



HAL
open science

Mecanisme de translocation de la toxine diphtérique

Anne Chassaing

► **To cite this version:**

Anne Chassaing. Mecanisme de translocation de la toxine diphtérique. Sciences du Vivant [q-bio].
Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS, 2008. Français. NNT: . tel-00364213

HAL Id: tel-00364213

<https://theses.hal.science/tel-00364213>

Submitted on 25 Feb 2009

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.

ECOLE DOCTORALE DU MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

ED 227

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de Docteur en Biochimie Biophysique
Du Muséum National d'Histoire Naturelle

Présentée et soutenue par
Anne CHASSAING

Le 9 octobre 2008

Mécanisme de translocation de la toxine diphtérique

Directeur de thèse : Pr. Daniel Gillet

JURY

Pr. Max Goyffon
Dr. Bruno Beaumelle
Dr. Ina Attree-Delic
Dr. Vincent Forge
Pr. Daniel Gillet

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au CEA-Saclay, au Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines, dirigé par le Docteur Dive. Je le remercie pour les moyens mis à ma disposition.

Je remercie les membres du jury, les Professeurs Max Goyffon et Daniel Gillet, le Docteur Vincent Forge, et plus particulièrement les Docteurs Ina Attree-Delic et Bruno Beaumelle, rapporteurs de la thèse.

Je remercie

le Pr. Daniel Gillet *pour m'avoir accueillie dans son équipe. Merci pour sa grande gentillesse, sa confiance et son écoute le long de ces trois années,*

Julien Barbier *pour sa disponibilité et ses conseils avisés,*

Sylvain Pichard *pour m'avoir transmis son savoir faire technique sur les protéines recombinantes et sa bonne humeur ces trois années,*

Stéphanie Raffestin *qui m'a accueillie puis formée à la biologie moléculaire,*

Marie Galloux *avec qui j'ai partagé les joies de la spectroscopie,*

Heidi Vitrac *pour ses précieux conseils sur les modèles membranaires.*

Je remercie les personnes à mes côtés ces trois années : Alicia, Aurélie, Bertrand, Carole, Emilie, Emmanuel, Florence, Floriana, Guillaume, Hua, Jérôme, Manuela, Natacha, Olivier, Steven, Stéphanie, Xiao-Fei, Yannick.... Merci aux secrétaires, Françoise et Florence, mais aussi à Christiane et Marie-Thérèse. Merci aux Agros, qui ont manifesté leur intérêt pour ce travail et participé à la bonne humeur de ces trois années.

Je remercie mes parents pour leur confiance et leur réconfort de chaque instant.

Pour terminer, je remercie JB, pour sa présence de tous les jours.

PARTIE I : CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Chapitre I : Toxines bactériennes à activité intracellulaire

1. Organisation structurale des toxines bactériennes à activité intracellulaire	19
1.1. Toxines AB _{RTC}	19
1.2. Toxines AB ₅	25
1.3. Toxines A _n B ₇	27
1.4. Toxines A orphelines	31
2. Mode d'action des toxines à activité intracellulaire	31
2.1. Mécanismes généraux d'intoxication des toxines de type AB	31
2.1.1. Mécanisme d'action des toxines de type AB _{RTC}	31
2.1.2. Mécanisme d'action des toxines de type AB ₅	35
2.1.3. Mécanisme d'action des toxines de type A _n B ₇	35
2.2. Récepteurs	37
2.2.1. Récepteurs protéiques	37
2.2.2. Récepteurs lipidiques	39
2.2.3. Récepteurs mixtes : cas des neurotoxines clostridiales	41
2.2.3.1. Neurotoxines botuliques	41
2.2.3.2. Neurotoxine tétanique	47
2.3. Internalisation et trafic intracellulaire des toxines	47
2.3.1. Voies d'internalisation des toxines	49
2.3.1.1. Internalisation des toxines par la voie clathrine dépendante	49
2.3.1.2. Internalisation des toxines par la voie des cavéoles	57
2.3.1.3. Internalisation des toxines par les voies indépendantes de la clathrine et des cavéoles	59
2.3.2. Trafic intracellulaire des toxines	63
2.3.2.1. Trafic des toxines par la voie endosomale	63
2.3.2.2. Trafic des toxines par la voie rétrograde	65
2.4. Compartiments de destination	73
2.4.1. Endosomes	73
2.4.2. Réticulum endoplasmique	77
2.5. Activités catalytiques, cibles cellulaires et fonctions touchées	79

Chapitre II : Membranes biologiques et translocation des toxines bactériennes

1. Membranes cellulaires et membranes modèles	85
1.1. Composition et structure des membranes cellulaires	85
1.2. Propriétés de la bicouche lipidique	87
1.2.1. La fluidité membranaire	89
1.2.2. Potentiel de membrane, constante diélectrique et pH à la surface de la membrane	91
1.3. Membranes modèles	93
1.3.1. Les couches planes de lipides	93
1.3.2. Les vésicules de bicouches lipidiques	95
2. Interactions protéines-membrane	97
2.1. Influence des têtes polaires	97
2.2. Influence des chaînes acylées	97
2.3. Repliement des protéines et membrane	99
3. Rôle du composant B des toxines bactériennes	101
3.1. Domaine de translocation des toxines AB _{RTC}	101
3.2. Pentamère B des toxines AB ₅	105
3.3. Heptamère des toxines A _n B ₇	107
4. Passage du composant A à travers la membrane	113
4.1. Toxines AB _{RTC}	113
4.2. Toxines AB ₅	115
4.3. Toxines A _n B ₇	121

Chapitre III : Toxine diphtérique

1. De la pathogénèse à la cristallographie de la DT	125
2. Structure et mécanisme d'action de la DT	129
2.1. Structure de la toxine diphtérique	129
2.2. Mécanisme d'intoxication de la DT	129
2.2.1. Liaison de la DT à son récepteur	131
2.2.2. Internalisation de la DT et trafic intracellulaire	133
2.2.3. Translocation à travers la membrane	135
2.2.3.1. <i>Isolé, le domaine C n'est pas transloqué</i>	135
2.2.3.2. <i>Domaine de translocation</i>	141
2.2.3.3. <i>Passage de C à travers la membrane</i>	153

2.3.4. Activité enzymatique du domaine C	155
3. Utilisation de la DT en biotechnologies	163

PARTIE II : RESULTATS-PUBLICATIONS

Article 1. La protonation concertée des histidines du domaine T de la toxine diphtérique déclenche son interaction avec la membrane	171
--	------------

Article 2. Le domaine T de la toxine diphtérique favorise la liaison à la membrane et la translocation du domaine C	185
--	------------

PARTIE III : CONCLUSIONS

Liste des abréviations	217
Liste des figures	219
Liste des tableaux	223
BIBLIOGRAPHIE	225

PARTIE I : CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Les toxines bactériennes appartiennent au monde des protéines amphitropiques, caractérisées par la propriété d'exister dans un état soluble et membranaire. Ces toxines représentent les facteurs de virulence les plus efficaces par lesquels une bactérie peut détériorer une cellule cible ou un organisme entier. La majorité des toxines bactériennes est constituée des toxines membranolytiques qui attaquent directement la surface des cellules cibles. D'autres libèrent dans la cellule un composant doué d'une activité enzymatique, capable de modifier un substrat de manière à perturber une fonction cellulaire vitale. Il s'agit des toxines à activité intracellulaire. Enfin, certaines bactéries injectent dans les cellules cibles des effecteurs toxiques à l'aide d'un système d'injection appelé « système de sécrétion de type III ».

Les **toxines membranolytiques** agissent au niveau de la membrane plasmique de la cellule cible. Elles forment des pores ou désorganisent la structure membranaire, et conduisent à la mort cellulaire par fuite de solutés. Plus de 100 toxines cytolytiques ciblant les cellules eucaryotes sont connues à ce jour. Elles sont produites par une cinquantaine de bactéries pathogènes et sont généralement impliquées dans les symptômes de l'infection (Alouf, 2000). Ces toxines sont des protéines monocaténares. Parmi les toxines membranolytiques, on distingue trois classes définies selon leur action sur la membrane plasmique : les toxines à activité détersive, les toxines formatrices de pores, les phospholipases et les sphingomyélinases, ces dernières représentant souvent des facteurs de pathogénicité secondaires. Les toxines à activité détersive sont en général des peptides amphiphiles. Elles perméabilisent la membrane par déstabilisation de son organisation et/ou formation de pores. Parmi les toxines formatrices de pores, on distingue les toxines interagissant avec le cholestérol (aussi appelées CDC pour « cholesterol-dependant cytolysin »), les toxines RTX (pour « repeat in toxin »), les cytohémolysines, les aérolysines, et les α -hémolysines (tableau 1).

Les **toxines à activité intracellulaire** contiennent généralement deux composants : un composant catalytique A et un composant B qui assure la liaison aux membranes et éventuellement la translocation du module A dans le milieu intracellulaire. La toxine diphtérique appartient à cette famille et est détaillée dans le chapitre III.

Type de toxine	Nom	Acronyme	Organisme	
Cytolysines cholesterol- dépendantes	Cereolysine O	CLO	<i>Bacillus cereus</i>	Gram positive
	Alveolysine	ALV	<i>Bacillus alvei</i>	Gram positive
	Laterosporolysine		<i>Bacillus laterosporus</i>	Gram positive
	Thuringiolysine O	TLO	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Gram positive
	Perfringolysine O	PFO	<i>Clostridium perfringens</i>	Gram positive
	Tetanolysine	TLY	<i>Clostridium tetani</i>	Gram positive
	Botulinolysine	BLY	<i>Clostridium botulinum</i>	Gram positive
	Bifementolysine		<i>Clostridium bifementans</i>	Gram positive
	Hystolytolysine O		<i>Clostridium histolyticum</i>	Gram positive
	Oedematolysine O		<i>Clostridium oedematiens</i>	Gram positive
	Septicolysine O		<i>Clostridium septicum</i>	Gram positive
	Sordellilysine		<i>Clostridium sordellii</i>	Gram positive
	Caproiciolysine		<i>Clostridium caproicum</i>	Gram positive
	Chauveolysine		<i>Clostridium chauvoei</i>	Gram positive
	Listeriolysine O	LLO	<i>Listeria monocytogenes</i>	Gram positive
	Ivanolysine O	ILO	<i>Listeria ivanovii</i>	Gram positive
	Seeligerolysine	LSO	<i>Listeria seeligeri</i>	Gram positive
Streptolysine O	SLO	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Gram positive	
Pneumolysine	PLY	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Gram positive	
Toxines RTX	Hémolysine	PvxA	<i>Proteus vulgaris</i>	Gram negative
	Hémolysine	PmxA	<i>Proteus mirabilis</i>	Gram negative
	Hémolysine	MmxA	<i>Morganella morgani</i>	Gram negative
	Leukotoxine	LktA	<i>Pasteurella hemolytica</i>	Gram negative
	Leukotoxine	PlkA	<i>Pasteurella hemolytica-like</i>	Gram negative
	Hémolysine	AshA	<i>Actinobacillus suis</i>	Gram negative
	Leukotoxine	AktA	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Gram negative
	Toxine RTX I	ApxA	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Gram negative
	Toxine RTX II	ApxB	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Gram negative
	Toxine RTX III	ApxC	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Gram negative
	Adénylcyclase	CyaA ou ATC	<i>Bordetella pertussis</i>	Gram negative
	Hémolysine A	HlyA	<i>Escherichia coli</i>	Gram negative
Cytohémolysin	Cytohémolysine	HlyA	<i>Vibrio cholerae</i>	Gram negative
	Cytohémolysin 1	Hly1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Gram negative
Aérolysines	Aérolysine (β-hémolysine)		<i>Aeromonas hydrophila, A. trota, A. salmonicida</i>	Gram negative
	Toxine α		<i>Clostridium septicum</i>	Gram positive
α-hémolysines	α-hémolysine		<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positive
	Hémolysine II		<i>Bacillus cereus</i>	Gram positive
	Toxine β		<i>Clostridium perfringens</i>	Gram positive
	Cytotoxin	CytK	<i>Bacillus cereus</i>	Gram positive
	Leukocidine chaîne S	LukS	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positive
	Leukocidine chaîne F	LukF	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positive
	γ-haémolysine	HlgA, HlgB	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positive
	γ-haémolysine	HlgC, HlgB	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positive
	Pantone-Valentine leukocidine	LukF-PV + LukS-PV	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positive

Tableau 1 : Toxines formatrices de pores.

Les **colicines** sont des toxines bactériennes produites par certaines souches d'*E.coli* et dirigées contre des souches bactériennes sensibles. Les colicines sont divisées en trois classes suivant leur mode d'action : dépolarisation de la membrane interne des bactéries par formation de pores, activité ribonucléase, activité endonucléase. La structure des colicines formatrices de canaux sensibles au potentiel de membrane est similaire à l'organisation structurale des toxines de type AB, puisqu'elles sont formées de trois domaines, dont l'un est un analogue du domaine de translocation rencontré chez certaines toxines de type AB_{RTC}.

Certaines bactéries à Gram négatif possèdent un **système de sécrétion de « type III »** ou « injectisome » permettant d'injecter directement dans le cytoplasme de la cellule des **effecteurs protéiques toxiques**. Le système de sécrétion de type III est une structure protéique en forme d'aiguille qui traverse la paroi bactérienne et forme un canal appelé « translocon » dans la membrane cytoplasmique de la cellule cible. Les effecteurs toxiques interfèrent avec les voies de signalisation de la cellule hôte qui sont normalement activées afin d'éliminer les agents infectieux. Ces effecteurs ont des activités variées (sérine/thréonine acétyltransférase, cystéine protéase, tyrosine phosphatase...) et ciblent principalement les petites protéines G.

Les **peptides antibiotiques** sont des peptides produits dans de nombreux tissus et types cellulaires des organismes vivants, comprenant les invertébrés, les plantes, et de nombreuses espèces animales. La classification des peptides se fait suivant leur composition en acides aminés et leur structure (Broden, 2005). Leurs mécanismes d'action sont variés, mais tous entraînent une déstabilisation de la membrane et la formation de canaux ioniques ou de pores. La perméabilisation de la membrane modifie le potentiel de membrane et le gradient de pH.

Les **superantigènes** sont des protéines monocaténaires, de 20 à 30 kDa, capables de provoquer l'activation polyclonale des lymphocytes T. Cette famille de toxines comprend notamment la toxine du syndrome de choc toxique streptococcique de *Streptococcus pyogenes* et les toxines érythrogènes (scarlatineuses) staphylococciques de *Staphylococcus aureus* (pour revue, voir (Llewelyn & Cohen, 2002)). Ces toxines se fixent directement sur les cellules

présentatrices de l'antigène de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH II) par une liaison n'impliquant pas le site de fixation classique des antigènes. Ces superantigènes sont alors reconnus par les lymphocytes T et permettent le pontage de la chaîne β des récepteurs du lymphocyte avec la molécule CMH II d'une cellule présentatrice de cet antigène, ce qui conduit à l'activation non spécifique du lymphocyte. C'est ainsi que 5 à 50% des lymphocytes T sont activés indépendamment de leur spécificité antigénique.

Chapitre I

Toxines bactériennes à activité intracellulaire (toxines de type AB)

1. Organisation structurale des toxines bactériennes à activité intracellulaire

1.1. Toxines AB_{RTC}

Les toxines de type AB_{RTC} comprennent la toxine diphtérique (DT) de *Corynebacterium diphtheriae*, l'exotoxine A (ETA) de *Pseudomonas aeruginosa*, les neurotoxines botuliques (BoNT) de *Clostridium botulinum* et tétanique (TeNT) de *Clostridium tetani*, les grandes toxines clostridiales (la toxine létale de *Clostridium sordellii*, les toxines A et B de *Clostridium difficile*, la toxine α de *Clostridium novyi* et la toxine hémorragique de *Clostridium sordellii*) et les facteurs dermonécrotiques (CNF1, CNF2 de *Escherichia coli* et la DNT de *Bordetella pertussis*) (tableau 2 et figure 1). Ces toxines sont constituées d'une chaîne polypeptidique unique, contrairement aux assemblages A₁B₅ et A_nB₇. Cette chaîne est organisée en trois domaines structuraux et fonctionnels (figure 1) : un domaine de liaison au récepteur (**R**), un domaine de translocation (**T**), et un domaine catalytique (**C**). Le domaine C se trouve en position N-terminale et le domaine R en position C-terminale, à l'exclusion de l'ETA et des toxines DNT, CNF1 et CNF2 pour lesquelles les positions sont inversées. Le domaine T est donc toujours situé entre R et C. D'une manière générale, la structure des domaines C des toxines AB_{RTC} possède une combinaison d'hélices α et de feuillets β , les domaines T sont essentiellement constitués d'hélices α et les domaines R de feuillets β .

Pour être actives, les toxines AB_{RTC} nécessitent un clivage enzymatique entre les composants A et B, c'est-à-dire entre les domaines C et T qui restent liés par un pont

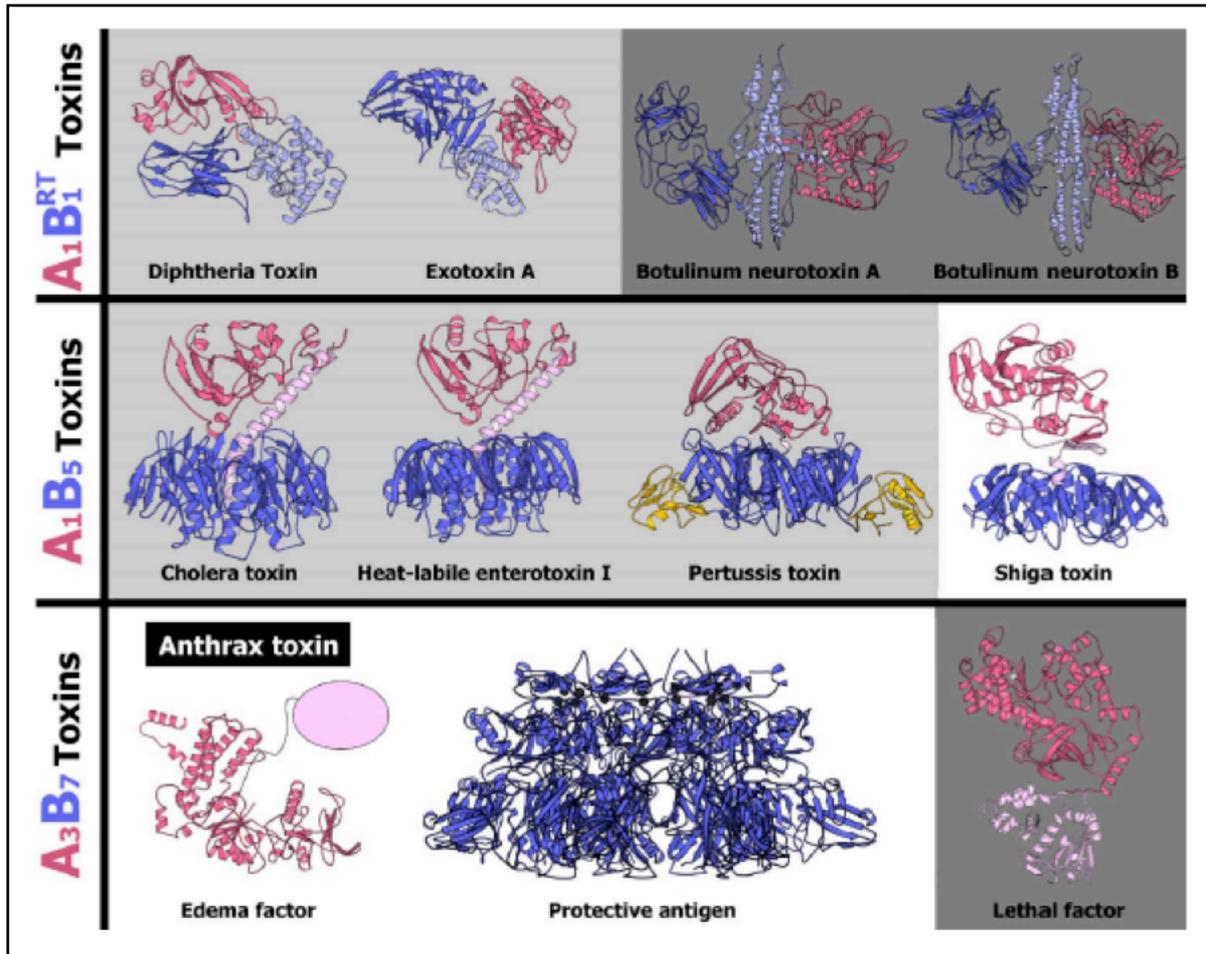


Figure 1 : Structure des toxines bactériennes de type AB. Le composant A est représenté en rose et le composant B en bleu. Pour les toxines RTC, le domaine de liaison au récepteur et le domaine de translocation sont représentés en bleu foncé et bleu clair respectivement. Pour les toxines A₁B₅ et A₃B₇, les segments A₁ (activité enzymatique) et A₂ sont représentés en rose foncé et rose clair respectivement. Pour la toxine pertussique, les deux domaines APT sont représentés en jaune. Les toxines qui possèdent une activité ADP-ribosyl transférase ou zinc-endopeptidase sont représentées sur fond gris clair et gris foncé respectivement. D'après Ménétrety *et al.*, 2005.

disulfure. En effet, le composant enzymatique n'est pas actif tant qu'il n'est pas libéré de la toxine native (Gill & Dinius, 1971). Cette étape de clivage protéolytique est appelée « étape d'activation ». Le composant A isolé est enzymatiquement actif, mais n'a pas la capacité d'entrer dans la cellule, alors que le composant B isolé peut se fixer aux cellules cibles mais n'est pas toxique.

La taille des toxines AB_{RTC} (figure 1 et tableau 2) varie selon le type d'environ 60 kDa pour les plus petites (DT, ETA) à 300 kDa pour les plus grosses (grandes toxines clostridiales). Les neurotoxines clostridiales ont une taille intermédiaire de 150 kDa. Dans une même toxine, les trois domaines C, T et R ont une taille comparable. La DT de *Corynebacterium diphtheriae* (Choe *et al.*, 1992) est la toxine AB_{RTC} la mieux connue. Son organisation structurale est détaillée dans le Chapitre III.

Certaines toxines AB_{RTC} se regroupent en familles structurales et fonctionnelles.

Les **neurotoxines clostridiales**, de 150 kDa, incluent les neurotoxines botuliques (BoNT) et tétanique (TeNT). Elles sont produites majoritairement par *Clostridium botulinum* (mais aussi *Clostridium barati*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium argentinense* et *Clostridium sporogenes*) et *Clostridium tetani*, respectivement. Il existe sept sérotypes de BoNT (BoNT/A à BoNT/G), qui présentent entre elles des conservations de séquence mais génèrent des anticorps distincts. Les BoNT sont clivées par une protéase bactérienne. Le composant B comprend le domaine T (segment N-terminal) et le domaine R (segment C-terminal) (Lacy *et al.*, 1998). Le domaine T des BoNT est composé d'hélices α avec une paire d'hélices amphiphiles particulièrement longues, faisant 105 Å de long. Une longue boucle entoure le domaine C, composé de structures α et β dans les structures cristallographiques de la BoNT/A (Lacy *et al.*, 1998) et la BoNT/B (Swaminathan & Eswaramoorthy, 2000) à pH 7 et pH 6. Elle s'étend des résidus 492-545 pour la BoNT/A et 481-535 pour la BoNT/B. Le mécanisme d'action des BoNT est encore mal connu, notamment le rôle du composant B. Le domaine T s'insère dans les membranes et participe à la translocation du domaine C. La présence d'une boucle non structurée appartenant au domaine T, et encerclant le domaine C a conduit certains auteurs à penser que la boucle joue un rôle dans la translocation du composant A (Brunger *et al.*, 2007).

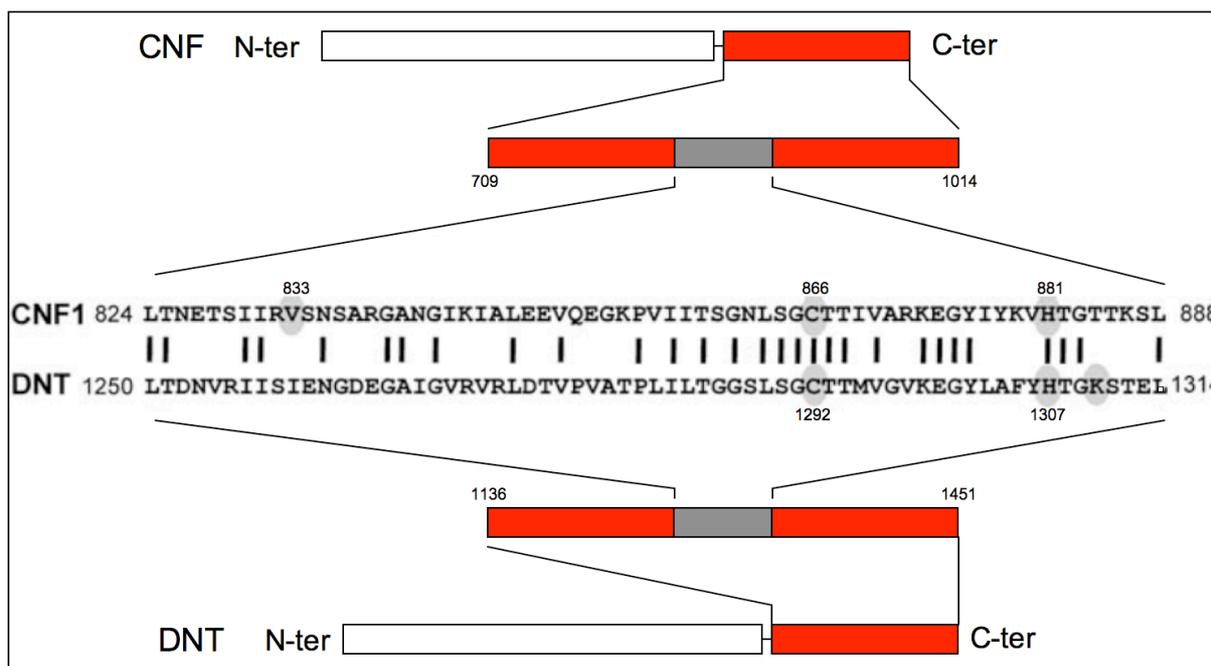


Figure 2 : Homologies de séquences entre les toxines CNF1 et DNT. Les toxines partagent des homologies au niveau de leurs domaines catalytiques (rouge) en C-terminal. L'homologie de séquence est particulièrement élevée entre la DNT et les CNF au niveau d'une séquence de 64 acides aminés (résidus 1250-1314 pour la DNT et 824-888 pour les CNF) avec 45% d'identité (gris), alors que pour le reste de la séquence des domaines catalytiques le pourcentage d'identité est de 13%. Les résidus impliqués dans l'activité catalytique sont surlignés en gris.

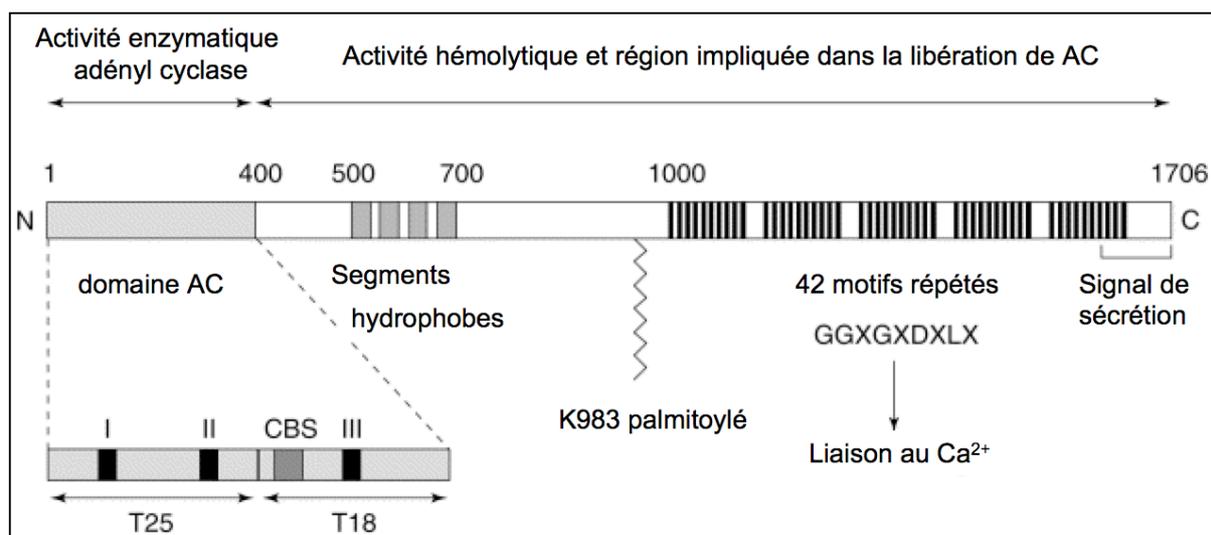


Figure 3 : Structure de l'adényl cyclase de *B. pertussis*. Le site de liaison à la calmoduline est indiqué (CBS). Le sous domaine T25 contient les principaux sites catalytiques et le sous domaine T18 contient le site de liaison à la calmoduline. Les segments I, II et III représentent les régions impliquées dans la catalyse. D'après Ladant & Ullman, 1999.

Les **grandes toxines clostridiales**, de haut poids moléculaire, issues de *Clostridium difficile*, *Clostridium sordellii* et *Clostridium novyi* sont les plus grandes toxines protéiques bactériennes connues. Leur masse moléculaire varie entre 250 kDa (toxine α de *C. novyi*) et 308 kDa (toxine A de *C. difficile*). Ces toxines portent une activité enzymatique glucosyltransférase dans leur région N-terminale, tandis que leur région C-terminale est impliquée dans la reconnaissance des cellules cibles.

Les toxines CNF1 et CNF2 (« cytotoxic necrotizing factor ») d'*E. coli*, d'environ 115 kDa, sont constituées d'une seule chaîne protéique qui contient un domaine C-terminal possédant une activité enzymatique et un domaine N-terminal servant à la reconnaissance cellulaire (pour revue, voir (Boquet, 2001)). Seule la structure du domaine C de CNF1 a été déterminée (Buetow *et al.*, 2001). Le domaine de liaison de CNF1 à la cellule semble impliqué dans la translocation. CNF1 et CNF2 possèdent 90% d'identité au niveau de leurs séquences (Oswald & De Rycke, 1990). La DNT de *B. pertussis* est une protéine de 160 kDa, sensible à la chaleur, et présente des similitudes avec les toxines produites par *E. coli*. L'homologie avec les CNF porte sur le domaine C (figure 2), ce qui suggère des mécanismes d'action similaires.

L'adénylate cyclase (CyaA) de *B. pertussis* est une toxine RTX dont l'organisation structurale et fonctionnelle est très proche des toxines AB_{RTC} (figure 3) (pour revue voir (Ladant & Ullmann, 1999)). Son composant A (appelé AC) porte l'activité catalytique et son composant B possède une activité hémolytique (Glaser *et al.*, 1988 ; Bellalou *et al.*, 1990). La structure cristallographique de la toxine entière n'a pas été déterminée, mais la structure du domaine C en complexe avec la calmoduline est disponible (Guo *et al.*, 2005). Le domaine de liaison au récepteur est caractérisé par la présence de 30 à 40 copies d'un motif répété de neuf résidus. Contrairement aux toxines de type AB, il semble que CyaA n'ait pas besoin d'être activée pour intoxiquer les cellules. CyaA possède une organisation structurale en trois domaines, dont les fonctions respectives sont similaires à celles des toxines AB_{RTC}. Elle sera classée dans cette famille structurale dans les deux premiers chapitres.

	Toxine		Organisme producteur	Cible	Activité enzymatique	Effet	
Toxines AB₁ 	Toxine diphtérique (DT)		<i>C. diphtheriae</i>	Facteur d'élongation 2	ADP-ribosyl transférase	Inhibition de la synthèse protéique	
	Exotoxine A (ETA)		<i>P. aeruginosa</i>				
	Neurotoxines clostridiales	Neurotoxine botulinique A à G (BoNT/A-G)		<i>C. botulinum</i>	Protéines du complexe SNARE	Zinc-endopeptidase	Inhibition de la libération de neurotransmetteur
		Neurotoxine tétanique (TeNT)		<i>C. tetani</i>			
	Grandes toxines clostridiales	Toxine A (ToxA)		<i>C. difficile</i>	Protéines Rho et Ras	Glucosyl-transférase	Désorganisation des filaments d'actine/Perturbation de la transduction du signal
		Toxine B (ToxB)					
		Toxine létale		<i>C. sordellii</i>			
	Toxine hémorragique						
	Toxines dermo-nécrotiques	CNF1		<i>E. coli</i>	Protéines Rho	Déaminase	Polymérisation des filaments d'actine
		CNF2					
DNT		<i>B. pertussis</i>					
Toxines A₁B₅ 	Famille cholérique	Toxine cholérique (CT)		G _{sα}	ADP-ribosyl transférase	Augmentation du taux d'AMPc	
		Entérotoxine I (LT-I)					
		Entérotoxine IIa (LT-IIa)					
		Entérotoxine IIb (LT-IIb)					
	Toxine pertussique (PT)		<i>B. pertussis</i>	Gi _α			
	Famille de Shiga	Toxine de Shiga (ST)		<i>S. dysenteriae</i>	ARNr 28S	Dépurinase	Inhibition de la synthèse protéique
		Toxines de type (SLT)					
Subtilase (SubAB)		<i>E. coli</i>	BiP	Sérine protéase	Perméabilité du RE/ Non reconnaissance des protéines mal repliées		
Toxines A₃B₇ 	Complexe toxique du charbon	Antigène protecteur (PA)		<i>B. anthracis</i>	-	Translocation de EF et LF	
		Facteur oedémateux (EF)			ATP	Adénylate-cyclase	Augmentation du taux d'AMPc
		Facteur léthal (LF)			MAPKK	Zinc-endopeptidase	Inhibition des voies de transduction du signal
	Famille des toxines qui ADP-ribosylent l'actine	Toxines VIP (VIP1 et VIP2)		<i>B. cereus</i>	Actine	ADP-ribosyl transférase	Dépolymérisation des filaments d'actine
		Toxines C2 (C2I et C2II)		<i>C. botulinum</i>			
		Toxines iota (Ia et Ib)		<i>C. perfringens</i>			
		Toxine CST (Sa et Sb)		<i>C. spiroforme</i>			
		Toxine CDT (CDTa et CDTb)		<i>C. difficile</i>			

Tableau 2 : Propriétés fonctionnelles de quelques toxines de type AB.

1.2. Toxines AB₅

Les toxines AB₅ sont formées de six sous-unités associées de manière non covalente. Le composant A correspond à une de ces sous-unités, le composant B étant formé de cinq sous-unités identiques, à l'exception de la toxine pertussique dont le pentamère B possède une formule de type S₂S₃S₄S₄S₅ (Stein *et al.*, 1994). Le pentamère B permet la reconnaissance cellulaire et la liaison aux cellules cibles et cela même en l'absence du composant A. Cependant, l'intoxication nécessite la présence de l'holotoxine. Ces toxines AB₅ présentent un haut degré d'homologie structurale (figure 1) alors qu'elles ne montrent qu'une faible identité au niveau de leur séquence primaire (Merritt & Hol, 1995). Comme les toxines AB_{RTC}, elles nécessitent un clivage protéolytique pour être activées. Ce clivage sépare le composant A en deux sous-unités structurales A₁ et A₂ (figure 1). A₁ est libérée et contient l'activité enzymatique, et A₂ reste liée au composant B. La partie C-terminale du segment A₂ se prolonge à travers l'orifice central du pentamère B et est liée de manière non covalente aux sous-unités du composant B.

Les prototypes de ce type structural sont la toxine cholérique (CTx) de *V. cholerae* et la toxine thermolabile (LT) d'*E. coli* (figure 1). Elles sont constituées d'un composant A de 27-28 kDa et d'un composant B pentamérique formé de cinq sous-unités B de 11-12 kDa chacune. Les cinq sous-unités B forment un orifice central, dont la structure a été élucidée par cristallographie pour les toxines thermolabile, pertussique, Shiga et cholérique (Sixma *et al.*, 1991 ; Stein *et al.*, 1994 ; Fraser *et al.*, 1994 ; Zhang *et al.*, 1995).

Le pentamère de la toxine pertussique (PTX) ne semble pas former un orifice mais une zone d'interaction importante au niveau de sa partie supérieure avec la sous-unité S₁ (figure 1). De plus, le composant B présente un domaine supplémentaire APT (figure 1, jaune) sur deux de ses monomères. Ce domaine est un domaine replié identiquement aux lectines de type C et permet certainement au composant B de se lier à des récepteurs membranaires glycosylés (Stein *et al.*, 1992).

1.3. Toxines A_nB₇

Les toxines A_nB₇ sont dites binaires puisque leurs composants A et B sont secrétés par la bactérie productrice sous forme dissociée. De plus, et à l'inverse des toxines AB₅, les sept sous-unités du composant B sont également dissociées. Elles forment un heptamère après liaison à la cellule. Cet assemblage n'est possible qu'après activation protéolytique des monomères du composant B. Le PA₈₃ monomérique est clivé par des enzymes de la famille de la furine en PA₆₃ qui est lié à la cellule et s'oligomérisent en heptamère. Le composant A est constitué d'un domaine catalytique et d'un domaine de liaison à l'heptamère B (figure 1). Ces toxines comprennent les toxines létale (LF+PA) et oedémateuse (EF+PA) de *Bacillus anthracis* (Ascenzi *et al.*, 2002), la toxine C2 de *Clostridium botulinum*, la toxine iota de *Clostridium perfringens*, la toxine ADP-ribosylante de *Clostridium spiroforme* (CST), la toxine VIP (« Vegetative Insecticidal Protein ») de *Bacillus cereus* et la CDT (Toxine de *C. difficile*) de *Clostridium difficile* (Aktories *et al.*, 1986 ; Popoff & Boquet, 1988 ; Perelle *et al.*, 1993) (tableau 2). Les monomères du composant B se lient à la membrane et s'associent en heptamère en l'absence du composant A. Les structures des toxines assemblées ne sont pas disponibles. Pour le complexe toxique du charbon, les structures des trois composants isolés ont été déterminées (Petosa *et al.*, 1997 ; Pannifer *et al.*, 2001 ; Drum *et al.*, 2002).

