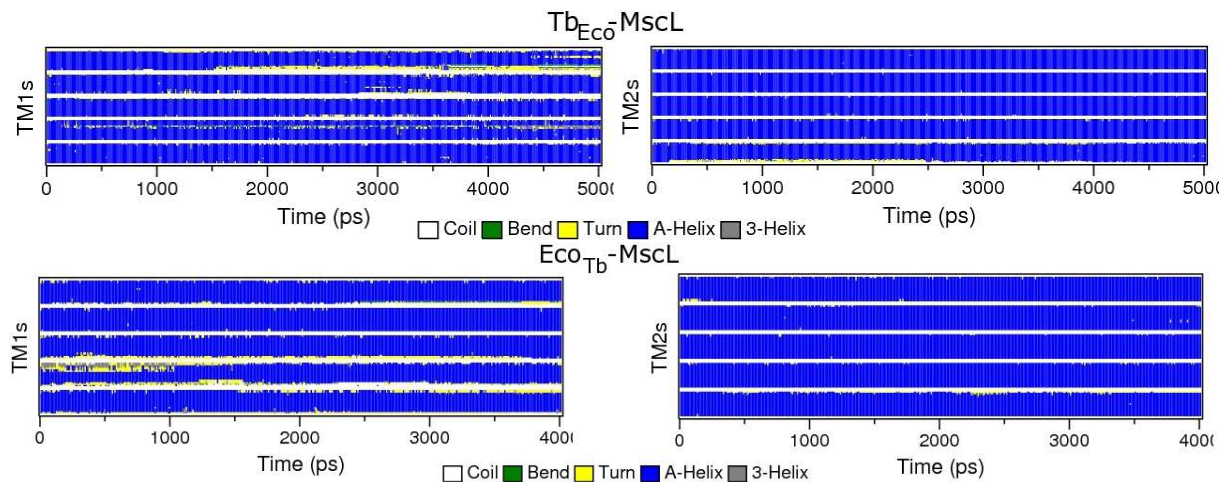


Fig. 14.7: Evolution des structures secondaires des hélices transmembranaires des canaux hybrides.

On observe une légère diminution de la hauteur (distance entre les extrémités des hélices, projetée sur la normale à la membrane) des hélices TM1 (2 \AA) et TM2 (0.5 \AA) de Tb_{Eco} -MscL, dont les segments transmembranaires sont pourtant ceux de Tb -MscL (fig.14.8 gauche, courbes noire et rouge). Pour Eco_{Tb} -MscL (fig.14.8 droite) dont les segments transmembranaires sont ceux de Eco -MscL, la hauteur des TM2 reste stable tandis que la hauteur des TM1 augmente de 3 \AA . Cette observation est confirmée par le calcul de l'angle d'inclinaison des hélices (fig. 14.9). Celui-ci augmente de plus de 5° pour Tb_{Eco} -MscL et diminue de quasiment 10° pour Eco_{Tb} -MscL. Le comportement est le même pour les boucles périplasmiques (fig.14.8 courbes vertes). Leur hauteur diminue pour Tb_{Eco} -MscL et reste stable pour Eco_{Tb} -MscL. Ces résultats suggèrent donc une adaptation du Tb_{Eco} -MscL à l'épaisseur hydrophobe des lipides par inclinaison des hélices transmembranaires, bien que cette adaptation soit moins prononcée que pour le canal

Eco-MscL natif. Eco_{Tb} -MscL ne subit pas de réarrangement structuraux allant dans le sens d'une absence d'adaptation à l'épaisseur hydrophobe des lipides, tout comme Tb-MscL natif.

En ce qui concerne l'épaisseur membranaire (courbes bleues et jaune de la figure 14.8), on observe, pour les deux canaux hybrides, la formation d'un bourgeon autour du canal. La hauteur des lipides dans le bulk reste stable alors que la hauteur des lipides proches du canal augmente. La hauteur des TM2 de Eco_{Tb} -MscL reste stable, l'inclinaison des TM2 de Tb_{Eco} -MscL reste modérée. Le bourgeonnement se forme donc pour limiter les interactions entre résidus hydrophobes et têtes polaires des lipides.

La diminution de hauteur, observée pour le Tb_{Eco} -MscL, ne s'accompagne pas d'une cassure des hélices transmembranaires (fig.14.10 gauche) dans le sens d'une rupture des liaisons hydrogène. L'angle de courbure reste le même en moyenne tout au long de la trajectoire. Toutefois, la courbure des TM1 oscille fortement autour de sa valeur moyenne, soulignant une fragilité de ces hélices. La courbure moyenne des hélices de Eco_{Tb} -MscL diminue quant à elle légèrement (de l'ordre de 5°) au cours de la trajectoire. Tout comme pour Tb_{Eco} -MscL, l'oscillation de sa valeur est beaucoup plus importante pour les TM1.

L'ensemble des résultats présentés ici concernent les changements conformationnels d'adaptation au mésappariement hydrophobe. Ils montrent que Tb_{Eco} -MscL, au contraire de Eco_{Tb} -MscL, tend à changer de conformation pour limiter les interactions entre résidus hydrophobes et têtes polaires des lipides. Cette adaptation de Tb_{Eco} -MscL s'effectue malgré des segments transmembranaires identiques au Tb-MscL natif, qui, lui, ne s'adapte pas au mésappariement hydrophobe. Le canal Tb-MscL devient donc plus sensible au mésappariement hydrophobe lorsqu'il est pourvu des boucles périplasmiques de Eco-MscL. A l'inverse, Eco-MscL devient moins sensible au mésappariement hydrophobe lorsqu'il est pourvu des boucles périplasmiques de Tb-MscL. Ces résultats soutiennent donc l'hypothèse selon laquelle la boucle périplasmique jouerait un rôle majeur dans la réponse du canal MscL au mésappariement hydrophobe. Toutefois, il est important de noter que les changements conformationnels induits chez Tb_{Eco} -MscL sont de beaucoup plus petite amplitude que chez Eco-MscL natif, suggérant que la boucle périplasmique participe mais n'est pas seule responsable de la sensibilité.

14.2.3 Phénomènes induits

Nous avons vu dans le chapitre 12 que l'adaptation du canal Eco-MscL natif à la membrane s'accompagnait d'une rotation claire dans le sens des aiguilles d'une montre des hélices transmembranaires. Le phénomène de rotation est plus difficile à caractériser dans le cas des canaux hybrides (fig. 14.11) et une des explications peut venir du fait que les moyennes ne sont calculées que sur une simulation de chaque système.

Comme l'angle de cassure des hélices TM1 fluctue beaucoup, nous les avons traité comme constituées de deux blocs indépendants vis à vis de la rotation axiale. La rotation des deux blocs étant similaire, les résultats ont été regroupés. Cette observation permet de confirmer, malgré les fluctuations, l'absence de cassure réelle des hélices TM1. Les TM2 sont considérées

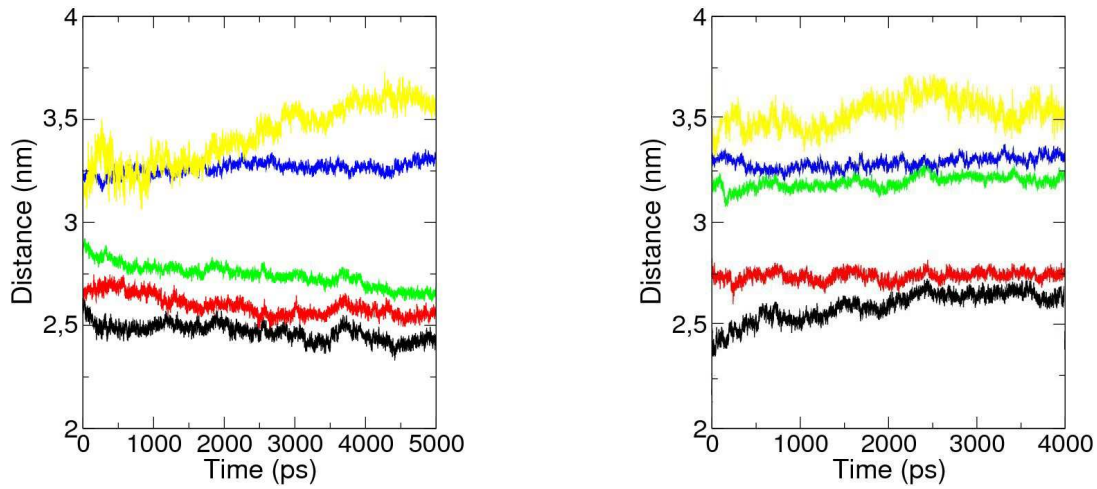


Fig. 14.8: Evolution de la hauteur des hélices transmembranaires, du positionnement de la boucle et de l'épaisseur membranaire au cours des simulations de *TbEco*-MscL (à gauche) et de *EcoTb*-MscL (à droite). En jaune les lipides au contact du canal, en bleu les lipides du bulk, en vert la boucle périplasmique, en noir les hélices TM1 et en rouge les hélices TM2.

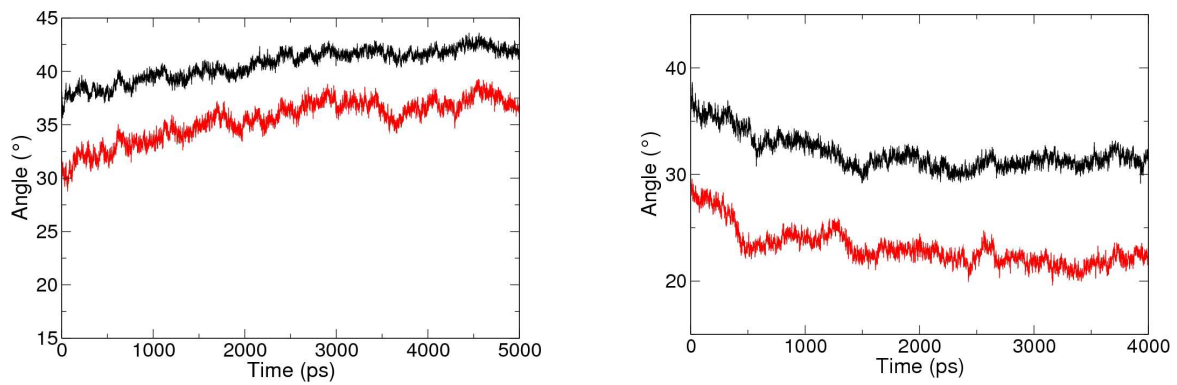


Fig. 14.9: Evolution de l'inclinaison des hélices transmembranaires de *TbEco*-MscL (à gauche) et de *EcoTb*-MscL (à droite). En noir, les hélices TM1, en rouge les TM2.

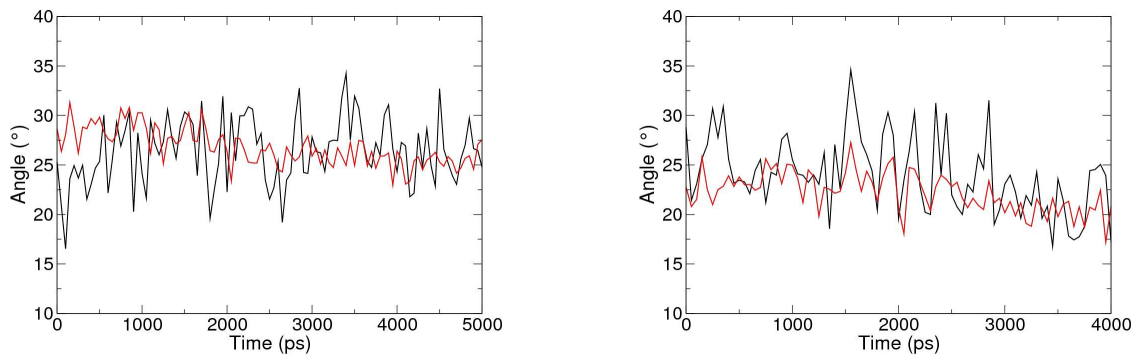


Fig. 14.10: Evolution de l'angle de cassure des hélices transmembranaires de *TbEco*-MscL (à gauche) et de *EcoTb*-MscL (à droite). En noir, les hélices TM1, en rouge les TM2.

comme rigides, tous les résidus subissant la même rotation.

Pour Tb_{Eco} -MscL, on observe une rotation horaire de 20° des hélices TM1 et TM2 dans les tout premiers temps de simulation. L'orientation des hélices TM2 reste ensuite stable. Par contre, pour les TM1, on observe une rotation progressive dans le sens inverse pour atteindre une rotation anti-horaire de 10° par rapport à l'orientation initiale.

Pour Eco_{Tb} -MscL, les hélices TM1 et TM2 subissent une rotation anti-horaire progressive de 10° .

En terme de rotation, la tendance est donc aussi inversée par rapport aux canaux natifs : rotation horaire pour Tb_{Eco} -MscL, comme Eco-MscL natif et rotation anti-horaire de Eco_{Tb} -MscL, comme Tb-MscL natif. Cependant, on observe bien ici que ce phénomène n'est pas si simple. Le comportement des hélices TM1 de Tb_{Eco} -MscL est difficile à interpréter. Un meilleur échantillonnage, obtenu par un plus grand nombre de simulations, pourrait permettre de savoir s'il s'agit d'un épiphénomène ou s'il est reproductible.

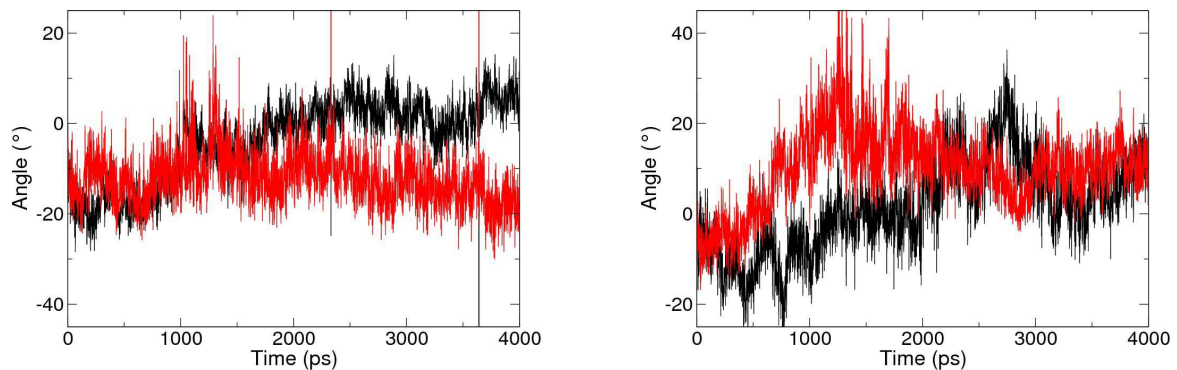


Fig. 14.11: Evolution de l'angle de rotation azimuthale des hélices transmembranaires de Tb_{Eco} -MscL (à gauche) et de Eco_{Tb} -MscL (à droite). En noir, les hélices TM1, en rouge les TM2.

L'ensemble des résultats présentés ici montre qu'au niveau des tendances générales, Tb_{Eco} -MscL se comporte plus comme Eco-MscL natif et Eco_{Tb} -MscL comme Tb-MscL natif. Ils vont donc dans le sens d'une inversion de la sensibilité au mésappariement hydrophobe avec l'inversion des boucles périplasmiques. la question qui subsiste alors est "L'effet au niveau de l'élargissement du pore est-il lui aussi inversé?"

La figure 14.12 présente le profil du pore des canaux hybrides en début et fin de simulation. Le diamètre minimal du pore de Tb_{Eco} -MscL passe de 2 à 4 Å. Le pore ne subit pas de modification majeure dans la région périplasmique. A l'inverse, pour Eco_{Tb} -MscL, on observe une diminution du diamètre minimal du pore et un rétrécissement de la cavité périplasmique.

Il semble donc que Tb_{Eco} -MscL subisse des mouvements allant vers l'élargissement du pore tandis que Eco_{Tb} -MscL subisse des mouvements pouvant aller vers une fermeture complète du pore.

14.2.4 Boucle périplasmique

En terme de fluctuation, on ne retrouve pas d'inversion des profils avec l'inversion de la boucle (fig. 14.13 et 14.14). On n'observe pas non plus d'adaptation des fluctuations des boucles au canal avec lequel elles ont été associées. Les fluctuations des boucles de Tb_{Eco} - et de Eco_{Tb} -MscL diffèrent globalement de celles de Eco- et Tb-MscL natifs. Cependant, il est important de

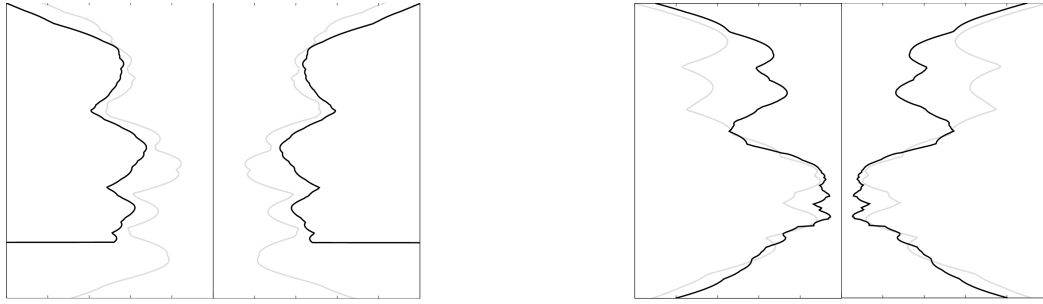


Fig. 14.12: Profil du pore de Tb_{Eco} -MscL (gauche) et de Eco_{Tb} -MscL (à droite) dans le DMPE. En noir, le profil en fin de simulation, en gris celui en début de simulation.

noter que l'échantillonnage n'est pas le même, ce qui peut avoir une importance.

Toutefois, lorsque l'on regarde de plus près les fluctuations des boucles de Eco_{Tb} - et Tb -MscL natif, on s'aperçoit que pour les résidus 59 à 68 et 57 à 66 respectivement, les profils sont très similaires. Cette région, et principalement les résidus I59, I61 (formant les pivots) et G63 (de grande flexibilité), doit donc jouer un rôle important dans le fait que le canal reste fermé. L'importance de I61 avait déjà été soulignée dans le chapitre précédent (sections 13.3.3 et 13.3.4). Une étude plus approfondie des boucles périplasmiques et plus spécifiquement de ces résidus, ainsi que des résidus R45, D53, R58 et D68 identifiés dans le chapitre précédent, nous aiderait à caractériser les spécificités de chaque boucle périplasmique et les raisons de leur effet sur la dynamique globale du canal. Ceci permettrait probablement de mieux comprendre les phénomènes qui régissent la différence de sensibilité.

14.2.5 Une Inversion de la sensibilité ?

Les mouvements directs d'adaptation au mésappariement hydrophobe, ainsi que les mouvements induits par l'élargissement du canal ont été analysés ici. L'ensemble des résultats (table 14.1) soutiennent une inversion de tendance quant à la sensibilité au mésappariement hydrophobe induite par un échange des boucles périplasmiques entre les canaux Eco- et Tb -MscL. Ces résultats soutiennent donc l'hypothèse selon laquelle la boucle périplasmique serait une région clé pour la détermination du niveau de sensibilité du MscL.

	Eco_{Tb} -MscL	Tb_{Eco} -MscL	Eco-MscL	Tb -MscL
inclinaison TM	non	oui	oui	non
rotation TM	anti-horaire	horaire	horaire	anti-horaire
courbure TM	stable	stable	augmente	stable
bourgeonnement membrane	oui	oui	non	oui
élargissement pore	non	oui	oui	non

Tab. 14.1: Récapitulatif des tendances observées pour les MscL natifs et hybrides dans du DMPE.

Il est à noter que les résultats obtenus ici ne proviennent que d'une simulation de chaque système. Il est donc nécessaire d'effectuer d'autres simulations afin de vérifier qu'ils ne soient pas artéfactuels. Toutefois, toutes les simulations de Eco-MscL natif ont permis d'observer un élargissement du pore, ce qui n'est pas le cas ici pour Eco_{Tb} -MscL. A l'inverse, aucune simulation

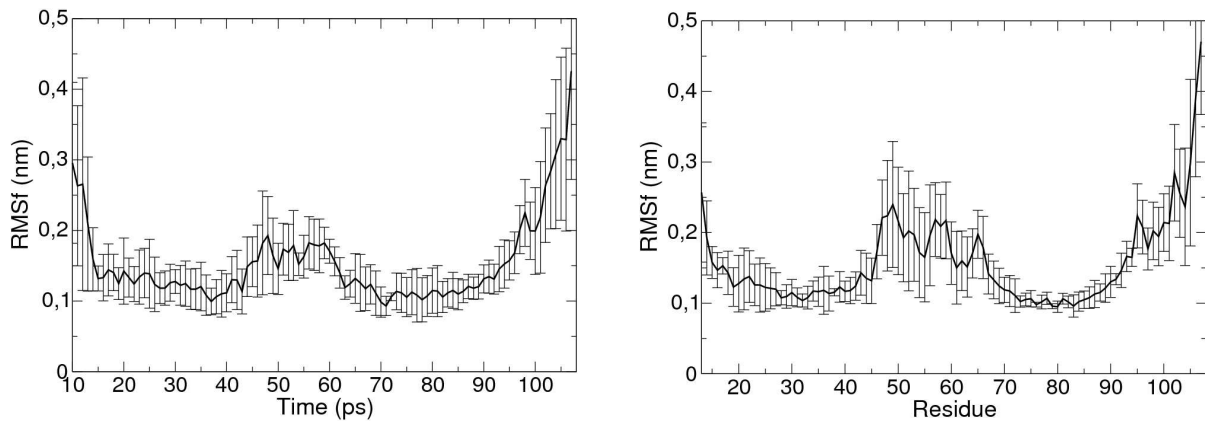


Fig. 14.13: Profils de fluctuation de Tb_{Eco} -MscL (à gauche) et de Eco_{Tb} -MscL (à droite).

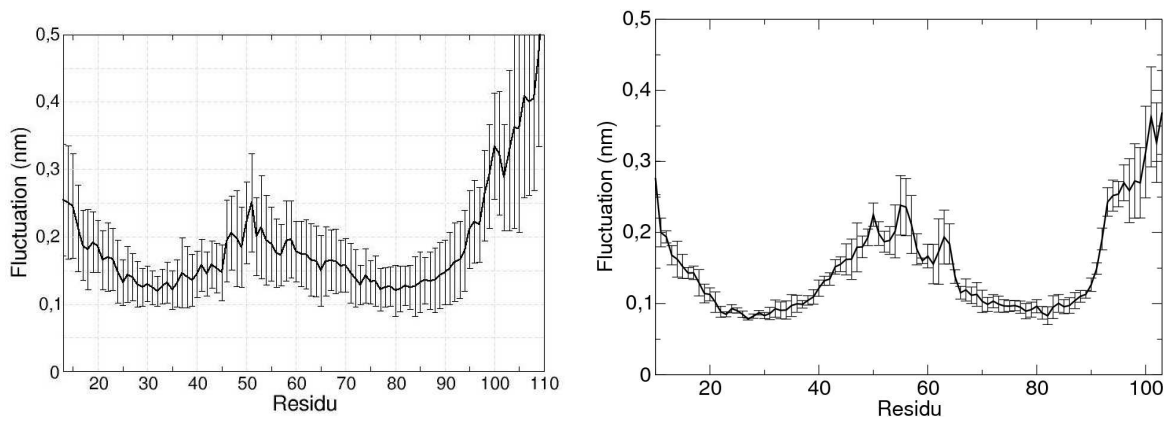


Fig. 14.14: Rappel des profils de fluctuation de Eco- (à gauche) et de Tb-MscL (à droite) natifs.

de Tb-MscL natif n'a permis d'observer un élargissement du pore, alors que le pore de Tb_{Eco} -MscL semble s'élargir. Même si les résultats obtenus ici ne sont que préliminaires, il semble plus que probable que le changement de boucle périplasmique entre les canaux induit une modification de leur sensibilité.

Quatrième partie

Discussion et Conclusion

Chapitre 15

Discussion générale

15.1 Modèle structural et conditions de Simulation

15.1.1 Importance du modèle structural

Les études effectuées ici sur le MscL de *E. coli* ont porté sur le modèle structural développé au sein du laboratoire (Valadié *et al.*, 2003). La plupart des études effectuées précédemment sur la séquence du MscL de *E. coli* se sont concentrées sur le modèle de Sukharev *et al.* (2001a). Plusieurs différences existent entre ce modèle et le notre. Les hélices transmembranaires sont, par exemple, plus longues dans le modèle de Sukharev, résultant en une boucle périplasmique plus courte (voir section 4.3.3). Dans le modèle de l'état fermé de Sukharev, plusieurs ponts salins (K55 et D53) sont présents entre les boucles périplasmiques de sous-unités adjacentes. Ces liaisons sont supposées se rompre dans le modèle de l'état ouvert. La présence de ponts salins peut augmenter la barrière énergétique à franchir pour les changements de conformation. Sur des temps de simulation, de telles interactions sont difficiles à casser. C'est la raison pour laquelle, Gullingsrud & Schulten (2003) ont considéré une conformation alternative pour les chaînes latérales, privilégiant des ponts salins intra sous-unité. Dans notre modèle, il n'y a pas de pont salin dans cette région. Ceci peut expliquer pourquoi les changements conformationnels sont facilités.

15.1.2 Stabilité du modèle

Lors de ce travail, nous avons comparé les mouvements induits par une diminution d'épaisseur membranaire sur deux structures : la structure cristallographique du MscL de *M. tuberculosis* et un modèle du MscL de *E. coli*. Les changements conformationnels observés pour le MscL de *E. coli* ne sont pas reproduits pour le MscL de *M. tuberculosis*. Cette différence de comportement ne peut pas être imputée à une instabilité du modèle.

Tout d'abord, le modèle étant construit pas homologie au MscL de *M. tuberculosis*, leurs structures sont proches, pour des séquences proches. La stabilité globale des structures doit donc être similaire. Effectivement, le modèle structural utilisé semble valide si l'on considère sa stabilité significative dans les simulations dans une membrane appropriée (POPE). Pour toutes les simulations effectuées, quel que soient les conditions testées, l'écart quadratique moyen (RMSd) pour les régions transmembranaires est similaire et conforme aux valeurs observées pour différentes

protéines membranaires, avec différents champs de force, lipides, protocoles de simulation, etc (Capener *et al.* , 2000; Gullingsrud *et al.* , 2001; Elmore & Dougherty, 2003) et les structures secondaires sont stables.

En outre, il a été observé expérimentalement que, placé dans une membrane de C14, le MscL *E. coli* adoptait une structure intermédiaire le long du chemin d'ouverture (Perozo *et al.* , 2002b). Les mouvements décrits ici et l'état final observé correspondent bien à un possible intermédiaire. Les structures secondaires restent de plus relativement stables. Les mouvements ne sont donc pas des mouvements induits par une instabilité de la structure ou de mauvais contacts.

Finalement, une différence de sensibilité à la tension membranaire a été observée pour les canaux MscL de *M. tuberculosis* et de *E. coli*. Le MscL de *M. tuberculosis* est deux fois plus difficile à ouvrir que celui de *E. coli* (Maurer *et al.* , 2000). La différence de comportement dans des membranes présentant un mésappariement hydrophobe pourrait être mise en relation avec cette différence de mécanosensibilité.