La structure du PA₈₃ a été déterminée par diffraction aux rayons X (Petosa *et al.*, 1997) (figure 4A). Le PA₈₃ est une longue protéine riche en structures β. Il est composé de quatre domaines fonctionnels identifiés à l'origine par digestion protéolytique à la trypsine et à la chymotrypsine. Le domaine 1 (D1, résidus 1-258) est lié à deux ions calcium et contient une longue boucle flexible (résidus 162-175) qui inclut la séquence RKKR qui est clivée lors de l'activation protéolytique. Le domaine D1a correspond à la partie N-terminale libérée lors du clivage. Le domaine D1b reste associé à la protéine. Le domaine 2 (D2, résidus 259-487) contient plusieurs très longs brins β impliqués dans la formation du pore membranaire. Il contient une large boucle flexible (résidus 303-319) impliquée dans l'oligomérisation du PA₆₃ et l'insertion membranaire (Chapitre II.3.3). Le domaine 3 (D3, résidus 488-595) n'a pas de fonction encore connue. Le domaine 4 (D4, résidus 596-735) est légèrement dissocié des trois autres, et est impliqué dans la liaison au récepteur.

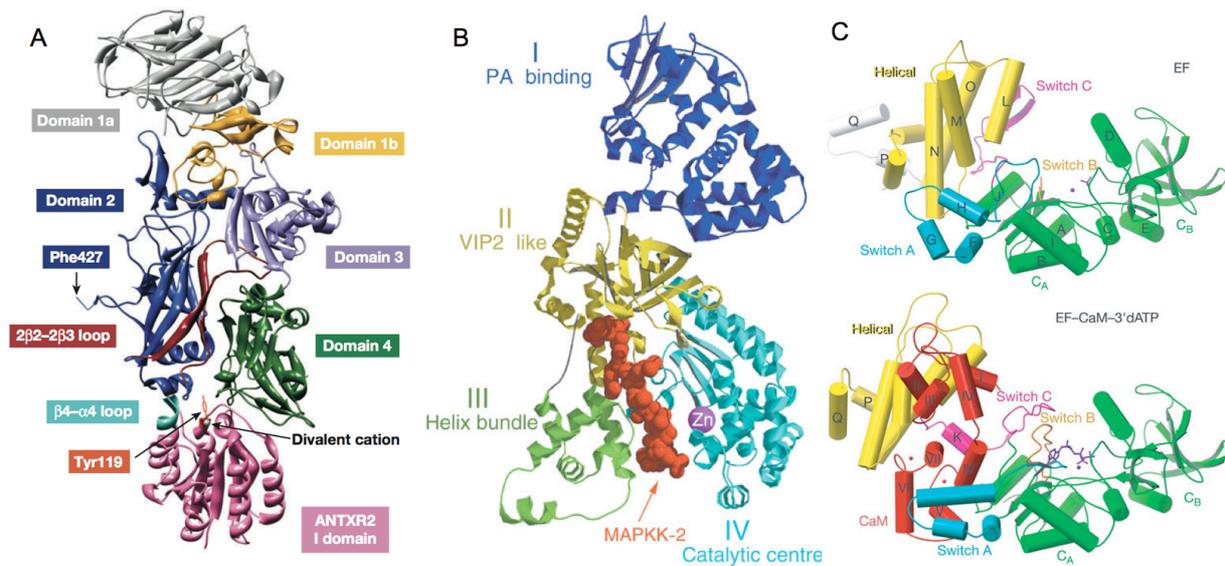


Figure 4 : Représentations tridimensionnelles des trois protéines constituant le complexe toxique du charbon. (A) Structure du PA, d'après Young & Collier, 2005. (B) Structure de LF lié à la MAPKK-2, d'après Pannifer *et al.*, 2001. (C) Structure de EF. En haut, EF seul. En bas, EF complexé à la calmoduline. Les switch représentent les zones impliquées dans la liaison à la calmoduline et dans les changements conformationnels induits. D'après Drum *et al.*, 2002.

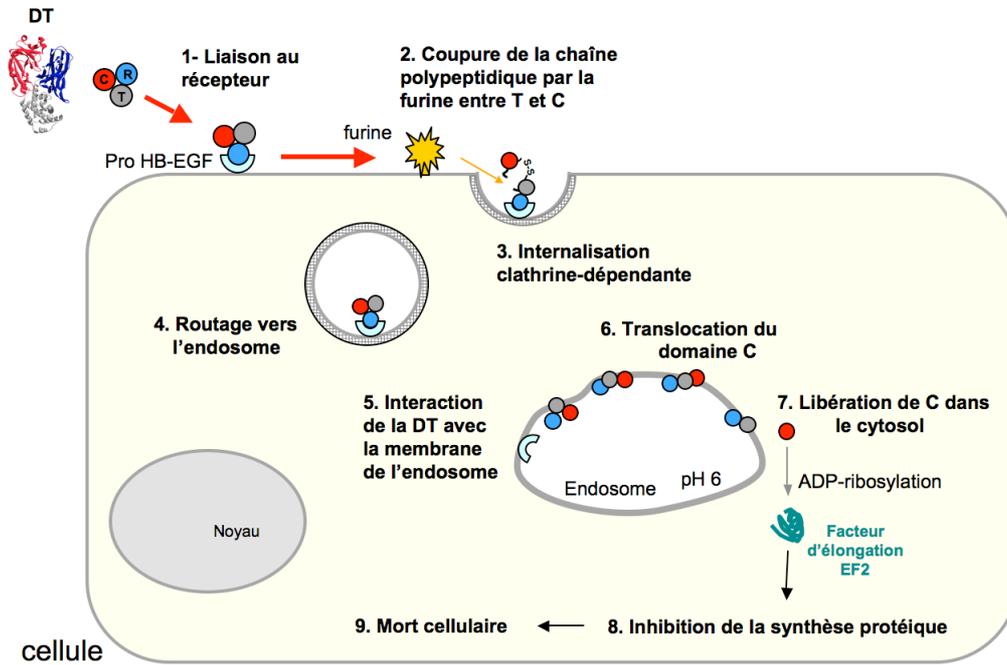
Le domaine I de LF (résidus 1-262) a pour fonction la liaison au PA₆₃ (figure 4B). Cette liaison implique sept résidus Ala (Lacy *et al.*, 2002). Il est composé de 12 hélices α et d'un feuillet β de 4 brins. Le site de liaison au PA₆₃ n'est pas connu, mais le repliement du domaine 1 est requis pour la liaison (Quinn *et al.*, 1991 ; Gupta *et al.*, 2001). Le domaine II (résidus 263-297 et 385-550) est composé d'hélices α et de feuillets β . Le domaine III est composé d'hélices α situées dans un cœur hydrophobe entre les hélices 2 et 3 du domaine II. Il est impliqué dans l'activité catalytique puisqu'il partage une surface de contact hydrophobe avec le domaine IV et ne rend accessibles au site catalytique que certaines conformations de substrats. Le domaine 4 est composé de neuf hélices α et d'un feuillet β de 4 brins. Un ion Zn²⁺ est tétracoordiné à une molécule d'eau, aux deux résidus histidines du motif métalloprotéase HExxH et à un glutamate.

La structure de EF est composée de trois domaines globulaires (Drum *et al.*, 2002) formés majoritairement d'hélices α (figure 4C). Le site actif est à l'interface des domaines C_A et C_B. Seize résidus hydrophobes sont enfouis dans la structure de EF. Lors de l'insertion de la calmoduline, ces interactions sont rompues, ce qui entraîne des mouvements des domaines en hélices (figure 4C).

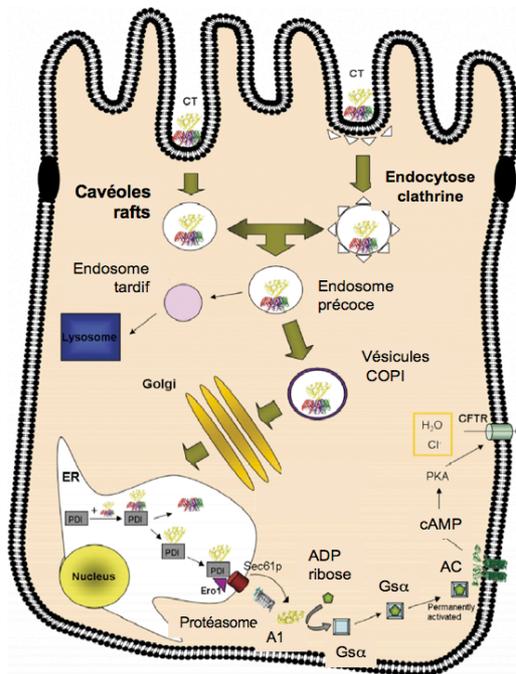
1.4. Toxines A orphelines

Certaines toxines à activité intracellulaire sont formées uniquement d'un composant A pour lequel aucun composant B n'a été identifié. Des exemples de ce type de toxines sont la toxine C3 de *Clostridium botulinum* et les toxines de type C3 de *Clostridium limosum*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* (Wilde & Aktories, 2001). Leurs structures ont été déterminées sous formes isolées (Han *et al.*, 2001 ; Menetrey *et al.*, 2002 ; Evans *et al.*, 2003) et complexées à leur co-facteur, le NAD (Menetrey *et al.*, 2002 ; Evans *et al.*, 2003). Ces protéines basiques font environ 25 kDa et ne contiennent ni domaine de liaison aux cellules, ni unité de translocation à travers les membranes lipidiques. Ainsi, leur pénétration dans les cellules est relativement faible. De fortes concentrations ou des micro-injections sont nécessaires pour obtenir des effets cytotoxiques notables par leur activité de type ADP-ribosyltransférase (Rubin *et al.*, 1988). Cette particularité a conduit à proposer le terme d'« exoenzyme » à la place du mot « toxine » pour dénommer ces protéines bactériennes.

A



B



C

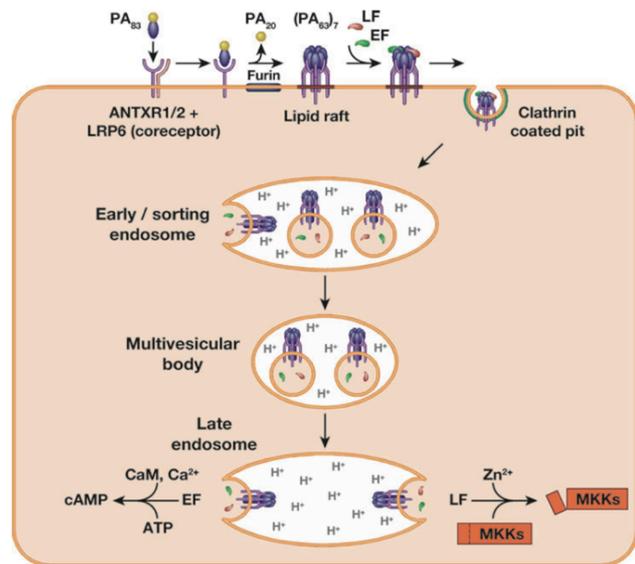


Figure 5 : Mécanismes d'action des toxines à activité intracellulaire de type AB. Les figures A, B, et C illustrent respectivement les mécanismes d'action des prototypes des toxines AB_{RTC}, AB₅ et A_nB₇. (A) Mécanisme d'action de la toxine diphtérique, (B) Mécanisme d'action de la toxine cholérique, d'après Broeck *et al.*, 2007, (C) Mécanisme d'action du complexe toxique du charbon. ANTXR1/2 se réfère aux récepteurs TEM8 et CMG2 du PA₈₃. D'après Young & Collier, 2008.

2. Mode d'action des toxines à activité intracellulaire

Les toxines de type AB affectent les fonctions cellulaires et/ou physiologiques de l'organisme hôte infecté. L'étude des mécanismes d'action de ces toxines a révélé de nombreux aspects de la physiologie des cellules-hôtes et, parallèlement, a ouvert de nouvelles approches thérapeutiques (Alouf, 2000). Certaines toxines ont en effet été utilisées avec succès pour servir d'agents thérapeutiques, d'autres ont été rationnellement modifiées pour élaborer des « immuno-toxines » capables de reconnaître et de provoquer la mort cellulaire de cellules cancéreuses de manière spécifique (Alouf, 2000). Une troisième approche exploite les propriétés naturelles de certaines toxines de cibler les cellules du système immunitaire pour créer des vaccins innovants capables de stimuler des réponses contre des antigènes spécifiques (Smith *et al.*, 2002).

2.1. Mécanismes généraux d'intoxication par les toxines de type AB

2.1.1. Mécanisme d'action des toxines de type AB_{RTC}

Les trois domaines structuraux R, T, et C des toxines AB_{RTC} assurent chacun une fonction correspondant à une étape distincte du mécanisme d'intoxication. La figure 5C illustre ces étapes pour la DT, la plus étudiée des toxines de cette famille. Son mécanisme est détaillé au Chapitre III. Les toxines AB_{RTC} se lient à leur récepteur à la surface de la cellule par leur domaine R (Naglish *et al.*, 1992 ; Nishiki *et al.*, 1994). La toxine est activée par une protéase, en général la furine, ou des protéases apparentées, présentes à la surface des cellules ou dans les compartiments d'internalisation (Tsuneoka *et al.*, 1993 ; Gordon *et al.*, 1995). La liaison de la toxine au récepteur déclenche l'internalisation du complexe. À ce stade, les deux composants A et B sont reliés par un pont disulfure réunissant l'extrémité C-terminale du domaine C à l'extrémité N-terminale du domaine T. Le complexe de la toxine liée à son récepteur transite vers l'endosome. Dans l'endosome, l'acidification du pH entraîne des changements de conformation des domaines de translocation de la DT et de l'ETA (Tortorella *et al.*, 1995 ; Mere *et al.*, 2005). Ces changements de conformation favorisent l'interaction avec la membrane endosomale. Dans le cas de la BoNT/A, aucun changement de conformation du domaine T n'est détecté (Galloux *et al.*, 2008). Le domaine T interagit avec la membrane de l'endosome et s'insère profondément. Le domaine T assiste le passage

du domaine C dans le cytosol de la cellule. Cette étape du mécanisme d'intoxication est appelée étape de translocation, qui est la moins connue du processus d'intoxication par les toxines AB_{RTC}. Dans le cytosol, la réduction du pont disulfure permet la libération du domaine C qui modifie son substrat. Ce type de toxine affecte des fonctions vitales de la cellule et entraîne la mort cellulaire.

Il existe des variations de ce mécanisme modèle chez les toxines AB_{RTC}. L'ETA, dont l'organisation structurale est très proche de la DT, transite jusqu'au réticulum endoplasmique (RE). Les toxines CNF1 et DNT se lient à leurs récepteurs puis sont endocytées. CNF1 atteint les endosomes tardifs où a lieu la translocation du domaine C (Contamin *et al.*, 2000 ; Pei *et al.*, 2001). La DNT possède un mécanisme original, indépendant de l'acidification de l'endosome (non sensible à la bafilomycine A₁), et d'un transfert vers le RE (non sensible à la brefeldine A) (Matsuzawa *et al.*, 2004). La translocation a lieu dans l'endosome précoce, que la toxine atteint par une voie indépendante du cytosquelette d'actine (non sensible à la cytochalasine) et des microtubules (non sensible au nocodazole). Il est possible que le clivage des 54 résidus N-terminaux par la furine déclenche l'exposition d'hélices hydrophobes, initiant ainsi la translocation.

CyaA se lie à son récepteur cellulaire qui n'est pas encore identifié (Guermonprez *et al.*, 2001). De manière similaire au domaine de translocation de certaines toxines AB_{RTC}, le domaine central de CyaA s'insère dans la membrane plasmique mais sans la nécessité d'être exposé à un pH acide (Rogel & Hanski, 1992). L'insertion de la toxine dans la membrane des érythrocytes conduit à la formation de pores perméants aux cations et provoque *in fine* la lyse de la cellule (Bellalou *et al.*, 1990 ; Benz *et al.*, 1994). L'originalité principale de la toxine CyaA eût égard aux autres toxines AB_{RTC}, concerne son mécanisme d'entrée dans les cellules eucaryotes, qui consiste en une translocation directe du domaine catalytique à travers la membrane plasmique (Rogel *et al.*, 1989 ; Rogel & Hanski, 1992 ; Ladant & Ullmann, 1999). Le domaine C est alors directement libéré dans le cytoplasme de la cellule. Le domaine RTX est probablement impliqué dans ce mécanisme (Rose *et al.*, 1995 ; Bauche *et al.*, 2006). Plusieurs études ont identifié ce domaine comme jouant un rôle dans le processus de translocation (Bellalou *et al.*, 1990 ; Karimova *et al.*, 1998 ; Osickova *et al.*, 1999 ; Gray *et al.*, 2001 ; Bauche *et al.*, 2006). Les mécanismes moléculaires de la translocation sont encore inconnus.

2.1.2. Mécanisme d'action des toxines de type AB₅

Le prototype de ces toxines est la CTx de *V. cholerae*. Ces toxines se lient à leur récepteur à la surface de la cellule par leur composant B puis sont endocytées. Elles empruntent la voie dite rétrograde, et transitent par plusieurs compartiments cellulaires (endosome, réseau trans-golgien, appareil de Golgi...) jusqu'au RE. Lors du trafic de la toxine, le composant A subit un clivage protéolytique entre les segments A₁ et A₂ (figure 5B). Cette activation est réalisée par la furine ainsi que par d'autres protéases cellulaires moins efficaces, probablement dans les endosomes et/ou dans le réseau trans-golgien (TGN). La toxine atteint ensuite le RE, où se produit la dissociation des deux composants. Cette dissociation semble avoir lieu sous l'action de protéines du RE et du potentiel rédox. Le domaine A₁ est pris en charge par des protéines chaperones et par un système de transport de la membrane du RE, le translocon Sec61p (voir Chapitre II.4.4.2). La sous-unité A₁ est ensuite transloquée dans le cytosol *via* le translocon (pour revues voir Spooner *et al.*, 2006 et Chinnapen *et al.*, 2007). La SubAB d'*E. coli* présente une particularité dans cette famille puisqu'elle exerce son activité catalytique sur une protéine du RE et ne semble pas être transloquée dans le cytosol (Paton *et al.*, 2006 ; Chong *et al.*, 2008).

2.1.3. Mécanisme d'action des toxines de type A_nB₇ (toxines binaires)

La toxine dont le mécanisme est le mieux compris est le complexe toxique du charbon de *B. anthracis* (figure 5C). Les monomères du composant B se lient à leur récepteur à la surface de la cellule. Après la liaison, les monomères sont activés par clivage protéolytique dans la région N-terminale. Ce clivage libère un fragment de 20 kDa dans le cas du PA₈₃. Le complexe PA₆₃/récepteur migre dans les radeaux lipidiques. Il s'ensuit un assemblage des PA₆₃ en une structure heptamérique (Hale *et al.*, 2004) (Chapitre II.3). Chez la toxine iota, le composant Ib non activé est capable de se fixer à son récepteur mais ne migre pas dans les radeaux lipidiques, et ne s'oligomérisent pas (Hale *et al.*, 2004). L'heptamérisation des composants B s'accompagne d'un changement de conformation qui conduit à la formation d'une structure en tonneau et à l'exposition du domaine de liaison des composants A. Cette structure est appelée « prépore ». Le composant A se fixe sur le composant B. L'ensemble est ensuite endocyté et transporté dans les endosomes précoces. Le pH acide de ces

	Toxine	Organisme producteur	Récepteur	Nature du récepteur	Références
Toxines AB_{RTC}	Toxine diphtérique (DT)	<i>C. diphtheriae</i>	proHB-EGF	protéique	Naglish <i>et al.</i> , 1992 Mekada <i>et al.</i> , 1988
	Exotoxine A (ETA)	<i>P. aeruginosa</i>	LRP1	protéique	Thompson <i>et al.</i> , 1991 Kounnas <i>et al.</i> , 1992 Pastrana <i>et al.</i> , 2005
	Neurotoxines botuliques (BoNT)	<i>C. botulinum</i>	VAMP (BoNT/B et G) SNAP25 (BoNT/A, C et E) GD1a, GT1b, GQ1b	mixte protéique	Nishiki <i>et al.</i> , 1994 Dong <i>et al.</i> , 2003
	Neurotoxine tétanique (TeNT)	<i>C. tetani</i>	Protéine ancrée au GPI (Thy-1 dans PC12) GT1b et GD1b	mixte	Habermann <i>et al.</i> , 1986 Lalli <i>et al.</i> , 2003
	Facteur nécrotique cytotoxique (CNF1)	<i>E. coli</i>	Précurseur du récepteur aux laminines (LRP)	protéique	Chung <i>et al.</i> , 2003
	Toxine adénylcyclase (CyaA)	<i>B. pertussis</i>	CD11b/CD18	protéique	Guermonprez <i>et al.</i> , 2001
Toxines AB₅	Toxine cholérique (CTx)	<i>V. cholerae</i>	GM1	lipidique	van Heyningen <i>et al.</i> 1971 ; Cuatrecasas, 1973
	Toxine de Shiga (STx)	<i>S. dysenteriae</i>	Gb3, Gb4	lipidique	Jacewicz <i>et al.</i> , 1986
Toxines A_nB₇	Antigène protecteur (PA)	<i>B. anthracis</i>	TEM8 CMG2 LRP6 (corécepteur)	protéique	Bradley <i>et al.</i> , 2001 Scobie <i>et al.</i> , 2003 Wei <i>et al.</i> , 2006

Tableau 3 : Récepteurs de quelques toxines à activité intracellulaire.

compartiments (pH 5-5,5) entraîne des changements conformationnels de la structure heptamérique, pour aboutir à la formation d'un pore fonctionnel. Des expériences indirectes suggèrent que le passage des composants A des toxines du charbon, iota et C2, c'est-à-dire les protéines EF et LF, Ia, et C2-I a lieu à travers le pore formé par les heptamères de PA₆₃, Ib et C2-II, respectivement (Knapp *et al.*, 2002).

2.2. Récepteurs

Les récepteurs des toxines de type AB sont des protéines membranaires ou des gangliosides et des sphingolipides. Les récepteurs des toxines de type AB connus à ce jour sont listés dans le tableau 3.

2.2.1. Récepteurs protéiques

L'ETA se lie au récepteur LRP1 (« low-density-lipoprotein related receptor ») de l' α 2-macroglobuline, une protéine de 600 kDa exprimée à la surface de la grande majorité des cellules de mammifères. Le récepteur LRP1 contient quatre domaines structuraux, caractérisés par la présence de motifs riches en cystéines. L'ETA se lie préférentiellement au domaine IV de LRP1 (appelé LRP1B). Le LRP1 lie une grande variété de ligands dont l' α 2-macroglobuline et les apolipoprotéines. Ce domaine isolé, exprimé à la surface d'une cellule, constitue un récepteur fonctionnel de l'ETA, capable d'assurer son internalisation (Pastrana *et al.*, 2005).

L'observation des structures C-terminales des toxines A et B de *C. difficile* montre qu'elles sont similaires aux régions de liaison des glycosyltransférases de *Streptococcus mutans*. Ceci suggère que ces toxines se lient à des structures osidiques formant les glycosylations des protéines membranaires (Krivan *et al.*, 1986 ; von Eichel-Streiber *et al.*, 1992). Le récepteur de la toxine B n'a pas été identifié. Chez la toxine A, la glycoprotéine 96 (gp96), une protéine de choc thermique exprimée dans la partie apicale des cellules de colon humain ainsi que dans le cytoplasme a été identifiée par coimmunoprécipitation avec la toxine A et spectrométrie de masse (Na *et al.*, 2008). La toxine A se lierait majoritairement à cette protéine. Le complexe toxine A/gp96 est transloqué dans le cytoplasme. Les auteurs proposent que cette protéine constitue un récepteur qui favorise l'entrée de la

toxine et participe à la transduction du signal.

Deux récepteurs protéiques ont été identifiés pour le PA₈₃ : TEM8 (« tumor endothelial marker-8 ») et CMG2 (« capillary morphogenesis protein 2 »). La protéine LRP6 joue un rôle de corécepteur (voir Chapitre I.2.3.1.1.). Le PA₈₃ se lie aux domaines extracellulaires de 190 acides aminés de ces deux récepteurs. Ces domaines correspondent au facteur de Von Willebrand et contiennent un site de liaison à un cation divalent (site MIDAS pour « metal ion-dependant adhesion site »). Cette liaison est nécessaire à la liaison du PA₈₃. Les récepteurs des toxines binaires C2 et iota ne sont pas connus.

2.2.2. Récepteurs lipidiques

Les gangliosides sont des glycosphingolipides sialylés (figure 6) présents dans le feuillet externe des membranes de certaines cellules, notamment les synapses. Leur diversité est régulée par des glycosyltransférases spécifiques (Bullens *et al.*, 2002), notamment la GD3 synthase qui est à l'origine de deux séries de gangliosides, la série (a) dérivant de GM3 et la série (b) dérivant de GD3. La GM2/GD2 synthase (β 1,4 GalNAc transférase) conduit à la formation de gangliosides dits complexes (figure 6) (Bullens *et al.*, 2002). Par ailleurs, les gangliosides coexistent avec le complexe SNARE (Soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor) dans les radeaux lipidiques (Chamberlain *et al.*, 2001 ; Lang *et al.*, 2002). Les gangliosides constituent des récepteurs pour certaines toxines bactériennes, comme GM1 pour la CTx et les toxines LTI et LTIIa (Griffiths *et al.*, 1986), Gb3 pour Stx et les toxines de type Shiga (Shimizu *et al.*, 2007).

Le composant B des toxines Ctx et LT sont des lectines. La structure du composant B lié à la partie saccharide du GM1 montre que chaque sous-unité B possède un site de liaison au GM1 (Merritt *et al.*, 1994 ; Merritt *et al.*, 1998). Cette association à cinq GM1 et la présence d'une liaison hydrogène entre l'extrémité galactose du GM1 et les sous-unités B conduisent à une très grande affinité, de l'ordre de 0,73 nM pour les sous-unités B de CTx et 0,57 nM pour celles des LT. Le composant B de STx et des toxines de type Shiga se lie à la

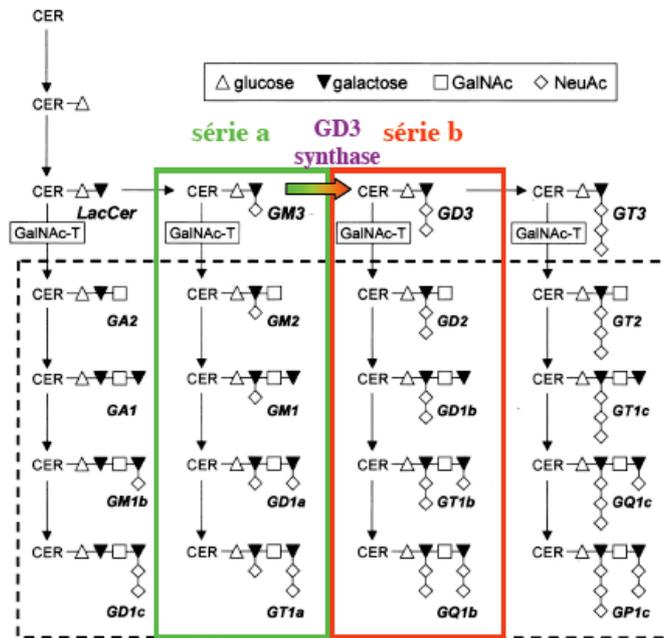


Figure 6 : Schéma de la synthèse des gangliosides. CER : céramide ; GalNAc : *N*-acétylgalactosamine ; LacCer : lactosylcéramide ; NeuAc : acide sialique ou neuraminique. La mutation de la *N*-acétylgalactosaminyl-transférase (GalNAc-T) est à l'origine de l'absence des gangliosides complexes compris dans le rectangle en pointillé. D'après Bullens *et al.*, 2006.

Sérotypage des BoNT	Gangliosides liés
A	GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b
B	GD1a, GD1b, GT1b
C	GD1a, GD1b, GT1b
D	GT1b
E	GD1a, GT1b, GQ1b
F	GD1a, GD1b, GT1b
G	Non nécessaire

Tableau 4 : Gangliosides impliqués dans la liaison des BoNTs. D'après Yowler & Schengrund, 2004.

partie osidique du récepteur Gb3 à la surface des cellules. Les parties osidiques et les acides gras sont tous deux importants pour la liaison de la toxine. La longueur, le degré d'insaturation et d'hydroxydation des chaînes acyles ont un effet sur la liaison de ces toxines et l'orientation du trafic cellulaire. Les Gb3 contenant une grande proportion de chaînes longues et saturées sont localisés dans les radeaux lipidiques, contrairement aux Gb3 contenant des proportions plus importantes en acides gras insaturés et qui se répartissent uniformément dans la membrane de la cellule. Cette localisation du Gb3 dans les radeaux n'est pas nécessaire pour la liaison de la toxine mais est indispensable pour l'intoxication cellulaire.

L'identité du récepteur de la SubAB n'est pas connue mais des travaux ont montré que la toxine est capable de se lier à l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ (Yahiro *et al.*, 2006). Il semblerait qu'elle se lie également à des composants issus d'extraits de gangliosides.

2.2.3. Récepteurs mixtes : cas des neurotoxines clostridiales

2.2.3.1. Neurotoxines botuliques

Les synaptotagmines I et II

Le premier récepteur protéique identifié pour les BoNTs est la synaptotagmine (Syt). Les Syts forment une famille d'une douzaine de protéines membranaires de transport, caractérisées par un unique domaine transmembranaire N-terminal et un large domaine cytoplasmique C-terminal. Les Syts I et II semblent fonctionner comme des protéines réceptrices du signal Ca^{2+} pour l'exocytose dans les vésicules synaptiques. Les autres isoformes sont moins bien caractérisés, mais ils sont souvent co-exprimés avec les Syts I et II dans le cerveau et leurs séquences sont conservées (Sudhof, 2002). Il a été montré que les Syts I et II se lient à la BoNT/B en présence de gangliosides, avec un K_D de 2,3 nM et 0,23 nM respectivement, mais sans la preuve que cette liaison assure l'entrée de BoNT/B dans les cellules (Nishiki *et al.*, 1996a ; Nishiki *et al.*, 1996b). La liaison de BoNT/A et BoNT/E à Syt I, indépendamment de la présence de gangliosides, a également été rapportée (Li & Singh, 1998) (tableau 4). La preuve de l'implication des Syts I et II dans l'entrée de BoNT/B mais pas celle des BoNT/A ou E dans les cellules PC12 (une lignée de cellules neuroendocrines) a

été apportée en 2003 (Dong *et al.*, 2003). L'entrée de la BoNT/B dans les PC12 est bloquée par le fragment minimal 1-267 de Syt II. Ce fragment, en association avec les gangliosides, est capable de neutraliser la toxicité de la BoNT/B chez la souris. Ceci prouve que les Syts I et II sont des récepteurs protéiques fonctionnels pour BoNT/B. De même, Syts I et II sont les récepteurs neuronaux de BoNT/G, indépendamment de la présence des gangliosides, mais pas des cinq autres types de BoNTs ou de TeNT (Rummel *et al.*, 2004a).

Le modèle de **double récepteur** a été récemment confirmé par l'identification des sites de liaison aux récepteurs protéiques des BoNT/B et G au niveau de l'extrémité C-terminale du composant B (Rummel *et al.*, 2007). Du fait de la localisation des Syts dans les vésicules synaptiques, des anticorps dirigés contre le domaine luminal de Syt I ont été utilisés pour suivre les mécanismes d'endo/exocytose, au niveau des synapses. Lors de ces expériences, un double marquage des cellules neuronales a été réalisé sur une autre protéine des vésicules synaptiques appelée SV2 et a montré une colocalisation importante et un fort marquage des filopodes (Matteoli *et al.*, 1992). Des travaux récents ont montré l'existence d'une interaction dépendante des ions calcium entre SV2 et Syt (Schivell *et al.*, 2005).

La protéine des vésicules synaptiques SV2

Le récepteur protéique de la BoNT/A a été identifié récemment comme étant SV2 (« Synaptic Vesicle 2 »), une autre protéine des vésicules synaptiques. SV2A est une glycoprotéine transmembranaire de 100 kDa environ présente dans les vésicules de sécrétion des cellules neuronales et endocrines chez les espèces animales de vertébrés (Buckley and Kelly, 1985). Deux autres isoformes, SV2B et SV2C, ont été identifiés (Bajjalieh *et al.*, 1994 ; Janz & Sudhof, 1999). Les différences observées entre les isoformes sont majoritairement situées dans la région N-terminale précédant les premiers domaines intermembranaires.

SV2A est présente dans toutes les vésicules synaptiques quel que soit leur contenu en neurotransmetteur. L'analyse d'hydrophobicité de SV2A a révélé la présence de 12 domaines d'insertion potentiels dans la membrane. La région N-terminale a été identifiée comme étant cytoplasmique et la région entre les domaines transmembranaires 7 et 8 intravésiculaire (figure 7) (Feany *et al.*, 1992). Des analogies de séquences remarquables (62% d'identité) ont été observées entre SV2, le domaine N-terminal des transporteurs de sucres de mammifères

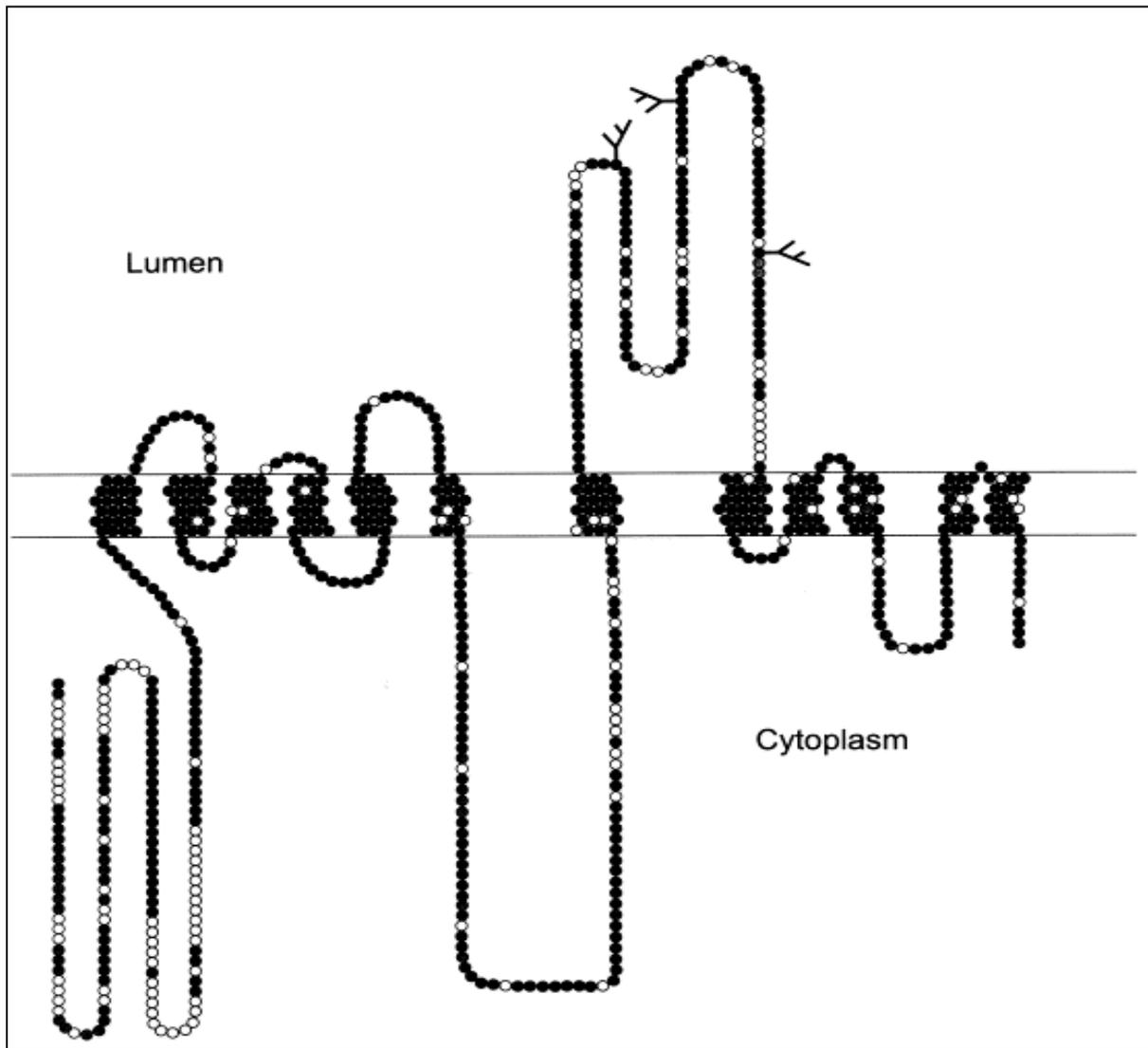


Figure 7 : Topologie des protéines SV2 et localisation des résidus conservés entre les isoformes. Chaque résidu est représenté par un cercle. Les cercles pleins représentent les résidus conservés parmi tous les isoformes. Les N-glycosylations sont indiquées. D'après Janz & Südhof, 1999.

et le domaine C-terminal des transporteurs membranaires des neurotransmetteurs (Feany *et al.*, 1992).

Les différents isoformes de SV2 pourraient permettre une spécialisation de certains types de synapses. Une interaction dépendante du calcium entre les trois isoformes de SV2 et la synaptotagmine a été mise en évidence (Schivell *et al.*, 2005).

Des complexes entre SV2B, Syt I et les protéines SNAREs, la syntaxine 1 et SNAP-25 (« synaptosome-associated protein 25 ») ont été détectés dans des extraits protéiques de cerveau (Lazzell *et al.*, 2004). Les protéines ciblées par les BoNTs interagissent donc entre elles et sont spatialement proches dans la cellule. De plus, Baldwin et Barbieri ont mis en évidence l'association des chaînes lourdes de BoNT/A et BoNT/B avec un complexe de protéines des vésicules synaptiques comprenant SV2, Syt I, la synaptogyrine 3, VAMP2, SNAP-25, plusieurs sous-unités de l'ATPase de type vacuolaire, GAPDH (Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déhydrogénase), vGLUT1/2 (transporteur de glutamate vésiculaire 1/2). BoNT/A et B interagiraient avec ce complexe exposé à la surface cellulaire suite à la fusion de vésicules synaptiques stimulées par influx calcique (Baldwin & Barbieri, 2007). L'endocytose de la toxine associée au complexe initierait l'internalisation de la BoNT dans les cellules.

L'interaction de la BoNT/A avec SV2 a été caractérisée par les équipes de E.R. Chapman et T. Binz en 2006. Des fragments recombinants de SV2 (A, B et C) inhibent la liaison de BoNT/A aux neurones (Dong *et al.*, 2006). De plus, la liaison de BoNT/A à des neurones d'hippocampe issus de souris knock-out pour les gènes codant pour SV2A/B est abolie, mais peut être restaurée par l'expression de l'un des trois isoformes de SV2.

L'équipe de T. Binz a montré que le composant B de la BoNT/A seulement, interagit spécifiquement avec l'isoforme C de SV2, indépendamment de la présence des gangliosides (Mahrhold *et al.*, 2006), et l'équipe de Chapman a montré que SV2C présente l'activité de liaison à BoNT/A la plus robuste parmi les isoformes de SV2 (Dong *et al.*, 2006). La séquence 454-579 de la chaîne lourde de la BoNT/A, située dans une boucle entre les domaines transmembranaires 7 et 8, est la séquence minimale nécessaire à la liaison.

2.2.3.2. Neurotoxine tétanique

La TeNT se lie au niveau des motoneurons à des récepteurs lipidiques et protéiques (Montecucco *et al.*, 2004). La toxine se lie aux gangliosides GD1b et GT1b (Habermann & Dreyer, 1986 ; Lalli *et al.*, 2003) ainsi qu'à une protéine ancrée au GPI. Cette protéine a été identifiée dans des lignées PC12 différenciées. Il s'agit de la protéine Thy-1 de 15 kDa (Herreros *et al.*, 2001 ; Munro *et al.*, 2001). La protéine Thy-1 est une protéine ancrée au GPI présente dans le cerveau et impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires, comme la transduction du signal (Simon *et al.*, 1999 ; Leyton *et al.*, 2001).

Cependant, ce récepteur ne semble pas être un récepteur unique de TeNT puisque des souris knockout pour Thy-1 sont toujours sensibles à la toxine (Herreros *et al.*, 2001). De plus, des traitements sur des neurones utilisant des phospholipases qui clivent les ancrés GPI protègent les neurones de l'intoxication (Munro *et al.*, 2001). Ceci suggère qu'une ou plusieurs glycoprotéines inconnues ancrées au GPI jouent un rôle de récepteur de la TeNT.

L'identification des récepteurs des toxines est importante car elle détermine les étapes suivant la liaison en surface, c'est-à-dire les voies d'entrée et le trafic intracellulaire. L'élucidation de ces voies permet de comprendre comment la toxine peut exercer son activité dans la cellule.

2.3. Internalisation et trafic intracellulaire des toxines

L'internalisation de molécules cargo (facteurs de croissance, hormones, protéines, lipides...) fait intervenir la formation de différents types de vésicules au niveau de la membrane plasmique. La nature de ces vésicules oriente la molécule cargo vers une voie de trafic intracellulaire donnée. Il existe plusieurs types de processus d'internalisation (figure 8). La macropinocytose et la phagocytose sont caractérisées par la formation de vésicules de grande taille (>0,5 μm). Les mécanismes d'endocytose induisent la formation de petites vésicules. Il existe plusieurs types de vésicules d'endocytose : les vésicules couvertes de clathrine, les cavéoles, et les vésicules lisses. Ces structures ont des diamètres compris entre 50 et 110 nm.

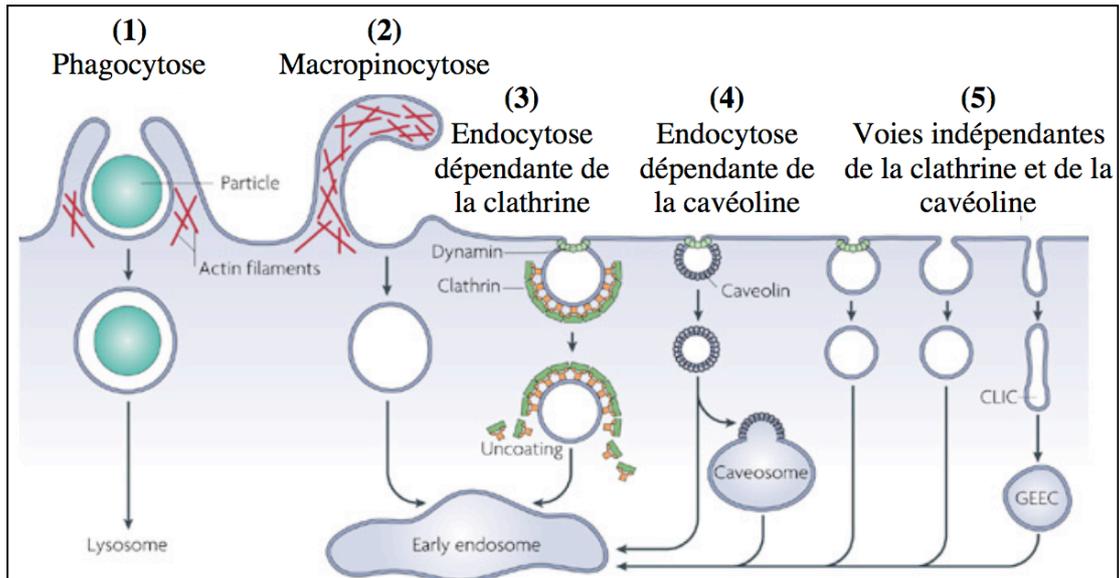


Figure 8 : Classification des voies d'endocytose. Les particules de grande taille peuvent être internalisées par phagocytose (1), tandis que l'entrée de fluide a lieu par macropinocytose (2). La taille des vésicules est plus réduite dans les autres voies d'endocytose qui comprennent la voie dépendante de la clathrine (3), la voie dépendante de la cavéoline (4), et les voies indépendantes de la clathrine et de la cavéoline (5). La plupart des molécules cargo internalisées sont dirigées vers l'endosome précoce, certaines voies passant avant par des compartiments intermédiaires comme le cavéosome et le GEEC (« glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein enriched early endosomal compartments »).

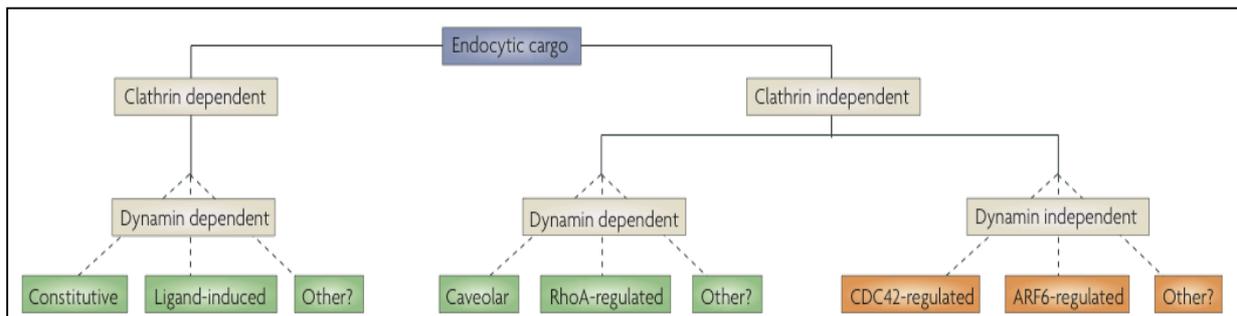


Figure 9 : Marqueurs des principales voies d'endocytose. D'après Mayor & Pagano, 2007.

Les vésicules d'endocytose dirigent les cargos vers des voies de trafic intracellulaire. Ces voies sont caractérisées par des marqueurs spécifiques du manteau vésiculaire, des compartiments impliqués, et d'autres molécules régulatrices (récepteurs, petites protéines G) (figure 9).

2.3.1. Voies d'internalisation des toxines

Le tableau 5 résume les voies d'internalisation empruntées par les toxines bactériennes de type AB, lorsqu'elles sont connues.

2.3.1.1. Internalisation des toxines par la voie clathrine dépendante

La définition morphologique de l'endocytose dépendante de la clathrine repose sur l'observation au niveau de la membrane des vésicules d'une couche dense aux électrons bordant les vésicules constituées ou en formation, appelées respectivement vésicules ou puits recouverts de clathrine (figure 10).

Cette couche est constituée d'un réseau géométrique organisé de molécules de clathrine et de protéines adaptatrices. D'autres protéines sont impliquées dans la régulation de la formation des puits, notamment Eps15. Le récepteur de la transferrine est internalisé par la voie dépendante de la clathrine. La transferrine est donc utilisée comme sonde de cette voie. Ainsi, une mutation particulière sur Eps15 conduit à l'inhibition de l'endocytose de la transferrine médiée par récepteur. C'est le premier dominant négatif identifié pour cette voie (Mayor & Pagano, 2007).

Les puits à clathrine concentrent des récepteurs membranaires qui possèdent, dans leur région cytoplasmique, un signal d'internalisation par cette voie. Au niveau de la surface cytoplasmique de la membrane plasmique, les adaptateurs AP2 (« assembly protein-2 ») (Kirchhausen, 1999) reconnaissent ce signal et, avec d'autres protéines, se lient à la clathrine, ce qui conduit à l'invagination des puits et à la formation de vésicules (figure 10a). La dynamine (Schmid *et al.*, 1998), est ensuite impliquée dans la constriction des puits à clathrine puis dans le détachement de la vésicule de la membrane (Sever *et al.*, 2000). Elle interagit avec de nombreux partenaires, notamment le cytosquelette d'actine.

Toxine	Voies d'internalisation		
	Dépendante des cavéoles	Dépendante de la clathrine	Indépendante de la clathrine et des cavéoles
DT <i>C. diphtheriae</i>		X	
ETA <i>P. aeruginosa</i>		X	
BoNTs <i>C. botulinum</i>		X	
TeNT <i>C. tetani</i>	X	X	
Tox B <i>C. difficile</i>		X	
CNF1 <i>E. coli</i>			X
CTx <i>V. cholerae</i>	X	X	X
STx <i>S. dysenteriae</i>		X	X
SubAB <i>E. coli</i>		X	
Toxine du charbon <i>B. anthracis</i>		X	
Toxine C2 <i>C. botulinum</i>			(X)
Toxine iota <i>C. perfringens</i>			(X)

Tableau 5 : Voies d'internalisation empruntées par les toxines de type AB. Les parenthèses signifient que la voie n'est pas démontrée.

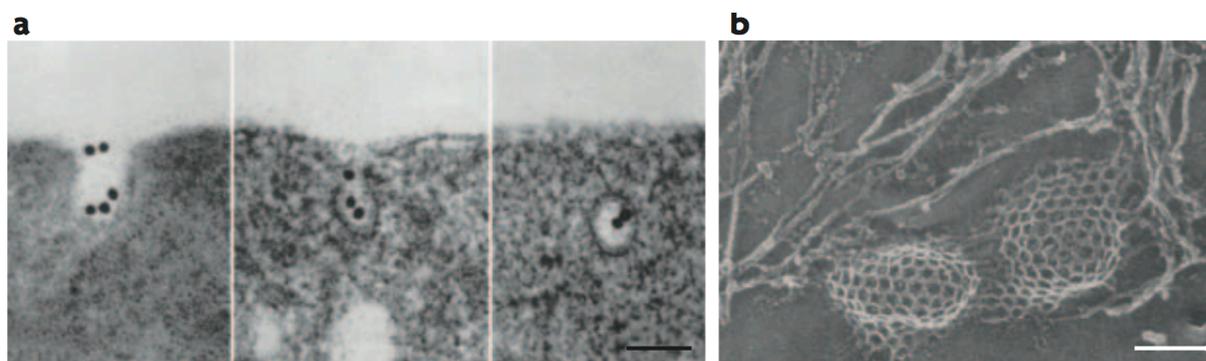


Figure 10 : Clichés de microscopie électronique représentant les étapes précoces de l'endocytose dépendante de la clathrine. (A) Section fine de réticulocytes incubés cinq minutes à 37°C avec de la transferrine immuno-marquée à l'or. Les clichés montrent l'accumulation de la transferrine dans les puits recouverts de clathrine, suivie de leur internalisation. (B) Enchevêtrement de molécules de clathrine dans un fibroblaste de poussin suite à un refroidissement rapide. L'échelle représente 100 nm. D'après Mayor & Pagano, 2007.

L'expression d'un dominant négatif de la dynamine (K44A) empêche donc l'entrée de ligands par les voies dépendantes de la clathrine et des cavéoles (Le & Nabi, 2003). De plus, l'expression d'un mutant négatif de l'intersectine, une protéine d'échafaudage régulant la formation des vésicules couvertes par la clathrine et qui interagit avec la dynamine, inhibe la voie d'entrée dépendante de la clathrine.

La présence de cholestérol dans la membrane plasmique est indispensable à la formation des puits de clathrine. Après cette étape d'internalisation, les vésicules libèrent leur manteau de clathrine avant de fusionner avec les endosomes de tri, encore appelés endosomes précoces.

Les toxines de type AB peuvent emprunter plusieurs voies d'internalisation. Les toxines empruntant la voie dépendante de la clathrine, de manière exclusive ou non, sont la DT (voir Chapitre III), l'ETA, les grandes toxines clostridiales, les neurotoxines clostridiales, la CTx, les LTI/II, la Stx, et le complexe toxique du charbon. Si les voies d'internalisation de ces toxines sont déterminées, peu d'études sont disponibles sur les mécanismes moléculaires déclenchant leur internalisation.

Les paragraphes suivants sont consacrés à la description des mécanismes d'internalisation des toxines AB. Seuls les mécanismes les mieux connus sont détaillés.

Toxine du charbon

Le complexe toxine-récepteur est internalisé essentiellement par la voie dépendante de la clathrine (Young & Collier, 2007). L'endocytose de ce complexe est dépendante de l'ubiquitination de résidus lysine des récepteurs, Lys352 dans TEM8 et Lys350 dans CMG2. La protéine LRP6, située à la surface cellulaire, est également impliquée dans l'internalisation, et agit comme un corécepteur (Wei *et al.*, 2006). L'interaction du domaine extracellulaire de LRP6 avec TEM8 et CMG2 stimulerait la liaison du PA et son internalisation. La protéine ARAP3, une protéine liant l'IP3, contient deux domaines de liaison aux GTPases, dont un liant la GTPase ARF6. Cette protéine joue un rôle dans l'internalisation de la toxine après la liaison du PA (Lu *et al.*, 2004).

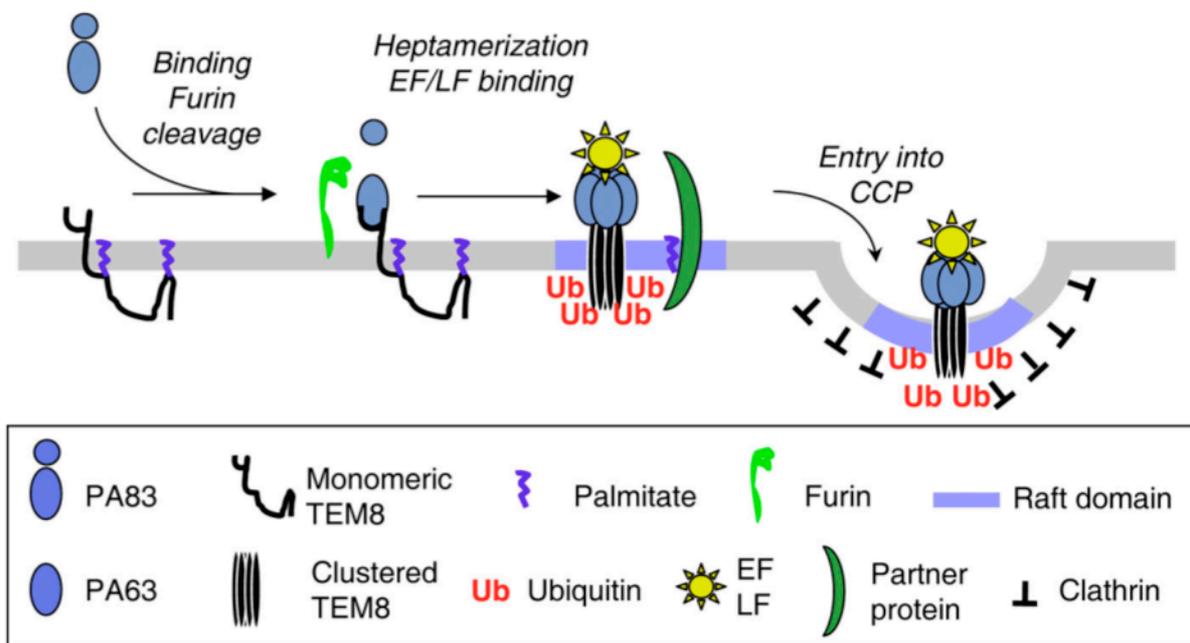


Figure 11 : Effet de la palmitoylation des récepteurs du complexe toxique du charbon sur l'internalisation de la toxine. D'après Abrami *et al.*, 2006.

La protéine ARF6 ayant pour rôle le recrutement des protéines adaptatrices de la clathrine AP2, la protéine ARAP3 semblerait impliquée dans l'internalisation du complexe par la voie dépendante de la clathrine.

Un élément important de la régulation de l'internalisation des récepteurs TEM8 et CMG2 est que ces deux récepteurs sont palmitoylés (figure 11). Cette modification lipidique prévient leur association avec les radeaux lipidiques et donc leur ubiquitination prématurée (Abrami *et al.*, 2006). La palmitoylation régule donc l'endocytose du PA₆₃.

Cette étude a ainsi permis d'identifier l'internalisation de radeaux lipidiques par la voie dépendante de la clathrine.

Toxine de Shiga

La Stx se lie de manière spécifique au glycolipide neutre Gb3 et est préférentiellement internalisée par la voie dépendante de la clathrine. Les récepteurs Gb3 étant localisés dans le feuillet externe de la membrane plasmique, le mécanisme de reconnaissance entre le cargo et les molécules adaptatrices situées de l'autre côté de la membrane est peu compris. Le complexe Stx/Gb3 s'agrège dans les puits de clathrine par un mécanisme encore inconnu (Sandvig, 2001). Il semble que ce soit la toxine qui oriente l'internalisation par la voie dépendante de la clathrine, étant donné que les récepteurs sont répartis de manière uniforme sur la membrane cellulaire. Des conditions interférant avec la voie dépendante de la clathrine ont un effet sur la toxicité. La transfection d'un gène codant pour un mutant d'Esp15 connu pour inhiber la formation des puits de clathrine dans des cellules COS-7, ne modifie pas l'entrée de la toxine (Nichols *et al.*, 2001). L'activation de tyrosines kinases par la Stx a été décrite chez certains types cellulaires (Mori *et al.*, 2000). La Stx active la protéine Syk, qui appartient à la famille des tyrosines kinases. Il en résulte une phosphorylation rapide des tyrosines de plusieurs protéines, dont une correspond à la chaîne lourde de la clathrine (Lauvrak *et al.*, 2006). La phosphorylation requiert l'activité de la protéine Syk. L'internalisation de la STx est donc dépendante de Syk (Lauvrak *et al.*, 2006).

La toxine subtilase

La SubAB se lie à son récepteur, non identifié, à la surface de la cellule. Des études de microscopie confocale de la SubAB et des composants B des sous-unités des toxines CTx et STx marquées par des fluorophores ont montré une colocalisation dans les vésicules de clathrine uniquement (Chong *et al.*, 2008). Ceci suggère des différences dans les mécanismes d'endocytose de ces toxines. Le composant B de la SubAB est colocalisé avec le récepteur de la transferrine alors que la colocalisation avec la cavéoline-1 est négligeable. Des expériences utilisant des inhibiteurs des constituants de la voie dépendante de la clathrine et des cavéoles montrent dans plusieurs types cellulaires que l'internalisation de la SubAB a lieu exclusivement par la voie dépendante de la clathrine (Chong *et al.*, 2008).

Neurotoxine tétanique

La TeNT se lie au ganglioside GD1b (tableau 3) et à des protéines à ancre GPI dont Thy-1, localisés dans les radeaux lipidiques, à la surface de la cellule. L'équipe de Schiavo a récemment identifié la voie d'internalisation de la TeNT (Deinhardt *et al.*, 2006) à l'aide de mutants négatifs dominants de l'AP2, l'AP180 et l'epsine 1, qui interviennent dans la voie clathrine. Ces mutants permettent de différencier les voies d'internalisation dépendantes de la clathrine, dépendantes ou indépendantes de l'epsine 1. En présence de mutants négatifs de l'AP2 et de l'AP180, l'internalisation de la TeNT n'a plus lieu. Ceci a permis à Deinhardt *et al.* (2006) de proposer l'existence d'une voie clathrine indépendante de l'epsine 1, impliquant des radeaux lipidiques, et distincte de la voie clathrine classique d'internalisation des récepteurs de la transferrine. Un mutant dominant négatif de l'epsine 1 n'interfère pas avec l'internalisation. La toxine emprunte donc exclusivement la voie dépendante de la clathrine. Or la toxine se lie au niveau de radeaux lipidiques, ce qui montre, de manière similaire au charbon, que les radeaux lipidiques peuvent emprunter la voie clathrine et pas seulement la voie des cavéoles. Les auteurs ont étudié la distribution spatiale du composant B de la TeNT, du GD1b, et des puits de clathrine par immunomarquage à l'or colloïdal sur des cellules neuronales (Deinhardt *et al.*, 2006). Les résultats montrent que la grande majorité du GD1b est situé sur les bords des puits de clathrine. Quelques GD1b sont retrouvés dans les puits. Les auteurs ont donc proposé un modèle de diffusion du ganglioside hors des puits de clathrine, déclenché par la liaison de TeNT aux protéines à ancre GPI (figure 12).

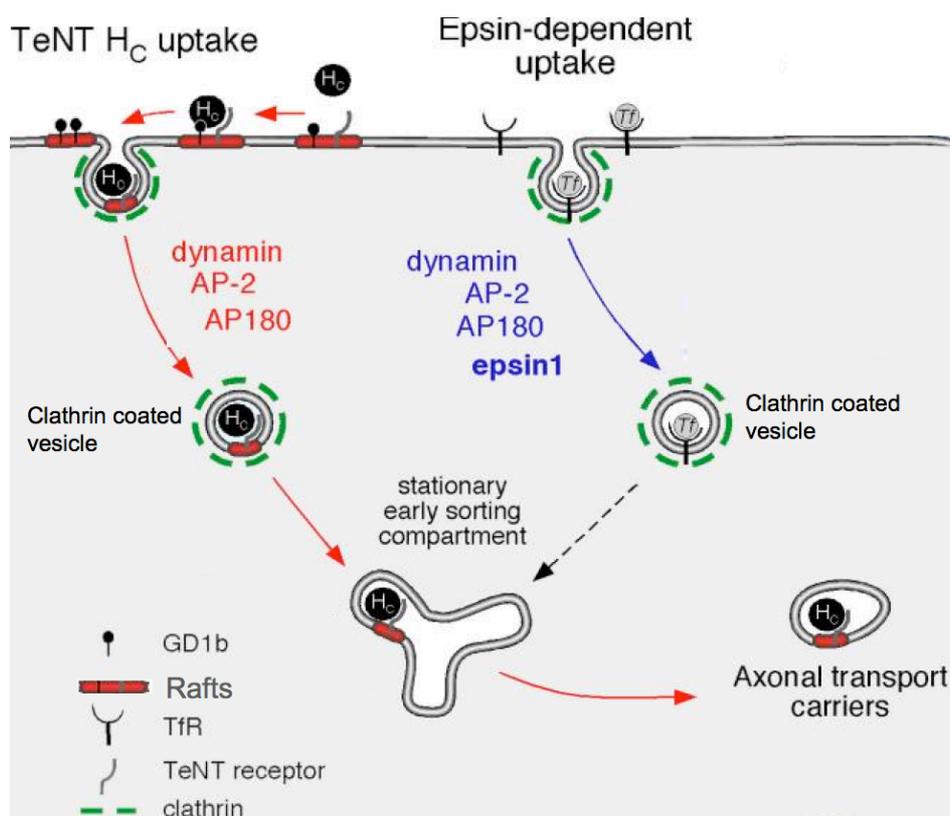


Figure 12 : Voies d'internalisation de la TeNT et de la transferrine dans les motoneurones. L'internalisation de la transferrine est médiée par la voie classique dépendante de la clathrine. La chaîne lourde de la TeNT (Hc) exploite une voie dépendante de la clathrine et des radeaux lipidiques. TeNT-Hc se lie à un complexe lipide/protéine impliquant le GD1b. Elle est ensuite regroupée dans les puits de clathrine alors que le GD1b en est exclu. L'internalisation de TeNT-Hc est dépendante de la dynamine, d'AP2 et d'AP180 mais ne nécessite pas l'epsine 1. La toxine est ensuite orientée vers un compartiment où convergent les voies endocytiques. Ce compartiment assure la fonction d'orientation de la toxine vers le transport rétrograde le long de l'axone. Modifié, d'après Deinhart *et al.*, 2006.

2.3.1.2. Internalisation des toxines par la voie des cavéoles

Les cavéoles sont des invaginations de la membrane, riches en cholestérol et en sphingolipides (Anderson, 1998 ; Parton & Simons, 2007) (figure 13). Des expériences biochimiques montrent que les cavéoles se situent dans la fraction non solubilisée par le Triton X100 et qu'elles contiennent de nombreuses protéines de signalisation (tyrosine kinases de la famille Src, récepteurs de facteurs de croissance, protéines à ancre GPI...) (Anderson, 1998). La cavéoline-1 est la protéine majeure des cavéoles. L'endocytose par des cavéoles est impliquée dans de nombreux processus tels la régulation de la composition de la membrane plasmique et la régulation spatio-temporelle de molécules de signalisation (del Pozo *et al.*, 2005). L'endocytose par les cavéoles fait intervenir de nombreuses molécules de signalisation et module ainsi un grand nombre de voies de signalisation intracellulaires, telles les voies de régulation de la migration, du cycle et de la transcription (Simons & Toomre, 2000).

L'équipe de Minshall (2004) a étudié l'endocytose de l'albumine par les cavéoles ainsi que l'endocytose de la sous-unité B de la CTx. Les résultats de cette étude concluent que la phosphorylation de la dynamine médiée par les protéines Src est nécessaire à l'internalisation par les cavéoles (Shajahan *et al.*, 2004). D'autres travaux ont confirmé le rôle des Src kinases qui régulent l'internalisation de l'albumine et des glycosphingolipides par les cavéoles (Minshall *et al.*, 2000 ; Sharma *et al.*, 2004 ; Shajahan *et al.*, 2004). Une autre protéine intervenant dans l'internalisation par les cavéoles est l'intersectine, une protéine d'échafaudage impliquée dans l'endocytose dépendante de la clathrine. L'intersectine est localisée dans la région de fermeture des cavéoles et interagit avec la dynamine, ce qui suggère qu'elle permet le mécanisme de scission (Predescu *et al.*, 2003). Plusieurs kinases régulent l'endocytose par les cavéoles. Il s'agit des Src kinases, MAP3K2, Dyrk3 et ARAF1 (Pelkmans & Zerial, 2005).

Plusieurs toxines de type AB₅ empruntent la voie de l'endocytose dépendante des cavéoles, de manière exclusive ou non. Ces toxines sont la CTx et les toxines LTI/II.

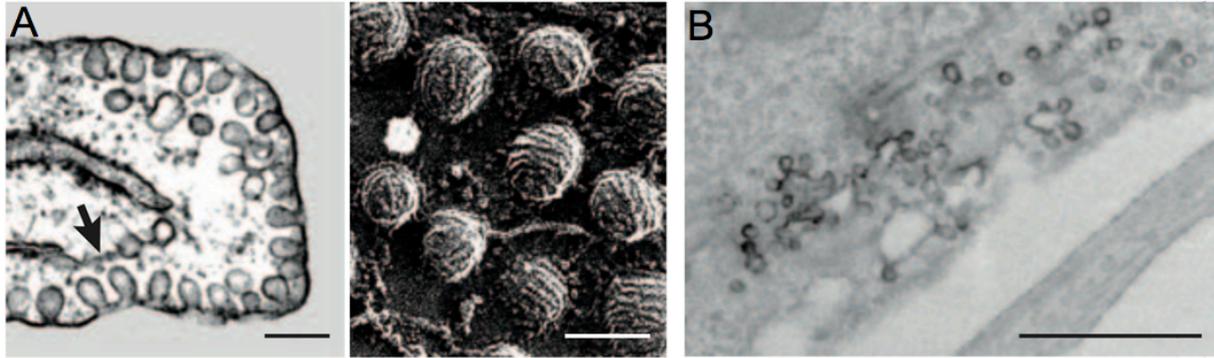


Figure 13 : Clichés de microscopie électronique représentant l'endocytose par les cavéoles. (A) Section fine (à gauche) et, après refroidissement rapide (à droite) de cellules endothéliales. La flèche indique le réticulum endoplasmique présent près des invaginations profondes des cavéoles. (B) Endocytose par la voie des cavéoles de la toxine cholérique dans des fibroblastes embryonnaires de souris. Les échelles représentent 200 nm pour le premier et troisième panneau, 100 nm pour le deuxième panneau. D'après Mayor & Pagano, 2007.

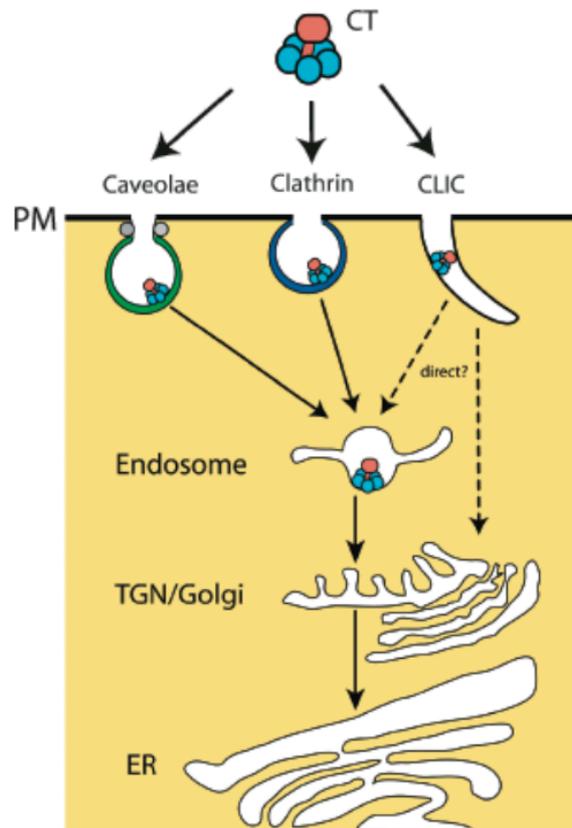


Figure 14 : Modes d'entrée de la toxine cholérique dans les cellules. La toxine peut emprunter la voie dépendante des cavéoles (vert), la voie dépendante de la clathrine (bleu) et la voie indépendante de la clathrine et des cavéoles. Les trois voies sont sensibles à la quantité de cholestérol présent dans la membrane. Après son internalisation, la toxine cholérique est détectée dans les endosomes précoces, le réseau *trans*-golgien et le réticulum endoplasmique.

Toxine cholérique

Des travaux de réflexion de neutrons sur des monocouches de lipides montrent que la liaison de CTx au GM₁ provoque une diminution locale de la densité lipidique dès pH 8 (Miller *et al.*, 2004). Celle-ci s'accompagne d'une désorganisation des lipides et d'une diminution d'épaisseur de la bicouche. La liaison de la toxine provoque donc une nouvelle phase lipidique, qui pourrait être impliquée dans l'initiation du mécanisme d'endocytose. L'utilisation de dérivés de GM₁ enrichis en cholestérol montre que la liaison est augmentée par rapport au GM₁ natif et aux dérivés de GM₁ enrichis en phospholipides (Orlandi & Fishman, 1998). Le cholestérol semble impliqué dans le recrutement des constituants des radeaux lipidiques, facilitant l'internalisation de la toxine par la voie clathrine.

La CTx emprunte plusieurs voies d'endocytose (i) dépendante/indépendante de la clathrine, (ii) dépendante des cavéoles et des radeaux lipidiques, (iii) indépendante de la dynamine et indépendante de la clathrine (Orlandi & Fishman, 1998 ; Torgersen *et al.*, 2001 ; Massol *et al.*, 2004 ; Kirkham *et al.*, 2005). L'endocytose par les cavéoles est majoritaire (figure 14). Le GM₁ étant particulièrement abondant dans les cavéoles (Parton, 1994), le composant B de la CTx est devenu un marqueur de cette voie.

2.3.1.3. Internalisation des toxines par les voies indépendantes de la clathrine et des cavéoles

Cette voie a été identifiée à partir des effets de l'expression d'un mutant de la dynamine-1 dans les cellules Hela. Il entraîne le blocage de l'endocytose par récepteur et une augmentation de l'entrée par phase fluide selon un processus indépendant de la clathrine et de la dynamine. Un caractère commun des voies indépendantes de la dynamine est l'implication des petites GTPases, soit Cdc42, un membre de la famille Rho, soit ARF6 un membre de la famille Arf (Mayor & Pagano, 2007).

Le rôle de Cdc42 dans l'endocytose indépendante de la dynamine a été mis en évidence pour la première fois lors de l'étude des effets d'un inhibiteur des RhoGTPases, la toxine B de *C. difficile*, et des effets de l'expression d'un dominant négatif de Cdc42 sur l'internalisation de protéines ancrées au GPI. Cette voie est utilisée par la CTx (en plus de la voie clathrine et des cavéoles), par la toxine vacuolisante VacA d'*Helicobacter pylori* et la

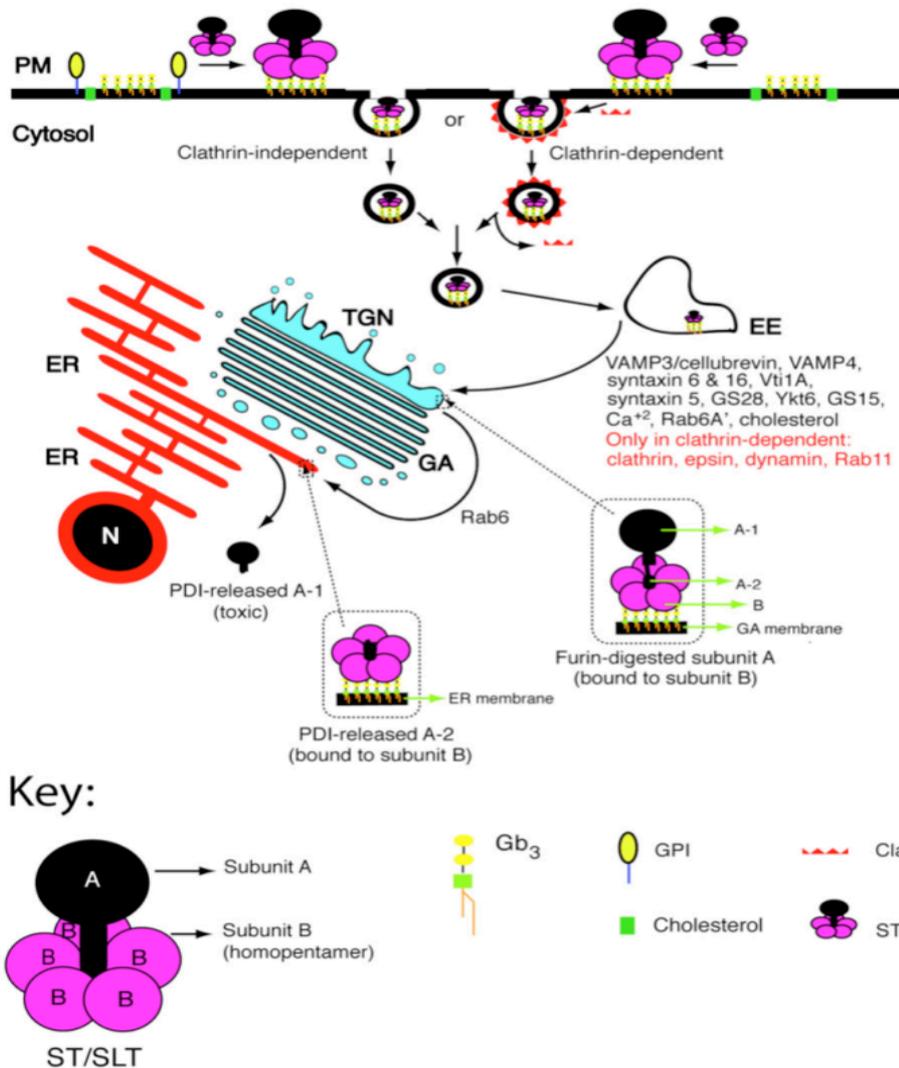


Figure 15 : Internalisation et trafic intracellulaire des toxines de Shiga et de type Shiga. EE, endosome précoce (EE pour « early endosome ») ; ER, réticulum endoplasmique ; ERAD, système de dégradation associé au réticulum endoplasmique ; GA, appareil de Golgi ; GPI, protéine ancrée au GPI ; N, noyau ; PDI, protéine disulfure isomérase ; PM, membrane plasmique ; ST, toxine de Shiga ; SLT, toxine de type Shiga ; TGN, réseau *trans*-golgien.

ricine. Elle représente le mécanisme principal d'internalisation par phase fluide dans de nombreux types cellulaires.

Le rôle de ARF6 a été suggéré dans l'endocytose indépendante de la clathrine et de la dynamine de plusieurs protéines, notamment les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I), de l'intégrine β , de la carboxypeptidase A, de la E-cadhérine et des protéines ancrées au GPI. Cependant, le rôle direct de ARF6 dans l'internalisation n'a pas été explicitement établi (Mayor & Pagano, 2007).

La nature des récepteurs qui se concentrent sur certaines zones de la membrane et empruntent cette voie n'est pas connue. Cependant, il semble que certains domaines membranaires spécialisés, tels les radeaux lipidiques, sont impliqués. Lorsque certaines de ces voies sont empruntées en plus des voies dépendantes de la clathrine et des cavéoles, leur importance quantitative est difficile à déterminer.

La toxine de Shiga

La Stx est capable de générer des invaginations de la membrane de cellules humaines, de souris, et sur des membranes modèles. Le composant B de la Stx, après liaison à son récepteur Gb3 (figure 15) a la propriété de réorganiser les lipides et de créer des microdomaines riches en complexe Stx-B/Gb3 (Romer *et al.*, 2007). Ces microdomaines créent au niveau de la membrane plasmique une courbure négative. Des invaginations tubulaires apparaissent ensuite. Leur formation est indépendante de la machinerie cellulaire. Une internalisation de la Stx dépendante des radeaux lipidiques a également été décrite (Johannes, 2002).

Une multitude de molécules cargo peut être internalisée par différentes voies d'endocytose, caractérisées par de nombreux paramètres, comme la nature de la composition lipidique du domaine membranaire, la composition du manteau couvrant les vésicules, le cytosquelette d'actine et les RhoGTPases impliquées, le mécanisme de fission. Certaines voies comme l'endocytose dépendante de la clathrine sont maintenant bien connues, mais d'autres commencent seulement à être caractérisées. De plus, plusieurs mécanismes d'endocytose d'un même cargo peuvent exister dans différents systèmes cellulaires ou dans différentes conditions.