15.1.3 Conditions de simulation

Les simulations analysées ici ont été effectuées en utilisant un traitement électrostatique de type cut-off et un couplage à la pression isotropique. Ce choix a été fait dans un souci de comparaison aux simulations effectuées à l'époque du début de ce travail (Gullingsrud *et al.* , 2001). Il a été montré que ces paramètres n'étaient pas l'idéal pour les simulations de systèmes membranaires (Patra *et al.* , 2003; Kandt *et al.* , 2007). Cependant, nous avons effectué différentes simulations, dans lesquelles de nombreuses conditions (vitesses initiales, température, contraintes, électrostatique, couplage à la pression) ont été modifiées. Dans tous les cas, nous avons observé des résultats similaires en terme de dynamique du canal. Les conclusions tirées de l'effet de l'épaisseur membranaire étaient sensiblement les mêmes. Par exemple, les résultats obtenus en utilisant le cut-off ou un traitement électrostatique de type reaction-field ne diffèrent que par le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre mais les mouvements décrits sont les mêmes.

15.2 Influence de l'épaisseur membranaire

15.2.1 Mésappariement hydrophobe

Elmore & Dougherty (2003) avaient déjà adressé, par dynamique moléculaire, l'effet d'un raccourcissement des chaînes acyles des lipides sur le MscL de *M. tuberculosis*. Cependant, ils avaient choisi de simuler une diminution progressive de la longueur des chaînes au cours du temps. Cette procédure était supposée servir d'approximation grossière de l'application d'une tension sur le système lipide-protéine. Les résultats qu'ils ont obtenus sont relativement similaires à ce que nous avons obtenu sur le canal de *M. tuberculosis* dans le DMPE. Ils observent un mésappariement hydrophobe clair, entraînant un bourgeonnement de la membrane autour du canal. Le comportement du MscL diffère d'une simulation à l'autre, mais dans tous les cas il semble que l'adaptation au mésappariement hydrophobe se fasse par des changements mineurs de conformation. Ces résultats semblent confirmer nos observations quant à la dynamique du MscL de *M. tuberculosis* lors d'un mésappariement hydrophobe. Toutefois, le fait d'utiliser ici des membranes pré-équilibrées est plus proche des expériences de (Perozo *et al.* , 2002b) dans

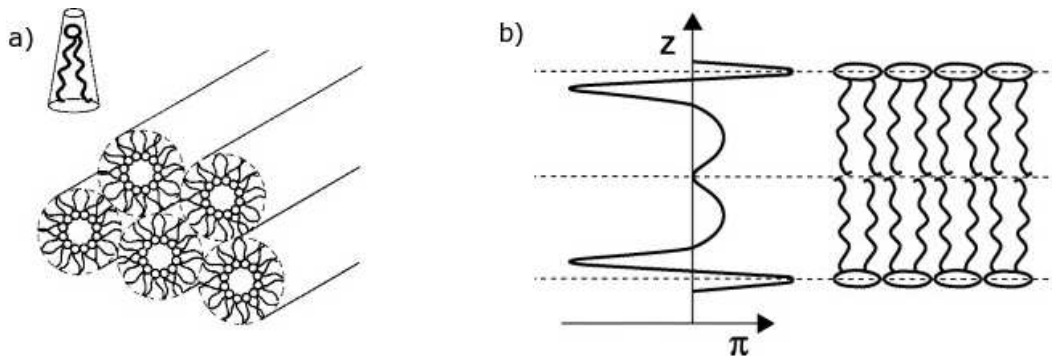


Fig. 15.1: a) Illustration de la structure conique des lipides PE qui forment préférentiellement des structures à courbure négative telles que la phase hexagonale. b) Représentation schématique du profil de pression latérale d'une bicouche lipidique. La pression latérale π est indiquée en fonction de l'enfouissement dans la membrane. Une pression négative est observable à l'interface polaire-apolaire. (Extrait de van den Brink-van der Laan *et al.* (2004))

lesquelles le comportement du canal était étudié dans des membranes d'épaisseur variable. Par contre, c'est la première fois ici que l'influence de l'épaisseur membranaire sur la séquence de *E. coli* est testée par dynamique moléculaire. Les résultats obtenus sont complètement différents de ceux décrits ci-dessus. En effet, quel que soit la simulation considérée, le MscL de *E. coli* s'adapte à l'épaisseur de la membrane avec des changements conformationnels relativement importants d'inclinaison, de courbure et de rotation des hélices transmembranaires, induisant une diminution de hauteur et un élargissement du canal. La comparaison directe entre les vecteurs principaux décrivant les fluctuations des trajectoires et les modes normaux calculés à partir du potentiel gros grain de Tirion (1996) indiquent que la diminution d'épaisseur membranaire accélère simplement les changements conformationnels impliqués dans la mécanique du canal. De plus, ces mouvements sont relativement similaires à ceux décrits dans le modèle d'ouverture de Sukharev *et al.* (2001b) ainsi que ceux décrits par Perozo *et al.* (2002b). Le canal de *E. coli* nécessite une tension plus faible pour s'ouvrir que celui de *M. tuberculosis*. Ceci peut signifier que les changements conformationnels requis pour ouvrir le canal sont plus faciles à réaliser. La différence de comportement est donc imputable à une différence de séquence. L'étude que nous avons menée sur le MscL de *E. coli* permet donc de décrire un possible intermédiaire structural proposé, où les hélices transmembranaires sont inclinées et courbées, et ce, à un niveau de détail atomique.

15.2.2 Profil de pression latérale

Les lipides utilisés pour constituer les membranes simulées sont des phosphatidyl-éthanolamine (POPE et DMPE). Ce sont donc des lipides ne formant pas de bicouches en conditions "normales" : leur structure globalement conique induit une préférence pour des structures à courbure négative (fig. 15.1.a). Il a été montré (van den Brink-van der Laan *et al.*, 2004) que de tels lipides induisaient, dans les membranes, une pression latérale variant avec l'enfouissement dans la bicouche (fig. 15.1.b). Cette pression latérale est nulle si le système peut être relâché.

Les analyses effectuées ici ont été réalisées sur des simulations avec un couplage isotropique à la pression. Il n'est donc pas possible de relâcher la pression latérale. On peut alors se demander

si les effets observés sont bien liés au mésappariement hydrophobe et non à ce phénomène. Cependant, nous avons vu que quelles que soient les conditions de simulation (couplage à la pression semi-isotropique, par exemple), des résultats similaires étaient obtenus en terme de dynamique du canal. Seuls les temps nécessaires pour atteindre l'équilibre variaient. On peut donc supposer que les mouvements observés sont bien liés au mésappariement hydrophobe mais que la pression latérale pouvant être induite accélère la cinétique d'ouverture.

15.3 Rôle de la boucle périplasmique

L'influence de la boucle périplasmique dans le mécanisme de sensibilité au mésappariement hydrophobe a été de nombreuses fois soulevée lors de ce travail.

Tout d'abord, lors de l'étude du MscL de *E. coli*, il semblait clair que les mouvements observés étaient guidés par une compétition entre solvant et lipides pour l'interaction avec les boucles périplasmiques. Ensuite, une grande différence de sensibilité est observée entre les MscL de *E. coli* et *M. tuberculosis*. Or, les séquences de ces deux espèces diffèrent essentiellement au niveau des boucles périplasmiques. Le modèle du MscL de *E. coli* ayant été construit par homologie à celui de *M. tuberculosis*, les structures des deux canaux sont proches, différant aussi essentiellement au niveau de la boucle périplasmique. Finalement, une inversion des boucles périplasmiques entre les deux canaux induit un changement de sensibilité : Le MscL de *M. tuberculosis* avec les boucles de celui de *E. coli* s'adapte au mésappariement hydrophobe, comme le MscL de *E. coli*, ce qui n'est pas le cas pour le MscL de *E. coli* avec les boucles de celui de *M. tuberculosis*, tout comme le MscL de *M. tuberculosis*.

Le rôle essentiel de cette région a déjà été souligné plusieurs fois, aussi bien expérimentalement (Ajouz *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2004) que par dynamique moléculaire (Meyer *et al.*, 2006). L'hypothèse formulée à partir de ces observations est que la boucle périplasmique agirait comme un ressort résistant au mouvement des hélices transmembranaires.

Les résultats obtenus ici sont en accord avec cette hypothèse. Nous avons soulevé le rôle que pourraient jouer les résidus R45, D53, R58 et D68 chez *M. tuberculosis*. Ils pourraient former un réseau d'interactions fortes entre eux, rigidifiant la boucle périplasmique, mais aussi avec le solvant. Ces interactions seraient difficilement compensables énergétiquement, contraignant le canal dans sa conformation. Toutefois, d'autres études plus approfondies de ces résidus doivent être effectuées afin de confirmer cette hypothèse. L'importance des résidus I61 chez *M. tuberculosis* Q65 chez *E. coli*, déjà montrée par Tsai *et al.* (2005), a aussi été soulignée mais les résultats ne permettent pas d'effectuer d'hypothèse claire quant à leur rôle dans le phénomène de sensibilité.

15.4 Mécanisme d'ouverture

Nous avons testé ici la sensibilité des canaux MscL à la diminution d'épaisseur membranaire. Le MscL de *E. coli* s'adapte au mésappariement hydrophobe, se stabilisant dans une conformation bien distincte de la structure fermée. Perozo *et al.* (2002b) ont montré que le MscL placé dans des lipides C14 nécessitait une tension plus faible pour s'ouvrir, adoptant une structure intermédiaire le long du chemin d'ouverture. Les mouvements d'adaptation que nous obser-

vons peuvent donc être considérés comme des mouvements menant à un intermédiaire et des mouvements décrivant les premières étapes d'ouverture du MscL. Ces mouvements consistent essentiellement en une inclinaison des hélices transmembranaires, associées à une diminution d'épaisseur et un élargissement du canal. Ces mouvements correspondent aux mouvements d'ouverture proposés dans le modèle de Sukharev *et al.* (2001b) et soutenus par de nombreuses données expérimentales (Perozo *et al.* , 2002a; Chiang *et al.* , 2005; Corry *et al.* , 2005). Toutefois certains détails diffèrent du modèle proposé par Sukharev. Tout d'abord, nous observons une courbure des hélices alors que celles-ci sont considérées comme des corps rigides dans le modèle d'ouverture. Cette courbure a été observée à plusieurs reprises lors d'expériences de dynamique moléculaire (Kong *et al.* , 2002; Elmore & Dougherty, 2003) et a été démontrée comme caractéristique des protéines membranaires (Sansom & Weinstein, 2000). De plus, nous observons une rotation des hélices transmembranaires. Cette rotation est supportée elle aussi par de nombreuses expériences (Perozo *et al.* , 2002a; Bartlett *et al.* , 2004; Levin & Blount, 2004) et a été observée en simulation (Colombo *et al.* , 2003). Finalement, nos résultats décrivent des mouvements asymétriques au sein du canal, contrairement au modèle de Sukharev basé sur une symétrie axiale des mouvements. Cette asymétrie a été montrée expérimentalement (Moe *et al.* , 2000; Iscla *et al.* , 2007) et observée à de nombreuses reprises (Bilston & Mylvaganam, 2002; Kong *et al.* , 2002; Colombo *et al.* , 2003).

Chapitre 16

Conclusions et perspectives

Les canaux mécanosensibles sont des canaux présentant la particularité de pouvoir traduire un stress mécanique en information intégrable par la cellule. Le premier canal mécanosensible caractérisé et le plus étudié est le canal mécanosensible bactérien de grande conductance MscL. Il agit comme une véritable soupape de sécurité, prévenant la lyse de la bactérie lors de chocs hypoosmotiques. Ce canal, dont la structure fermée a été résolue par cristallographie (Chang *et al.*, 1998), est un modèle idéal, permettant la combinaison de résultats expérimentaux et computationnels, pour comprendre comment les canaux mécanosensibles sentent la tension membranaire et y répondent. La compréhension des mécanismes de sensibilité et de réponse à la tension du MscL permettrait d'obtenir une vue du rôle des différents domaines protéiques, de l'eau et des lipides. Ceci permettrait de concevoir des mécanismes généraux applicables à des systèmes mécanosenseurs plus élaborés.

Mon travail a consisté à étudier la dynamique du canal mécanosensible MscL au sein de bicouches lipidiques modèles d'épaisseur variable. Il était basé sur les expériences de Perozo *et al.* (2002b) montrant qu'un mésappariement hydrophobe permettait d'obtenir un intermédiaire structural le long du chemin d'ouverture. L'objectif était de comprendre les mécanismes de la sensibilité ainsi que les premières étapes de son mécanisme d'ouverture à un niveau atomique.

Nous avons mis en évidence que le mésappariement hydrophobe entraînait des interactions défavorables entre résidus hydrophobes et têtes polaires et solvant. Ces interactions sont mises en balance avec des interactions favorables entre la boucle périplasmique et les têtes polaires et le solvant. En fonction de la séquence, l'une ou l'autre de ces interactions va dominer et le mésappariement hydrophobe va soit entraîner un changement conformationnel du canal soit un bourgeonnement de la membrane.

Pour le MscL de *E. coli*, nous avons pu caractériser un intermédiaire structural le long du chemin d'ouverture et ainsi déterminer les premières étapes du mécanisme d'ouverture du MscL. Il serait intéressant maintenant de déterminer l'ensemble des étapes de son mécanisme d'ouverture. Pour cela, il faut trouver une méthode permettant d'obtenir une structure totalement ouverte mais ceci n'est pas aisé. Durant ma thèse, nous avons essayé de suivre pas à pas les directions de mouvements obtenus par analyse en modes normaux mais, pour plusieurs raisons, cette tentative

a été infructueuse (voir Annexe). Il faudrait donc peut-être envisager d'autres stratégies. Une autre méthode serait de simuler le MscL dans une membrane courbe, Perozo *et al.* (2002b) ayant montré que la courbure membranaire stabilisait le MscL dans une structure ouverte. Meyer *et al.* (2006) ont déjà essayé de simuler le MscL dans une membrane courbe mais sans observer d'ouverture. La membrane qu'ils ont utilisée n'était en effet pas courbe mais conique et la structure de Sukharev qu'ils ont utilisée présente des ponts salins entre sous-unités difficiles à casser sur des temps de simulation. Un problème supplémentaire des membranes courbes réside dans les conditions périodiques. Il serait donc nécessaire d'utiliser de très grandes membranes qui soulève le problème de la taille du système. Une solution serait d'utiliser un modèle gros grain (Shih *et al.*, 2007; Reynwar *et al.*, 2007) ou un modèle mixte (Ayton *et al.*, 2007), qui permettrait de simuler de grandes membranes courbes sur des temps longs.