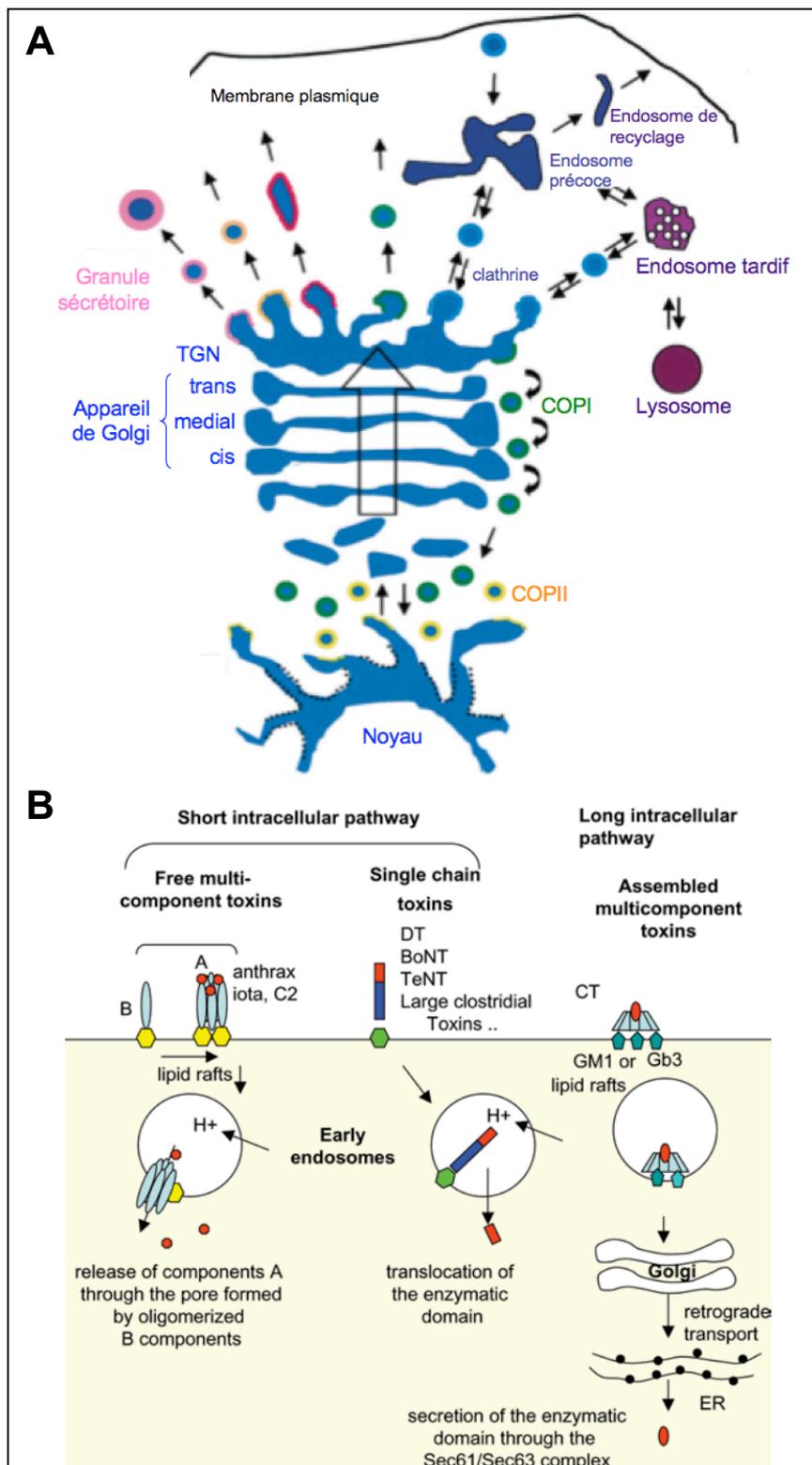


Figure 16 : Les deux grandes voies de trafic intracellulaire. (A) Les voies sécrétoire et endosomale. La voie endosomale est indiquée par des doubles flèches et la voie sécrétoire par des flèches simples. (B) Liaison des toxines de type AB à la membrane et voies intracellulaires empruntées. D'après Geny & Popoff, 2006. Rouge : composant A, bleu foncé : composant B monomérique, bleu clair : composant B multimérique. Hexagones jaunes : récepteurs des toxines binaires, hexagone vert : récepteur des toxines AB_{RTC}, pentagone : récepteurs des toxines AB₅ (gangliosides).

2.3.2. Trafic intracellulaire des toxines

Une fois internalisées, les molécules cargo empruntent une multitude de voies dans la cellule. Certaines suivent la voie « endosomale », où elles sont libérées dans les endosomes pour ensuite i) soit transiter vers les lysosomes et être dégradées, ii) soit être recyclées lors de leur passage dans des endosomes spécialisés. D'autres molécules suivent la voie « rétrograde » : elles gagnent l'endosome puis transitent vers les compartiments intracellulaires impliqués classiquement dans la voie sécrétoire de la cellule (figure 16A). Les toxines de type AB empruntent une voie de trafic intracellulaire qui dépend de la toxine et de son mode d'internalisation. Le routage de la toxine est dirigé par de nombreuses molécules de signalisation dès l'endocytose. Il existe deux grandes voies de trafic intracellulaire utilisées par les toxines translocantes. La voie « courte » ou « endosomale » a pour destination finale l'endosome tardif. La voie « longue » ou rétrograde a pour destination finale le RE. Ces deux voies sont illustrées dans la figure 16B.

2.3.2.1. Trafic des toxines par la voie endosomale

À l'exception de l'endocytose dépendante des cavéoles, dont la destination peut être régulée, les autres voies endocytiques convergent vers les endosomes.

L'organisation de la voie endocytique est bien définie au niveau fonctionnel. Beaucoup de récepteurs (comme le récepteur de la transferrine) ainsi que d'autres protéines et lipides empruntent cette voie et convergent vers l'endosome précoce. L'endosome précoce constitue la première sortie de la voie endosomale. Il est le seul compartiment où le

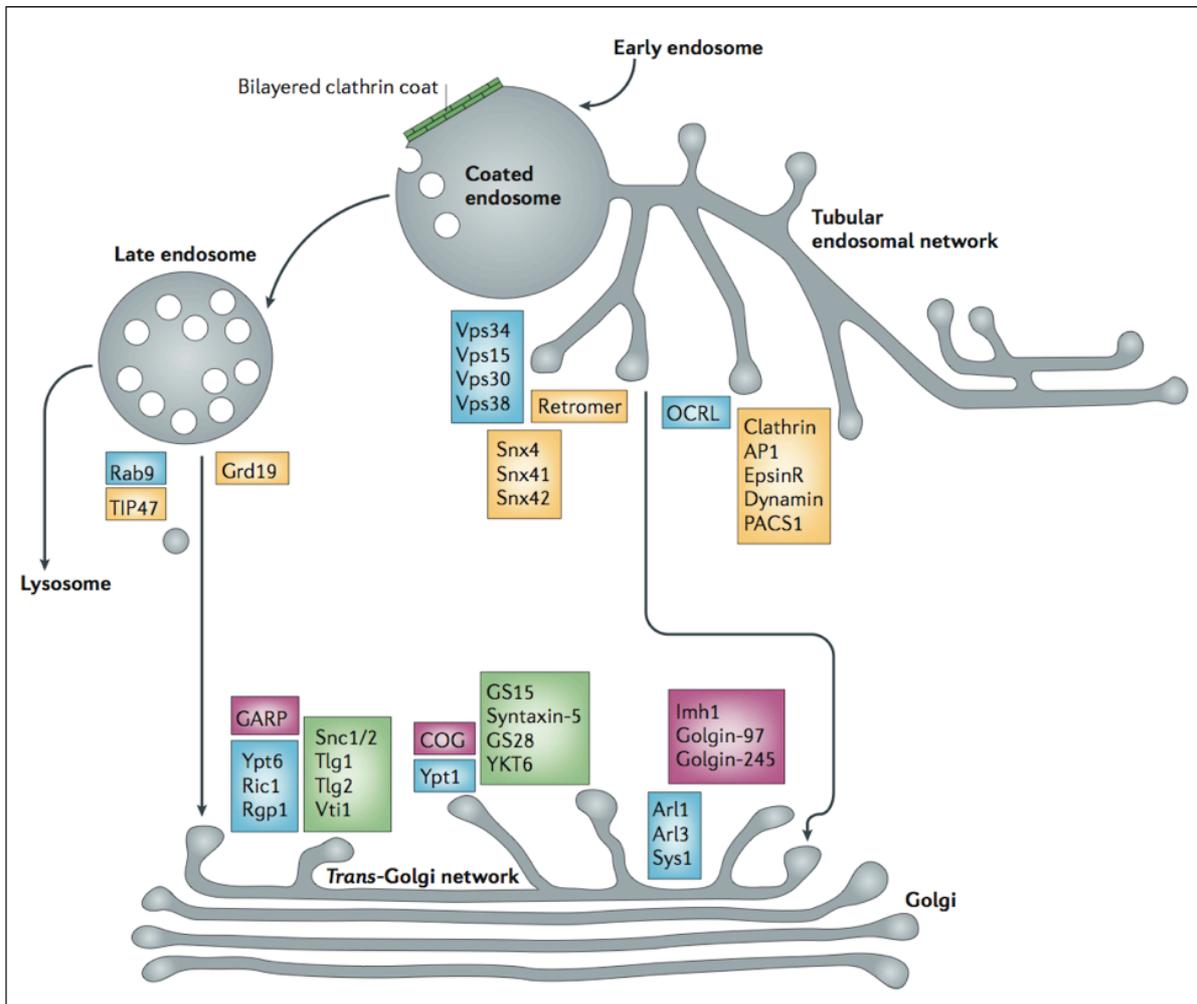


Figure 17 : Éléments de la machinerie moléculaire impliquée dans le transport rétrograde des endosomes au réseau *trans-golgien*. Les molécules impliquées sont représentées en couleur selon leur rôle : recrutement à proximité de la membrane (bleu), bourgeonnement et détachement (jaune), attachement à la membrane (rose) ou fusion de la membrane (vert). D'après Bonifacino *et al.* 2006.

découplage ligand-récepteur peut avoir lieu (pH~6,2). Les récepteurs protéiques et lipidiques sont ensuite recyclés *via* les endosomes de recyclage et redirigés vers la membrane plasmique. Les autres molécules sont soit dirigées vers le réseau trans-golgien (TGN) soit vers les endosomes tardifs qui constituent la deuxième voie de sortie de la voie endosomale.

La voie « courte » est généralement empruntée par les toxines AB_{RTC} et les toxines A_nB₇. Ces toxines sont internalisées puis migrent vers leur destination finale : les endosomes. Les BoNT sont endocytées par la voie dépendante de la clathrine. L'acidification des vésicules synaptiques (système nerveux périphérique) conduit à la translocation du composant A dans le cytosol du motoneurone. Cette chaîne légère, par son activité enzymatique de type métalloprotéase à zinc, clive les protéines SNARE impliquées dans l'exocytose. Cela conduit à un blocage de la neurotransmission. En revanche, les TeNT sont endocytées dans des vésicules non recouvertes qui ne s'acidifient pas. Les vésicules transportent de manière rétrograde la toxine vers le corps cellulaire du motoneurone, jusqu'au système nerveux central, par le biais de microtubules. Les TeNT accèdent alors aux inter neurones inhibiteurs dont elles bloquent la libération de neurotransmetteurs (glycine, GABA). L'absence de libération de neurotransmetteurs a pour conséquence l'absence de contrôle inhibiteur des motoneurones. Le mécanisme de passage entre les motoneurones et les neurones inhibiteurs reste inconnu.

2.3.2.2. Trafic des toxines par la voie rétrograde

De l'endosome à l'appareil de Golgi

Le TGN a un rôle central puisqu'il est un lieu de convergence des voies endocytique et sécrétoire (figure 16A). Il joue un rôle dans l'orientation des protéines synthétisées vers leur destination finale et constitue également un carrefour pour un nombre limité de protéines qui transitent de l'endosome au TGN (récepteurs à hydrolases, enzymes transmembranaires, et des protéines SNARE). Le transport rétrograde est initié au niveau de l'endosome recouvert (« coated endosome »), qui est un intermédiaire de maturation entre l'endosome précoce et l'endosome tardif. Ce type d'endosome est connecté à un vaste réseau de connections tubulaires, depuis lesquelles certains cargos sont transportés vers le TGN (figure 17).

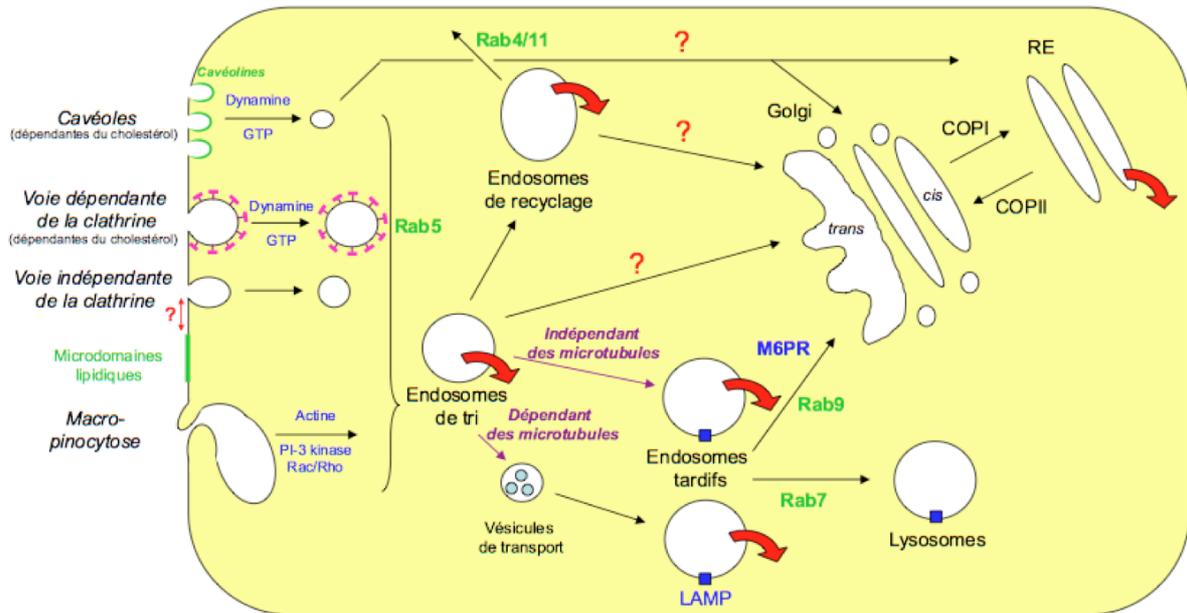


Figure 18 : Différentes voies d'endocytose et de trafic intracellulaire exploitées par les toxines. D'après Thèse de Julien Barbier, 2003.

Les protéines orthologues aux rétromères et à l'AP1 sont retrouvées chez *S. cerevisiae* comme chez les humains. Elles sont des composants conservés de la machinerie du trafic retrograde. À l'opposé, les orthologues de Rab9, TIP47 et PACS1 sont retrouvés uniquement chez les métazoaires, et sont certainement des protéines spécialisées dans les mécanismes complexes de sortie de l'endosome plus élaborés chez les eucaryotes.

La nature des transporteurs des cargos de l'endosome au TGN n'est pas connue, à l'exception des vésicules contenant Rab9. Le type de vésicules dont le transport est dépendant des rétromères, de la clathrine ou des radeaux lipidiques est également mal connu. Des études génétiques et biochimiques ont permis d'identifier des facteurs d'attachement et de fusion des vésicules au TGN, qui sont recrutés par des petites GTPases de la famille Rab ou Arl. Comme dans les mécanismes classiques de fusion, ces facteurs d'attachement facilitent l'assemblage de complexes SNARE. Les combinaisons de SNARE dans ces complexes sont à l'origine de la spécificité de fusion entre deux organelles. Dans *S. cerevisiae*, un complexe formé par les v-SNARE, Snc1 ou Snc2, et les t-SNARE, Tlg1, Tlg2 et Vti1 est impliqué dans la fusion des éléments de transport de l'endosome précoce vers le TGN (Bonifacino & Rojas, 2006).

Des approches morphologiques et biochimiques vont dans le sens d'un transport des toxines vers le TGN à partir d'un compartiment endosomal précoce. Ces études utilisent souvent des toxines modifiées génétiquement (par l'addition de sites de sulfatation) ce qui permet de suivre les modifications qu'elles subissent dans l'appareil de Golgi et de quantifier leur transport (Johannes & Goud, 1998). Il semble cependant que plusieurs voies de transport sont empruntées par les toxines pour atteindre l'appareil de Golgi (figure 18). Ainsi, une voie « courte » (directe), à partir des endosomes précoces de tri et de recyclage est mise à contribution pour le transport des toxines de type Shiga (Mallard *et al.*, 1998). Il existe également une voie « longue » (ou indirecte) d'accès à l'appareil de Golgi, dépendante de Rab9, qui permet le transport du récepteur au mannose-6-phosphate *via* des endosomes tardifs (Lombardi *et al.*, 1993 ; Riederer *et al.*, 1994). Cette voie ne semble pas être impliquée dans le transport des toxines de Shiga vers l'appareil de Golgi (Mallard *et al.*, 1998 ; Wilcke *et al.*, 2000) mais reste une voie d'accès possible des toxines pertussique et cholérique (Xu & Barbieri, 1996) à l'appareil de Golgi. Le cholestérol joue un rôle crucial dans le transfert des toxines des endosomes à l'appareil de Golgi. En effet, le transport des toxines Stx (Falguieres *et al.*, 2001) et CTx (Shogomori & Futerman, 2001) dépend de la teneur en cholestérol dans la

cellule, même si l'effet direct sur le transport des endosomes à l'appareil de Golgi reste obscur, puisque le taux de cholestérol affecte également la structure de l'appareil de Golgi et le transport des endosomes tardifs vers l'appareil de Golgi.

La Stx entre dans les cellules par la voie dépendante de la clathrine et est transportée directement depuis l'endosome précoce ou l'endosome de recyclage à l'appareil de Golgi (Mallard *et al.*, 1998). La nature des chaînes acylées du Gb3 est importante pour l'orientation de la toxine dans le trafic intracellulaire. Les Gb3 contenant des chaînes longues et saturées sont localisés dans les radeaux lipidiques à l'inverse des Gb3 contenant des chaînes insaturées. Il semble qu'une internalisation dépendante de la clathrine soit nécessaire pour le transport rétrograde depuis les endosomes précoces ou les endosomes de recyclage vers l'appareil de Golgi. Les membranes des vésicules impliquées dans le transport rétrograde contiennent la molécule EpsinR, une molécule adaptatrice de la clathrine (Saint-Pol *et al.*, 2004). Comme pour les récepteurs au mannose-6-phosphate, le transport de la STx des endosomes précoces au TGN requiert la clathrine, l'EpsinR et la dynamine (Saint-Pol *et al.*, 2004 ; Lauvrak *et al.*, 2004). Ces protéines favorisent certainement la formation de vésicules spécifiques permettant le transport des endosomes précoces au TGN. La voie empruntée par la Stx des endosomes précoces au TGN fait intervenir la protéine Rab6a'. Deux complexes SNARE intervenant dans la fusion des vésicules de transport ont été identifiés (Mallard *et al.*, 2002 ; Tai *et al.*, 2004), mais aucune hypothèse n'a encore été avancée pour expliquer pourquoi deux complexes SNARE interviennent dans la fusion d'un seul type de vésicules dans les cellules de mammifère.

Le complexe CTx/GM1 atteint l'appareil de Golgi *via* les endosomes précoces et tardifs (De Haan & Hirst, 2004). La quantité de GM1 présente dans les membranes est déterminante pour le choix de la voie intracellulaire. La CTx rentre dans l'appareil de Golgi par la voie dépendante des radeaux lipidiques et des cavéoles dans des cellules Hela exprimant un fort taux de GM1 mais pas dans des cellules Hela ou Caco-2 exprimant un faible taux de GM1. De plus, le transport de CTx depuis la membrane plasmique à l'appareil de Golgi est affecté si la quantité de cholestérol est diminuée. Ceci suggère qu'une balance entre les glycosphingolipides et le cholestérol régule l'endocytose par la voie des cavéoles (Sharma *et al.*, 2004).

De l'appareil de Golgi au reticulum endoplasmique

Le transport vésiculaire du TGN au RE est médié *via* des vésicules dites « vésicules COPI ». Ces vésicules interviennent également dans le transport intra golgien. La purification de vésicules de membrane de Golgi a révélé l'existence d'un complexe de sept sous-unités, appelées COPI, composant le manteau (Malhotra *et al.*, 1989 ; Waters *et al.*, 1991). Le bourgeonnement des vésicules COPI est initié lorsque la protéine ARF1 (ADP-ribosylation factor 1) lie le GTP (Chardin *et al.*, 1996). La protéine ARF-GTP, liée à la membrane, recrute un complexe préformé du manteau, ce qui entraîne une déformation de la membrane et la formation de vésicules. La séquence KKXX est nécessaire et suffisante pour diriger le transport rétrograde depuis l'appareil de Golgi jusqu'au RE (Jackson *et al.*, 1993) et maintenir les protéines dans le RE. Cette séquence est reconnue par les récepteurs KDEL qui se lient aux protéines luminales du RE exposant cette séquence, et les redirigent dans le RE (Lewis & Pelham, 1992).

Les toxines qui transitent depuis l'appareil de Golgi jusqu'au RE appartiennent essentiellement à la famille AB₅. Il s'agit des toxines STx, CTx et des toxines de plantes. Cette voie de trafic serait également empruntée par les toxines ETA et PTX.

La STx (Sandvig *et al.*, 1992) et la CTx (Majoul *et al.*, 2002) atteignent le RE. En effet, la glycosylation dans le RE a été mise en évidence par des approches morphologiques et biochimiques (par addition de sites de glycosylation). Il semble que ce transport existe également pour l'ETA (Jackson *et al.*, 1999) ainsi que pour la PTX (el Baya *et al.*, 1997). Les mécanismes de ce transport rétrograde ont été bien étudiés.

La séquence KDEL (ou analogue) est présente chez les toxines CTx, LT et l'ETA. Le transport rétrograde de Stx du Golgi au RE utilise une voie dépendante de COPI et de Rab6 (Girod *et al.*, 1999 ; White *et al.*, 1999). Il est intéressant de noter que la séquence KDEL est présente dans le composant A de la CTx et qu'une séquence proche, RDEL qui permet également la liaison aux récepteurs KDEL, se trouve dans la toxine LT1 de *E. coli* (Lencer *et al.*, 1995). La séquence KDEL est portée par la partie C-terminale du fragment A₂. Cette portion reconnaît le récepteur Erd2p et dirige le trafic de la toxine de l'appareil de Golgi au RE (Majoul *et al.*, 1998 ; Roy, 2002) (figure 19). La sous unité B de CTx, bien que ne portant pas de séquence KDEL, est également transportée jusqu'au RE, par un mécanisme inconnu.

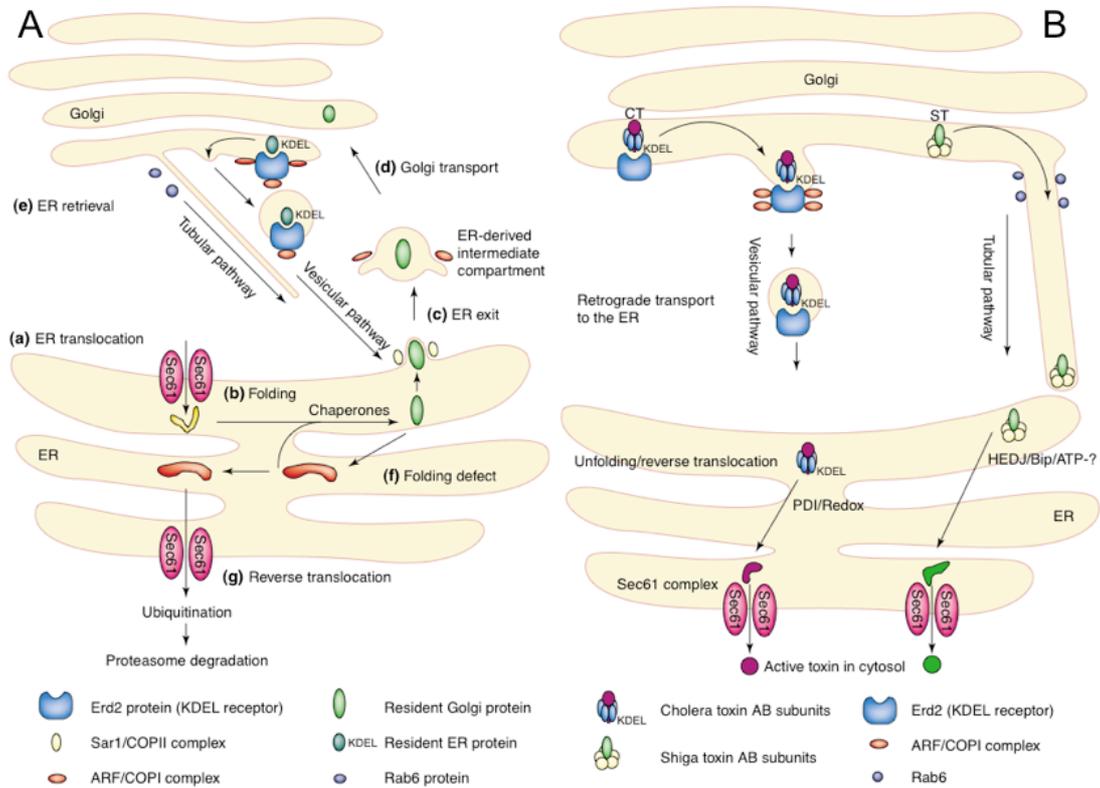


Figure 19 : Éléments de trafic intracellulaire. (A) Entrée et sortie de protéines du RE. (B) Exploitation des éléments de trafic cellulaire et du réticulum endoplasmique par la toxine de Shiga et la toxine cholérique. D'après Roy, 2002.

Ces séquences ne semblent pas être indispensables pour l'orientation vers le RE. En effet, lorsqu'elles sont modifiées, un transport retardé des toxines a été observé, ce qui suggère que d'autres voies de transport rétrograde peuvent être utilisées. L'ETA possède une séquence voisine « REDLK ». Le résidu final lysine est facilement coupé par des exoprotéases laissant une séquence REDL au niveau C-terminal (Hessler & Kreitman, 1997). Cette séquence est alors capable de se lier aux récepteurs KDEL avec une plus faible affinité. Ces résultats suggèrent que l'ETA doit atteindre le RE pour agir. De nouveaux signaux cytoplasmiques de triage intracellulaire sont découverts régulièrement, ce qui confirme la complexité de ces phénomènes (Cosson & Letourneur, 1997).

Les toxines CTx et STx empruntent la voie KDEL et COPI, bien que ces voies-là ne soient pas nécessaires à la toxicité. En effet, le motif KDEL chez la CTx n'est pas nécessaire à l'activité de la toxine, bien qu'il améliore l'efficacité de l'intoxication (Lencer *et al.*, 1995). Chez la Ctx, le récepteur GM1 a été identifié comme véhiculant la toxine jusqu'au Golgi puis au RE (Fujinaga *et al.*, 2003). La séquence KDEL pourrait alors avoir pour fonction le maintien efficace de la toxine dans le RE permettant à la chaîne A₂ d'être transloquée dans le cytosol.

La SubAB ne possède pas de séquence de type KDEL mais est dirigée vers le RE (Chong *et al.*, 2008). La spécificité de cette toxine est qu'elle exerce son activité catalytique dans le RE et n'est pas transloquée dans le cytosol.

2.4. Compartiments de destination

2.4.1. Endosomes

Les **endosomes précoces** ont une compartimentation complexe. On distingue les endosomes constitués d'une simple vacuole et les endosomes dont la vacuole contient des régions multivésiculaires qui prennent en charge certains cargos. Par exemple, le récepteur de la transferrine transite par l'endosome précoce. Certaines protéines destinées aux lysosomes, comme le LDL, peuvent transiter *via* une population d'endosomes appelés « **high motile endosome** ». La compartimentation des endosomes précoces est particulièrement importante pour le trafic de certains facteurs de croissance.

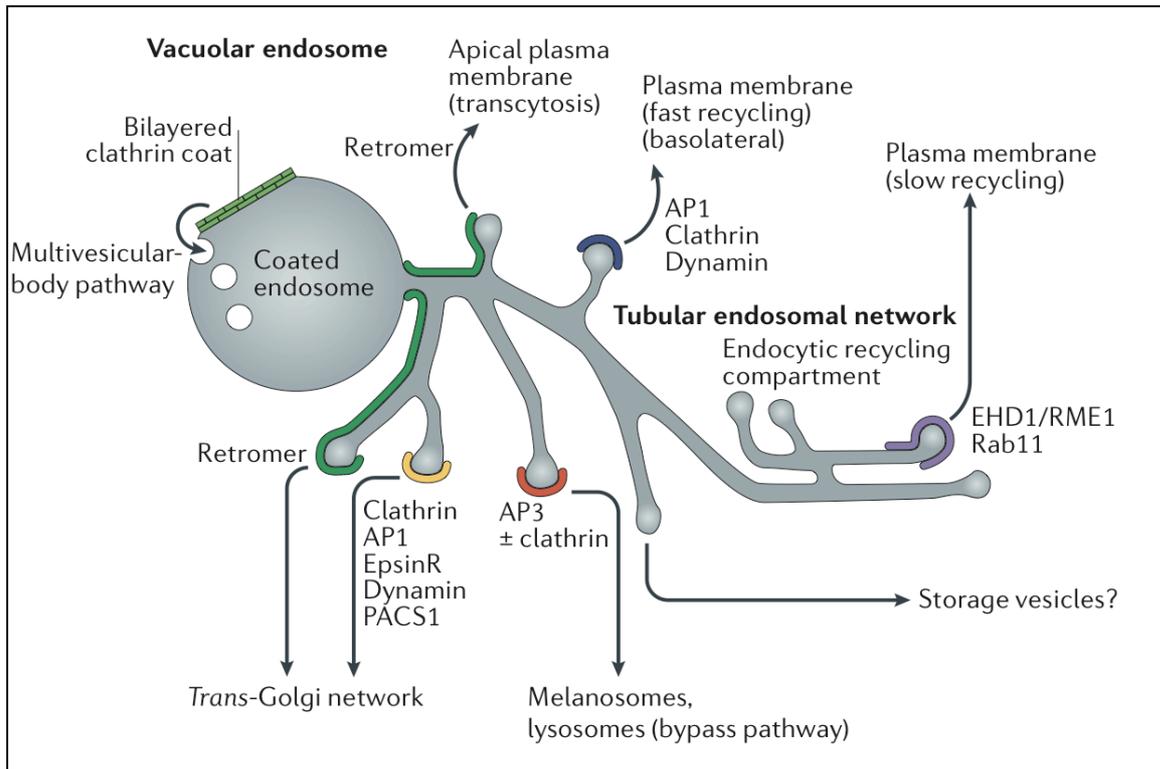


Figure 20 : Représentation schématique du réseau tubulaire endosomal. D'après Bonifacino *et al.*, 2006.

La membrane des endosomes est caractérisée par une variation de sa composition lipidique. Au cours de la maturation des endosomes précoces vers l'endosome tardif, la morphologie du compartiment évolue. Chez les endosomes recouverts, la vacuole principale se ramifie en un vaste réseau tubulaire (figure 20), qui permet l'orientation des cargos vers de nombreuses destinations, telles la membrane plasmique, la membrane des lysosomes, les vésicules de stockage (Arighi *et al.*, 2004 ; Carlton *et al.*, 2004). Le réseau tubulaire joue un rôle dans la sortie des cargos en plus de son rôle dans le recyclage de certains récepteurs. Ces multiples ramifications expliquent la diversité de molécules telles la clathrine, les rétromères, l'AP1, l'AP3, la dynamine, l'epsine R, qui s'associent à différents domaines tubulaires associés à des destinations variées (Valdivia *et al.*, 2002).

La formation des bourgeonnements au niveau de l'endosome a lieu grâce au recrutement de nombreuses molécules du cytosol. D'autres cargos restent dans la partie vacuolaire de l'endosome recouvert, lequel va poursuivre sa maturation vers l'endosome tardif. Ils sont ensuite transportés vers le réseau tubulaire par le biais de vésicules (Arighi *et al.*, 2004).

Les protéines et les lipides destinés aux endosomes tardifs sont collectés par des corps multivésiculaires formés par bourgeonnement de la membrane des endosomes précoces. Une fois détachés, ces corps multivésiculaires ou «endosomal carrier vesicles» (ECV) sont rapidement acidifiés (pH~5,5) et empruntent une voie dépendante des microtubules jusqu'aux endosomes tardifs. Leur composition membranaire reste néanmoins différente de celle des endosomes tardifs car l'acide lysobisphosphatidique n'est pas détectable dans les ECV (Kobayashi *et al.*, 2001). Les ECV jouent un rôle essentiel dans la régulation de la quantité de certains récepteurs. L'ubiquitination des molécules cargos lors de leur internalisation serait un signal reconnu au niveau de l'endosome, et permettrait aux cargos d'être dirigés vers les corps multivésiculaires (Mayor & Pagano, 2007). La régulation de certains récepteurs implique donc des phénomènes d'ubiquitination de leur domaine cytoplasmique. Dans l'endosome, les desubiquitinases permettent une régulation de la quantité de récepteurs. Ceux-ci sont soit dirigés vers les corps multivésiculaires puis les ECVs (récepteurs ubiquitinés), soit recyclés (récepteurs non ubiquitinés).

Les **endosomes tardifs** constituent la deuxième sortie de la voie endocytaire. Ils sont regroupés dans la région périnucléaire. Leur identification est facilitée par la formation de

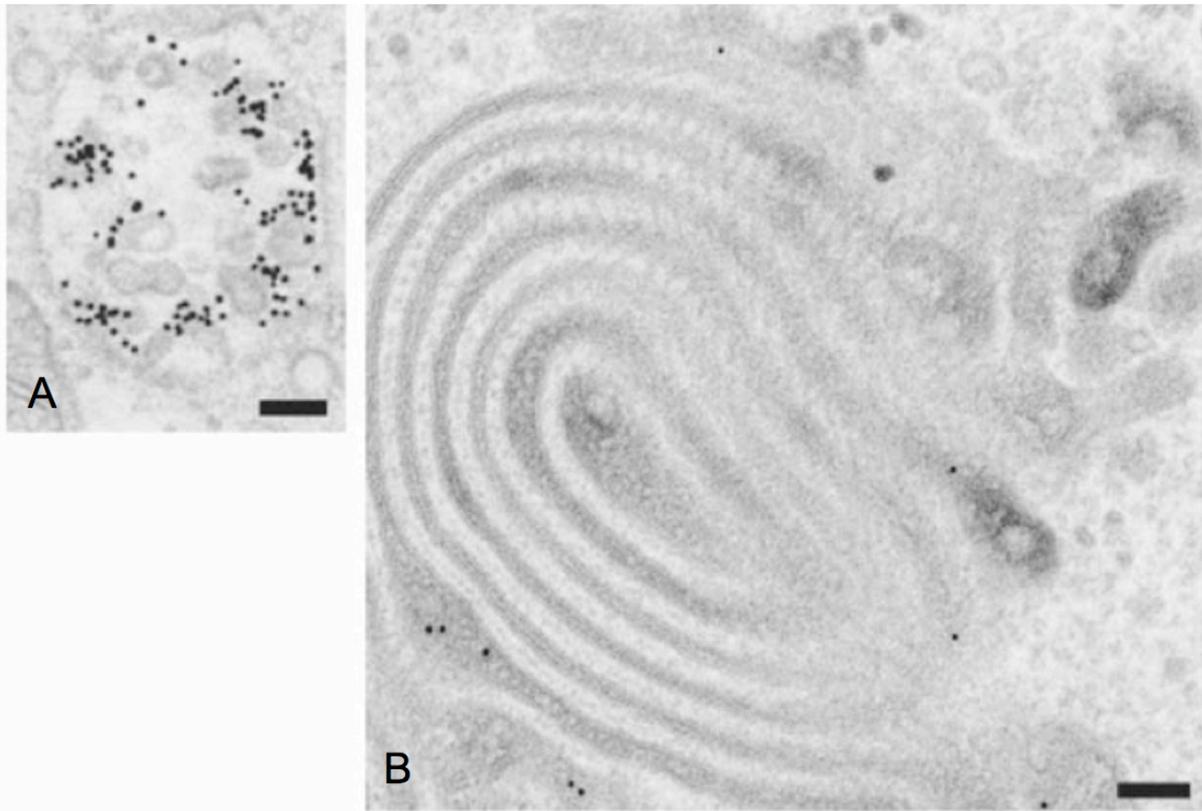


Figure 21 : Trafic intracellulaire du récepteur de l'EGF. (A) L'EGF transite via des corps multivésiculaires et (B) séjourne dans l'endosome tardif pendant plus de trois heures avant d'atteindre les lysosomes. L'échelle représente 100 nm. D'après Russell *et al.*, 2006.

corps denses en microscopie électronique. Les endosomes tardifs ont une structure caractéristique en forme d'oignon (figure 21B). Les endosomes tardifs contiennent des régions tubulaires, des régions en citerne et des régions multivésiculaires. Ces dernières contiennent des domaines caractérisés par des compositions protéiques et lipidiques propres. L'endosome tardif contient plusieurs vésicules internes dont les membranes sont différentes de la membrane de l'endosome tardif (Kobayashi *et al.*, 2001) et contiennent un fort taux d'acide lysobisphosphatidique (Gruenberg, 2001). Les enzymes lysosomiales activées par le faible pH (5,0-5,5) sont déjà fonctionnelles dans les endosomes tardifs. La protéolyse est donc activée dès ce compartiment. L'endosome tardif est une voie de sortie de protéines et des lipides, qui peuvent alors être exportés vers d'autres destinations (TGN). De plus, les endosomes tardifs peuvent communiquer avec la membrane plasmique dans certains types cellulaires. Dans les cellules dendritiques, les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type II sont transportées depuis les endosomes tardifs jusqu'à la membrane plasmique, et peuvent être également directement libérées par fusion des endosomes tardifs avec la membrane plasmique.

2.4.2. Réticulum endoplasmique

Le RE est un réseau membranaire formé de tubules, de vésicules et de saccules interconnectés. Ces structures interviennent dans la synthèse protéique, la séquestration du calcium, la production de stéroïdes, le stockage et la production de glycogène, et l'export de protéines.

Les protéines synthétisées dans le cytosol et destinées à la voie sécrétoire sont dirigées vers le RE par leur séquence signal en région N-terminale. Ces protéines possèdent également une particule de reconnaissance du signal (SRP) qui permet la reconnaissance du récepteur SRP sur la membrane du RE et l'interaction avec le complexe Sec61p (Matlack *et al.*, 1998). Les étapes de traduction et de translocation par le Sec61p dans le RE sont concomitantes.

La lumière du RE contient de nombreuses molécules chaperons qui se lient aux polypeptides synthétisés et assistent leur repliement. Ces chaperones incluent BiP (Gething, 1999), la calnexine et la calréticuline (Hebert *et al.*, 1995) et la protéine disulfure isomérase (PDI). Ces chaperons assistent le repliement des protéines synthétisées en prévenant l'agrégation et en assurant la formation des ponts disulfures. Les protéines du RE mal repliées sont rétrotransloquées *via* le translocon Sec61p vers le protéasome pour être dégradées.