La différence de sensibilité observée entre les canaux de *E. coli* et de *M. tuberculosis* nous a permis de souligner le rôle important que jouait la boucle périplasmique. Toutefois, l'étude des canaux hybrides, où les boucles périplasmiques des MscL de *E. coli* et *M. tuberculosis* ont été inversées, n'est que préliminaire. Il serait donc intéressant de poursuivre cette étude et de caractériser l'ensemble des interactions intervenant dans le phénomène de sensibilité au mésappariement hydrophobe. De plus, nous avons pointé ici l'importance de certains résidus de la boucle périplasmique dans le phénomène de sensibilité, mais aucune donnée expérimentale ne permet de soutenir cette observation. Il serait donc intéressant de muter ces résidus et de tester le phénotype induit.

Finalement, dans les études que nous avons menées, les extrémités N- et Cterminales n'étaient pas présentes. Le rôle putatif de l'extrémité Nterminale, comme seconde barrière pour l'ouverture, proposé dans le modèle de Sukharev est fortement controversé. De plus, le récent affinement de la structure cristallographique propose un placement de l'hélice Nterminale à l'interface entre la membrane et le solvant, formant avec l'hélice TM1 une conformation similaire à l'hélice TM3 du MscS (elle aussi bordant le pore). Il serait donc intéressant de modéliser cette région et d'étudier sa dynamique afin de discriminer les deux propositions de placement et de comprendre sa fonction. La structure de la région Cterminale a été, quant à elle, déterminée et déjà modélisée et étudiée pour la structure de Sukharev du MscL de *E. coli*. Il serait donc intéressant de la replacer sur notre modèle et d'étudier son influence sur la dynamique globale du canal.

L'étude du canal MscL est donc un sujet très intéressant permettant de comprendre les mécanismes de sensibilité et de réponse à la tension membranaire mais de nombreuses questions restent à ce jour irrésolues et de nombreuses études restent encore à être menées.

Bibliographie

Bibliographie

- Agre, Peter. 2006. The aquaporin water channels. *Proc Am Thorac Soc*, **3**(1), 5–13.
- Ajouz, B, Berrier, C, Garrigues, A, Besnard, M, & Ghazi, A. 1998. Release of thioredoxin via the mechanosensitive channel MscL during osmotic downshock of Escherichia coli cells. *J Biol Chem*, **273**(41), 26670–26674.
- Ajouz, B, Berrier, C, Besnard, M, Martinac, B, & Ghazi, A. 2000. Contributions of the different extramembranous domains of the mechanosensitive ion channel MscL to its response to membrane tension. *J Biol Chem*, **275**(2), 1015–1022.
- Akitake, Bradley, Anishkin, Andriy, & Sukharev, Sergei. 2005. The "dashpot" mechanism of stretch-dependent gating in MscS. *J Gen Physiol*, **125**(2), 143–154.
- Albuquerque, E X, Daly, J W, & Warnick, J E. 1988. Macromolecular sites for specific neurotoxins and drugs on chemosensitive synapses and electrical excitation in biological membranes. *Ion Channels*, **1**, 95–162.
- Amadei, A, Linssen, A B, & Berendsen, H J. 1993. Essential dynamics of proteins. *Proteins*, **17**(4), 412–425.
- Anezo, Celine, de Vries, Alex H, Hans-Dieter, Hölftje, Tieleman, D Peter, & Marrink, Siewert-Jan. 2003. Methodological issues in lipid bilayer simulations. *J Phys Chem B*, **107**(35), 9424–9433.
- Anishkin, Andriy, Gendel, Vyacheslav, Sharifi, Neda A, Chiang, Chien-Sung, Shirinian, Lena, Guy, H Robert, & Sukharev, Sergei. 2003. On the conformation of the COOH-terminal domain of the large mechanosensitive channel MscL. *J Gen Physiol*, **121**(3), 227–244.
- Anishkin, Andriy, Chiang, Chien-Sung, & Sukharev, Sergei. 2005. Gain-of-function mutations reveal expanded intermediate states and a sequential action of two gates in MscL. *J Gen Physiol*, **125**(2), 155–170.
- Ayton, Gary S, Noid, Will G, & Voth, Gregory A. 2007. Multiscale modeling of biomolecular systems : in serial and in parallel. *Curr Opin Struct Biol*, **17**(2), 192–198.
- Bahar, I, Atilgan, A R, & Erman, B. 1997. Direct evaluation of thermal fluctuations in proteins using a single-parameter harmonic potential. *Fold Des*, **2**(3), 173–181.
- Bai, J, & Pagano, R E. 1997. Measurement of spontaneous transfer and transbilayer movement of BODIPY-labeled lipids in lipid vesicles. *Biochemistry*, **36**(29), 8840–8848.

- Bartlett, Jessica L, Levin, Gal, & Blount, Paul. 2004. An in vivo assay identifies changes in residue accessibility on mechanosensitive channel gating. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(27), 10161–10165.
- Bass, Randal B, Strop, Pavel, Barclay, M T, & Rees, Douglas C. 2002. Crystal structure of Escherichia coli MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel. *Science*, **298**(5598), 1582–1587.
- Batiza, A F, Rayment, I, & Kung, C. 1999. Channel gate! Tension, leak and disclosure. *Structure*, **7**(5), R99–103.
- Berendsen, H J C, Postma, J P M, van Gunsteren, W F, Di Nola, A, & Haak, J R. 1984. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys*, **81**, 3684–90.
- Berendsen, H J C, Van Der Spoel, David, & van Drunen. 1995. GROMACS : A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comp Phys Comm*, **91**, 43–56.
- Berger, O, Edholm, O, & Jahnig, F. 1997. Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophys J*, **72**(5), 2002–2013.
- Berrier, C, Coulombe, A, Houssin, C, & Ghazi, A. 1989. A patch-clamp study of ion channels of inner and outer membranes and of contact zones of E. coli, fused into giant liposomes. Pressure-activated channels are localized in the inner membrane. *FEBS Lett*, **259**(1), 27–32.
- Berrier, C, Besnard, M, Ajouz, B, Coulombe, A, & Ghazi, A. 1996. Multiple mechanosensitive ion channels from Escherichia coli, activated at different thresholds of applied pressure. *J Membr Biol*, **151**(2), 175–187. Comparative Study.
- Berrier, C, Garrigues, A, Richarme, G, & Ghazi, A. 2000. Elongation factor Tu and DnaK are transferred from the cytoplasm to the periplasm of Escherichia coli during osmotic downshock presumably via the mechanosensitive channel mscL. *J Bacteriol*, **182**(1), 248–251.
- Bilston, Lynne E, & Mylvaganam, Kausala. 2002. Molecular simulations of the large conductance mechanosensitive (MscL) channel under mechanical loading. *FEBS Lett*, **512**(1-3), 185–190.
- Binder, Wolfgang H, Barragan, Veronique, & Menger, Fredric M. 2003. Domains and rafts in lipid membranes. *Angew Chem Int Ed Engl*, **42**(47), 5802–5827.
- Blount, P, & Moe, P C. 1999. Bacterial mechanosensitive channels : integrating physiology, structure and function. *Trends Microbiol*, **7**(10), 420–424.
- Blount, P, Sukharev, S I, Moe, P C, Schroeder, M J, Guy, H R, & Kung, C. 1996a. Membrane topology and multimeric structure of a mechanosensitive channel protein of Escherichia coli. *EMBO J*, **15**(18), 4798–4805.
- Blount, P, Sukharev, S I, Schroeder, M J, Nagle, S K, & Kung, C. 1996b. Single residue substitutions that change the gating properties of a mechanosensitive channel in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(21), 11652–11657.

-
- Blount, P, Sukharev, S I, Moe, P C, Nagle, S K, & Kung, C. 1996c. Towards an understanding of the structural and functional properties of MscL, a mechanosensitive channel in bacteria. *Biol Cell*, **87**(1-2), 1–8.
- Blount, P, Schroeder, M J, & Kung, C. 1997. Mutations in a bacterial mechanosensitive channel change the cellular response to osmotic stress. *J Biol Chem*, **272**(51), 32150–32157.
- Bond, Peter J, Holyoake, John, Ivetic, Anthony, Khalid, Syma, & Sansom, Mark S P. 2007. Coarse-grained molecular dynamics simulations of membrane proteins and peptides. *J Struct Biol*, **157**(3), 593–605.
- Brooks, Bernard R, Bruccoleri, R E, Olafson, B D, States, D J, Swminathan, S, & Karplus, M. 1983. CHARMM : A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J Comput Chem*, **4**, 187–217.
- Bruschweiler, Rafael. 1995. Collective protein dynamics and nuclear spin relaxation. *J Chem Phys*, **102**, 3396–3403.
- Bryl, K, & Yoshihara, K. 2001. The role of retinal in the long-range protein-lipid interactions in bacteriorhodopsin-phosphatidylcholine vesicles. *Eur Biophys J*, **29**(8), 628–640.
- Buechner, M, Delcour, A H, Martinac, B, Adler, J, & Kung, C. 1990. Ion channel activities in the Escherichia coli outer membrane. *Biochim Biophys Acta*, **1024**(1), 111–121.
- Buton, X, Morrot, G, Fellmann, P, & Seigneuret, M. 1996. Ultrafast glycerophospholipid-selective transbilayer motion mediated by a protein in the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*, **271**(12), 6651–6657.
- Canutescu, Adrian A, Shelenkov, Andrew A, & Dunbrack, Roland L Jr. 2003. A graph-theory algorithm for rapid protein side-chain prediction. *Protein Sci*, **12**(9), 2001–2014.
- Capener, C E, Shrivastava, I H, Ranatunga, K M, Forrest, L R, Smith, G R, & Sansom, M S. 2000. Homology modeling and molecular dynamics simulation studies of an inward rectifier potassium channel. *Biophys J*, **78**(6), 2929–2942.
- Chang, G, Spencer, R H, Lee, A T, Barclay, M T, & Rees, D C. 1998. Structure of the MscL homolog from Mycobacterium tuberculosis : a gated mechanosensitive ion channel. *Science*, **282**(5397), 2220–2226.
- Cheatham, T E 3rd, Miller, J L, Fox, T, Darden, Thomas A, & Kollman, P A. 1995. Molecular dynamics simulations on solvated biomolecular systems - the Particle Mesh Ewald method leads to stable trajectories of DNA, RNA and proteins. *Journal of the American Chemical Society*, **117**(14), 4193–94.
- Chen, Changjun, Xiao, Yi, & Zhang, Linsen. 2005. A directed essential dynamics simulation of peptide folding. *Biophys J*, **88**(5), 3276–3285.
- Chiang, Chien-Sung, Anishkin, Andriy, & Sukharev, Sergei. 2004. Gating of the large mechanosensitive channel in situ : estimation of the spatial scale of the transition from channel population responses. *Biophys J*, **86**(5), 2846–2861.
-

- Chiang, Chien-Sung, Shirinian, Lena, & Sukharev, Sergei. 2005. Capping transmembrane helices of MscL with aromatic residues changes channel response to membrane stretch. *Biochemistry*, **44**(37), 12589–12597.
- Chothia, C, & Lesk, A M. 1986. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J*, **5**(4), 823–826.
- Colombo, Giorgio, Marrink, Siewert Jan, & Mark, Alan E. 2003. Simulation of MscL gating in a bilayer under stress. *Biophys J*, **84**(4), 2331–2337.
- Cooke, John P. 2007. Angiogenesis and the role of the endothelial nicotinic acetylcholine receptor. *Life Sci*, **80**(24-25), 2347–2351.
- Cordomi, Arnau, Edholm, Olle, & Perez, Juan J. 2007. Effect of different treatments of long-range interactions and sampling conditions in molecular dynamic simulations of rhodopsin embedded in a dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayer. *J Comput Chem*, **28**(6), 1017–1030.
- Corey, D P, & Hudspeth, A J. 1979. Response latency of vertebrate hair cells. *Biophys J*, **26**(3), 499–506.
- Corry, Ben, Rigby, Paul, Liu, Zhen-Wei, & Martinac, Boris. 2005. Conformational changes involved in MscL channel gating measured using FRET spectroscopy. *Biophys J*, **89**(6), L49–51.
- Cruickshank, C C, Minchin, R F, Le Dain, A C, & Martinac, B. 1997. Estimation of the pore size of the large-conductance mechanosensitive ion channel of *Escherichia coli*. *Biophys J*, **73**(4), 1925–1931.
- Csonka, L N, & Hanson, A D. 1991. Prokaryotic osmoregulation : genetics and physiology. *Annu Rev Microbiol*, **45**, 569–606.
- Cui, C, Smith, D O, & Adler, J. 1995. Characterization of mechanosensitive channels in *Escherichia coli* cytoplasmic membrane by whole-cell patch clamp recording. *J Membr Biol*, **144**(1), 31–42.
- Dalke, A, & Schulten, K. 1997. Using Tcl for molecular visualization and analysis. *Pac Symp Biocomput*, 85–96.
- de Planque, Maurits R R, & Killian, J Antoinette. 2003. Protein-lipid interactions studied with designed transmembrane peptides : role of hydrophobic matching and interfacial anchoring. *Mol Membr Biol*, **20**(4), 271–284.
- de Vries, Alex H, Mark, Alan E, & Marrink, Siewert J. 2004. Molecular dynamics simulation of the spontaneous formation of a small DPPC vesicle in water in atomistic detail. *J Am Chem Soc*, **126**(14), 4488–4489.
- Deng, Yiqun, Zheng, Qi, Ketas, Thomas J, Moore, John P, & Lu, Min. 2007. Protein design of a bacterially expressed HIV-1 gp41 fusion inhibitor. *Biochemistry*, **46**(14), 4360–4369.

-
- Driscoll, M, & Tavernarakis, N. 1997. Molecules that mediate touch transduction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Gravit Space Biol Bull*, **10**(2), 33–42.
- Dumas, F, Lebrun, M C, & Tocanne, J F. 1999. Is the protein/lipid hydrophobic matching principle relevant to membrane organization and functions? *FEBS Lett*, **458**(3), 271–277.
- Edwards, G, & Weston, A H. 1995. The role of potassium channels in excitable cells. *Diabetes Res Clin Pract*, **28 Suppl**, S57–66.
- Elmore, D E, & Dougherty, D A. 2001. Molecular dynamics simulations of wild-type and mutant forms of the Mycobacterium tuberculosis MscL channel. *Biophys J*, **81**(3), 1345–1359.
- Elmore, Donald E, & Dougherty, Dennis A. 2003. Investigating lipid composition effects on the mechanosensitive channel of large conductance (MscL) using molecular dynamics simulations. *Biophys J*, **85**(3), 1512–1524.
- Engelman, Donald M. 2005. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*, **438**(7068), 578–580.
- Ewis, Hosam E, & Lu, Chung-Dar. 2005. Osmotic shock : a mechanosensitive channel blocker can prevent release of cytoplasmic but not periplasmic proteins. *FEMS Microbiol Lett*, **253**(2), 295–301.
- Fernandes, Fabio, Loura, Luis M S, Prieto, Manuel, Koehorst, Rob, Spruijt, Ruud B, & Hemminga, Marcus A. 2003. Dependence of M13 major coat protein oligomerization and lateral segregation on bilayer composition. *Biophys J*, **85**(4), 2430–2441.
- Fink, M, Duprat, F, Lesage, F, Reyes, R, Romey, G, Heurteaux, C, & Lazdunski, M. 1996. Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *EMBO J*, **15**(24), 6854–6862.
- Fiser, Andras, & Sali, Andrej. 2003. Modeller : generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods Enzymol*, **374**, 461–491.
- Freitas, MS, Gaspar, LP, Lorenzoni, M, Almeida, FC, Tinoco, LW, Almeida, MS, Maia, LF, Degreve, L, Valente, AP, & Silva, JL. 2007. Structure of the Ebola fusion peptide in a membrane-mimetic environment and the interaction with lipid rafts. *J Biol Chem*.
- Glauner, K S, Mannuzzu, L M, Gandhi, C S, & Isacoff, E Y. 1999. Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel. *Nature*, **402**(6763), 813–817.
- Goldstein, H. 1950. *Classical mechanics*.
- Guharey, F, & Sachs, F. 1984. Stretch-activated ion channels in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J. Physiol.*, **352**, 685–701.
- Gullingsrud, J, Kosztin, D, & Schulten, K. 2001. Structural determinants of MscL gating studied by molecular dynamics simulations. *Biophys J*, **80**(5), 2074–2081.
-

- Gullingsrud, Justin, & Schulten, Klaus. 2003. Gating of MscL studied by steered molecular dynamics. *Biophys J*, **85**(4), 2087–2099.
- Gustin, M C, Zhou, X L, Martinac, B, & Kung, C. 1988. A mechanosensitive ion channel in the yeast plasma membrane. *Science*, **242**(4879), 762–765.
- Hamill, O P, & Martinac, B. 2001. Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol Rev*, **81**(2), 685–740.
- Hanzal-Bayer, Michael F, & Hancock, John F. 2007. Lipid rafts and membrane traffic. *FEBS Lett*, **581**(11), 2098–2104.
- Hase, C C, Minchin, R F, Kloda, A, & Martinac, B. 1997. Cross-linking studies and membrane localization and assembly of radiolabelled large mechanosensitive ion channel (MscL) of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, **232**(3), 777–782.
- Hayward, S, Kitao, A, & Go, N. 1995. Harmonicity and anharmonicity in protein dynamics : a normal mode analysis and principal component analysis. *Proteins*, **23**(2), 177–186.
- Henikoff, S, & Henikoff, J G. 1993. Performance evaluation of amino acid substitution matrices. *Proteins*, **17**(1), 49–61.
- Hess, B. 2000. Similarities between principal components of protein dynamics and random diffusion. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics*, **62**(6 Pt B), 8438–8448.
- Hess, Berk. 2002. Convergence of sampling in protein simulations. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, **65**, 1–10.
- Hess, Berk, Bekker, H, Berendsen, H J C, & Fraaije, J G E M. 1997. LINCS : A linear constraint solver for molecular simulations. *J Comput Chem*, **18**, 1463–72.
- Hinsen, Konrad, & Kneller, G R. 1999. A simplified force field for describing vibrational protein dynamics over the whole frequency range. *J Comp Chem*.
- Hockney, R. W., & Goel, S. P. 1974. Quiet high-resolution computer models of plasma. *J Comput Phys*, **14**, 148–158.
- Hofsass, Christofer, Lindahl, Erik, & Edholm, Olle. 2003. Molecular dynamics simulations of phospholipid bilayers with cholesterol. *Biophys J*, **84**(4), 2192–2206.
- Holthuis, Joost C M, & Levine, Tim P. 2005. Lipid traffic : floppy drives and a superhighway. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**(3), 209–220.
- Hudspeth, A J. 1983. Mechanoelectrical transduction by hair cells in the acousticolateralis sensory system. *Annu Rev Neurosci*, **6**, 187–215.
- Hunenberger, P H, & McCammon, J A. 1999. Effect of artificial periodicity in simulations of biomolecules under Ewald boundary conditions : a continuum electrostatics study. *Biophys Chem*, **78**(1-2), 69–88.

- Iscla, Irene, Levin, Gal, Wray, Robin, Reynolds, Robert, & Blount, Paul. 2004. Defining the physical gate of a mechanosensitive channel, MscL, by engineering metal-binding sites. *Biophys J*, **87**(5), 3172–3180.
- Iscla, Irene, Levin, Gal, Wray, Robin, & Blount, Paul. 2007. Disulfide trapping the mechanosensitive channel MscL into a gating-transition state. *Biophys J*, **92**(4), 1224–1232.
- Kabsch, W, & Sander, C. 1983. Dictionary of protein secondary structure : pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, **22**, 2577–2637.
- Kandt, Christian, Ash, Walter L, & Tieleman, D Peter. 2007. Setting up and running molecular dynamics simulations of membrane proteins. *Methods*, **41**(4), 475–488.
- Katz, B. 1950. Depolarization of sensory terminals and initiation of impulse in the muscle spindle. *J. Physiol.*, **111**, 261–282.
- Kirber, M T, Walsh, J V Jr, & Singer, J J. 1988. Stretch-activated ion channels in smooth muscle : a mechanism for the initiation of stretch-induced contraction. *Pflugers Arch*, **412**(4), 339–345. In Vitro.
- Kloda, Anna, Ghazi, Alexandre, & Martinac, Boris. 2006. C-terminal charged cluster of MscL, RKKEE, functions as a pH sensor. *Biophys J*, **90**(6), 1992–1998.
- Kolafa, J, Perram, J W, & Bywater, R P. 2000. Essential motions and energetic contributions of individual residues in a peptide bound to an SH3 domain. *Biophys J*, **79**(2), 646–655.
- Kong, Yifei, Shen, Yufeng, Warth, Tiffany E, & Ma, Jianpeng. 2002. Conformational pathways in the gating of Escherichia coli mechanosensitive channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(9), 5999–6004.
- Kusumi, Akihiro, Nakada, Chieko, Ritchie, Ken, Murase, Kotono, Suzuki, Kenichi, Murakoshi, Hideji, Kasai, Rinshi S, Kondo, Junko, & Fujiwara, Takahiro. 2005. Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid : high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **34**, 351–378.
- Kyte, J, & Doolittle, R. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157**(1), 105–132.
- Lansman, J B, Hallam, T J, & Rink, T J. 1987. Single stretch-activated ion channels in vascular endothelial cells as mechanotransducers? *Nature*, **325**(6107), 811–813.
- Lee, A G. 1998. How lipids interact with an intrinsic membrane protein : the case of the calcium pump. *Biochim Biophys Acta*, **1376**(3), 381–390.
- Lee, A G. 2003. Lipid-protein interactions in biological membranes : a structural perspective. *Biochim Biophys Acta*, **1612**(1), 1–40.
- Leekumjorn, Sukit, & Sum, Amadeu K. 2006. Molecular simulation study of structural and dynamic properties of mixed DPPC/DPPE bilayers. *Biophys J*, **90**(11), 3951–3965.

- Leekumjorn, Sukit, & Sum, Amadeu K. 2007. Molecular characterization of gel and liquid-crystalline structures of fully hydrated POPC and POPE bilayers. *J Phys Chem B*, **111**(21), 6026–6033.
- Levadny, Victor, & Yamazaki, Masahito. 2005. Cationic DMPC/DMTAP lipid bilayers : local lateral polarization of phosphatidylcholine headgroups. *Langmuir*, **21**(13), 5677–5680.
- Levin, Gal, & Blount, Paul. 2004. Cysteine scanning of MscL transmembrane domains reveals residues critical for mechanosensitive channel gating. *Biophys J*, **86**(5), 2862–2870.
- Levina, N, Totemeyer, S, Stokes, N R, Louis, P, Jones, M A, & Booth, I R. 1999. Protection of Escherichia coli cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels : identification of genes required for MscS activity. *EMBO J*, **18**(7), 1730–1737.
- Li, Yuezhou, Moe, Paul C, Chandrasekaran, Subramanian, Booth, Ian R, & Blount, Paul. 2002. Ionic regulation of MscK, a mechanosensitive channel from Escherichia coli. *EMBO J*, **21**(20), 5323–5330.
- Li, Yuezhou, Wray, Robin, & Blount, Paul. 2004. Intragenic suppression of gain-of-function mutations in the Escherichia coli mechanosensitive channel, MscL. *Mol Microbiol*, **53**(2), 485–495.
- Lindahl, E, & Edholm, O. 2000. Mesoscopic undulations and thickness fluctuations in lipid bilayers from molecular dynamics simulations. *Biophys J*, **79**(1), 426–433.
- Lindahl, Erik. 2001. *Computational modeling of biological membrane and interface dynamics*. Ph.D. thesis, Royal Institut of Thechnology, Department of Physics.
- M, Allen, & D, Tildesley. 1987. *Computer simulation of liquids*. Clarendon Press, Oxford.
- Maingret, F, Patel, A J, Lesage, F, Lazdunski, M, & Honore, E. 1999. Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J Biol Chem*, **274**(38), 26691–26696.
- Marques, O, & Sanejouand, Y H. 1995. Hinge-bending motion in citrate synthase arising from normal mode calculations. *Proteins*, **23**(4), 557–560.
- Marrink, S J, Lindahl, E, Edholm, O, & Mark, A E. 2001. Simulation of the spontaneous aggregation of phospholipids into bilayers. *J Am Chem Soc*, **123**(35), 8638–8639.
- Marrink, Siewert-Jan, & Tieleman, D Peter. 2002. Molecular dynamics simulation of spontaneous membrane fusion during a cubic-hexagonal phase transition. *Biophys J*, **83**(5), 2386–2392.
- Martinac, B, Buechner, M, Delcour, A H, Adler, J, & Kung, C. 1987. Pressure-sensitive ion channel in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**(8), 2297–2301.
- Martinac, Boris. 2005. Force from lipids : physical principles of gating mechanosensitive channels by mechanical force revealed by chemical manipulation of cellular membranes. *Chem Educ*, **10**, 107–114.

- Maurer, J A, & Dougherty, D A. 2001. A high-throughput screen for MscL channel activity and mutational phenotyping. *Biochim Biophys Acta*, **1514**(2), 165–169.
- Maurer, J A, Elmore, D E, Lester, H A, & Dougherty, D A. 2000. Comparing and contrasting Escherichia coli and Mycobacterium tuberculosis mechanosensitive channels (MscL). New gain of function mutations in the loop region. *J Biol Chem*, **275**(29), 22238–22244.
- Maurer, Joshua A, & Dougherty, Dennis A. 2003. Generation and evaluation of a large mutational library from the Escherichia coli mechanosensitive channel of large conductance, MscL : implications for channel gating and evolutionary design. *J Biol Chem*, **278**(23), 21076–21082.
- McIntosh, Thomas J, Vidal, Adriana, & Simon, Sidney A. 2003. Sorting of lipids and transmembrane peptides between detergent-soluble bilayers and detergent-resistant rafts. *Biophys J*, **85**(3), 1656–1666.
- Meyer, Grischa R, Gullingsrud, Justin, Schulten, Klaus, & Martinac, Boris. 2006. Molecular dynamics study of MscL interactions with a curved lipid bilayer. *Biophys J*, **91**(5), 1630–1637.
- Mitra, Kakoli, Ubarretxena-Belandia, Iban, Taguchi, Tomohiko, Warren, Graham, & Engelman, Donald M. 2004. Modulation of the bilayer thickness of exocytic pathway membranes by membrane proteins rather than cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(12), 4083–4088.
- Moe, P C, Blount, P, & Kung, C. 1998. Functional and structural conservation in the mechanosensitive channel MscL implicates elements crucial for mechanosensation. *Mol Microbiol*, **28**(3), 583–592.
- Moe, P C, Levin, G, & Blount, P. 2000. Correlating a protein structure with function of a bacterial mechanosensitive channel. *J Biol Chem*, **275**(40), 31121–31127.
- Moore, P B, Lopez, C F, & Klein, M L. 2001. Dynamical properties of a hydrated lipid bilayer from a multianosecond molecular dynamics simulation. *Biophys J*, **81**(5), 2484–2494.
- Mouritsen, M M. 1998. Self-assembly and organization of lipid-protein membranes. *Curr Opin Colloid Interf Sci*, **3**, 78–87.
- Mouritsen, Ole G, & Blom, M. 1984. Mattress model of lipid-protein interactions in membranes. *Biophys J*, **46**, 141–153.
- Mukherijee, S, & Maxfield, Frederick R. 2004. Membrane domains. *Ann Rev Cell Dev Biol*, **20**, 839–866.
- Munro, S. 1995. An investigation of the role of transmembrane domains in Golgi protein retention. *EMBO J*, **14**(19), 4695–4704.
- Munro, S. 1998. Localization of proteins to the Golgi apparatus. *Trends Cell Biol*, **8**(1), 11–15.
- Mura, Cameron, Phillips, Martin, Kozhukhovskiy, Anna, & Eisenberg, David. 2003. Structure and assembly of an augmented Sm-like archaeal protein 14-mer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(8), 4539–4544.