Le RE est également le siège de glycosylations en N-terminal des polypeptides qui entrent dans le RE (Kornfeld & Kornfeld, 1985). Le groupement $\text{GlcMan}_8\text{GlcNAc}_2$ est greffé à un résidu asparagine contenu dans la séquence -N-X-S/T- (où X est un acide aminé quelconque excepté la proline). La forme monoglycosylée du peptide est reconnue par les chaperones du RE qui assistent le repliement du polypeptide (Hammond & Helenius, 1995). Une fois le polypeptide correctement replié, cette forme monoglycosylée quitte le RE par bourgeonnement de certains sites de la membrane (Palade, 1975).

2.5. Activités catalytiques, cibles cellulaires et fonctions touchées

Les toxines de type AB délivrent leur composant enzymatique dans le cytosol de la cellule. Certaines toxines partagent la même activité enzymatique, laquelle peut s'exercer sur des substrats très variés. La modification de ces substrats a pour conséquence la modification de fonctions vitales pour la cellule (synthèse des protéines, signalisation cellulaire, régulation du cytosquelette d'actine, phénomènes sécrétoires synaptiques).

Les neurotoxines BoNT et TeNT sont des métalloprotéases à zinc spécifiques des **protéines de la famille SNARE**. Ces cibles intraneuronales sont impliquées dans la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane présynaptique. Les TeNT et les sérotypes B, D, F et G des BoNT clivent la protéine VAMP (ou synaptobrevine) en un site unique spécifique du sérotype. Les sérotypes A, C et E de la BoNT clivent la région C-terminale de SNAP25 sur plusieurs sites. Enfin, la BoNT/C clive également la syntaxine.

La toxine dilatante cytolétale, provenant de différentes souches d'*E. coli* est capable de produire une dilatation marquée des cellules CHO. Une activité similaire a été observée à partir d'extraits d'entéropathogènes Gram (-). Ces toxines provoquent un blocage irréversible du **cycle cellulaire** des cellules eucaryotes, qui arrêtent leur division et se dilatent avant de mourir. Ces toxines endommageraient l'ADN génomique pendant la phase S du cycle, ce qui entraîne le blocage de ce dernier.

Certaines toxines ont pour effet **l'inhibition de la synthèse protéique**. C'est le cas de la DT et de l'ETA. Leurs mécanismes d'action sont similaires et leurs composants A

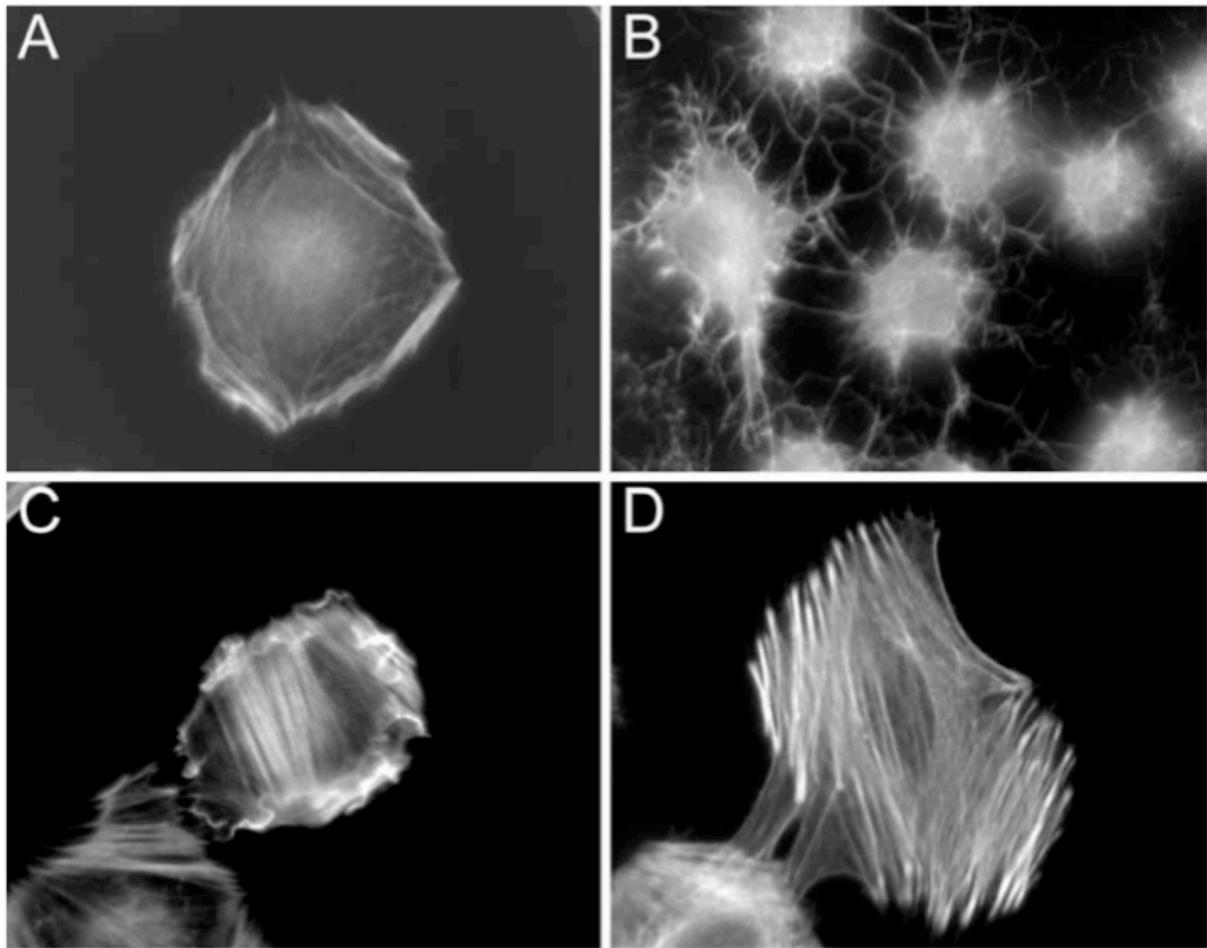


Figure 22 : Désorganisation du cytosquelette d'actine induite par l'action de toxines bactériennes. Cellules HeLa (A) non traitées, (B) traitées par la toxine B de *C. difficile*, (C) traitées par CNF1 d'*E. coli*, (D) traitées par CNT γ de *Y. pseudotuberculosis*. Les cellules ont été traitées 2 heures à 37°C puis fixées par la rhodamine phalloïde, qui se lie à l'actine F. D'après Hoffmann & Schimdt, 2004.

transfèrent un ADP-ribose sur un résidu histidine modifié de l'EF-2. Cette modification bloque l'étape de traduction et donc la synthèse protéique (Chapitre III.2.3.4). De même, les composants A des toxines Shiga et de type Shiga possèdent une activité N-glycosidase. Après clivage protéolytique, le segment A₁ ôte un résidu adénine de l'ARN 28S, composant les ribosomes eucaryotes 60S. Les toxines bactériennes agissent également sur **l'organisation du cytosquelette d'actine** (figure 22). Certaines agissent sur la cyto-architecture cellulaire, soit indirectement *via* l'activation ou l'inactivation de petites protéines G, soit directement sur les molécules d'actine.

De nombreuses cibles moléculaires impliquées dans la **signalisation cellulaire** sont modifiées par les toxines bactériennes. Le facteur LF de *B. anthracis* est une métalloprotéase à zinc (Klimpel *et al.*, 1994) qui clive la partie N-terminale des MAP (« Mitogen Activated Protein ») kinase Mek1 et Mek2 (Duesbery *et al.*, 1998). D'autres toxines ont une activité adénylcyclase et catalysent la conversion de l'ATP cellulaire en AMPc. C'est le cas du facteur EF de *B. anthracis* et de l'adénylcyclase de *B. pertussis*, tous deux dépendants de la calmoduline. D'autres toxines ont pour cible moléculaire les protéines G hétérotrimériques. La PTX possède une activité d'ADP ribosyltransférase ayant pour cible la sous-unité α des protéines Gi/o impliquées dans la transduction du signal des systèmes eucaryotes. Les toxines CTx et LT ont également la propriété d'ADP ribosyler les protéines Gs trimériques. Il en résulte l'activation directe de l'adénylcyclase et l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc. Une autre stratégie utilisée par des toxines bactériennes (comme la toxine B de *C. difficile*) pour modifier les GTPases de faible poids moléculaire, consiste en une glucosylation de la thréonine 35 ou 37 respectivement des GTPases de la famille Ras ou Rho (figure 23), ce qui les rend inactives.

Enfin, l'activité protéase à sérine de la SubAB présente l'originalité d'être très spécifique de la chaperone BiP et donc d'affecter **les fonctions du RE** ainsi que sa perméabilité, ce qui s'avère toxique pour la cellule.

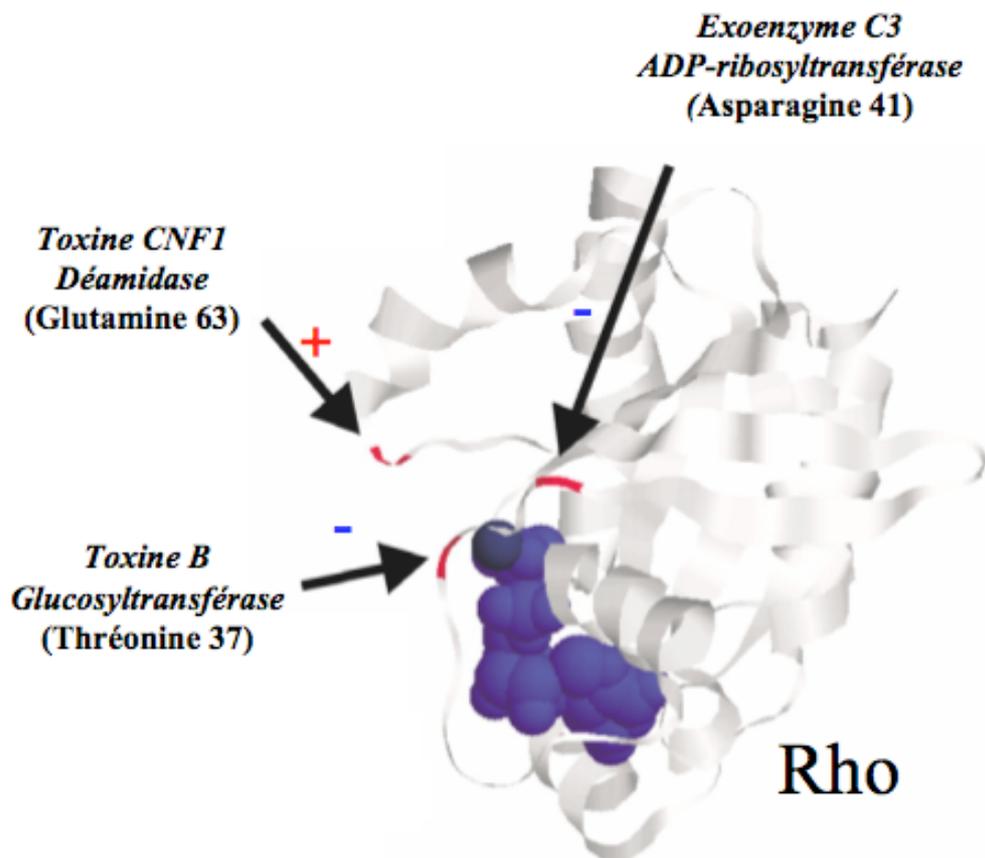


Figure 23 : Modification des petites protéines G par les toxines bactériennes. Les toxines bactériennes utilisent différents mécanismes pour activer (toxine CNF1 d'*E. coli*) ou inactiver (Toxine C3 de *C. botulinum*, toxine B de *C. difficile*) de manière permanente les GTPases de faible poids moléculaire. Ainsi, la toxine CNF1 active les protéines Rho par une déamidation de la glutamine 63, un résidu nécessaire à l'activité de ces GTPases. L'exoenzyme C3, à travers une ADP-ribosylation de l'asparagine 41, bloque l'interaction des protéines Rho avec leurs effecteurs. Finalement, la toxine B inactive les protéines Rho *via* une glucosylation de la thréonine 37 empêchant l'interaction de ces protéines avec leurs effecteurs. D'après (Barbieri *et al.*, 2002).

Chapitre II

Membranes biologiques et translocation des toxines bactériennes

Les membranes biologiques sont impliquées dans la compartimentation cellulaire, le maintien de l'homéostasie cellulaire, la communication avec l'environnement et la transduction de signaux extracellulaires. Elles constituent également un lieu d'échange de molécules et d'information entre les deux milieux qu'elles séparent. Les toxines bactériennes à activité intracellulaire ont développé des stratégies pour assurer le passage de leur domaine toxique à travers la membrane qui constitue une barrière hydrophobe. Ce passage est appelé « translocation ». Ces toxines sont des toxines protéiques (Chapitre I) solubles. L'objectif de ce chapitre est de comprendre comment les toxines de type AB arrivent, par des mécanismes moléculaires, dépendants ou non de l'environnement de l'hôte, à traverser la membrane plasmique et/ou la membrane des compartiments cellulaires et à injecter leur domaine toxique à l'intérieur des cellules. Pour comprendre ces mécanismes, une première partie de ce chapitre est consacrée à l'étude des propriétés des membranes biologiques et des modèles membranaires utilisés. Une deuxième partie est un état des lieux des stratégies de translocation utilisées par les toxines de type AB.

		Membrane plasmique des érythrocytes	Myéline	Mitochondrie	Microsome
Phospholipides	PC	23	11	48	40
	PE	20	14	28	17
	PI	2	0	8	11
	PS	11	7	0	0
	PG	0	0	1	2
	DPG	0	0	11	0
	Totaux	56	32	95	70
Sphingolipides		18	32	0	5
Stéroïds		25	25	5	6
Autres		11	1	0	19

PC, PE, PI, PS, PG, DPG : phosphatidylcholine, éthanolamine, inositol, sérine, diphosphatidylglycérol

Tableau 6 : Composition lipidique de différentes membranes biologiques. Les proportions de lipides sont données en pourcentage de lipides totaux en poids. Extrait de Shechter, Biochimie et biophysique des membranes, Masson, 1997.

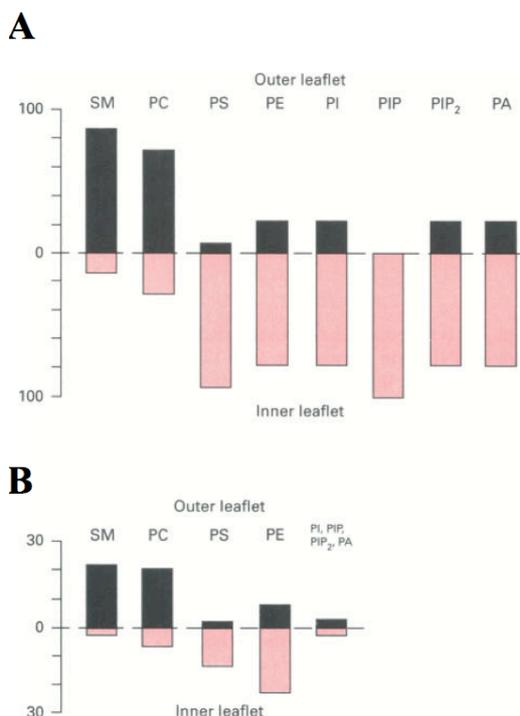


Figure 24 : Distribution asymétrique des phospholipides dans la membrane des érythrocytes humains. (A) Distribution de chaque phospholipide sur la couche externe ou interne de la membrane, exprimée en pourcentage pour chaque lipide. (B) Distribution exprimée en pourcentage de phospholipides totaux. SM : sphingomyéline, PC : phosphatidylcholine, PE : phosphatidyléthanolamine, PS : phosphatidylsérine, PI : phosphatidylinositol, PIP : phosphatidylinositol 4-phosphate, PIP₂ : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PA : acide phosphatidique. D'après Zachowski, 1993.

1. Membranes cellulaires et membranes modèles

1.1. Composition et structure des membranes cellulaires

L'organisation en bicouche des membranes biologiques a été proposée pour la première fois par Gorter et Grendel en 1925 et les premières structures de bicouches orientées et déshydratées ont été résolues dans les années 1970 par diffraction des rayons X à une résolution de 5 à 10 Å (Levine & Wilkins, 1971). Cependant, la fluidité des bicouches lipidiques rend extrêmement difficile l'interprétation des clichés de diffraction.

De nombreuses classes de lipides sont présentes dans les membranes de cellules eucaryotes : les phospholipides, les glycolipides, les sphingolipides, les stérols, et leurs dérivés (Fahy *et al.*, 2005). L'étude des membranes biologiques a montré que la composition en lipides des membranes varie selon le type cellulaire et le type de membrane (van Meer, 1998) (tableau 6). Cette composition varie au cours du développement cellulaire (Simons & Ikonen, 2000). Les cellules adaptent ainsi la composition de la bicouche lipidique (et donc ses propriétés) aux besoins de l'activité membranaire. De plus, pour un type de membrane donné, la composition diffère d'une monocouche à l'autre, résultat du phénomène de flip-flop membranaire. Les membranes biologiques possèdent une distribution transmembranaire asymétrique des lipides qui la composent. Le rôle de cette asymétrie est encore discuté. Néanmoins, dans le cas des globules rouges, l'asymétrie de la membrane plasmique explique sa forme discoïdale facilitant son passage dans les capillaires (figure 24).

En milieux aqueux, l'organisation la plus stable des lipides est celle qui minimise les contacts entre le solvant et la partie polaire. Les propriétés amphiphiles des lipides permettent donc leur disposition spontanée en bicouche, les chaînes acyles apolaires au centre et les têtes polaires au contact du milieu aqueux. La bicouche ainsi formée présente une zone centrale hydrophobe peu dense, d'une épaisseur de 30 Å, et deux zones périphériques plus riches en radicaux hydrophiles, d'une épaisseur de 15 Å chacune.

L'état fluide et désordonné des membranes biologiques rend difficile la détermination de leur structure à une échelle atomique. Winner et White ont utilisé les techniques de

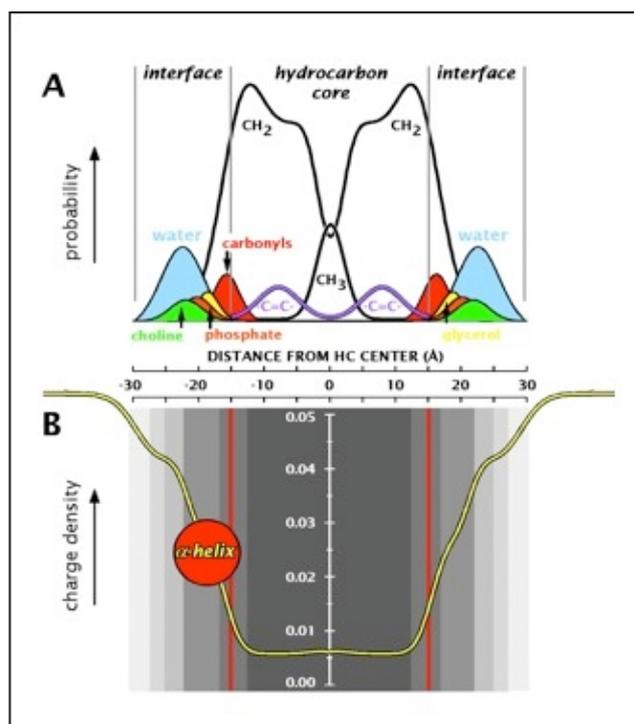


Figure 25 : Structure d'une bicouche lipidique fluide de dioléophosphatidyl-choline (DOPC). (A) L'aire des distributions gaussiennes est proportionnelle au nombre de chaque groupement chimique composant les lipides. (B) Profil de polarité. D'après Protein-Lipid interactions : From Membrane Domains to Cellular Networks, Lukas K. Tamm, 2000.

	% total de phospholipides						
	PC	PE	PI	PS	CL	PA	Autre
Membrane plasmique	16,8	20,3	17,7	33,6	0,2	3,9	6,9
Vésicules de sécrétion	35	22,3	19,1	12,9	0,7	1,2	8,8
Vacuole	46,5	19,4	18,3	4,4	1,6	2,1	7,7
Noyau	44,6	26,9	15,1	5,9	<1	2,2	4,3
Peroxisome	48,2	22,9	15,8	4,5	7,0	1,6	ND
Microsome	51,3	33,4	7,5	6,6	0,4	0,2	0,5
Mitochondrie	40,2	26,5	14,6	3,0	13,3	2,4	ND
Membrane interne mitochondrie	38,4	24	16,2	3,8	16,1	1,5	ND
Membrane externe mitochondrie	45,6	32,6	10,2	1,2	5,9	4,4	ND

Tableau 7 : Composition lipidique des membranes des organites de *S. cerevisiae*. PC : phosphatidylcholine, PE : phosphatidyléthanolamine, PS : phosphatidylsérine, PI : phosphatidylinositol, CL : cardiolipine, PA : acide phosphatidique. D'après Zinser *et al.*, 1991.

diffraction aux rayons X et de neutrons afin d'obtenir une image de bicouche lipidique fluide de dioléophosphatidyl-choline (DOPC) (Wiener *et al.*, 1991; Wiener & White, 1992). Plutôt que de définir la position précise de chaque atome, les auteurs décrivent la membrane comme une distribution spatiale des différents groupements submoléculaires projetés sur la normale au plan membranaire. La probabilité de présence de chaque groupement chimique est fonction de sa distance transmembranaire. La figure 25 montre la distribution des différents groupements chimiques présents dans une bicouche de DOPC. L'interface membranaire est définie par les régions occupées par l'eau d'hydratation des têtes polaires tandis que le cœur hydrophobe est occupé par les chaînes carbonées. L'épaisseur de la membrane est donc dépendante de la composition en lipides.

Cette représentation illustre certaines caractéristiques fondamentales des membranes biologiques : la largeur des distributions reflète le désordre thermique au sein d'une membrane fluide, et l'épaisseur cumulée des deux interfaces est égale à l'épaisseur de la zone hydrophobe. Enfin, la composition lipidique varie suivant les organites (tableau 7).

L'étude des compositions membranaires des organites est fondamentale pour la compréhension du trafic intracellulaire de certaines protéines et de leur conformation dans leur compartiment de destination.

1.2. Propriétés de la bicouche lipidique

Dans une bicouche, aucune liaison chimique ne lie les lipides entre eux. Bien que confinés dans un espace défini par la membrane, les différents constituants d'une membrane biologique sont animés de mouvements variés, régulés par la fluidité intrinsèque de la membrane. Par ailleurs, à la surface de la membrane, le potentiel électrostatique et la modification de la constante diélectrique de l'eau peuvent déstabiliser les protéines. L'environnement hydrophobe des lipides impose une adaptation structurale des protéines solubles lorsqu'elles interagissent avec les membranes.

1.2.1. La fluidité membranaire

Plusieurs paramètres régulent la fluidité et la stabilité de la membrane, caractéristiques qui lui permettent d'assurer des fonctions très diverses.

La température de fusion T_m est la température de transition entre une phase gel $L\beta$ et la phase fluide $L\alpha$. Dans la phase gel $L\beta$, les chaînes d'acides gras ont une conformation ordonnée. Elles sont parallèles les unes aux autres, en contact étroit, et étirées au maximum. Pour $T > T_m$ (phase fluide $L\alpha$), la mobilité autour des liaisons C-C augmente. Elles oscillent, et ne sont plus étirées au maximum. L'épaisseur de la bicouche lipidique diminue et le contact entre les chaînes est moins étroit.

La phase $L\alpha$ décrite sur des systèmes modèles est la phase la plus représentative des membranes biologiques. Cette phase fluide est appelée liquide-cristalline. Les chaînes des lipides sont désordonnées et les lipides peuvent diffuser latéralement dans le plan. La fluidité membranaire est caractérisée par les mouvements des lipides qui tournent autour de leur axe, perpendiculairement au plan de la membrane, dû à la flexibilité des chaînes hydrocarbonées. Les lipides sont animés de mouvements de rotation, diffusion latérale, et diffusion transversale (flip-flop). Ces mouvements confèrent une certaine fluidité à la membrane et, par conséquent, favorisent la mobilité des protéines dans le plan de la membrane.

Un des facteurs régulant la fluidité des membranes est le point de fusion des lipides qui la composent. La longueur des chaînes acyles et le nombre d'insaturations déterminent le point de fusion du lipide et donc la fluidité de la membrane. À longueur de chaînes hydrocarbonées égales, la fluidité de la membrane diminue avec l'augmentation du nombre d'insaturations. À nombre d'insaturations égales, la fluidité de la membrane diminue lorsque la longueur des chaînes acyles augmente. À température physiologique, les phospholipides s'organisent en phase fluide désordonnée, alors que les sphingolipides, qui possèdent un T_m plus élevé, s'organisent en phase gel. Il en résulte une séparation de phase dans la membrane. Le cholestérol, qui interagit avec les sphingolipides favorise cette séparation et contribue à la formation des radeaux lipidiques. La fluidité et la diffusion des lipides ne sont donc pas homogènes sur toute la surface membranaire.

Enfin, la fluidité membranaire dépend des variations de température et de pression, ce qui explique en partie la variabilité des observations expérimentales. Les modifications de fluidité de la membrane induisent des changements d'organisations structurales des protéines insérées.

1.2.2. Potentiel de membrane, constante diélectrique et pH à la surface de la membrane

La membrane constitue un environnement amphiphile, hydrophile à l'extérieur et hydrophobe à l'intérieur. La membrane et son environnement aqueux peuvent être divisés en trois régions électriquement distinctes. La région des têtes a une constante diélectrique (ϵ) dont la valeur est centrée sur 30, et généralement comprise entre 30 et 50 (Vaz *et al.*, 1978) ; celle de la région hydrophobe n'est que de 2 à 4 et la constante diélectrique de l'eau est de 78,5 (Ashcroft *et al.*, 1981). Ces valeurs révèlent donc un changement conséquent de caractéristiques électriques dans l'environnement de la membrane, reflétant ainsi une diminution de la polarité comparativement au milieu aqueux (Dufour *et al.*, 1993). Ces modifications peuvent contribuer à augmenter les effets de répulsions électrostatiques entre les chaînes latérales chargées d'une protéine et les têtes polaires à la surface de la membrane. L'interface membranaire est une région importante modulant de nombreuses réactions. Selon la composition en lipides, les charges se répartissent différemment à l'interface, faisant varier l'organisation des molécules d'eau et la constante diélectrique. À la surface de la membrane, les molécules d'eau forment des ponts hydrogènes avec les lipides et entre elles également. La présence de ces dipôles à la surface et autour des têtes polaires crée un champ électrostatique. Les membranes sont globalement chargées négativement et portent donc un potentiel électrostatique négatif. Ce potentiel conduit à un recrutement en surface de contre-ions positifs. Parmi ces cations, des protons sont recrutés en surface. Ils s'organisent et diffusent dans un réseau bidimensionnel de liaisons hydrogènes (Teissie *et al.*, 1985). La matrice de cette structure est constituée des groupements hydroxyles et esters des têtes polaires, de leurs molécules d'eau d'hydratation et des molécules d'eau intercalées entre les lipides (Prats *et al.*, 1987). Le recrutement de protons aboutit à une baisse de 1 à 2 unités de pH (Eisenberg *et al.*, 1979), et ce jusqu'à une distance de 5 à 15 Å de la surface de la membrane (Prats *et al.*, 1989 ; Bychkova *et al.*, 1996).

Ainsi la diminution de la polarité, l'augmentation de la force ionique et la baisse significative du pH à la surface de la bicouche peuvent modifier la stabilité des protéines à proximité de la membrane.

1.3. Membranes modèles

Les membranes artificielles sont des bicouches lipidiques le plus souvent composées de phospholipides. Elles fournissent de précieux renseignements sur leurs comportements et leurs caractéristiques physico-chimiques. Les membranes artificielles sont largement utilisées pour étudier les interactions protéine-membrane ou l'activité de transporteurs protéiques. Notre description se focalise ici sur les modèles plan et vésiculaire composés de phospholipides.

1.3.1. Les couches planes de lipides

Les lipides dissouts dans un solvant organique et déposés à la surface d'une solution aqueuse, conduisent, après évaporation du solvant organique, à la formation d'une monocouche de lipides à l'interface air/eau. La tête polaire des lipides est en contact avec l'eau, et la chaîne acyle avec l'air. Les monocouches lipidiques sont utilisées entre autres pour cristalliser des protéines en deux dimensions. L'obtention de tels cristaux nécessite une concentration élevée de protéines, une orientation identique, et une mobilité des protéines dans le plan de l'interface lipide/solvant aqueux, de façon à optimiser les interactions protéine-protéine. Les cristaux bidimensionnels se prêtent à des études structurales par une combinaison de diffraction d'électrons et de microscopie électronique (Rigaud *et al.*, 2000). Une bicouche lipidique plane peut être obtenue à travers un orifice séparant deux compartiments aqueux. Ce dispositif permet d'avoir accès aux deux compartiments aqueux, contrairement aux liposomes, et de mimer l'environnement membranaire, contrairement à la monocouche lipidique. Ce système se prête à l'étude de la perméabilité ionique de la bicouche. Il est aisé de mesurer des courants et des potentiels de part et d'autre de la bicouche à l'aide d'électrodes. L'équipe de Finkelstein a entrepris ce type d'expérience afin d'étudier la topographie du domaine T de la DT dans les membranes (Silverman *et al.*, 1994c ; Senzel *et al.*, 2000).

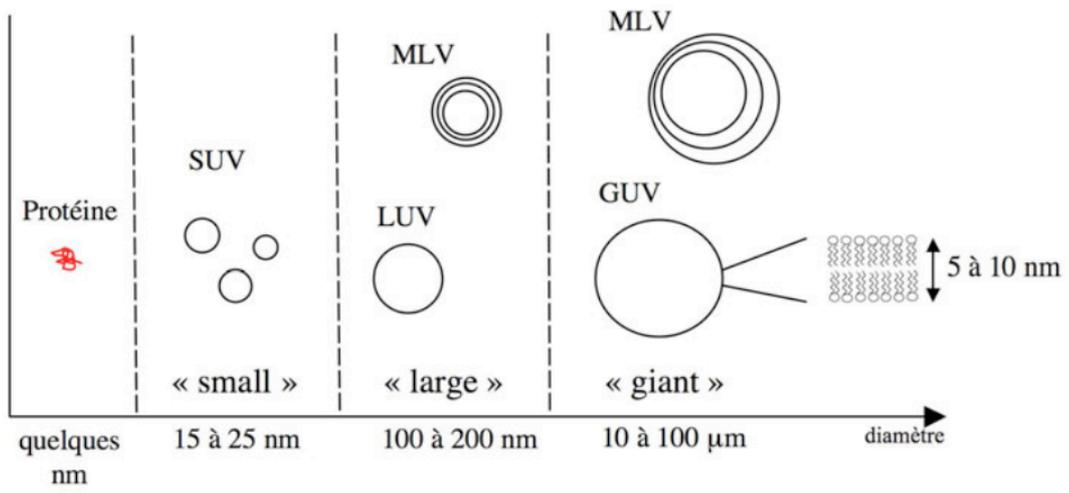


Figure 26 : Taille des vésicules lipidiques.

1.3.2. Les vésicules de bicouches lipidiques

Les vésicules sont les systèmes modèles les plus utilisés. Elles trouvent des applications dans les domaines de la biochimie, la biophysique, la cosmétologie et la pharmacologie. Ce sont des vésicules constituées d'une bicouche lipidique isolant le milieu externe du milieu interne (figure 26).

La méthode la plus simple de préparation de liposomes consiste à évaporer le solvant organique dans lequel sont dissouts les lipides, puis à les remettre en suspension dans un solvant aqueux par agitation. Il se forme ainsi des liposomes multilamellaires (« Multi Lamellar Vesicles » ou MLV) dont le diamètre externe avoisine les 200 nm. Ce sont des structures en bicouche lipidique, closes, concentriques et séparées par des volumes aqueux. Ces liposomes ont l'inconvénient d'être très hétérogènes et de posséder un volume aqueux interne relativement faible par rapport à la quantité de lipides. Les MLV présentent aussi l'inconvénient d'une forte diffusion de la lumière, ce qui les rend inadaptées aux études spectroscopiques.

Les vésicules unilamellaires de petite taille (« Small Unilamellar Vesicles » ou SUV) sont obtenues à partir des MLV, en les soumettant à des ultrasons ou à des pressions élevées dans une presse de French. Les vésicules sont de taille homogène, de 12 à 20 nm de diamètres intérieur et extérieur. Le faible diamètre, et donc la courbure imposée, génèrent des contraintes d'association entre les lipides. La surface et le nombre de lipides sont significativement différents entre les couches interne et externe. Le rayon de courbure est assez éloigné de celui rencontré *in vivo*. Cependant, leur taille est favorable à l'utilisation en spectroscopie.

Les vésicules unilamellaires de grande taille (« Large Unilamellar Vesicles » ou LUV) sont généralement obtenues par inversion de phase (Rigaud *et al.*, 1983). Les lipides, solubles dans l'éther, sont mélangés à un tampon aqueux non miscible dans l'éther. Les lipides se partitionnent à l'interface éther-eau, la tête polaire en contact avec l'eau. Le mélange est soniqué jusqu'à l'obtention d'une solution opalescente, correspondant à une dispersion monophasique à l'échelle macroscopique. L'éther est évaporé sous vide partiel.

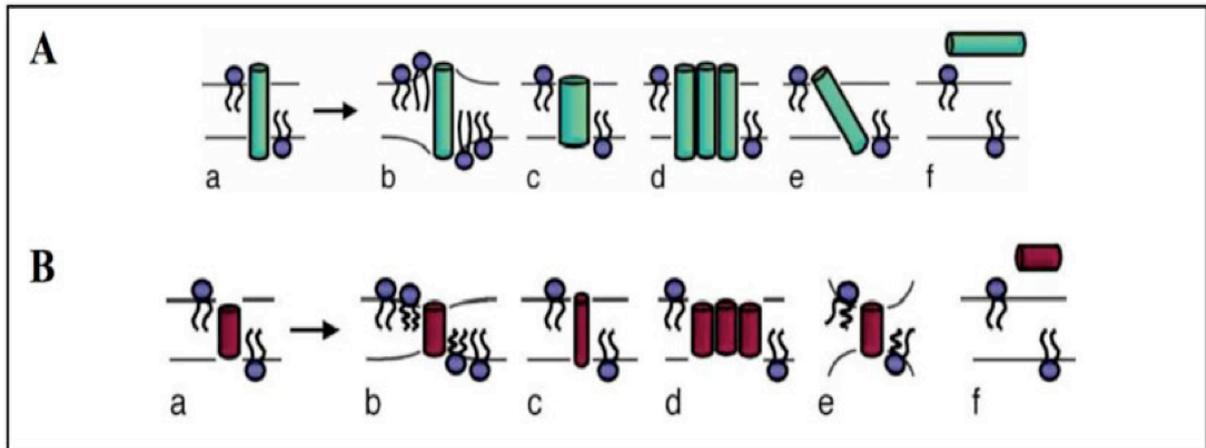


Figure 27 : Représentation schématique des adaptations permettant de réduire ou abolir le « mismatch » hydrophobe entre une hélice transmembranaire et la bicouche lipidique. (A) Adaptation au « mismatch » positif. Lorsque la partie hydrophobe de l'hélice est plus longue que l'épaisseur des chaînes acyles des lipides (a), on peut observer un réarrangement des lipides, (b) une déformation de l'hélice (c), une oligomérisation des peptides (d), la formation d'une phase non lamellaire (e), une inclinaison de l'hélice (f), ou, si la différence d'épaisseur est trop grande, le peptide ne s'insère pas dans la membrane (f). (B) Adaptation au « mismatch » négatif. Les phénomènes décrits de (a) à (f) sont similaires à ceux du « mismatch » positif. D'après de Planque & Killian, 2003.

Les lipides s'organisent de manière à optimiser l'interaction partie polaire-éther dont la quantité diminue. Il se forme un gel transitoire, auquel il succède une phase liquéfiée lors de l'élimination totale de l'éther. Il y a formation de liposomes unilamellaires dont le diamètre varie entre 0,2 μm et 1 μm . L'extrusion sur des filtres successifs de 0,4 μm et 0,2 μm aboutit à une population de taille plus homogène, centrée autour de 150 nm. Des vésicules de très grande taille (« Giant Unilamellar Vesicles » ou GUV) sont utilisées pour étudier des phénomènes membranaires au niveau microscopique.

2. Interactions protéines-membrane

2.1. Influence des têtes polaires

L'hétérogénéité chimique de l'interface membranaire offre de nombreuses possibilités d'interactions avec les protéines. Une surface importante des protéines, membranaires ou transitoirement membranaires est en contact avec cette région qui représente la moitié de l'épaisseur de la membrane. Les têtes polaires créent un réseau bidimensionnel de liaisons hydrogènes entre elles et les molécules d'eau. D'autre part, les membranes biologiques contiennent entre 10 et 20% de lipides anioniques, à l'origine d'un potentiel de surface. Cet aspect est fondamental, étant donné que la première étape de liaison des protéines à la membrane implique souvent des interactions électrostatiques entre les charges négatives des phospholipides et les résidus basiques de la protéine (Johnson & Cornell, 1999). Le potentiel de membrane créé par les têtes polaires conduit au recrutement de contre-ions positifs. Ceci a pour conséquence l'augmentation de la force ionique à proximité de la surface de la membrane. Il en résulte une augmentation locale de leur concentration et donc une acidification du pH de une à deux unités pouvant s'étendre sur une distance de 5 à 15 Å de la surface (Bychkova *et al.*, 1996). Ces propriétés facilitent notamment l'insertion membranaire des colicines (Zakharov & Cramer, 2002).

2.2. Influence des chaînes acylées

L'épaisseur de la bicouche, constituée par les chaînes acyles des phospholipides est une caractéristique fondamentale et dépend de la composition en lipides. Les protéines

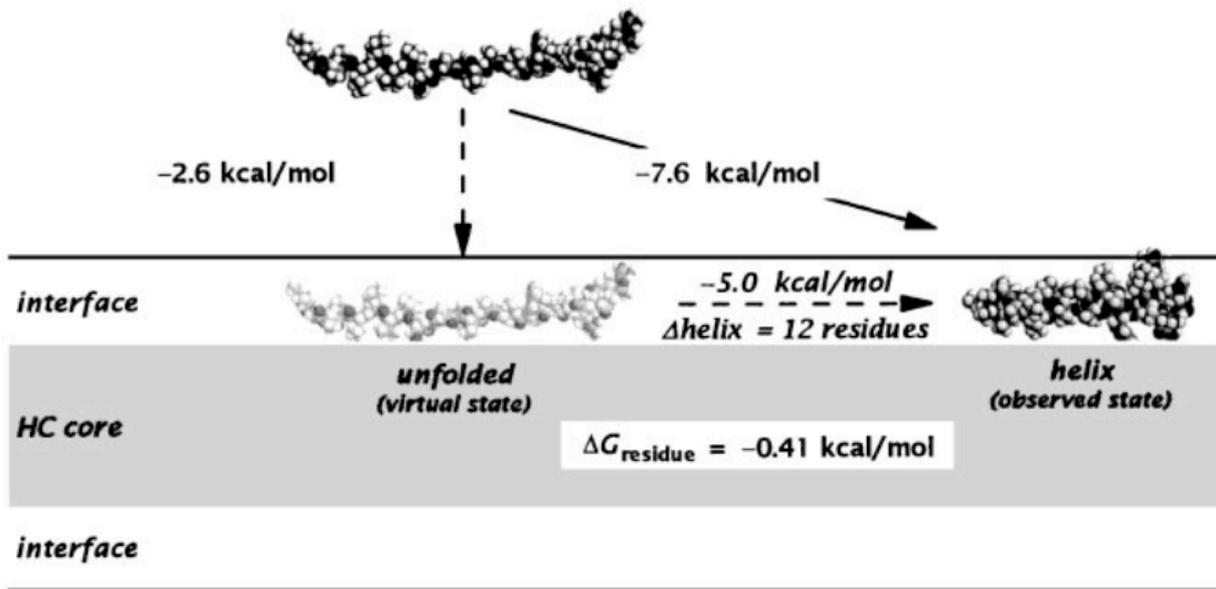


Figure 28 : Couplage partition/repliement de la méliittine dans une membrane de POPC. La formation de structures secondaires lors de la liaison à la membrane apporte une stabilité de 5 kcal.mol^{-1} , soit environ $0,41 \text{ kcal.mol}^{-1}$ par résidu. D'après White & Wimley, 1999.

membranaires s'insèrent de telle manière que les segments transmembranaires soient recouverts par les chaînes acyles de la membrane. Lorsque l'épaisseur de la membrane et la longueur des segments transmembranaires diffèrent, on observe des réarrangements structuraux. Ainsi, l'épaisseur de la membrane influence l'orientation des hélices transmembranaires, et inversement, la longueur du segment transmembranaire d'une protéine influence le positionnement des lipides situés à proximité (de Planque & Killian, 2003). La figure 27 résume les adaptations possibles des lipides et des peptides. Un mauvais ajustement des deux parties peut aboutir à une adaptation de l'épaisseur de la bicouche lipidique. Si la protéine est suffisamment flexible, elle peut aussi s'adapter par des changements d'orientation et de compaction des hélices transmembranaires et donc modifier parfois la fonction des protéines.

2.3. Repliement des protéines et membrane

Les protéines membranaires ont des structures repliées et stables. L'association à la membrane est considérée selon un modèle à quatre étapes (White & Wimley, 1999). Ce modèle est une combinaison du modèle à trois étapes proposé par Jacobs et White en 1989, pour décrire les étapes précoces de l'association (Jacobs & White, 1989), et du modèle à deux étapes de Popot et Engelman selon lequel les hélices transmembranaires se positionnent dans la membrane et s'assemblent ensuite pour former la structure fonctionnelle (Popot & Engelman, 1990). La figure 28 présente les quatre étapes d'interaction avec la membrane du modèle de White et Wimley : partition, repliement, insertion et association des peptides entre eux.

L'association d'un polypeptide avec la membrane s'accompagne de la formation de structures secondaires. En effet, la formation d'une structure stable ne peut être obtenue qu'en minimisant les interactions entre les parties polaires de la chaîne polypeptidique et la partie hydrophobe des lipides. Les groupements CO et NH des liaisons peptidiques ayant un caractère polaire, la liaison à la membrane catalyse la formation de structures secondaires, principalement des hélices α et des feuillets β . Les groupements CO et NH forment alors des ponts hydrogènes, et les chaînes latérales des acides aminés sont projetées vers l'extérieur. Les liaisons hydrogènes des structures secondaires réduisent considérablement le coût énergétique de la partition membranaire des liaisons peptidiques. L'énergie libre de transfert

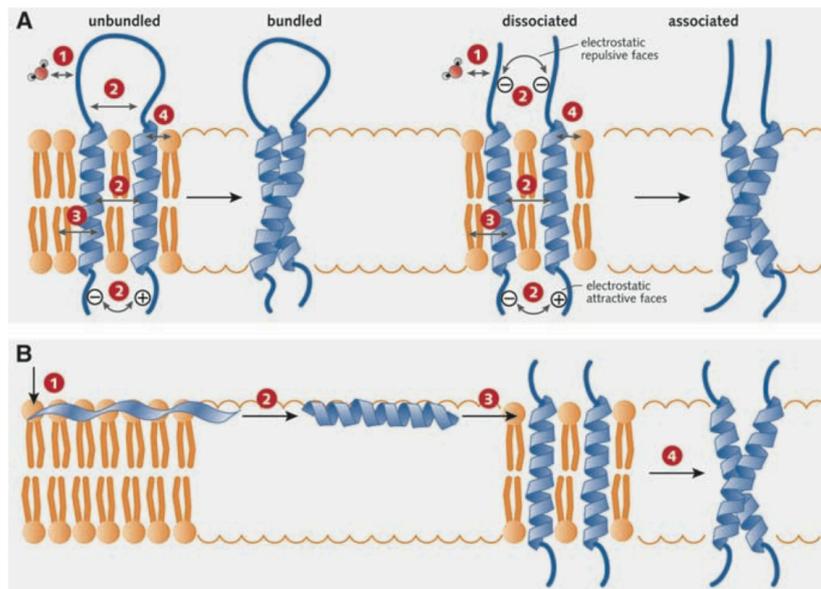


Figure 29 : Formation des hélices et association à la membrane. (A) Illustration des forces impliquées dans le regroupement d'hélices transmembranaires chez les protéines contenant plusieurs hélices (à gauche) ou entre les hélices de protéines différentes (à droite). 1 : interaction protéine/eau, 2 : interactions protéine/protéine, 3 : interaction protéine/cœur hydrophobe de la membrane, 4 : interactions protéine/têtes polaires. (B) Illustration du modèle à quatre étapes proposé par White *et al.*, 2001. 1 : partition avec la région interfaciale de la membrane, 2 : repliement à la surface de la membrane, 3 : insertion dans la membrane, 4 : regroupement des hélices.

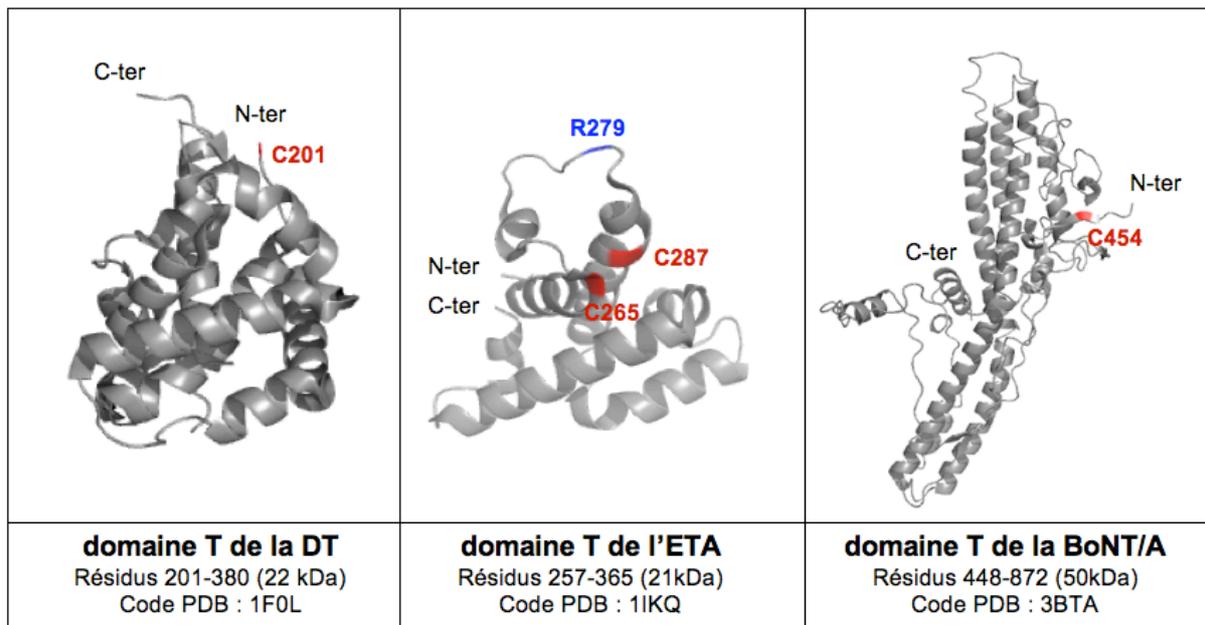


Figure 30 : Structures des domaines de translocation de quelques toxines de type AB_{RTC}. Les cystéines du domaine T impliquées dans les ponts disulfure entre les domaines T et C (ou intracaténaire à T pour l'ETA) sont représentées en rouge. L'argine 279 de l'ETA est le site de clivage protéolytique et est représentée en bleu.

ΔG de l'eau vers un milieu non polaire d'un peptide non replié est beaucoup plus élevée que lorsque le peptide est structuré (White & Wimley, 1999).

L'utilisation de peptides modèles comme la mélittine, un peptide de 27 résidus contenu dans le venin d'abeille, a permis une description structurale et thermodynamique de l'insertion des hélices α dans les membranes (White & Wimley, 1999). La figure 29 illustre le couplage de la partition et du repliement de la mélittine dans les membranes. La variation d'énergie libre attribuée à la formation de structures secondaires de la mélittine à l'interface est estimée à -5 kcal.mol^{-1} (Ladokhin & White, 1999).

Une fois les éléments de structure secondaire formés, l'insertion membranaire dépend de la nature des chaînes latérales présentes. La valeur de l'énergie libre de la pénétration dans le cœur hydrophobe de la membrane dépend de la séquence qui doit être riche en résidus hydrophobes. L'obtention de la structure tridimensionnelle compacte est la dernière étape du repliement des protéines membranaires. Cette étape du repliement implique diverses interactions entre les éléments de structure secondaire, mais aussi avec les différentes parties de la bicouche lipidique, et le milieu aqueux (figure 29).

Ainsi, les forces impliquées dans l'association des hélices sont de plusieurs ordres. Les résidus polaires se groupent pour minimiser les contacts avec la partie hydrophobe des lipides. À l'inverse les résidus hydrophobes interagissent avec les chaînes acylées. Puis l'association entre les segments transmembranaires est stabilisée par des interactions spécifiques entre les chaînes latérales (liaisons hydrogènes et forces de van der Waals).

3. Rôle du composant B des toxines bactériennes

3.1. Domaine de translocation des toxines AB_{RTC}

Le composant B des toxines AB_{RTC} intervient dans la translocation *via* le domaine T. Des exemples de structures des domaines de translocation des AB_{RTC} sont représentés figure 30. Les domaines de translocation interagissent avec la membrane sous l'effet du pH endosomal en exposant des régions hydrophobes, dans le cas des toxines DT (Chapitre III) et ETA (Mere *et al.*, 2005). La présence de régions amphipatiques dans les domaines de translocation permet une interaction des charges positives avec la membrane. Une

	Toxine	Sélectivité ionique	Conductance (pS)	Diamètre (nm)	Références
AB	Toxine diphtérique (DT)	Anions*/Cations*	20	>1,8	Donovan <i>et al.</i> , 1981 Hoch <i>et al.</i> , 1985
	Exotoxine A (ETA)	–	30	–	Hoch <i>et al.</i> , 1985 Gambale <i>et al.</i> , 1992
	Toxine tétanique (TeNT)	Cations	30	–	Hoch <i>et al.</i> , 1985 Gambale & Montal, 1988
	Toxine botulique (BoNT)	Cations	12	–	Donovan & Middlebrook, 1986
	Adénycyclase (CyaA)	Cations	4 à 60	–	Benz <i>et al.</i> , 1994 Osikowa <i>et al.</i> , 1999 Knapp <i>et al.</i> , 2008
AB₅	Toxine cholérique (CTx)	Anions	55	2,1	Krasilnikov <i>et al.</i> , 1989
A_nB₇	Antigène protecteur (PA ₆₃)	Cations	165	1,1	Blaustein, 1989 Blaustein & Finkelstein, 1990
	Toxine C2-II	Cations	–	2,7	Blöcker <i>et al.</i> , 2003 Schleberger <i>et al.</i> , 2006
	Toxine iota Ib	Cations	85	>1	Knapp <i>et al.</i> , 1999 Knapp <i>et al.</i> , 2002

Tableau 8 : Propriétés de quelques canaux formés par les toxines à activité intracellulaire. (-) : non déterminé ; * : dépend des conditions expérimentales.

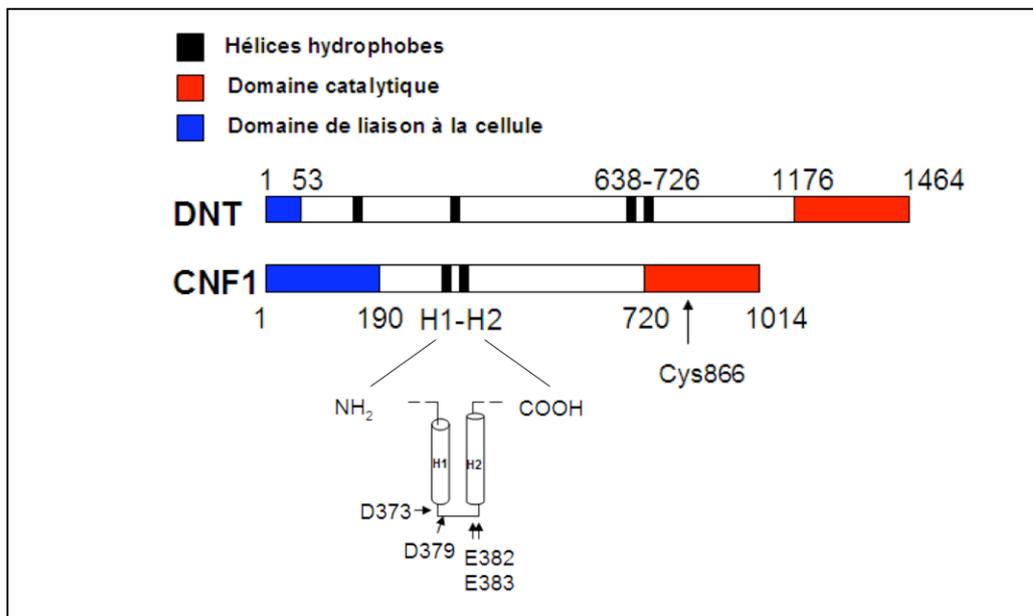


Figure 31 : Domaines fonctionnels des toxines CNF1 et DNT. Représentation schématique des structures de CNF1 et DNT. D'après Pei *et al.*, 2001. Les résidus impliqués dans l'insertion membranaire des hélices H1 et H2 de CNF1 sont indiqués. D'après Buetow *et al.*, 2001.

neutralisation des charges négatives permet ensuite l'insertion des résidus dans la membrane (Montagner *et al.*, 2007).

Les composants B des toxines AB_{RTC} ont la capacité de former des canaux dans les membranes, souvent sélectifs pour les cations. Les différents types de canaux formés par les toxines RTC sont représentés dans le tableau 8. Le passage des domaines C par ces canaux est toujours discuté.

Toxine botulique

Les données sur la translocation des BoNT portent essentiellement sur le sérotype A. La baisse du pH entraîne une diminution de la solubilité du domaine T, ce qui favorise son insertion dans la membrane (Galloux *et al.*, 2008). En effet, le domaine T de la BoNT/A contient une alternance de résidus hydrophobes et de résidus chargés. Leur protonation serait suffisante pour créer des zones hydrophobes favorables à l'insertion. La boucle déstructurée encerclant le domaine C serait également impliquée dans l'insertion de la toxine dans la membrane, puisqu'une construction du domaine T dépourvue de sa boucle, n'interagit avec la membrane qu'une unité de pH plus basique que le domaine T (Galloux *et al.*, 2008).

Toxines dermonécrotiques

Malgré leurs organisations structurales similaires (figure 31), les toxines DNT et CNF1 ont évolué vers des mécanismes différents pour transloquer leur domaine toxique. Sous l'effet du pH acide dans l'endosome tardif, CNF1 expose les hélices hydrophobes H1 et H2 qui permettraient d'ancrer la toxine et d'initier la translocation (Pei *et al.*, 2001). Contrairement à CNF1, la DNT n'est pas sensible au pH acide. Lors de la liaison au récepteur à la surface de la cellule, la DNT est clivée par la furine en C-terminal du résidu Arg44 (Matsuzawa *et al.*, 2004). Certains auteurs ont supposé que ce clivage permet un changement de conformation de la protéine et l'exposition d'hélices hydrophobes (Matsuzawa *et al.*, 2002). La translocation du domaine catalytique semble impliquer les résidus 45-166 qui correspondraient à l'équivalent du domaine de translocation des toxines AB_{RTC}.

3.2. Pentamère B des toxines AB₅

Toxine cholérique et enterotoxines apparentées

Des observations sur bicouches lipidiques ont montré que la CTx forme des canaux sensibles au potentiel de membrane (tableau 8), et que le canal est formé uniquement par le composant B (Krasilnikov *et al.*, 1991). Les composants B de la CTx et des toxines LT isolées sont capables d'atteindre les citernes du Golgi (Parton, 1994). Le composant B-A₂ semble se dissocier du composant A₁ sous l'action de la PDI, qui possède à la fois une propriété de réarrangement des ponts disulfure et une propriété d'action sur le repliement des protéines (Tsai *et al.*, 2001). La PDI catalyse la réduction du pont disulfure entre la cystéine 187 du segment A₁ et la cystéine 199 du segment A₂, et forme un intermédiaire transitoire avec le segment A₁. Cet intermédiaire doit ensuite être oxydé pour pouvoir être libéré dans le RE puis transloqué. La protéine Ero1, à activité oxydase, a été identifiée comme responsable du détachement de A₁ en oxydant le pont disulfure de l'extrémité C-terminale de la PDI (Tsai & Rapoport, 2002), libérant ainsi la sous-unité A₁. Ainsi, le composant B des toxines CTx et LT n'intervient pas lors de la translocation du segment A₁. Cependant, il assure la vectorisation de A₁ à son compartiment de destination.

Toxine pertussique

Les domaines de la PTX impliqués dans la translocation n'ont pas été déterminés avec précision. Le composant A (ou sous-unité S₁) est capable de se lier à des bicouches lipidiques (Hausman & Burns, 1992). Ceci suggère que S₁ interagit directement avec la membrane et dirige sa propre translocation, le pentamère B ne jouant peut être aucun rôle dans cette étape. Cette hypothèse est en accord avec des expériences de transfection dans des cellules CHO du gène codant pour S₁ fusionnée à un peptide contenant des sites de N-glycosylation, et montrent que le peptide est glycosylé. La sous-unité S₁ atteint donc le RE (Hazes & Read, 1997 ; Veithen *et al.*, 2000 ; Castro *et al.*, 2001). L'équipe de Read (1996) a proposé un modèle dans lequel la sous-unité S₁ se dissocie de l'oligomère B dans le RE et est transloquée sans l'aide du composant B. Ce modèle est basé sur la structure cristallographique du complexe PTX-ATP (Hazes *et al.*, 1996). Les charges négatives des trois phosphates de l'ATP déstabilisent les interactions entre les charges négatives de l'extrémité C-terminale de S₁

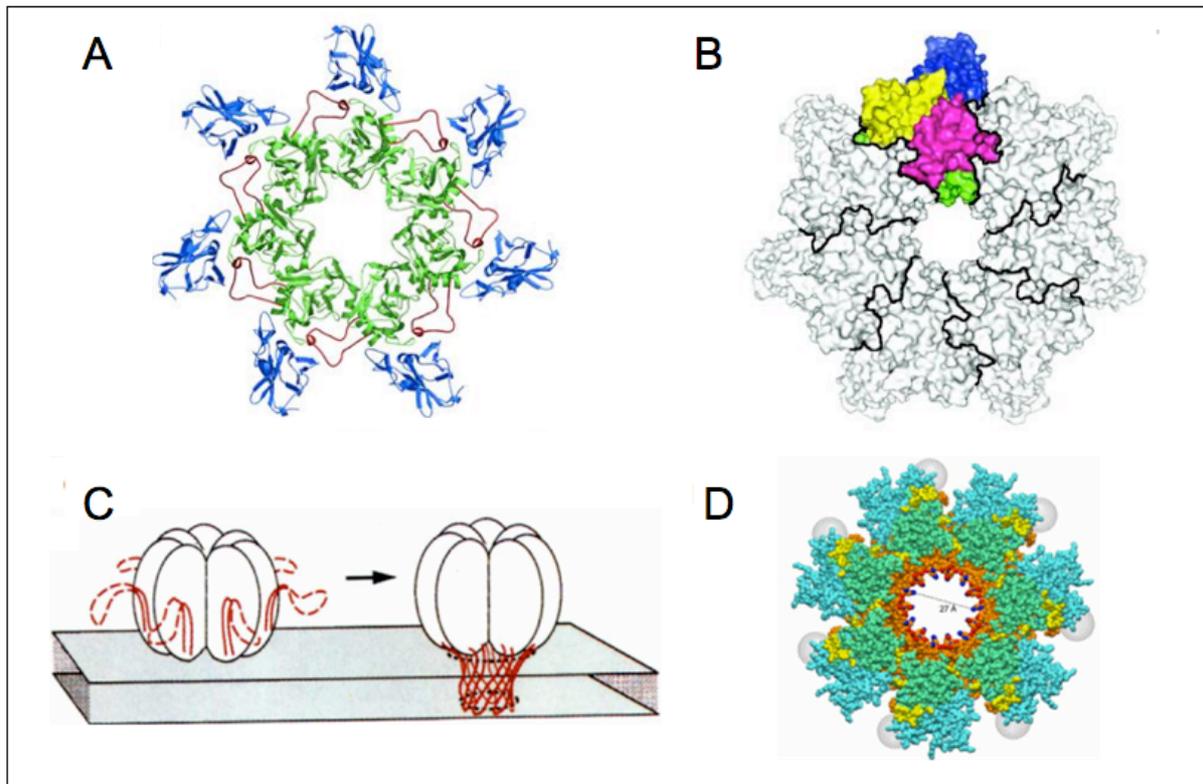


Figure 32 : Structures des heptamères formés par la toxine du charbon et la toxine C2-II. (A) Prépoire heptamérique ($(PA_{63})_7$) (vue axiale). Seuls les domaines 2 (vert) et 4 (bleu) sont représentés d'après la structure du $(PA_{63})_7$ à 3,6 Å. La boucle flexible 2 β 2-2 β 3 du domaine 2 est représentée en rouge. (B) Détail d'un monomère de PA_{63} dans l'heptamère $(PA_{63})_7$. Domaine 1 : rose, domaine 2 : vert, domaine 3 : jaune, domaine 4 : bleu. Le domaine 2 est luminal alors que les domaines 3 et 4 sont situés dans la partie externe de l'heptamère. D'après Lacy *et al.*, 2004. (C) Transition structurale prépoire/pore chez la toxine du charbon. Les sept boucles 2 β 2-2 β 3 s'associent pour former un tonneau β de 14 brins. D'après Petosa *et al.*, 1997. (D) Modèle de l'heptamère formé par C2-II à partir d'une superposition avec la structure de l'heptamère $(PA_{63})_7$. Les sites de liaison du composé C2-I sont représentés en jaune et déduits de la structure de l'heptamère de $(PA_{63})_7$. Domaine D1' : vert, D2 : orange, D3 : bleu, D4 : gris clair.

et le pentamère B. Il en résulte une déstabilisation des interactions S₁/pentamère puis à leur détachement. Étant donné que le RE est le seul compartiment, en plus du cytosol, où l'ATP est disponible, les auteurs suggèrent que cette dissociation ait lieu dans le RE.

Toxine de Shiga

Les phénomènes ayant lieu dans le RE chez la STx ne sont pas encore connus, mais plusieurs auteurs s'accordent sur l'hypothèse d'une analogie avec la CTx. Une fois dans le RE, le composant B n'est relié au composant A que par un pont disulfure. La PDI pourrait alors jouer le même rôle de réduction du pont que dans le cas de la CTx (Tsai *et al.*, 2001 ; Tsai & Rapoport, 2002)

Le rôle du composant B chez les toxines AB₅ est donc de vectoriser la toxine vers son compartiment de destination. Ceci permet l'utilisation du composant B comme un traceur cellulaire non toxique mais aussi comme vecteur de substances thérapeutiques en recherche biomédicale.

3.3. Heptamère B des toxines A_nB₇

Le pH acide rencontré dans l'endosome déclenche un changement de conformation du composant B des toxines binaires, conduisant à un pore heptamérique inséré dans la membrane. La majorité des études portent sur le pore translocateur formé par le composant B du charbon (PA₆₃)₇. Le mécanisme de translocation des toxines iota, VIP, CST et C2 est moins connu. Toutes les sous-unités des composants B de ces toxines nécessitent un clivage en N-terminal par des protéases à sérine (Barth *et al.*, 2004), libérant un fragment de 20 kDa pour s'oligomériser. Seule la structure cristallographique du pré-pore formé par le PA₆₃ a été déterminée (figure 32 A&B), en solution à 4,5 Å (Petosa *et al.*, 1997) puis à 3,6 Å (Lacy *et al.*, 2004), et en complexe avec le domaine von Willebrand de CMG2 à 4,3 Å. Les structures des heptamères du PA₆₃ et de C2-II formant le pore compétent ont été déterminées par modélisation (figure 32D et Nguyen *et al.*, 2004).

Toxine du charbon

Les structures du pré-pore et du PA₆₃ ont révélé la possible implication de la boucle 2β2-2β3 au niveau de chaque PA₆₃ dans la formation d'un pore en tonneau β de 14 brins, similaire à celui de l'alpha-toxine de *Staphylococcus aureus*. En effet, dans la structure du pré-pore, les boucles 2β2-2β3 sont prises en sandwich entre les domaines 2 et 4 de la sous-unité voisine. Un mouvement de cette boucle est requis pour se positionner à la base de l'heptamère (Lacy *et al.*, 2004) (figure 32C). La protonation de résidus Glu et Asp semble impliquée dans le changement de conformation pré-pore-pore lors de la baisse du pH (Wimalasena *et al.*, 2007). La nouvelle conformation est une structure appelée « pore », d'environ 15Å de diamètre. La structure du pré-pore formé par le complexe toxique du charbon a été déterminée à 4,5 Å (Lacy *et al.*, 2004). En revanche, la structure du pore formé par PA₆₃ n'est pas déterminée, mais a été prédite à partir des structures aux rayons X du PA monomérique (Lacy *et al.*, 2004) et de l'heptamère formé par l'α-hémolysine de *Staphylococcus aureus*. Le modèle obtenu est compatible avec des travaux de mutagenèse et d'étude de la conductance du pore (Nguyen, 2004).

Autres toxines binaires

Les connaissances des mécanismes de translocation des autres toxines binaires sont moins abouties que pour la toxine du charbon.

Contrairement au PA₈₃ qui peut être activé par clivage protéolytique, soit en solution par des protéases à sérine, soit à la surface des cellules par la furine ou des enzymes apparentées, les composants Ib et C2-II sont clivés exclusivement en solution par des protéases à sérine (Barth *et al.*, 2004).

De manière remarquable, les composants CSTb et Ib sont interchangeables, c'est-à-dire capables de transloquer le composant enzymatique de l'autre (Perelle *et al.*, 1997). À l'inverse, le composant C2-II transloque uniquement le composant enzymatique C2-I. Ceci suggère que

la structure du canal formé par C2-II diffère considérablement de celles formées par Ib et CSTb (Popoff *et al.*, 1989).

La structure du pré-pore formé par le composant de translocation et de liaison de la chaîne C2-II n'a pas été déterminée par cristallographie, mais modélisée à partir de la structure du pré-pore PA₆₃ (Schleberger *et al.*, 2006), et notamment à partir de l'étude des homologies de séquences des domaines D1', D2 et D3 de C2-II avec les domaines correspondants du PA₆₃ (figure 32D). La faible homologie entre les domaines de liaison à la membrane n'a pas permis d'intégrer le domaine D4 au modèle.

Ainsi, chez des toxines de type A_nB₇, les composants B possèdent de fortes similarités structurales et forment un pore heptamérique sélectif aux cations. Ce pore interagit avec le composant A et favorise sa translocation. Cependant, excepté pour la toxine du charbon, le passage des composants A à travers le pore n'est pas démontré.

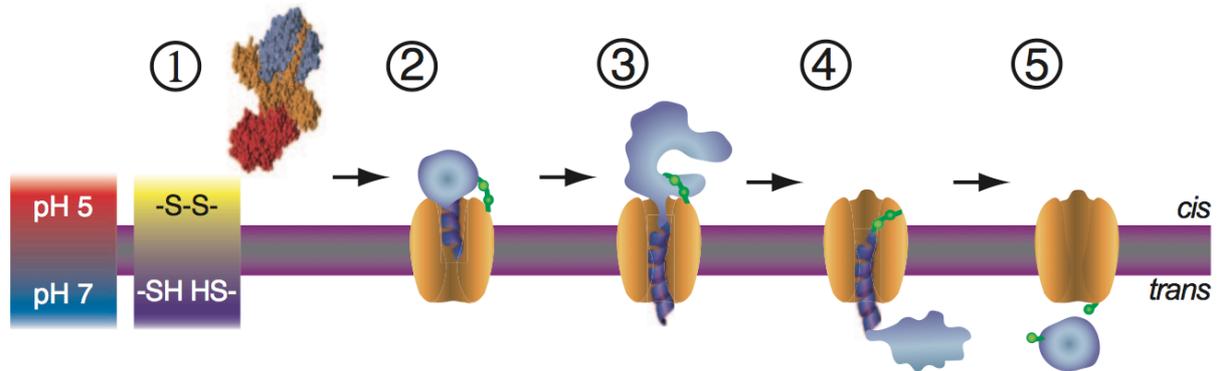


Figure 33 : Modèle de translocation du domaine catalytique de la BoNT à travers son composant B. (1) Structure cristallographique de la BoNT/A avant l'insertion dans la membrane, (2) Insertion de la BoNT/A dans la membrane, (3) et (4) étapes transitoires de translocation dans la membrane, (5) étape de libération du composant A dans le cytosol. Les conditions expérimentales miment la membrane des endosomes et leur environnement aqueux. D'après Fisher & Montal, 2007.

4. Passage du composant A à travers la membrane

Le composant B assiste la translocation du composant A. Cependant, cette machinerie moléculaire n'est pas toujours suffisante. En effet, des facteurs autres que le composant B sont souvent requis, comme l'état de repliement du composant A et la présence de facteurs cellulaires.

4.1. Toxines AB_{RTC}

La grande majorité des données sur la translocation du domaine C des toxines AB_{RTC} a été obtenue pour la DT. Elles sont détaillées dans le Chapitre III.

Toxine botulique

L'équipe de Montal a montré que les deux composants de la BoNT/A sont enfouis dans la bicouche lipidique à pH acide (Koriazova & Montal, 2003) et a émis l'hypothèse que le complexe composant A/composant B est une structure dynamique. Le composant B préviendrait l'agrégation du domaine C à pH acide dans l'endosome *via* des interactions hydrophobes. Ceci permettrait de maintenir l'état partiellement déplié pendant la translocation. Le composant B agit donc comme un canal et une chaperone transmembranaire pour la protéase. Il assure ainsi une conformation du domaine C compétente pour la translocation de l'endosome au cytosol (Koriazova & Montal, 2003 ; Fisher & Montal, 2006).

Le domaine C de la BoNT/A possède une structure globulaire de dimensions estimées à 55Å x 55Å x 62Å (Smart *et al.*, 1997 ; Oh *et al.*, 1999a) qui ne permet pas son passage à travers le canal de diamètre 15Å formé par le composant B (Lacy *et al.*, 1998). Les changements de structure des deux composants à pH neutre et à pH endosomal ont été suivis par dichroïsme circulaire (Koriazova & Montal, 2003). À pH 5, le contenu en hélices du composant A diminue, accompagné d'une détection de canaux ioniques par des techniques électrophysiologiques, ce qui traduit un domaine enzymatique compétent actif. À pH 4.5, le contenu en hélice augmente sans toutefois observer de canaux ioniques et d'activité protéasique. Ainsi, la perte de structure secondaire, c'est-à-dire une conformation non repliée

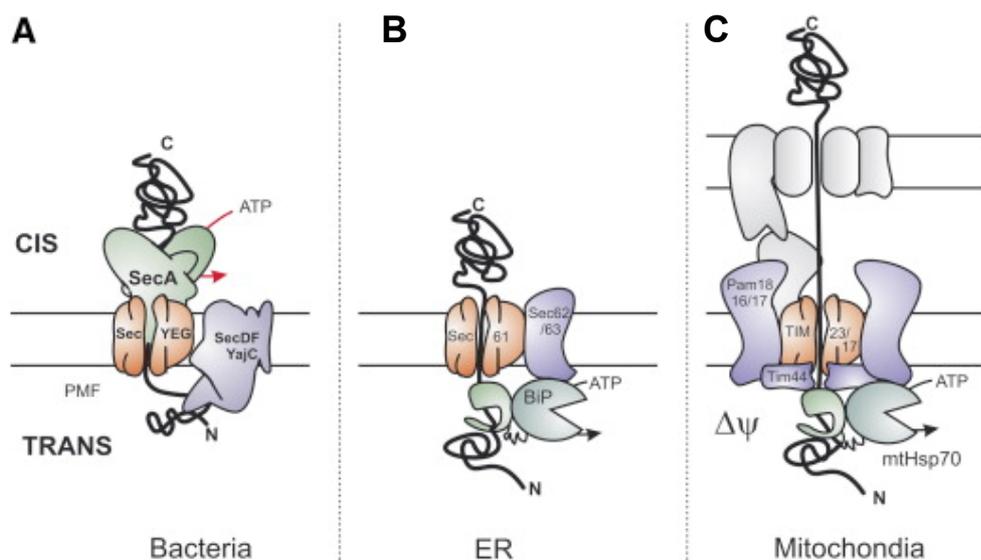


Figure 34 : Protéines impliquées dans la machinerie Sec suivant leur localisation membranaire. (A) Système de translocation dans la bactérie *E. coli* (SecYEG/SecA), (B) dans le reticulum endoplasmique (Sec61 $\alpha\beta\gamma$ /BiP), (C) dans la mitochondrie (TOM-TIM/mtHsp70). En rouge, le canal de translocation ; en vert, les protéines moteurs ; en bleu, les autres protéines associées. D'après Tomkiewicz *et al.*, 2007.

	Protéine motrice	Energie	Localisation	Protéines du canal Sec	Autres protéines
Bactérie	SecA	ATP, PMF	<i>Cis</i>	SecYEG	SecDF(yajC)
Réticulum endoplasmique	BiP	ATP, PMF	<i>Trans</i>	Sec61 $\alpha\beta\gamma$	Sec62/63 BAP GR170
Mitochondrie	mtHsp70	ATP, $\Delta\psi$	<i>Trans</i>	Tim23/17	Tim44, Pam18/16/17 Mge1

Tableau 9: Caractéristiques des systèmes de translocation post-traductionnels. D'après Tomkiewicz *et al.*, 2007.

du composant A, corrèle avec la détection de canaux et l'activité protéase. Les auteurs ont émis l'hypothèse qu'à pH 4,5, le domaine C s'insère dans les membranes mais sa conformation bloque le canal, ne permettant donc pas de le détecter (figure 33).

L'implication de facteurs cellulaires dans la translocation des toxines AB_{RTC} a essentiellement été étudiée pour la DT. L'hélice TH1 de la DT contient un motif appelé T1 de 10 acides aminés qui interagit lors de la translocation avec un complexe cytosolique de translocation, constitué notamment des protéines Hsp90, β -COP, et thioredoxine réductase 1. L'implication de ces facteurs cytosoliques dans la translocation est décrite dans le chapitre III. Le pH acide endosomal est un facteur essentiel pour permettre la translocation chez les toxines AB_{RTC}. Le gradient de pH endosome/cytosol constitue la force énergétique de translocation chez la DT et la BoNT/A. Dans le cas de l'ETA, ce gradient est nécessaire mais insuffisant pour permettre la translocation du domaine C (Taupiac *et al.*, 1996) qui nécessite un mécanisme dépendant de l'ATP. Le mécanisme est donc opposé à la DT, qui nécessite un gradient de pH mais pas l'hydrolyse directe de l'ATP. Chez l'ETA, l'acidification du pH est donc un facteur cellulaire qui intervient en amont de la translocation, probablement dans les changements de conformation de son domaine T.

4.2. Toxines AB₅

Le composant B des toxines AB₅ n'intervient pas dans le mécanisme de translocation (Chapitre II,3.2). Ces toxines utilisent des machineries cellulaires impliquées dans la translocation de protéines nouvellement synthétisées. La prise en charge des segments A₁ des toxines AB₅ commence à être comprise et fait intervenir des protéines du RE.

Utilisation de la machinerie Sec

La machinerie Sec est impliquée dans l'exportation de protéines nouvellement synthétisées dans le cytoplasme vers la membrane externe ou le périplasma chez les bactéries ou vers la membrane du RE chez les eucaryotes. Les néo-protéines portent une séquence signal en N-terminal qui permet la reconnaissance de la machinerie Sec. La machinerie Sec se compose, quelle que soit sa localisation, de deux éléments (figure 34 et tableau 9) :

le translocon Sec (ou « protéine du canal ») et une protéine moteur (ou « translocase »). La translocation des protéines par la voie Sec est dépendante à la fois de l'hydrolyse de l'ATP et d'une force proton-motrice, dépendante du gradient de pH et du potentiel de membrane. Elle nécessite aussi la participation de nombreuses protéines, notamment des chaperones (pour revue voir Tomkiewicz *et al.*, 2007). La protéine constituant le canal est fortement conservée chez les organismes, alors que les protéines motrices diffèrent de par leur structure, leur mécanisme d'action et leur localisation. Dans la bactérie, la protéine moteur est SecA et dirige la translocation *cis* vers *trans*, alors que l'importation des protéines du RE chez les eucaryotes a lieu par la protéine BiP situé côté *trans* (figure 34).

La machinerie Sec est également empruntée dans la voie de retro-translocation de protéines mal repliées et destinées à la dégradation (figure 19). Elles sont « retro-transloquées » dans le cytosol puis ubiquitinées au niveau des résidus lysines dans le cytosol où elles vont être dégradées par le protéasome.