- Murase, Kotono, Fujiwara, Takahiro, Umemura, Yasuhiro, Suzuki, Kenichi, Iino, Ryota, Yamashita, Hidetoshi, Saito, Mihoko, Murakoshi, Hideji, Ritchie, Ken, & Kusumi, Akihiro. 2004. Ultrafine membrane compartments for molecular diffusion as revealed by single molecule techniques. *Biophys J*, **86**(6), 4075–4093.
- Murtola, Teemu, Falck, Emma, Patra, Michael, Karttunen, Mikko, & Vattulainen, Ilpo. 2004. Coarse-grained model for phospholipid/cholesterol bilayer. *J Chem Phys*, **121**(18), 9156–9165.
- Murzin, A G, Brenner, S E, Hubbard, T, & Chothia, C. 1995. SCOP : a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol*, **247**(4), 536–540.
- Nakamaru, Y, Takahashi, Y, Unemoto, T, & Nakamura, T. 1999. Mechanosensitive channel functions to alleviate the cell lysis of marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*, by osmotic downshock. *FEBS Lett*, **444**(2-3), 170–172.
- Oakley, A J, Martinac, B, & Wilce, M C. 1999. Structure and function of the bacterial mechanosensitive channel of large conductance. *Protein Sci*, **8**(10), 1915–1921.
- Olivieri, Lilian. 2006. *Etude de l'influence de la boucle périplasmique sur les propriétés mécaniques du canal MscL*. M.Phil. thesis, Université Paris Diderot.
- Oseki, M, & M, Sato. 1965. Changes in the membrane potential and the membrane conductance associated with a sustained compression of the non-myelinated nerve terminal in Pacinian corpuscles. *J. Physiol.*, **180**, 186–208.
- Ou, X, Blount, P, Hoffman, R J, & Kung, C. 1998. One face of a transmembrane helix is crucial in mechanosensitive channel gating. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(19), 11471–11475.
- Ozdirekcan, Suat, Rijkers, Dirk T S, Liskamp, Rob M J, & Killian, J Antoinette. 2005. Influence of flanking residues on tilt and rotation angles of transmembrane peptides in lipid bilayers. A solid-state 2H NMR study. *Biochemistry*, **44**(3), 1004–1012.
- Pandit, Sagar A, Bostick, David, & Berkowitz, Max L. 2003. Mixed bilayer containing dipalmitoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylserine : lipid complexation, ion binding, and electrostatics. *Biophys J*, **85**(5), 3120–3131.
- Park, Kyu-Ho, Berrier, Catherine, Martinac, Boris, & Ghazi, Alexandre. 2004. Purification and functional reconstitution of N- and C-halves of the MscL channel. *Biophys J*, **86**(4), 2129–2136.
- Park, Sang Ho, & Opella, Stanley J. 2005. Tilt angle of a trans-membrane helix is determined by hydrophobic mismatch. *J Mol Biol*, **350**(2), 310–318.
- Patra, M, Karttunen, M, Hyvonen, M T, Falck, E, Lindqvist, P, & Vattulainen, I. 2003. Molecular dynamics simulations of lipid bilayers : major artifacts due to truncating electrostatic interactions. *Biophys J*, **84**(6), 3636–3645.

-
- Perahia, D, & Mouawad, L. 1995. Computation of low-frequency normal modes in macromolecules : improvements to the method of diagonalization in a mixed basis and application to hemoglobin. *Comput Chem*, **19**(3), 241–246.
- Perozo, E, Kloda, A, Cortes, D M, & Martinac, B. 2001. Site-directed spin-labeling analysis of reconstituted MscL in the closed state. *J Gen Physiol*, **118**(2), 193–206.
- Perozo, Eduardo, & Rees, Douglas C. 2003. Structure and mechanism in prokaryotic mechanosensitive channels. *Curr Opin Struct Biol*, **13**(4), 432–442.
- Perozo, Eduardo, Cortes, D Marien, Sompornpisut, Pornthep, Kloda, Anna, & Martinac, Boris. 2002a. Open channel structure of MscL and the gating mechanism of mechanosensitive channels. *Nature*, **418**(6901), 942–948.
- Perozo, Eduardo, Kloda, Anna, Cortes, D Marien, & Martinac, Boris. 2002b. Physical principles underlying the transduction of bilayer deformation forces during mechanosensitive channel gating. *Nat Struct Biol*, **9**(9), 696–703.
- Pivetti, Christopher D, Yen, Ming-Ren, Miller, Samantha, Busch, Wolfgang, Tseng, Yi-Hsiung, Booth, Ian R, & Saier, Milton H Jr. 2003. Two families of mechanosensitive channel proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, **67**(1), 66–85.
- Raaijmakers, MH. 2007. ATP-binding-cassette transporters in hematopoietic stem cells and their utility as therapeutical targets in acute and chronic myeloid leukemia. *Leukemia*.
- Rand, R P, & Parsegian, V A. 1988. The influence of polar group identity on the interaction between phospholipid bilayers. *In : Molecular mechanism of membrane fusion*. Plenum Pub. Corp.
- Rand, R P, & Parsegian, V A. 1989. Hydratation forces between phospholipid bilayers. *Biochem. Biophys. Acta*, **988**, 351–376.
- Reynwar, Benedict J, Illya, Gregoria, Harmandaris, Vagelis A, Muller, Martin M, Kremer, Kurt, & Deserno, Markus. 2007. Aggregation and vesiculation of membrane proteins by curvature-mediated interactions. *Nature*, **447**(7143), 461–464.
- Sackin, H. 1995. Mechanosensitive channels. *Annu Rev Physiol*, **57**, 333–353.
- Sackmann, E. 1984. Physical basis of trigger processes and membrane structure. *Pages 105–143 of : Chapman, D (ed), Biological membranes*, vol. 5. Academic press, London.
- Saier, M H Jr, Eng, B H, Fard, S, Garg, J, Haggerty, D A, Hutchinson, W J, Jack, D L, Lai, E C, Liu, H J, Nusinew, D P, Omar, A M, Pao, S S, Paulsen, I T, Quan, J A, Sliwinski, M, Tseng, T T, Wachi, S, & Young, G B. 1999. Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochim Biophys Acta*, **1422**(1), 1–56.
- Saint, N, Lacapere, J J, Gu, L Q, Ghazi, A, Martinac, B, & Rigaud, J L. 1998. A hexameric transmembrane pore revealed by two-dimensional crystallization of the large mechanosensitive ion channel (MscL) of Escherichia coli. *J Biol Chem*, **273**(24), 14667–14670.
-

- Sali, A, Potterton, L, Yuan, F, van Vlijmen, H, & Karplus, M. 1995. Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER. *Proteins*, **23**(3), 318–326.
- Sansom, M S, & Weinstein, H. 2000. Hinges, swivels and switches : the role of prolines in signalling via transmembrane alpha-helices. *Trends Pharmacol Sci*, **21**(11), 445–451.
- Schulz, G E. 2000. beta-Barrel membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **10**(4), 443–447.
- Seigneuret, M, & Devaux, P F. 1984. ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane : relation to shape changes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**(12), 3751–3755.
- Shapovalov, George, Bass, Randal, Rees, Douglas C, & Lester, Henry A. 2003. Open-state disulfide crosslinking between Mycobacterium tuberculosis mechanosensitive channel subunits. *Biophys J*, **84**(4), 2357–2365.
- Shechter, E. 2000. *Biochimie et biophysique des membranes*. 2e edn. Dunod.
- Shelley, John C, Shelley, Mee Y, Reeder, Robert C, Bandyopadhyay, Sanjoy, & Klein, Michael L. 2001. A coarse grained model for phospholipid simulations. *J Phys Chem B*, **105**(19), 4464–4470.
- Shih, Amy Y, Freddolino, Peter L, Arkhipov, Anton, & Schulten, Klaus. 2007. Assembly of lipoprotein particles revealed by coarse-grained molecular dynamics simulations. *J Struct Biol*, **157**(3), 579–592.
- Singer, S. J., & Nicholson, G. L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720–731.
- Smart, O S, Neduvelil, J G, Wang, X, Wallace, B A, & Sansom, M S. 1996. Hole : a program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models. *J Mol Graph*, **14**, 354–360.
- Sokabe, M, Sachs, F, & Jing, Z Q. 1991. Quantitative video microscopy of patch clamped membranes stress, strain, capacitance, and stretch channel activation. *Biophys J*, **59**(3), 722–728.
- Sonne, Jacob, Jensen, Morten O, Hansen, Flemming Y, Hemmingsen, Lars, & Peters, Gunther H. 2007. Reparameterization of all-atom dipalmitoylphosphatidylcholine lipid parameters enables simulation of fluid bilayers at zero tension. *Biophys J*, **92**(12), 4157–4167.
- Sotomayor, Marcos, & Schulten, Klaus. 2004. Molecular dynamics study of gating in the mechanosensitive channel of small conductance MscS. *Biophys J*, **87**(5), 3050–3065.
- Stadler, A. 2003. *Influence of the bilayer thickness on the dynamic and structural properties of the MscL of Escherichia coli*. M.Phil. thesis, Université Paris Diderot.
- Steinbacher, Stefan, Bass, Randal B, Strop, Pavel, & Rees, Douglas C. 2007. Structures of the mechanosensitive channels MscL and MscS. *Pages 1–24 of : Mechanosensitive ion channels, Part A*, vol. 58.

-
- Strandberg, Erik, Ozdirekcan, Suat, Rijkers, Dirk T S, van der Wel, Patrick C A, Koeppe, Roger E 2nd, Liskamp, Rob M J, & Killian, J Antoinette. 2004. Tilt angles of transmembrane model peptides in oriented and non-oriented lipid bilayers as determined by ^2H solid-state NMR. *Biophys J*, **86**(6), 3709–3721.
- Sukharev, S. 1999. Mechanosensitive channels in bacteria as membrane tension reporters. *FASEB J*, **13 Suppl**, S55–61.
- Sukharev, S, Durell, S R, & Guy, H R. 2001a. Structural models of the MscL gating mechanism. *Biophys J*, **81**(2), 917–936.
- Sukharev, S, Betanzos, M, Chiang, C S, & Guy, H R. 2001b. The gating mechanism of the large mechanosensitive channel MscL. *Nature*, **409**(6821), 720–724.
- Sukharev, S I, Martinac, B, Arshavsky, V Y, & Kung, C. 1993. Two types of mechanosensitive channels in the Escherichia coli cell envelope : solubilization and functional reconstitution. *Biophys J*, **65**(1), 177–183.
- Sukharev, S I, Blount, P, Martinac, B, Blattner, F R, & Kung, C. 1994. A large-conductance mechanosensitive channel in E. coli encoded by mscL alone. *Nature*, **368**(6468), 265–268.
- Sukharev, S I, Blount, P, Martinac, B, & Kung, C. 1997. Mechanosensitive channels of Escherichia coli : the MscL gene, protein, and activities. *Annu Rev Physiol*, **59**, 633–657.
- Sukharev, S I, Sigurdson, W J, Kung, C, & Sachs, F. 1999. Energetic and spatial parameters for gating of the bacterial large conductance mechanosensitive channel, MscL. *J Gen Physiol*, **113**(4), 525–540.
- Suzuki, M, Sato, J, Kutsuwada, K, Ooki, G, & Imai, M. 1999. Cloning of a stretch-inhibitable nonselective cation channel. *J Biol Chem*, **274**(10), 6330–6335.
- Tama, F, Gadea, F X, Marques, O, & Sanejouand, Y H. 2000. Building-block approach for determining low-frequency normal modes of macromolecules. *Proteins*, **41**(1), 1–7.
- Thompson, J D, Gibson, T J, Plewniak, F, Jeanmougin, F, & Higgins, D G. 1997. The CLUSTAL-X windows interface : flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, **25**(24), 4876–4882.
- Tieleman, D P, Marrink, S, & Berendsen, H J C. 1997. A computer perspective of membranes : molecular dynamics studies of lipid bilayer systems. *Biochem. Biophys. Acta*, **1331**(3), 235–270.
- Tieleman, D P, Shrivastava, I H, Ulmschneider, M R, & Sansom, M S. 2001. Proline-induced hinges in transmembrane helices : possible roles in ion channel gating. *Proteins*, **44**(2), 63–72.
- Tieleman, D Peter. 2006. Computer simulations of transport through membranes : passive diffusion, pores, channels and transporters. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **33**(10), 893–903.
- Tirion, MM. 1996. Large Amplitude Elastic Motions in Proteins from a Single-Parameter, Atomic Analysis. *Phys Rev Lett*, **77**(9), 1905–1908.
-

- Tironi, Ilario, Sperb, Rene, Smith, Paul E, & van Gunsteren, W F. 1995. A generalized reaction field method for molecular dynamics simulations. *J Chem Phys*, **102**, 5451–59.
- Tsai, I-Jung, Liu, Zhen-Wei, Rayment, John, Norman, Christel, McKinley, Allan, & Martinac, Boris. 2005. The role of the periplasmic loop residue glutamine 65 for MscL mechanosensitivity. *Eur Biophys J*, **34**(5), 403–412.
- Unwin, N. 1995. Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature*, **373**(6509), 37–43.
- Valadié, H. 2003 (Dec). *Etudes des propriétés dynamiques du canal mécanosensible MscL par des approches théoriques*. Ph.D. thesis, Université Paris Diderot.
- Valadié, H, Lacapère, J J, Sanejouand, Y-H, & Etchebest, C. 2003. Dynamical properties of the MscL of Escherichia coli : a normal mode analysis. *J Mol Biol*, **332**(3), 657–674. Comparative Study.
- van den Bogaart, Geert, Krasnikov, Victor, & Poolman, Bert. 2007. Dual-color fluorescence-burst analysis to probe protein efflux through the mechanosensitive channel MscL. *Biophys J*, **92**(4), 1233–1240.
- van den Brink-van der Laan, Els, Killian, J Antoinette, & de Kruijff, Ben. 2004. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochim Biophys Acta*, **1666**(1-2), 275–288.
- Van Der Spoel, David, Lindahl, Erik, Hess, Berk, Groenhof, Gerrit, Mark, Alan E, & Berendsen, Herman J C. 2005. GROMACS : fast, flexible, and free. *J Comput Chem*, **26**(16), 1701–1718.
- Verlet, L. 1967. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Physiol Rev*, **159**(98-103).
- Walker, R G, Willingham, A T, & Zuker, C S. 2000. A Drosophila mechanosensory transduction channel. *Science*, **287**(5461), 2229–2234.
- Whatmore, J, Wiedemann, C, Somerharju, P, Swigart, P, & Cockcroft, S. 1999. Resynthesis of phosphatidylinositol in permeabilized neutrophils following phospholipase Cbeta activation : transport of the intermediate, phosphatidic acid, from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum for phosphatidylinositol resynthesis is not dependent on soluble lipid carriers or vesicular transport. *Biochem J*, **341** (Pt 2), 435–444.
- Yoshimura, K, Batiza, A, Schroeder, M, Blount, P, & Kung, C. 1999. Hydrophilicity of a single residue within MscL correlates with increased channel mechanosensitivity. *Biophys J*, **77**(4), 1960–1972.
- Yoshimura, Kenjiro, Nomura, Takeshi, & Sokabe, Masahiro. 2004. Loss-of-function mutations at the rim of the funnel of mechanosensitive channel MscL. *Biophys J*, **86**(4), 2113–2120.

Cinquième partie

Annexes

Ouverture du canal MscL : une tentative

.1 Introduction

Le canal MscL est présent chez toutes les bactéries où il agit comme une véritable soupape de sécurité : lors d'un choc hypo-osmotique, la tension membranaire induite entraîne son ouverture, libérant de petits osmolytes et permettant ainsi la survie de la cellule.

Nous disposons de deux résolutions de la même structure cristallographique du MscL de *M. tuberculosis* (Chang *et al.* , 1998; Steinbacher *et al.* , 2007) dans son état fermé et de deux modèles structuraux de celui de *E. coli* (Sukharev *et al.* , 2001a; Valadié *et al.* , 2003) (fig. 1). Ces structures décrivent toutes un état fermé ou quasi-fermé du MscL.

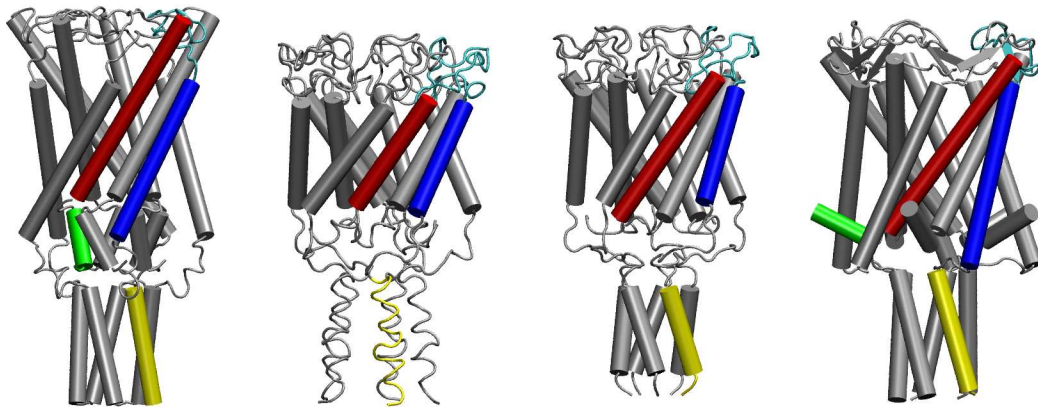


Fig. 1: Les quatre structures du MscL. De gauche à droite : modèle de Sukharev *et al.* (2001a), modèle de Valadié *et al.* (2003), première et seconde structures cristallographiques. La représentation est de type cartoon. Pour un monomère, le domaine Nterminal est en jaune, l'hélice TM1 en rouge, la TM2 en bleu, la boucle périplasmique en cyan et le domaine Cterminal en jaune.

Un des challenges de l'étude du MscL est de déterminer sa structure ouverte, afin de déterminer ses mécanismes d'action. Nous nous sommes donc intéressés à ce problème.

Les grands changements conformationnels requis pour conduire à l'état d'ouverture ont été explorés par une approche de modes normaux. En effet, cette approche permet de décrire des mouvements intrinsèques de la protéine et donc d'explorer un chemin possible d'ouverture.

.2 Modèle d'étude

La plupart des données expérimentales portent sur le MscL de *E. coli*. L'ensemble des analyses que nous avons effectuées précédemment portent sur le modèle de Valadié *et al.* (2003). C'est donc ce modèle que nous avons choisi de privilégier. Nous avons tronqué le domaine Cterminal après le résidu 110, cette délétion n'affectant pas le mécanisme d'ouverture (Blount *et al.*, 1996). La structure ainsi obtenue est composée de 490 résidus, correspondant à 4685 atomes (fig. 2).

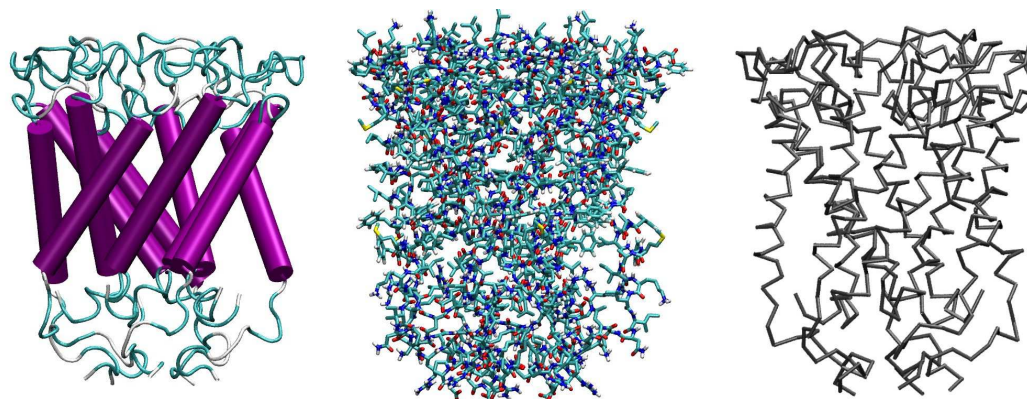


Fig. 2: Représentation de la structure du MscL utilisée lors de l'étude. A gauche, en représentation cartoon coloré selon la structure secondaire, au milieu en représentation cpk coloré selon le type d'atome, à droite en représentation C α trace.

.3 Méthodes existantes

La plupart des méthodes basées sur les approches de modes normaux ont une vocation interprétative et non prédictive : la structure que l'on souhaite atteindre est connue (Kirillova *et al.*, 2007), ou du moins caractérisée par un certain nombre de données, comme la densité électronique (Tama *et al.*, 2004a,b; Delarue & Dumas, 2004) ou des distances entre résidus (Zheng & Brooks, 2005, 2006). Ces méthodes permettent de trouver un chemin entre états initial et final, mais ne permettent pas de prédire l'état final. La description du chemin conformationnel est réalisée en suivant itérativement les directions données par les modes normaux.

La méthode NMFF (Tama *et al.*, 2004a) peut être considérée comme intermédiaire entre ces deux contextes : elle permet de diriger l'évolution de la structure en suivant les modes normaux sans connaître en détails la structure finale mais en tenant compte de données de faible résolution (des cartes de densité électronique à plus de 10Å de résolution).

Une structure cible étant nécessaire, nous avons construit un état intermédiaire et un état ouvert de notre structure d'intérêt (le modèle de Eco-MscL proposé par Valadié *et al.* (2003)), en superposant les hélices transmembranaires à celle des modèles de ces états proposés par Sukharev *et al.* (2001b) puis en reconstruisant les boucles grâce à modeller (Fiser & Sali, 2003). Les deux structures sont représentées dans la figure 3.

Un certain nombre de points du modèle d'ouverture proposé par Sukharev *et al.* (2001b) restent controversés bien que les mouvements globaux d'inclinaison des hélices associés à un

élargissement et à une diminution de hauteur du canal soient globalement admis. C'est pourquoi les modèles des structures intermédiaire et ouverte que nous avons construits doivent être considérés comme des structures putatives de ces états. Toutefois, ils permettent d'apporter un support de direction vers laquelle évoluer.

Plusieurs résolutions entre 10 et 20Å ont été testées pour les deux cartes de densité construites à partir des modèles des états intermédiaire et ouvert. Les résultats obtenus à partir de la structure fermée en suivant les modes vers la carte de densité à 15Å de résolution de l'état intermédiaire sont représentés figure 4. On observe que le canal subit bien une diminution de hauteur associé à une inclinaison des hélices transmembranaires. Cependant, l'inclinaison observée est très inférieure à celle attendue. De plus, l'élargissement du canal se produit essentiellement au niveau des boucles périplasmiques et, dans une moindre mesure, au niveau des extrémités cytoplasmiques et aucun élargissement du diamètre du pore n'est observé. Pour la carte de densité du modèle ouvert ainsi que pour d'autres niveaux de résolution, des observations similaires peuvent être faites.

Ces résultats montrent donc que, par cette méthode, les mouvements d'ouverture du canal ne peuvent être reproduits. Plusieurs raisons pourraient expliquer cette observation. Tout d'abord, les modes normaux pourraient ne pas être suffisants pour décrire le phénomène d'ouverture. Le canal MscL s'ouvre sous contrainte mécanique issue d'une tension de la membrane. Nous avons vu précédemment qu'une diminution de l'épaisseur de la membrane permettait d'obtenir un intermédiaire structural le long du chemin d'ouverture. Les résultats de comparaison entre les directions de mouvement issus de la dynamique essentielle du MscL dans des membranes fines (de DMPE) et les modes normaux montrent qu'un certain nombre de mouvements sont similaires aux deux méthodes. Cependant, il se peut que certains des mouvements induits par la membrane et n'étant pas reproduits par les modes normaux soient essentiels à l'ouverture. Il se peut aussi que les mouvements induits par la membrane et reproduits par les modes normaux ne soient pas suffisants pour l'ouverture. Finalement, il se peut que les données concernant la structure à atteindre soient fausses, dirigeant le système vers un état qu'il ne peut atteindre.

Les méthodes présentées ici se basent sur une connaissance a priori de l'état final. Il est donc nécessaire de développer une méthode permettant de faire évoluer le système en suivant les directions données par les modes normaux sans connaissance sur la structure finale.

4 Méthode abordée

4.1 Principe général

La méthode développée ici consiste à suivre itérativement les directions de mouvement données par les modes normaux pour faire évoluer la structure fermée du canal MscL, en ne prenant pour connaissance a priori que le fait que le pore s'ouvre.

Les modes utilisés sont ceux décrits dans Valadié *et al.* (2003) basés sur la méthode Tirion (1996). Le principe général de la méthode peut se définir comme suit :

1. minimiser l'énergie de la structure de telle sorte que les contraintes de longueurs de liaisons (inter-C α puisqu'il s'agit d'une méthode gros grain) soient respectées,

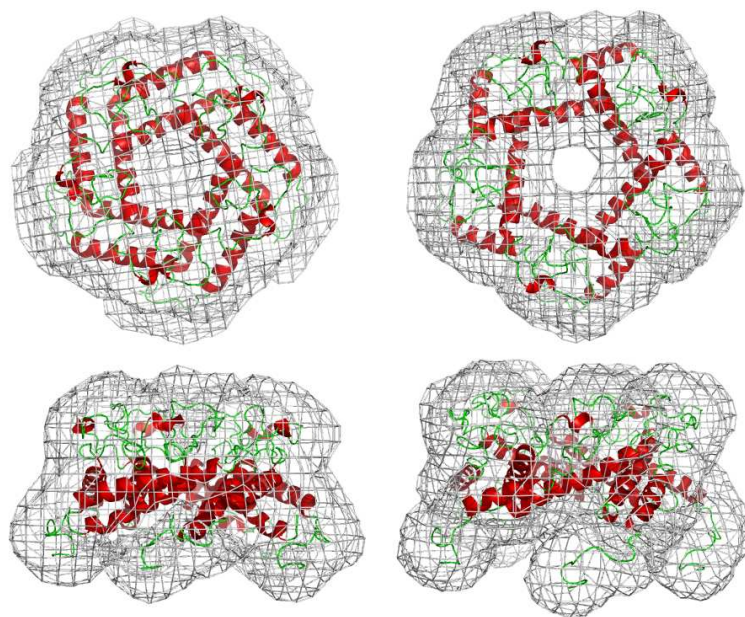


Fig. 3: Structures intermédiaire (gauche) et ouverte (droite) modélisées. La représentation est de type cartoon, colorée selon les structures secondaires. La carte de densité électronique à une résolution de 15Å est superposée.