Toxine cholérique

Le composant enzymatique des toxines AB₅ est généralement stable. La translocation à travers le pore de Sec61p nécessite donc le dépliement du domaine catalytique. Des travaux montrent que des extraits de lumen de RE favorisent le dépliement partiel du composant A₁ de CTx (Tsai *et al.*, 2001). Le facteur de dépliement identifié est la PDI. L'ensemble A₁/PDI est dirigé vers le lumen du RE pour être transloqué à travers la membrane. En effet, le segment A₁ seul a une faible affinité pour les protéines du RE (Tsai & Rapoport, 2002). Le composant A₁ interagirait avec des protéines du RE impliquées dans le système ERAD (Werner *et al.*, 1996 ; Teter & Holmes, 2002 ; Tsai & Rapoport, 2002). La translocation de A₁ dans le cytosol est assurée par le complexe Sec61p (Hazes & Read, 1997 ; Schmitz *et al.*, 2000). Une fois dans le cytosol, le segment A₁ n'est pas dégradé par le protéasome puisque sa séquence est pauvre en lysines qui sont des sites d'ubiquitination et des sites de dégradation par le protéasome. Une étude récente a montré que le segment A₁ subit cependant une dégradation indépendante de l'ubiquitine, probablement dépendante d'autres protéases cytosoliques (Teter *et al.*, 2002).

Toxine de Shiga

Le mécanisme de translocation de la sous-unité A₁ n'est pas connu. Par analogie avec la ricine et la CTx (Wesche *et al.*, 1999 ; Simpson *et al.*, 1999 ; Schmitz *et al.*, 2000) qui interagissent avec le complexe Sec61p, la sous-unité A₁ de la STx pourrait être également transloquée par cette machinerie.

Le domaine A₁ de la toxine I de type Shiga contient 251 résidus et porte un segment hydrophobe dans sa partie N-terminale (224-242), au niveau de la boucle clivée par la furine. Des études suggèrent que ce fragment hydrophobe est impliqué dans la retro-translocation de A₁ (Saleh *et al.*, 1996). En effet, des domaines semblables ont été identifiés dans les composants A₁ de Stx et des toxines de type Shiga, mais aussi dans d'autres protéines qui inactivent les ribosomes (abrine, ricine...). Les travaux de La Pointe (2005) montrent que le mécanisme de translocation ne repose pas sur la reconnaissance d'une séquence peptidique spécifique mais sur un élément moins spécifique comme l'exposition d'une séquence mal repliée ou d'une séquence hydrophobe. La comparaison des séquences des sous-unités A₁ dans d'autres toxines retrouvées dans le RE conforte cette hypothèse puisque aucune séquence similaire n'est retrouvée dans les autres toxines clivées par des protéases et passant par le RE (LaPointe *et al.*, 2005). Le fragment 1-239 de la Stx serait stable dans la toxine et ne constituerait donc pas un substrat pour les chaperones. L'ajout du résidu Leu240 déstabiliserait le fragment qui deviendrait alors un substrat pour les chaperones du RE. Chez la STx, le dépliement du composant A₁ est favorisé par deux facteurs protéiques, Bip et HEDJ (« human ER-associated DnaJ ») qui sont respectivement une protéine de la famille des Hsp70 et une protéine de la famille des DnaJ. Des travaux de mutagenèse introduisant des résidus lysines dans le composant A de la ricine ont montré une dégradation préférentielle du domaine catalytique et une diminution de toxicité (Deeks *et al.*, 2002). Ceci suggère que de faibles occurrences de résidus lysines dans les sous-unités catalytiques empruntant la machinerie Sec61p permet d'éviter la dégradation par le protéasome. Il apparaît que les toxines empruntant la voie de translocation dans le RE contiennent très peu de résidus lysine, alors que les toxines de type AB_{RTC}, qui sont transloquées depuis l'endosome, ont un contenu classique en lysines (Hazes & Read, 1997).

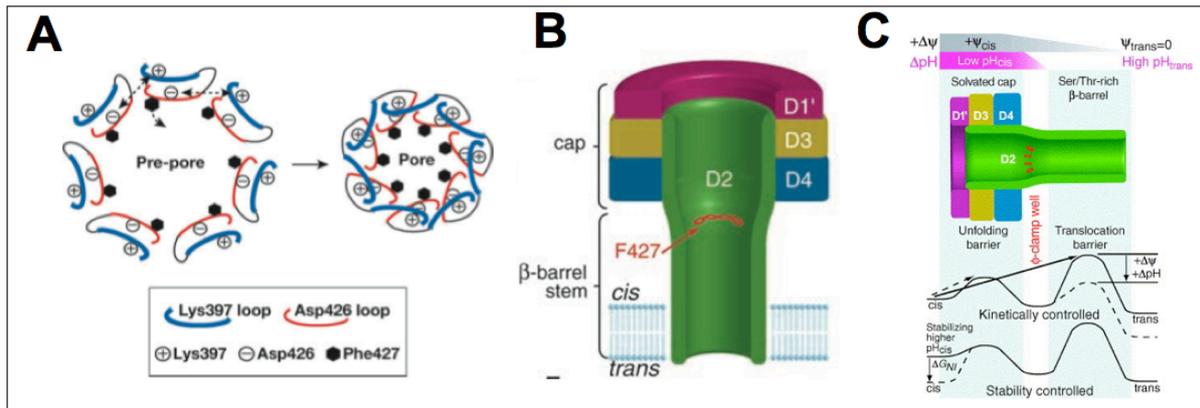


Figure 35 : Organisation de l'heptamère formé par le complexe toxique du charbon, et rôle dans la translocation. (A) Positions des résidus Phe427 dans la structure du pré-pore et du pore formés par le complexe toxique du charbon. La conversion pré-pore-pore est due aux interactions entre les chaînes latérales des résidus Lys397 et Asp426. D'après Young & Collier, 2007. (B) Représentation hypothétique du pore PA₆₃. La partie membranaire est formée de 14 brins β. Domaine D1' (rouge), domaine D2 (vert), domaine D3 (jaune), domaine 4 (bleu). (C) Modèle des phénomènes énergétiques à l'intérieur de l'heptamère PA₆₃. L'anneau de Phe427 (φ clamp) constitue une barrière énergétique aux peptides exposant des régions hydrophobes. Le gradient électrochimique (en haut en gris) chute d'un tiers de sa valeur côté *cis* de l'anneau de Phe. Le gradient de pH (en haut en rouge) est conservé côté *cis*. Cette structure constitue donc un entonnoir qui sépare deux compartiments, l'un acide, l'autre au pH cytosolique. Les conditions acides dans le compartiment *cis* peuvent déstabiliser la protéine et favoriser son dépliage. Soit la variation de pH du côté *trans*, soit la variation du gradient électrochimique peut réduire la barrière énergétique de translocation. La translocation peut être limitée en termes cinétiques par la barrière de translocation (flèche) mais cette barrière est réduite par des grandes variations de pH et de potentiel électrochimique (ligne pointillée). La translocation est certainement dépendante de la stabilité du peptide. D'après Krantz *et al.*, 2006.

Les toxines de type AB₅ ne possèdent pas leur propre machinerie de translocation et utilisent des facteurs cellulaires, tels les protéines chaperones du RE pour favoriser leur dépliement et la machinerie Sec pour atteindre le cytosol. Ceci est possible grâce à la séquence du segment A₁ très pauvre en lysines, qui leur permet d'éviter la voie de dégradation du RE.

4.3. Toxines A_nB₇

Une étude sur la translocation de la protéine de fusion entre la séquence N-terminale de liaison de LF (LF_N) et le domaine C de la DT à travers le pore (PA₆₃)₇ a montré que le pore n'est pas passif, mais qu'il catalyse la translocation (Wimalasena *et al.*, 2007). En effet, la mutation Phe427Ala inhibe fortement l'efficacité de translocation de la protéine de fusion. Cette étude suggère que le résidu Phe427 est impliqué dans la translocation et que la nature hydrophobe de ce résidu ainsi que la géométrie de sa chaîne latérale sont fondamentales pour la translocation. Dans la structure cristallographique du pré-pore, les sept Phe427 appartenant au domaine 2 font face au lumen et forment un anneau à l'intérieur du pore de translocation (figure 35A). Le fonctionnement de cet anneau de phenylalanines n'est pas encore bien compris. Des expériences sur des membranes planes ont montré que la translocation de LF_N entraîne un blocage de la conduction ionique du pore, alors qu'une mutation Phe427Ala entraîne une succession d'états transitoires de conductance. L'anneau de Phe semble fixer de manière étroite l'extrémité N-terminale de LF_N. L'équipe de Collier a montré que la nature des interactions entre les phenylalanines et LF_N sont hydrophobes et non spécifiques. Les auteurs ont donc proposé que l'anneau de Phe agit comme une chaperone, en se liant aux régions hydrophobes exposées lors du dépliement de LF_N (Krantz *et al.*, 2005) (figure 35 B&C). Les auteurs suggèrent que l'interaction de l'anneau de Phe avec les segments hydrophobes de ses substrats réduit l'énergie nécessaire à leur dépliement. Enfin, l'anneau de Phe formerait un entonnoir autour du peptide piégé, bloquant la conductance, et préservant localement le gradient de pH dans le pore formé par le PA₆₃ (figure 35C).

L'implication de facteurs cellulaires dans la translocation des toxines A_nB_7 a essentiellement été étudiée pour le complexe toxique du charbon. Le motif T1 identifié dans l'hélice TH1 de la DT est également présent dans les régions N-terminales des facteurs LF et EF du complexe du charbon. L'équipe de J. Murphy a étudié les interactions de la protéine de fusion LF_N -domaine C de la DT, lors de la translocation à travers le pore $(PA_{63})_7$, en présence et absence de certaines protéines du complexe COPI (Tamayo *et al.*, 2008). Les résultats montrent que les protéines β -COP et ζ_1 -COP améliorent très significativement la translocation. De même, le pH est un facteur essentiel lors du mécanisme d'intoxication par les toxines binaires, en permettant la réorganisation des sous-unités B en pore de translocation. Un gradient de pH supérieur à une unité de pH est requis pour une translocation de ces toxines (Abrami *et al.*, 2003).

Il est admis que le gradient électrochimique dans l'endosome est positif et d'amplitude très variable (Van Dyke *et al.*, 1985 ; Rybak *et al.*, 1997). Les potentiels généralement appliqués sur des bicouches planes (0-20 mV) donnent sur des modèles membranaires des résultats similaires aux observations sur cellules, ce qui suggère que le potentiel de la membrane endosomale se situe vers cette valeur. Très peu d'études ont défini son rôle et sa relative importance par rapport au gradient de pH. Pour le complexe du charbon, la translocation serait majoritairement dirigée par le gradient de pH, et le gradient électrochimique favoriserait l'insertion de la région N-terminale cationique des facteurs LF et EF dans le pore formé par PA_{63} lors des étapes précoces de la translocation (Young & Collier, 2007).

Autres toxines binaires

Contrairement aux autres toxines de cette famille, la toxine iota nécessite un clivage protéolytique d'un fragment de 9 à 11 acides aminés en N-terminal de son composant Ia pour être actif (Gibert *et al.*, 2000). La stoechiométrie de liaison des composants A des toxines iota, C2 et CST n'est pas connue.

Chapitre III

Toxine diphtérique

La diphtérie est une maladie causée par certaines souches lysogènes de la bactérie *Corynebacterium diphtheriae*, infectées par le corynephage β . Ce phage porte le gène *tox* (Gill *et al.*, 1972), codant pour la DT. La transcription du gène est sous le contrôle d'un promoteur dépendant du fer (Murphy *et al.*, 1978). La carence en fer conduit à l'expression de la DT. Cette protéine est l'unique agent responsable de la pathologie. La membrane vert-de-gris, caractéristique de l'infection, est visible sur la langue et le pharynx de nombreux patients. Elle est à l'origine du nom de la pathologie (du grec *diphthêra*, membrane).

La DT fait appartient à la famille des toxines bactériennes à activité intracellulaire (Menestrina *et al.*, 1994 ; Falnes & Sandvig, 2000). Elle est composée de trois domaines structuraux, chacun portant une fonction biologique distincte dans le mécanisme d'intoxication. Le domaine R assure la spécificité cellulaire de la toxine et le domaine T participe au transfert du domaine C dans le cytosol. L'activité catalytique, responsable de la cytotoxicité de la DT, conduit à l'arrêt de la synthèse des protéines. Les cellules infectées libèrent leur contenu cellulaire, dont le fer, pris en charge par *C. diphtheriae*.

1. De la pathologie à la cristallographie de la DT

La diphtérie a été découverte en 1820. Elle est caractérisée par des lésions membranaires localisées sur la langue, le pharynx et de nombreux tissus adjacents. Son agent pathogène a été découvert par Klebs en 1883 et isolé un an plus tard. En 1888, Roux et Yersin ont démontré que les filtrats de culture de *C. diphtheria* contenaient une protéine thermosensible qu'ils nommèrent toxine diphtérique. En 1891, von Behring et Kitasato ont traité avec succès un enfant en lui injectant le sérum d'un animal immunisé avec la toxine. En 1913, Theobald Smith proposa l'utilisation d'un mélange de toxine et d'antitoxine pour immuniser l'homme contre la diphtérie. En 1923, Ramon découvrit que la toxine traitée au formol perdait sa toxicité mais conservait son immunogénicité. La toxine traitée, appelée anatoxine diphtérique, est encore utilisée pour la vaccination contre la diphtérie. Le traitement de la diphtérie se réduit aujourd'hui à des injections sous-cutanées de sérum de cheval immunisé. Avant le traitement par sérothérapie, la mortalité était de 60%. Elle est aujourd'hui inférieure à 10%. La propagation de la maladie se fait par contagion, soit par contact direct avec le malade, soit par l'intermédiaire d'objets ayant servi à ce dernier.

En 1959, Strauss et Hende ont montré que la DT inhibe la synthèse protéique sur des cultures ou des extraits cellulaires sans qu'il y ait inhibition de la synthèse des ARN (Strauss & Hendee, 1959). Dans les années soixante, Collier et Pappenheimer ont montré que le NAD est nécessaire à cette inhibition et ont identifié le facteur d'élongation-2 (EF-2) impliqué dans la traduction, comme cible intracellulaire de la DT (Collier, 1967). L'activité catalytique de la DT a été caractérisée deux ans plus tard (Honjo *et al.*, 1969).

De nombreuses avancées comme la détermination de la structure de la DT (Choe *et al.*, 1992) ainsi que de nombreuses études biophysiques ont permis de comprendre le mécanisme d'intoxication. Cependant, le mécanisme de translocation du domaine C à travers la membrane reste méconnu.

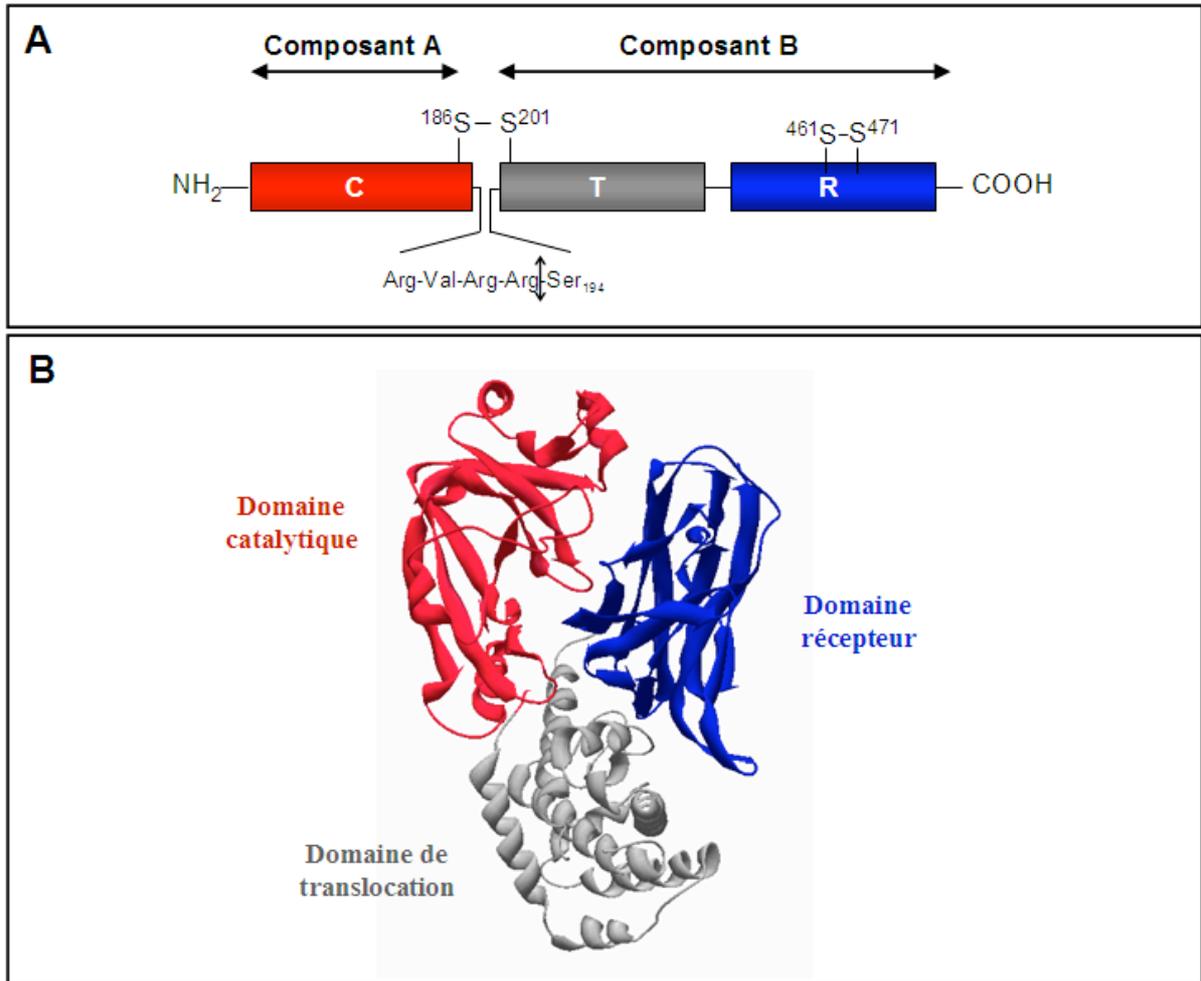


Figure 36 : Structure de la toxine diphtérique. (A) Représentation schématique des trois domaines structuraux de la DT. Le site de clivage de la furine entre les deux fragments A et B est représenté par une flèche. (B) Structure tridimensionnelle de la DT (PDB : 1F0L).

2. Structure et mécanisme d'action de la toxine diphtérique

2.1. Structure de la toxine diphtérique

La structure tridimensionnelle de la DT a été résolue à 2,5 Å en 1992 par cristallographie (Choe *et al.*, 1992), affinée à 2,3 Å en 1994 (Bennett & Eisenberg, 1994) puis à 2 Å (Bennett *et al.*, 1994) et enfin à 1,55 Å (Steere & Eisenberg, 2000). La DT est une toxine de type AB, organisée en 3 domaines structuraux (figure 36). Le fragment A correspond au domaine C et est constitué de sept hélices α et deux feuillets β . Le fragment B comprend le domaine de translocation T et le domaine de liaison au récepteur R, respectivement constitués de neuf hélices α et de neuf feuillets β . La toxine contient quatre cystéines qui forment deux ponts disulfures, C₁₈₆-C₂₀₁ et C₄₆₁-C₄₇₁. Le premier relie le domaine C au domaine T. Le second est intra-caténaire au domaine R.

2.2. Mécanisme d'intoxication de la toxine diphtérique

Le mécanisme d'intoxication d'une cellule eucaryote sensible à la DT se caractérise par une série d'événements qui conduisent à une inhibition irréversible de la synthèse protéique et à la mort cellulaire. Les étapes du mécanisme d'intoxication par la DT sont :

- la liaison de la DT à son récepteur, le proHB-EGF (« heparin-binding epidermal growth factor »),
- le clivage par la furine et l'endocytose par la voie clathrine dépendante,
- le transit de l'endosome précoce à l'endosome tardif *via* des vésicules endocytiques,
- la translocation du domaine C,
- la libération du domaine C dans le cytosol et l'ADP-ribosylation de l'EF-2 en présence de NAD, ce qui conduit au blocage de la synthèse des protéines.

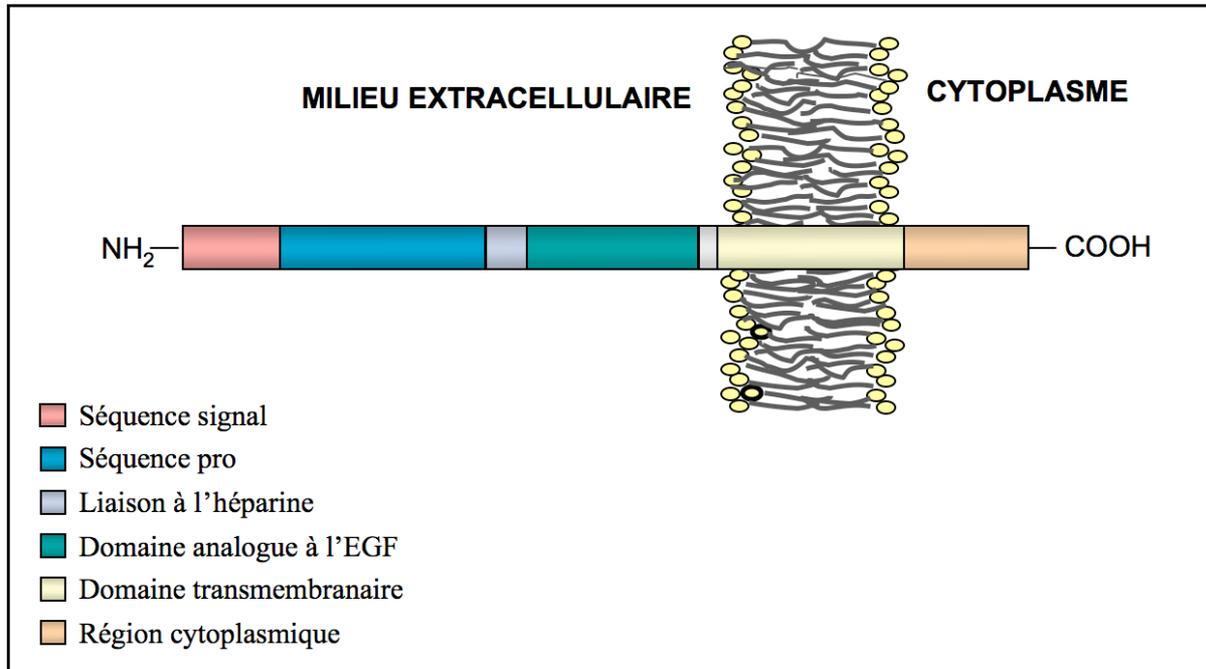


Figure 37 : Représentation schématique du récepteur de la toxine diphtérique, le proHB-EGF.

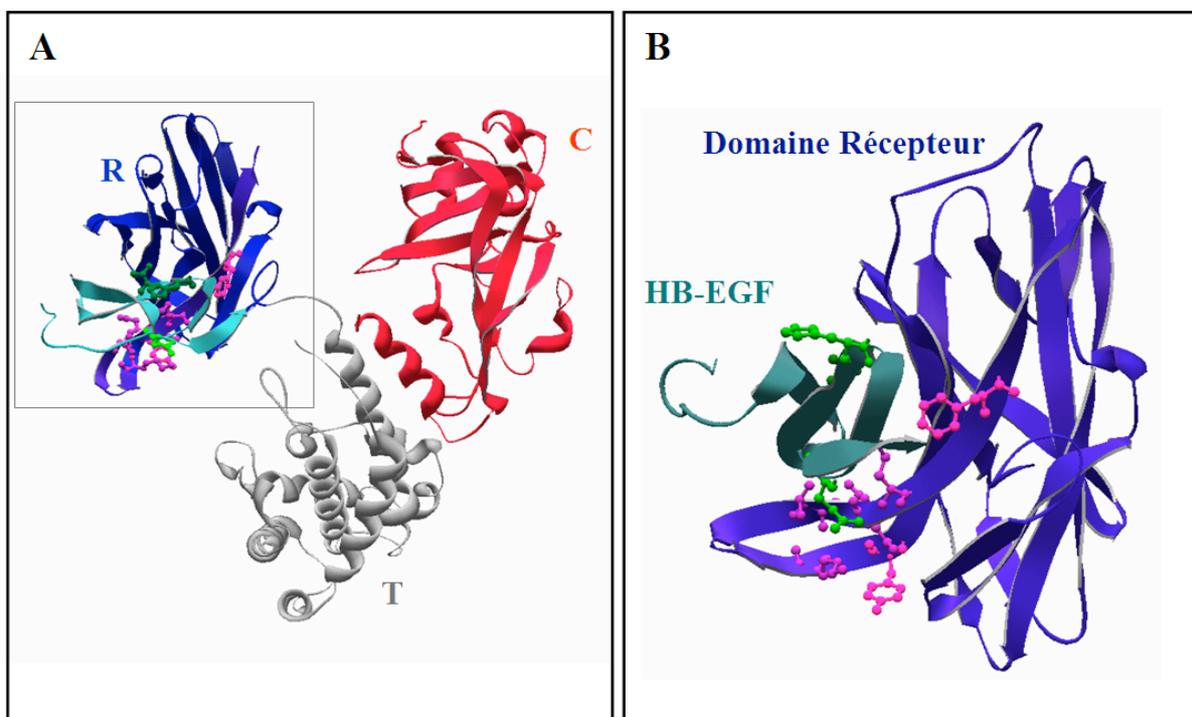


Figure 38 : Interaction du domaine R de la toxine diphtérique avec l'HB-EGF. (A) La DT en interaction avec l'HB-EGF (en bleu clair) est en conformation ouverte (PDB : 1XDT). (B) Localisation des acides aminés impliqués dans la liaison (en rose, résidus de R ; en vert, résidus de l'HB-EGF).

2.2.1. Liaison de la DT à son récepteur

La première étape du mécanisme d'intoxication d'une cellule eucaryote par la DT est la liaison à son récepteur cellulaire spécifique. Le récepteur de la DT a été identifié à la surface des cellules épithéliales de rein de singe Vero. C'est un précurseur membranaire d'un analogue du facteur de croissance de l'épiderme liant l'héparine, le proHB-EGF (Naglich *et al.*, 1992). Il s'agit d'une protéine transmembranaire (figure 37). Elle est clivée pour libérer le facteur de croissance mature HB-EGF, un membre de la famille EGF (Higashiyama *et al.*, 1991). Bien que ce clivage libère une majorité de HB-EGF soluble, une quantité significative de proHB-EGF reste associée à la membrane et fonctionne comme un facteur de croissance (Higashiyama *et al.*, 1995) et comme un récepteur pour la DT (Naglich *et al.*, 1992 ; Iwamoto *et al.*, 1994).

À la surface de la cellule, le proHB-EGF forme un complexe avec d'autres protéines membranaires, dont des protéoglycanes sulfatés de l'héparine et l'antigène de surface CD9 (Iwamoto *et al.*, 1991), qui ont pour effet d'augmenter la capacité du récepteur à lier la DT. Le CD9 appartient à la famille des tetraspans, caractérisée par une organisation en quatre hélices transmembranaires, délimitant deux boucles extracellulaires de tailles inégales. Des expériences de co-précipitation suggèrent que le CD9 n'interagit pas directement avec la DT. Cependant, il semble lier l'HB-EGF (Iwamoto *et al.*, 1994) par la plus longue de ses deux boucles extracellulaires. Les molécules de type héparine se lient au proHB-EGF et entraînent un changement de conformation du domaine, qui augmente l'affinité du récepteur pour la toxine (Shishido *et al.*, 1995).

Plusieurs espèces de mammifères sont sensibles à la DT, mais la souris et le rat sont résistants. La résistance de ces espèces est due à l'absence de récepteurs fonctionnels de la DT (Cha *et al.*, 1998). La comparaison des séquences des HB-EGF humain, murin et simien montre que trois acides aminés I333, I135 et E141 impliqués dans la liaison au récepteur, sont remplacés par d'autres acides aminés dans le récepteur murin (Mitamura *et al.*, 1997). La mutation chez le singe E141H, correspondant à l'HB-EGF de souris, conduit à une diminution d'un facteur 100 de toxicité (Hooper & Eidels, 1996). Inversement, les cellules murines transfectées par le gène codant pour le récepteur simien deviennent sensibles à la DT (Brown *et al.*, 1993).

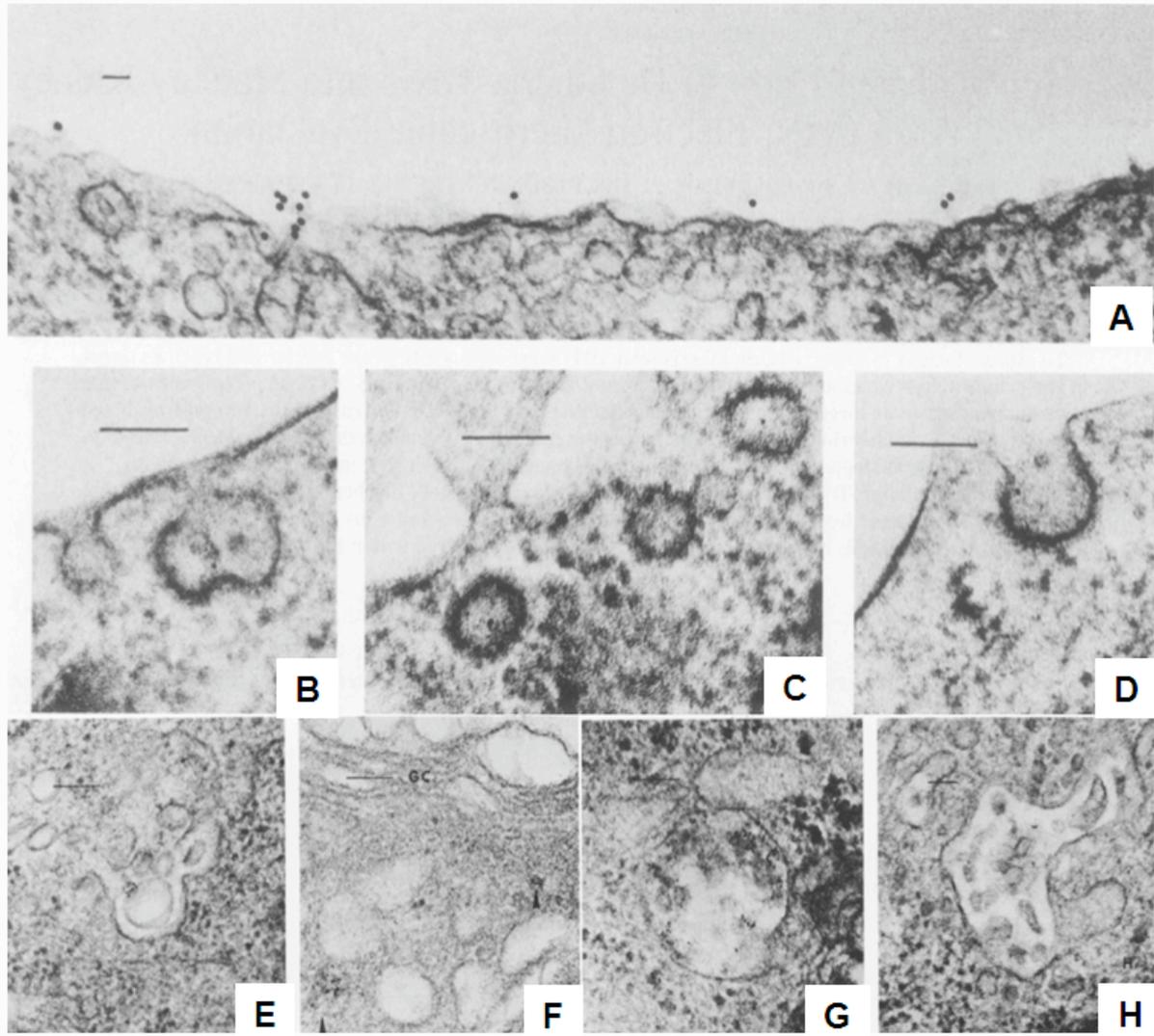


Figure 39 : Trafic intracellulaire de la DT biotinylée (or colloïdal couplé à l'avidine). (A) $t=0$, Distribution des sites de liaison de la DT sur la membrane plasmique. (B, C, D) $t=60s$, la DT est présente dans des invaginations de la membrane et dans des vésicules recouvertes de clathrine. (E) à $t=5$ min, la DT est localisée dans un compartiment amorphe, l'endosome, près du noyau. (F) $t=5$, la DT est dans des vésicules (flèches) proches des citernes de l'appareil de Golgi (GC). (G) $t=30$ min, la DT est présente dans un corps multivésiculaire. (H) $t=30$ min, échantillon incubé en présence de 20 mM de méthylamine. Échelle : 100 nm. D'après Morris *et al.*, 1985.

La liaison de la DT à l'HB-EGF implique la participation de deux feuillets β de 5 et 6 brins du domaine R. Les mutations Y514A, K516A, V523A, N524A, F530A (Shen *et al.*, 1994) et S525F (Greenfield *et al.*, 1987) dans le domaine R ont montré l'implication de ces acides aminés dans la liaison à l'HB-EGF. La figure 38 montre la structure cristallographique du complexe DT/HB-EGF. Pour se lier à l'HB-EGF, le domaine R doit se désolidariser des domaines C et T (Louie *et al.*, 1997) (figure 38A). Il subit une rotation de 180°C autour d'un axe perpendiculaire aux résidus 379-386 reliant les domaines T et R (Kundu & Jernigan, 2004). Cependant, sous cette forme ouverte, la DT peut former des homodimères, incapables de se lier à l'HB-EGF (Bennett & Eisenberg, 1994).

2.2.2. Internalisation de la DT et trafic intracellulaire

Après liaison de la DT à son récepteur, le complexe est endocyté par la cellule (figure 39). L'internalisation est médiée par des vésicules recouvertes de clathrine (Moya *et al.*, 1985). Une expérience de diminution du potassium intracellulaire, connue pour inhiber la formation des puits et l'endocytose par la voie clathrine montre que les cellules sont protégées de la toxine (Moya *et al.*, 1985 ; Sandvig *et al.*, 1985). De plus, des expériences de surexpression d'un mutant de la dynamine incapable de lier le GTP dans des cellules COS-7y montre que les cellules sont protégées de la toxine (Simpson *et al.*, 1998).

Dans les cinq minutes qui suivent la scission des vésicules de la surface membranaire, la toxine est détectée au niveau des endosomes précoces (Morris *et al.*, 1985). En une dizaine de minutes, la DT est adressée *via* des vésicules de transport aux compartiments tardifs de l'endocytose : l'endosome tardif et le lysosome. Le récepteur suit probablement le même chemin (Ronnberg & Middlebrook, 1989) et ne semble pas être recyclé. La DT subit une acidification progressive, qui est de l'ordre de 6-6,5, 5,5-6 et 4,5-5,5 dans les endosomes précoces, tardifs et lysosomes, respectivement (Demaurex, 2002). La baisse du pH pourrait également être à l'origine de la dissociation DT/récepteur, dès pH 6,4 (Brooke *et al.*, 1998). L'acidification entraîne l'interaction de la DT avec la membrane et la translocation du domaine C dans le cytoplasme. L'endosome précoce est le compartiment où la translocation est la plus efficace (Lemichez *et al.*, 1997). L'étape de translocation est un événement limitant. En effet, les molécules de DT internalisées ne transloquent pas toutes leur domaine

C. La translocation d'une seule molécule suffirait à tuer la cellule (Yamaizumi *et al.*, 1978 ; Falnes *et al.*, 2000).

2.2.3. Translocation à travers la membrane

Malgré les nombreuses études menées sur le domaine T de la DT, le mécanisme de translocation est peu connu. Des résultats divergent, notamment l'importance de l'oligomérisation pour la translocation, la nécessité du dépliement du domaine C pour être translocable, l'importance des interactions entre C et T insérés et la relation entre la formation de canaux ioniques et la translocation. Ces divergences proviennent essentiellement des variations expérimentales des systèmes étudiés.

À pH acide, la DT change de conformation vers un état compétent pour l'interaction avec la membrane et la translocation. Ce changement de conformation concerne les trois domaines de la toxine (Tortorella *et al.*, 1995). Plusieurs études montrent que chaque domaine isolé est capable de s'insérer dans les membranes à pH acide (Zhao & London, 1988 ; Quertenmont *et al.*, 1999). Un changement conformationnel du domaine R permet sa dissociation du récepteur (Brooke *et al.*, 1998). Ainsi, la toxine est moins contrainte pour interagir avec la membrane. Le domaine R n'est pas nécessaire à la translocation et peut être remplacé par un domaine de liaison à un autre récepteur (Murphy & vanderSpek, 1995). Le domaine T est indispensable à la translocation du domaine C, et est même suffisant pour induire le passage du domaine C à travers une bicouche lipidique plane (Oh *et al.*, 1999a). Cette observation montre l'importance du domaine T dans le processus de translocation.

2.2.3.1. Isolé, le domaine C n'est pas transloqué

Le mécanisme de translocation du domaine C de l'endosome précoce vers le cytoplasme n'est pas encore résolu et la littérature présente des résultats contradictoires selon le type de membrane utilisé. Toutes les études s'accordent sur l'implication du domaine T dans la translocation, mais à des degrés divers. Certains suggèrent que le domaine T possède la machinerie nécessaire à la translocation du domaine C (Oh *et al.*, 1999a) tandis que d'autres proposent un mécanisme dépendant de l'ATP et de chaperones cytosoliques (Zhan *et al.*, 1995).