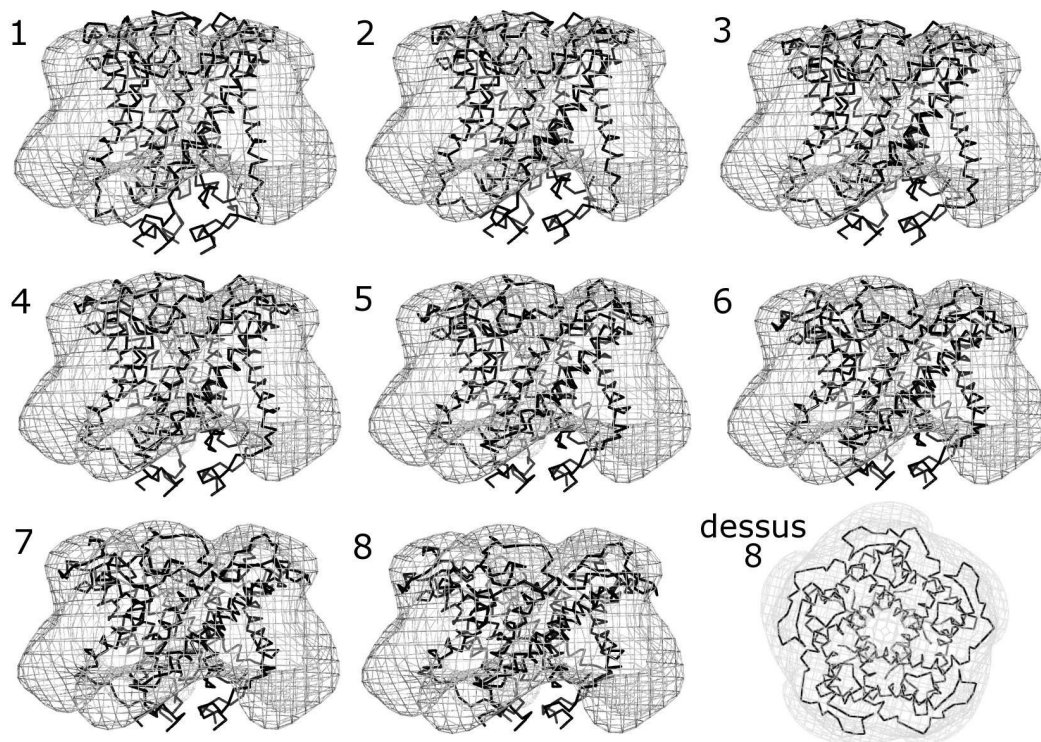


Fig. 4: Evolution de la structure du MscL vers la carte de densité à 15Å de résolution de l'état intermédiaire réalisée à partir du logiciel NMFF (Tama *et al.* , 2004a).

2. calculer les modes normaux,
3. choisir les modes permettant un élargissement du pore et les amplitudes associées,
4. déplacer les atomes $C\alpha$ suivant ces modes,
5. recommencer jusqu'à ce qu'il ne soit plus possible de faire évoluer le système.

Le système, bien que réduit aux $C\alpha$, demeure de grande taille (1470 modes pour 490 résidus). Afin de limiter les temps de calcul, nous avons choisi de limiter notre analyse aux 200 premiers modes. En effet, il a été montré que les modes de plus basse fréquence étaient suffisants pour décrire les mouvements principaux des protéines (Tama *et al.*, 2000). De plus, dans sa thèse, Valadié (2003) a étudié les transitions entre structures fermée et ouverte du modèle de Sukharev *et al.* (2001b). Elle a pu montrer que les 100 premiers modes étaient suffisants pour décrire 80% du mouvement.

Nous avons utilisé un algorithme de type Monte Carlo afin de déterminer l'amplitude des modes. Au départ, une amplitude nulle est associée à chaque mode.

A chaque itération :

1. un mode est tiré au hasard,
2. l'amplitude associée est modifiée par un facteur tiré aléatoirement inférieur à un seuil donné,
3. la structure est déplacée suivant l'ensemble des modes,
4. si le pore s'élargit (voir définition section suivante), la modification est conservée,
5. sinon, un nombre aléatoire est tiré :
 - si celui-ci est inférieur à un seuil, la modification est conservée,
 - sinon elle est rejetée.

Ce processus est effectué jusqu'à ce que le système n'évolue plus pendant 20 itérations consécutives.

4.2 Discussion

Plusieurs difficultés résident dans l'approche décrite ici : le choix de l'amplitude maximale de déplacement associée à chaque mode ainsi que la détermination des critères permettant de définir l'élargissement du pore. De plus, il n'est pas possible de tester ces deux paramètres séparément. L'ouverture du pore se traduit par un élargissement de son diamètre ainsi qu'une augmentation de la taille de sa cavité. Dans le cas précis du MscL, il est généralement admis que cette ouverture est aussi associée à un élargissement global du diamètre du canal ainsi qu'à une diminution de sa hauteur. Nous avons testé séparément l'augmentation du volume de la cavité ainsi que l'augmentation du diamètre minimal du pore. L'utilisation de ces deux variables donnent des résultats similaires. La détermination du diamètre minimal du pore étant plus aisée, nous l'avons utilisé comme critère de choix des modes à suivre. Il serait intéressant par la suite de coupler l'élargissement du diamètre minimal du pore aux deux autres variables que sont l'augmentation du rayon de gyration du canal dans le plan de la membrane et la diminution de la hauteur du canal. Mais il n'est pas certain que l'ensemble de ces variables définissent correctement l'ouverture du pore. Afin d'en être sûr, il serait nécessaire, en premier lieu, de déterminer une amplitude de

déplacement suivant les modes, suffisamment grande pour permettre un déplacement significatif et donc un temps de calcul raisonnable et suffisamment petite pour ne pas trop déformer les liaisons.

Plusieurs facteurs d'amplitude maximale associée aux modes ont été testés. La figure 5 présente deux exemples de résultats obtenus avec une amplitude telle que le plus grand déplacement subi par un atome soit de 1\AA et 2\AA respectivement. Dans le premier cas, après un certain nombre d'itérations, la structure n'est quasiment pas modifiée. Dans le second, les liaisons sont tellement déformées qu'il n'est plus possible, par une minimisation simple et rapide, de rétablir les longueurs de liaisons inter-C α . Nous avons alors essayé d'autres méthodes de minimisation plus efficaces, mais on se retrouve dans le premier cas de figure où la structure n'évolue pas assez. Dans la méthode développée par Zheng & Brooks (2006), à chaque itération, deux déplacements successifs sont effectués : le premier en suivant les directions données par les modes, le second en suivant les directions données par les modes après réorientation suivant les nouvelles positions des atomes. Cette méthode permet un déplacement d'une amplitude suffisante, sans pour autant trop déformer les liaisons. Il serait donc intéressant de l'appliquer à notre problème.

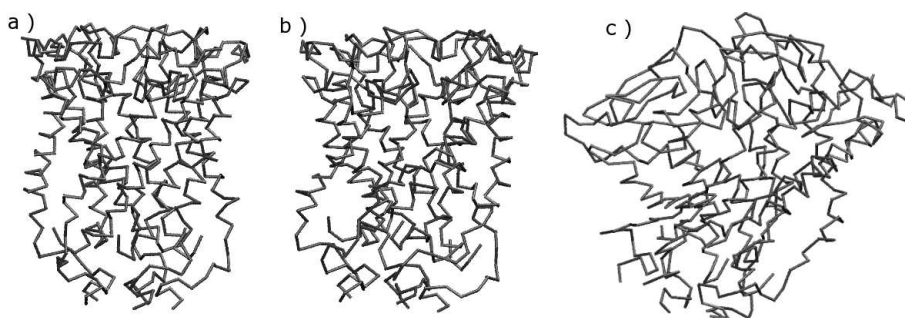


Fig. 5: Exemples de structures obtenues en suivant les modes normaux vers un élargissement du pore avec différentes amplitudes. a) Structure initiale. b) Après 500 itérations avec une amplitude maximale de 1\AA . c) Après 800 itérations avec une amplitude maximale de 2\AA .

5 Conclusion

Nous avons ici tenté d'aborder de manière simple le problème complexe d'obtenir et donc de définir ce qu'est l'ouverture d'un pore sans connaissance a priori sur sa structure. Les premiers résultats montrent qu'une telle démarche n'est pas aisée. Il serait nécessaire d'utiliser des descripteurs plus complexes ainsi qu'un algorithme plus performant pour peut-être obtenir de meilleurs résultats.

Bibliographie

- Blount, P, Sukharev, S I, Moe, P C, Nagle, S K, & Kung, C. 1996. Towards an understanding of the structural and functional properties of MscL, a mechanosensitive channel in bacteria. *Biol Cell*, **87**(1-2), 1–8.
- Chang, G, Spencer, R H, Lee, A T, Barclay, M T, & Rees, D C. 1998. Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis* : a gated mechanosensitive ion channel. *Science*, **282**(5397), 2220–2226.
- Delarue, Marc, & Dumas, Philippe. 2004. On the use of low-frequency normal modes to enforce collective movements in refining macromolecular structural models. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(18), 6957–6962.
- Fiser, Andras, & Sali, Andrej. 2003. Modeller : generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods Enzymol*, **374**, 461–491.
- Kirillova, S, Cortes, J, Stefaniu, A, & Simeon, T. 2007. An NMA-guided path planning approach for computing large-amplitude conformational changes in proteins. *Proteins*.
- Steinbacher, Stefan, Bass, Randal B, Strop, Pavel, & Rees, Douglas C. 2007. Structures of the mechanosensitive channels MscL and MscS. *Pages 1–24 of : Mechanosensitive ion channels, Part A*, vol. 58.
- Sukharev, S, Durell, S R, & Guy, H R. 2001a. Structural models of the MscL gating mechanism. *Biophys J*, **81**(2), 917–936.
- Sukharev, S, Betanzos, M, Chiang, C S, & Guy, H R. 2001b. The gating mechanism of the large mechanosensitive channel MscL. *Nature*, **409**(6821), 720–724.
- Tama, F, Gadea, F X, Marques, O, & Sanejouand, Y H. 2000. Building-block approach for determining low-frequency normal modes of macromolecules. *Proteins*, **41**(1), 1–7.
- Tama, Florence, Miyashita, Osamu, & Brooks, Charles L 3rd. 2004a. Flexible multi-scale fitting of atomic structures into low-resolution electron density maps with elastic network normal mode analysis. *J Mol Biol*, **337**(4), 985–999.
- Tama, Florence, Miyashita, Osamu, & Brooks, Charles L 3rd. 2004b. Normal mode based flexible fitting of high-resolution structure into low-resolution experimental data from cryo-EM. *J Struct Biol*, **147**(3), 315–326.

- Tirion, MM. 1996. Large Amplitude Elastic Motions in Proteins from a Single-Parameter, Atomic Analysis. *Phys Rev Lett*, **77**(9), 1905–1908.
- Valadié, H. 2003 (Dec). *Etudes des propriétés dynamiques du canal mécanosensible MscL par des approches théoriques*. Ph.D. thesis, Université Paris Diderot.
- Valadié, H, Lacapère, J J, Sanejouand, Y-H, & Etchebest, C. 2003. Dynamical properties of the MscL of Escherichia coli : a normal mode analysis. *J Mol Biol*, **332**(3), 657–674. Comparative Study.
- Zheng, Wenjun, & Brooks, Bernard R. 2005. Normal-modes-based prediction of protein conformational changes guided by distance constraints. *Biophys J*, **88**(5), 3109–3117.
- Zheng, Wenjun, & Brooks, Bernard R. 2006. Modeling protein conformational changes by iterative fitting of distance constraints using reoriented normal modes. *Biophys J*, **90**(12), 4327–4336.

Résumé

Les canaux mécanosensibles de large conductance (MscL) sont des protéines membranaires intégrales permettant à la bactérie de survivre lors de chocs hypo-osmotiques. Leur principale caractéristique est de s'ouvrir en réponse à un stress mécanique : une tension de la membrane. La compréhension de leur mode d'activation est un prérequis pour élaborer un modèle global du mécanisme de sensibilité à la tension membranaire.

Nous avons étudié ici les premières étapes du mécanisme d'ouverture du MscL induites par une diminution de l'épaisseur membranaire, ainsi que les interactions gouvernant ces changements conformationnels par des simulations de dynamique moléculaire. La comparaison de l'analyse en composante principale des trajectoires et des directions données par l'analyse en modes normaux nous a permis de mettre en évidence l'influence de la membrane sur la dynamique intrinsèque du canal. Nous avons ensuite étudié des canaux MscL issus de différents organismes et présentant des sensibilité mécaniques différentes. Des différences significatives entre les comportements des deux systèmes plongés dans des membranes d'épaisseur variable ont été mises en évidence. Ces différences nous ont conduit à explorer le rôle des différentes régions et notamment le rôle des boucles périplasmiques en construisant des canaux hybrides par combinaison de régions issues d'organismes différents. Les résultats obtenus confirment le rôle primordial des boucles périplasmiques dans la sensibilité du MscL.

Abstract

Mechanosensitive channels of Large conductance (MscL) are integral membrane proteins that permit the bacterium to survive when hypo-osmotic shock occurs. Their principal characteristic is to open in response to a mechanical stress : a tension of the membrane. The comprehension of their mode of activation is necessary to work out a global model of the mechanism of sensitivity to membrane tension.

We studied here the first stages of the gating mechanism of MscL induced by membrane thinning, as well as the interactions controlling these conformational changes by simulations of molecular dynamics. The comparison of the principal component analysis of the trajectories and the directions given by the normal modes analysis enabled us to highlight the influence of the membrane on the intrinsic dynamics of the channel. We then studied MscL channels from various organisms and having different sensitivity. Significant differences between the behaviors of the two systems plunged in membranes of variable thickness were highlighted. These differences led us to explore the role of the various domains and in particular the role of the periplasmic loops by building hybrid channels by combination of domains from different organisms. The results obtained confirm the fundamental role of the periplasmic loops in the sensitivity of the MscL.