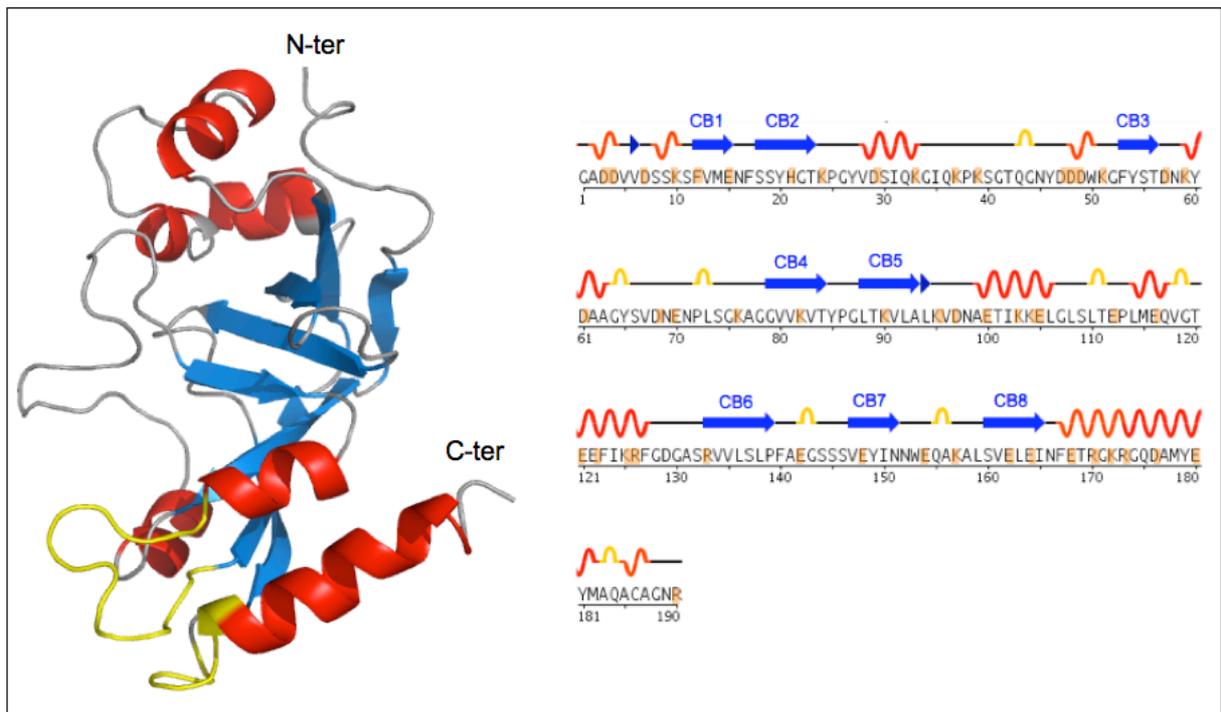


Figure 40 : Structure du domaine catalytique de la DT à pH 5 et séquence (PDB : 1DTP). Les hélices sont représentées en rouge et les brins β (CB) en bleu. Dans la structure, les deux boucles 66-78 et 169-176, dont le positionnement est différent par rapport à leur positionnement dans le domaine C dans la DT observée à pH 7,5, sont représentées en jaune. Les résidus chargés sont surlignés en orange. D'après Weiss *et al.* 1995.

Structure du domaine catalytique isolé

La structure du domaine C isolé (figure 40) a été déterminée à pH 5 à 2,5 Å (Weiss *et al.*, 1995). Cette structure est quasiment identique à celle du domaine C dans la toxine à pH 7,5. La principale différence est le rapprochement des deux boucles 66-78 et 169-176. Ce changement structural semble dû à l'absence du domaine T à proximité puisque qu'aucun résidu protonable à pH 5 ne semble être accessible (Weiss *et al.*, 1995). Le domaine C est composé de sept petites hélices α qui entourent deux feuillets β de 3 et 5 brins. Le repliement global de ce domaine est similaire à celui observé pour l'ETA, bien que leur homologie de séquence soit faible (Allured *et al.*, 1986).

Propriétés en solution

Des expériences de dénaturation thermique et de dénaturation au pH ont montré que le domaine C se déplie partiellement (Blewitt *et al.*, 1985 ; Ramsay & Freire, 1990). Le phénomène est réversible pour le domaine C qui retrouve sa conformation active alors qu'il ne l'est pas pour la toxine entière (Ramsay *et al.*, 1989). Les données de dichroïsme circulaire confirment ces changements structuraux en solution et montrent que le domaine C adopte une structure « molten globule » (MG) (Zhao & London, 1988), caractérisée par une perte de structure tertiaire, la conservation des structures secondaires, et l'exposition au solvant de zones hydrophobes. Ces premiers résultats sur le domaine C isolé, ajoutés au fait que sa structure ne change pas à pH 5 ont conduit à deux hypothèses : (i) dans la DT, à pH acide, le domaine C est déstabilisé et cette conformation facilite l'interaction avec les membranes et donc la translocation, et (ii) T étant plus réactif au pH ($pK_{1/2}^{MG} = 5,3$) (Chenal *et al.*, 2002b) que le domaine C, il interagit avec les membranes avant le domaine C et favorise sa translocation.

Propriétés d'interaction avec les membranes

L'observation de la structure de C montre que certains brins β (CB4, CB5, CB8) présentent une alternance de résidus hydrophiles et hydrophobes, de manière similaire à celle observée dans les structures transmembranaires (Tortorella *et al.*, 1995). De plus, la capacité du domaine C à interagir avec des micelles formées par des détergents suggère que C s'insère

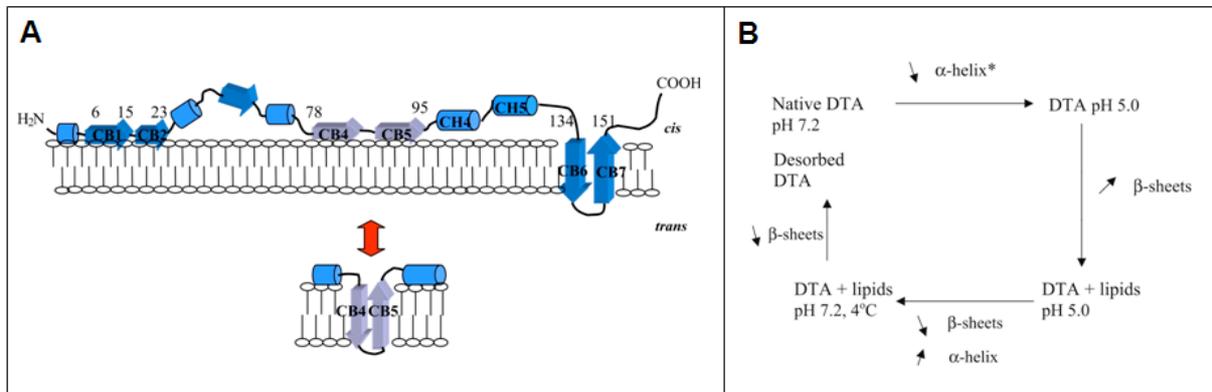


Figure 41 : Modèle d'insertion membranaire du domaine C de la toxine diphtérique à pH 5, proposé par Wolff *et al.*, (2004). (A) Modèle d'insertion du domaine C dans des LUV d'asolectine. Les brins CB4 et CB5 fluctueraient entre une position à la surface de la membrane et une position transmembranaire. Les brins CB6 et CB7 adopteraient une position transmembranaire en épingle β . (B) Changements de structures secondaires observés en FTIR en présence de membranes, lors de l'acidification. D'après Wolff *et al.*, 2004.

dans les membranes, et adopte peut-être des structures transmembranaires. L'interaction du domaine C avec des membranes modèles a été étudiée par les équipes de Cabiaux et London. Des études de digestion protéolytique du domaine C en présence de vésicules anioniques ont conduit l'équipe de Cabiaux à proposer un modèle d'insertion du domaine C à pH 5 (Wolff *et al.*, 2004) (figure 41A), dans lequel le domaine C interagit avec la membrane par trois régions principalement :

- la région 134-151, comprenant les brins CB6 et CB7, adopterait une orientation transmembranaire. Cependant, ces brins contiennent des résidus chargés qui favorisent peu leur orientation transmembranaire. Les auteurs suggèrent que la position membranaire de CB6 et CB7 devient possible en tenant compte de l'oligomérisation de la protéine (Jackson & Mantsch, 1995 ; Tamm & Tatum, 1997) :

- la région 78-95, contenant les brins CB4-CB5 adopterait une position fluctuante entre une position transmembranaire et une position à la surface de la membrane,

- la région 1-23 contenant CB2 et CB3 pourrait s'insérer très superficiellement dans la membrane.

Cependant, ces travaux de Wolff ne prennent pas en compte les possibles changements de conformation engendrés par les digestions protéolytiques, qui peuvent modifier l'insertion membranaire du domaine T. Il est également difficile de conclure sur la position, en solution ou faiblement insérées, des autres régions.

Des expériences de FTIR (« spectroscopie Infra Rouge à Transformée de Fourier ») montrent que l'insertion du domaine C dans les membranes à pH acide s'accompagne d'une augmentation du contenu en feuillet β (figure 41B) (Wolff *et al.*, 2004). Ces résultats sont différents de l'augmentation du contenu en hélices α observée par dichroïsme circulaire sur C isolé (Hayashibara & London, 2005). Cependant, les résultats de FTIR à pH 7 se rapprochent plus de la structure cristallographique que ceux obtenus par dichroïsme circulaire (Bennett & Eisenberg, 1994 ; Bennett *et al.*, 1994). De plus, la nature des lipides utilisés (DOPC/DOPG vs asolectine) et le ratio protéine/lipide utilisé (1:8 vs 1:20 w/w) varient. Combinés, ces facteurs modifient le ratio protéine : vésicule et peuvent jouer sur l'état d'oligomérisation de la protéine et donc sa structure secondaire. Quelques soient les travaux, les changements de structures secondaires lors de l'insertion dans la membrane restent faibles (Hayashibara & London, 2005).

L'équipe de London a étudié la topologie du domaine C en présence de vésicules anioniques (Hayashibara & London, 2005). La fluorescence et l'extinction de fluorescence de groupements bimaire (bromo triméthyl ammonium) greffés à des cystéines introduites par mutagenèse tout le long de la séquence du domaine C ont été étudiées à pH 4,5. Les résultats montrent que le domaine C est inséré dans la région interfaciale de la membrane. Les résultats de cette étude diffèrent légèrement ceux de Wolff *et al.* (2004) puisqu'une insertion superficielle est observée pour les résidus 81 dans CB4, 90-91 dans CB5, 136 dans CB6 et 162-163 dans CB8, ainsi que pour les régions 1-30 en N-terminal et 186 en C-terminal.

Le modèle de London *et al.* (2005) semble plus probable que le modèle proposé par Wolff *et al.* (2004). En effet, le brin CB7 ne possède pas de résidus hydrophobes (figure 40) et diffère donc des brins β observés dans les feuilletts transmembranaires. De plus, des études montrent qu'en général, les épingles β monomériques ne forment pas des structures stables (Shatursky *et al.*, 1999 ; Hotze *et al.*, 2002). La formation d'un tonneau β nécessite un fort degré d'oligomérisation, qui n'a pas lieu pour le domaine C lors des expériences sur les membranes modèles. De plus, les tonneaux β formeraient des pores, qui n'apparaissent pas lors des expériences de perméabilisation de vésicules (Hayashibara & London, 2005).

Ainsi le domaine C ne peut adopter une conformation transmembranaire à pH acide. Le domaine T est donc indispensable à sa translocation. L'étude des effets mutuels et des interactions de ces deux domaines l'un sur l'autre est donc fondamentale pour comprendre le mécanisme de la translocation. Cet aspect a fait l'objet de mes travaux de thèse. Les résultats sont présentés dans l'article 2 de la partie II.

2.2.3.2. Domaine de translocation

Changement de conformation du domaine T à pH acide

Le domaine T est composé de neuf hélices α (figure 42). À pH 7, deux hélices hydrophobes, TH8 et TH9, sont prises en sandwich entre deux groupes d'hélices : TH1-TH4 sont des hélices amphiphiles et TH5-TH7 contiennent des parties hydrophobes. À pH 7, le domaine a une organisation globulaire. Au cours du processus d'intoxication, le domaine T

subit des changements de conformation induits par l'acidification de l'endosome et interagit avec la membrane endosomale. À pH acide, le domaine T adopte un état MG en solution, (D'Silva & Lala, 1998 ; Chenal *et al.*, 2002b). Les groupes d'hélices TH1-TH4 et TH5-TH7 se désolidarisent partiellement de TH8 et TH9. Ces dernières sont alors partiellement exposées au solvant (D'Silva & Lala, 1998 ; Zhan *et al.*, 1994). L'état MG obtenu à pH acide est différent des intermédiaires obtenus lors d'une dénaturation par un agent chaotropique à pH alcalin (Chenal *et al.*, 2002a ; Chenal *et al.*, 2002b). Ces résultats montrent que l'état MG n'est pas un intermédiaire de repliement obtenu à pH alcalin. Les différentes caractéristiques de ces états peuvent s'expliquer par le fait que l'état MG du domaine T est impliqué dans l'interaction avec la membrane à pH acide. Dans l'hypothèse que l'état MG correspond à un intermédiaire de repliement à pH neutre, celui-ci serait dangereux pour la bactérie. En effet, une telle conformation pourrait interagir avec la membrane de la bactérie. Des travaux du laboratoire suggèrent que la formation et la stabilisation de l'état MG implique des acides aspartiques, des acides glutamiques ou des histidines (Chenal *et al.*, 2002b). Le rôle des histidines dans les changements de conformation pH-dépendants du domaine T est l'objet du premier article de la partie II.

Insertion membranaire du domaine T

L'interaction du domaine T avec la membrane est contrôlée par le pH. À pH acide, le domaine T forme un état MG capable de s'insérer dans les membranes. Ceci semble indiquer que l'interaction avec la membrane nécessite ce changement conformationnel. L'étude de l'interaction membranaire en fonction du pH montre que l'acquisition de l'état inséré, compétent pour la translocation, se fait en deux étapes : entre pH 7 et pH 6, la liaison du domaine T à la membrane met en jeu des interactions essentiellement hydrophobes. Puis, lorsque le pH diminue, le domaine T se réorganise dans la membrane et s'insère plus profondément. Cette étape implique des interactions hydrophobes et électrostatiques entre la membrane et le domaine T (Chenal *et al.*, 2002b).

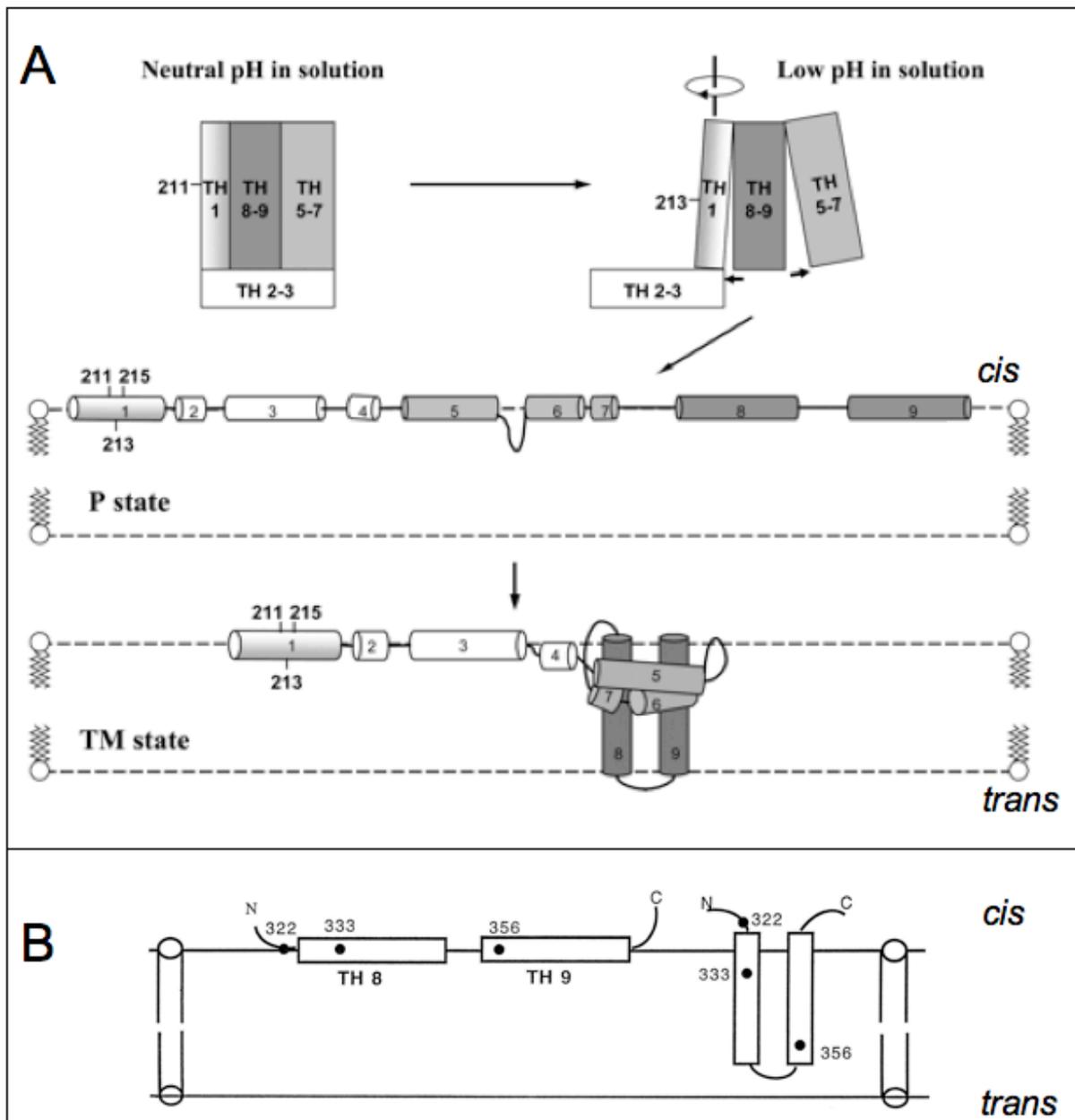


Figure 43 : Topologie du domaine T de la toxine diphtérique inséré dans les membranes selon les états P et TM. (A) Conformations du domaine T dans les membranes dans les état P (conformation à la surface de la membrane) et TM (conformation transmembranaire). D'après Wang *et al.*, 2006. (B) Localisation des mutations ayant permis d'identifier les positions des hélices TH8 et TH9. D'après Wang *et al.*, 1997b.

L'étude de mutants de l'hélice TH1 souligne l'importance de son caractère amphiphile prononcé et de son excès de charges positives à pH acide. Cette propriété est essentielle pour la toxicité de la DT (vanderSpek *et al.*, 1993 ; Madshus, 1994 ; vanderSpek *et al.*, 1994). En substituant les résidus chargés de l'hélice TH1 par des acides aminés neutres, polaires ou hydrophobes, la translocation du domaine C est fortement inhibée (Madshus, 1994).

Topologie du domaine T inséré dans la membrane

La topologie du domaine T inséré dans la membrane a été largement étudiée. Des travaux suggèrent que les hélices TH8-TH9 adoptent une orientation transmembranaire (Oh *et al.*, 1996 ; Silverman *et al.*, 1994a). Suivant les conditions expérimentales, deux états d'insertion se distinguent en fonction de l'insertion des hélices TH8 et TH9 (figure 43). Un premier état, « P-state » où ces hélices sont partiellement insérées, et un deuxième état, « TM-state » où ces hélices sont en position transmembranaire. La structure cristallographique du domaine T a conduit à un modèle d'insertion dans la membrane (Choe *et al.*, 1992). Les boucles TL3 et TL5, localisées à la jonction des hélices TH5-5' et TH6, et TH8 et TH9, portent respectivement quatre et deux résidus carboxyliques : Asp290, Glu292, Asp 295 et Glu298, ainsi que Glu349 et Asp352. À pH acide, la protonation de ces résidus pourrait permettre l'insertion des boucles dans la membrane. Lorsque les boucles apparaissent du côté *trans*, ces résidus seraient déprotonés. À nouveau chargés négativement, les résidus bloqueraient les hélices en position transmembranaire. Ce modèle est appuyé par le travail de plusieurs équipes. La mutation du résidu Asp295 dans TL3 (Falnes *et al.*, 1992 ; Silverman *et al.*, 1994a), ou Glu349 et Asp352 dans TL5 (Silverman *et al.*, 1994a Kaul *et al.*, 1996) par des résidus neutres ou basiques réduit la toxicité de la DT. L'équipe de London a montré qu'*in vitro*, les mutations Glu349Lys et Asp352Lys inhibent partiellement l'insertion dans la membrane (Ren *et al.*, 1999b). L'insertion membranaire des mutants, comparable à la forme sauvage du domaine T, est obtenue à un pH plus acide. Ces résultats suggèrent que ces résidus sont impliqués, mais aussi que la protonation d'autres résidus intervient dans le mécanisme d'insertion membranaire du domaine T.

Les résultats des nombreuses études de la topologie du domaine T isolé ont conduit à plusieurs modèles d'insertion membranaire du domaine T (figure 44). Ceux-ci dépendent essentiellement des conditions expérimentales utilisées. L'épaisseur de la membrane,

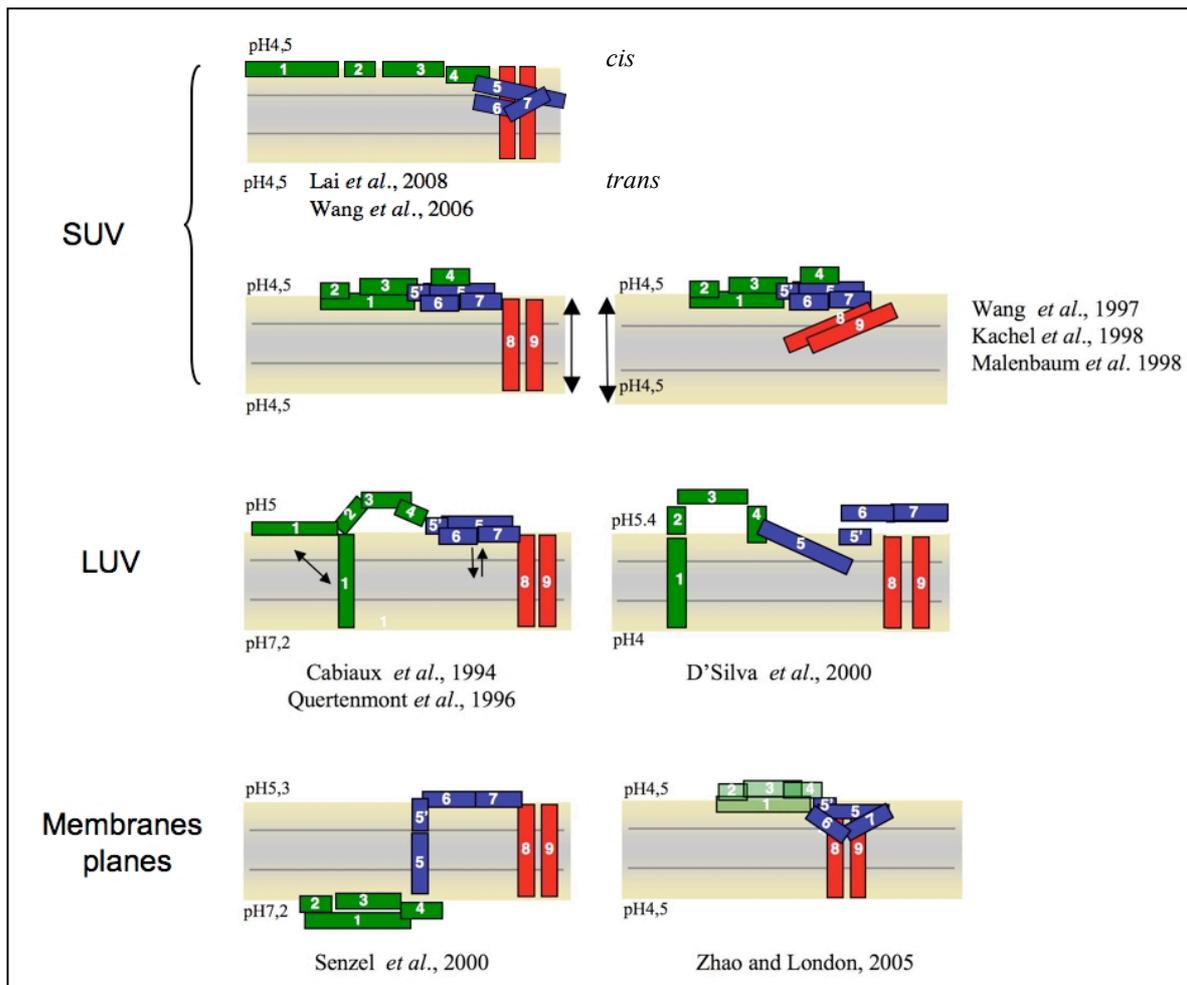


Figure 44 : Modèles d'insertion membranaire du domaine T.

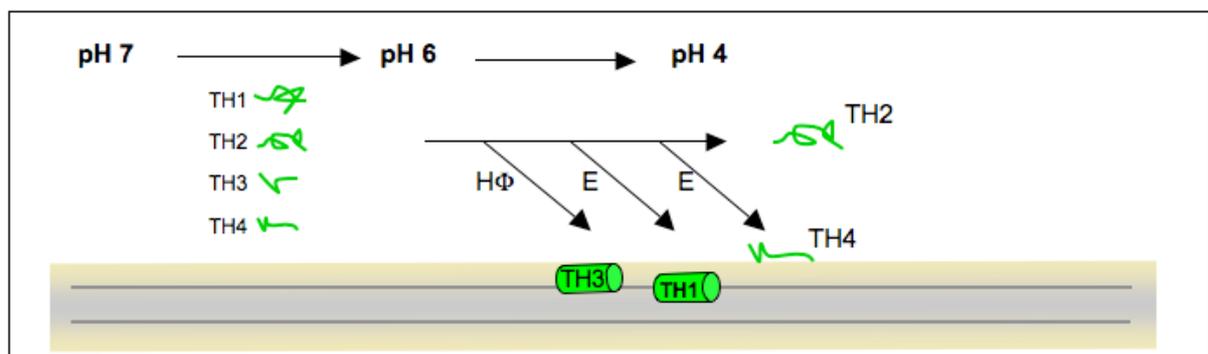


Figure 45 : Capacité de partition dans la membrane des hélices N-terminales du domaine T de la DT, en fonction du pH. La nature des interactions, hydrophobe (H Φ) ou électrostatique (E), favorisant cette insertion, est indiquée. D'après les résultats de Montagner *et al.*, 2007.

la concentration en protéine, la présence ou non d'un gradient de pH, modulent la conformation des hélices dans la membrane.

Des études structurales ont été menées afin de déterminer si la transition de l'état soluble à l'état membranaire du domaine T nécessite une réorganisation de ses éléments de structures secondaires. Le maintien des hélices TH8 et TH9 insérées dans les membranes a été démontré par des études spectroscopiques par résonance de spin électronique (Zhan *et al.*, 1995 ; Oh *et al.*, 1996 ; Oh *et al.*, 1999b). Cette technique révèle que lors de l'insertion du domaine T, la boucle TL5 entre TH8 et TH9 adopte une structure en hélice α (Oh *et al.*, 1999b). L'étude d'accessibilité des résidus de TH8 et TH9 à des agents de polarité variable a contribué à définir les régions d'hélices en contact entre elles, et avec les chaînes acyles de la membrane (Oh *et al.*, 1999b). L'hélice TH8 est insérée dans la membrane, une face en contact avec la protéine, l'autre avec la partie hydrophobe de la membrane. La boucle TL5 serait en contact avec la membrane et la protéine. Les résultats de Lala et D'Silva confirment l'organisation en hélices α de TH1, TH8 et TH9 insérées dans la membrane (D'Silva & Lala, 2000). Par ailleurs, l'introduction de prolines dans les hélices TH5, TH6, TH8 et TH9 entraîne une perte de toxicité de la DT (Hu *et al.*, 1998). L'ensemble de ces résultats suggère fortement que le domaine T inséré dans les membranes conserve une structure secondaire en hélice α .

La position des hélices TH8 et TH9 dans la membrane a largement été étudiée. Les parties N-terminale de TH8 et C-terminale de TH9 sont localisées du côté *cis* de la membrane alors que la boucle TL5, reliant les deux hélices, se situe du côté *trans* de la membrane (Cabiaux *et al.*, 1994 ; Kachel *et al.*, 1998, Mindell *et al.*, 1992). Dans certaines conditions, les hélices TH8 et TH9 peuvent aussi se positionner parallèlement au plan de la membrane (figure 45). Cette orientation est favorisée lorsque la membrane est plus épaisse ou pour de faibles concentrations en protéine (Wang *et al.*, 1997b ; Kachel *et al.*, 1998 ; Malenbaum *et al.*, 1998).

La position des deux autres groupes d'hélices, TH5 à TH7 et TH1 à TH4 dans la membrane est encore confuse. Les équipes obtiennent des résultats variables dus aux conditions expérimentales différentes. Les équipes de London et Lala travaillent avec des vésicules lipidiques à différents pH. L'équipe de Finkelstein utilise des membranes planes et un gradient de pH. Ces dernières conditions se rapprochent des conditions nécessaires à une translocation efficace. Cependant les conditions utilisées par London et son équipe permettent

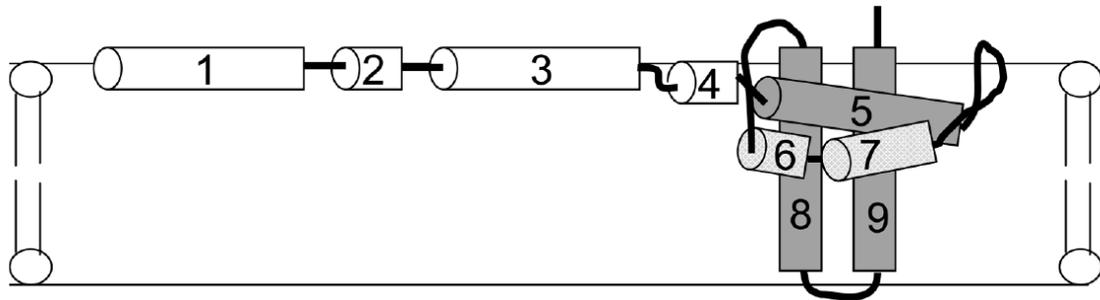


Figure 46 : Illustration schématique de la hiérarchie des interactions entre les hélices lors de l'insertion du domaine T de la toxine diphtérique. L'insertion des hélices en gris foncé, TH5, TH8 et TH9, dépend des interactions entre elles trois. L'insertion des hélices en gris clair, TH6 et TH7, est dépendante de l'insertion du groupe d'hélices en gris foncé. L'insertion du groupe d'hélices TH1 à TH4 en blanc est peu affectée par l'insertion des autres groupes d'hélices. D'après Lai *et al.*, 2008.

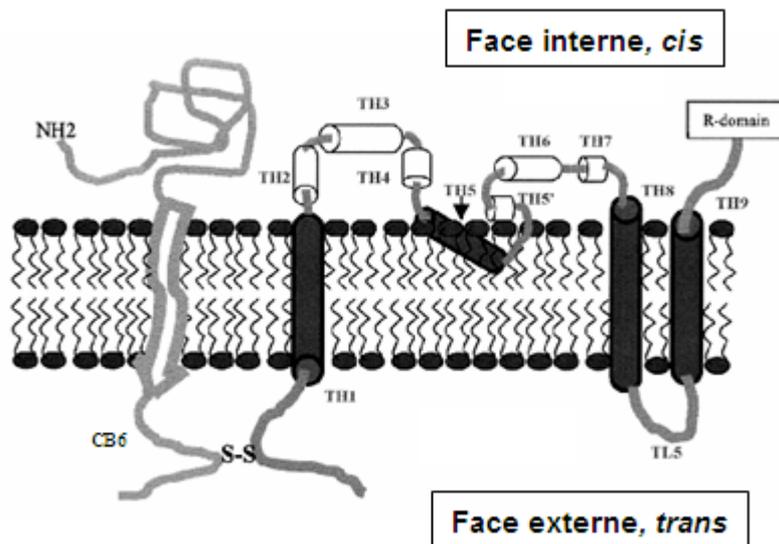


Figure 47 : Modèle topologique de l'insertion de la DT dans des membranes modèles à pH 5,2. La partie N-terminale du domaine T (TH1, noir) et la partie C-terminale du domaine C (résidus 131-141, gris) sont localisées du côté *trans*. D'après D'Silva & Lala, 2000.

certainement d'accumuler des états qui correspondent à des étapes précoces de la translocation.

Les travaux de Montagner *et al.* (2007) ont déterminé la capacité de chacune des hélices TH1-4 à interagir avec des SUV à partir de peptides synthétiques mimant ces hélices. Les résultats montrent que les hélices TH1 et TH3 présentent de fortes propriétés de partition dans la membrane (figure 45). Les auteurs suggèrent que la formation d'un état fonctionnel du domaine T est lié à une réorganisation des hélices amphiphiles, d'abord exposées au solvant à l'état lié à pH 6 (Chenal *et al.*, 2002b) puis insérées dans un environnement apolaire à pH 4. L'acidification progressive éliminerait les charges négatives répulsives des hélices amphiphiles, ce qui permettrait l'insertion membranaire.

Les hélices TH5, TH6 et TH7 possèdent de longs fragments hydrophobes. Elles peuvent donc potentiellement adopter une position transmembranaire. L'étude de la fluorescence intrinsèque des tryptophanes 206 et 281 montre que les hélices TH1 et TH5 pénètrent partiellement dans la membrane (Malenbaum *et al.*, 1998). Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres laboratoires. Cependant, D'Silva et Lala montrent que TH1 adopte une position transmembranaire, alors que TH5 s'insère dans la membrane tout en restant proche de la surface (D'Silva & Lala, 2000) (figure 47). Des études de protéolyse de la DT en interaction avec des vésicules lipidiques ont été réalisées (Cabiaux *et al.*, 1994 ; Quertenmont *et al.*, 1996) et montrent que les hélices TH5, TH6 et TH7 sont digérées par la protéinase K alors qu'elles ne sont pas accessibles à la pronase, qui est une protéine plus grosse. L'équipe de London propose que ce groupe d'hélices s'insère profondément dans la membrane mais adopte une position non transmembranaire (Rosconi & London, 2002 ; Rosconi *et al.*, 2004 ; Zhao & London, 2005). Enfin, l'équipe de London a observé que les conformations des groupes d'hélices sont interdépendantes (Wang *et al.*, 1997b ; Lai *et al.*, 2008). Ils montrent par mutagenèse que le blocage de l'insertion de TH5 affecte la formation du pore par TH8 et TH9. TH5 participerait donc à sa formation (Wang *et al.*, 1997b). Ils montrent également que le blocage de l'insertion des hélices TH6 et TH7 par la substitution L307R n'empêche pas l'insertion profonde de TH5 et, au contraire, favorise la formation des pores. Ceci suppose que les hélices TH5 et TH6 agissent comme un bouchon, qui bloque en partie le pore. Une interaction entre TH5 et TH6-7 a certainement lieu dans l'état peu inséré du domaine T ("P-state"), car le blocage de l'insertion profonde de TH6 et TH7 conduit à une insertion de TH5 visible en fluorescence. Ainsi, les hélices TH5, TH8 et TH9

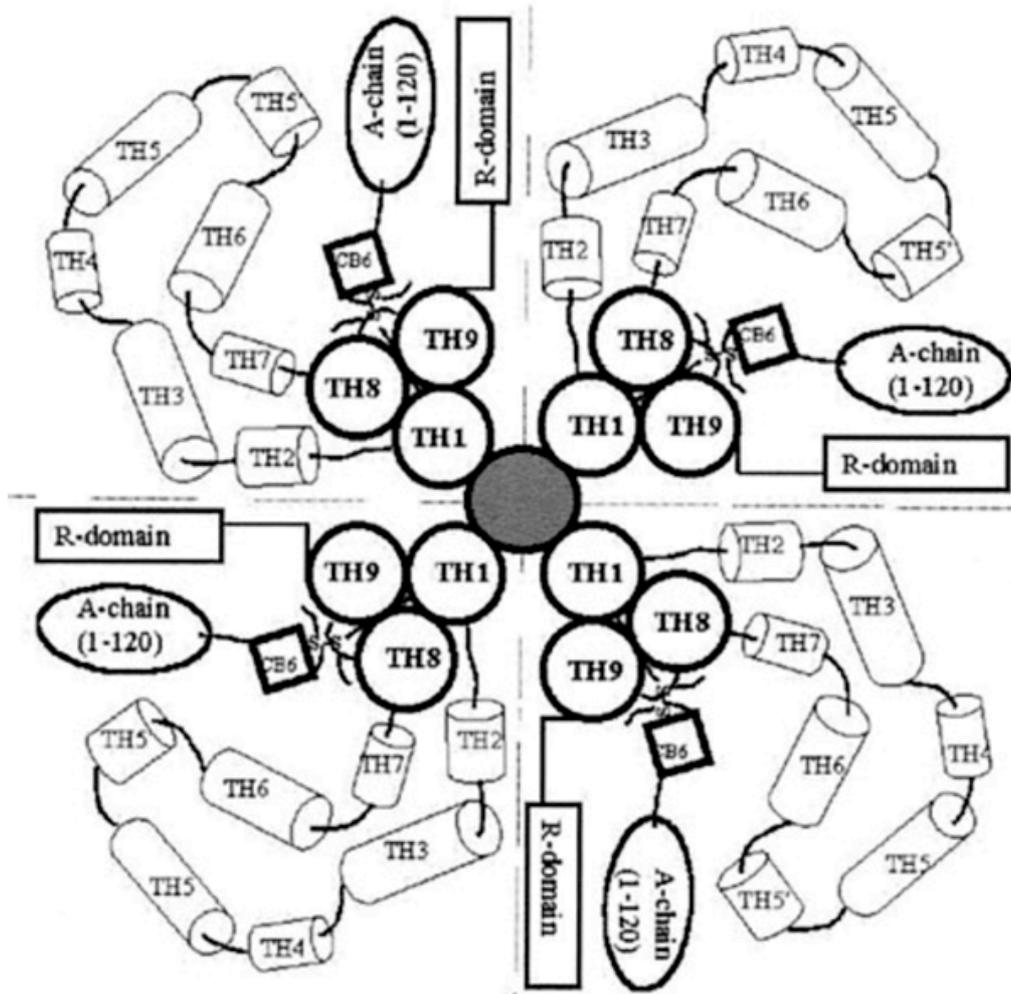


Figure 48 : Modèle du pore formé par la multimérisation de domaines T insérés dans les membranes. Le cercle central représente le pore formé par les hélices TH1, TH8 et TH9 du domaine T. Les carrés représentent les régions CB6 des domaines C en position transmembranaire. D'après D'Silva & Lala, 2000.

pour former une structure dépendante de la conformation de chaque hélice dans la membrane (Lai *et al.*, 2008). Les auteurs ont proposé un modèle à partir de ces données. La figure 46 illustre le modèle topologique proposé par Lai *et al.* (2008) et la hiérarchie des interactions entre les groupements d'hélices lors de l'insertion du domaine T.

Formation de canaux ioniques par le domaine T

Le domaine T isolé, comme la DT, forme des canaux ioniques à pH acide dans les membranes planes (London, 1992 ; Mindell *et al.*, 1994 ; Silverman *et al.*, 1994b) et dans les membranes cellulaires (Papini *et al.*, 1988 ; Sandvig & Olsnes, 1988 ; Eriksen *et al.*, 1994). Les canaux sont sélectifs pour les cations monovalents (ions potassiques, sodiques et protons) (Sandvig & Olsnes, 1988). Le domaine T est, à lui seul, responsable de leur formation (Silverman *et al.*, 1994c). Des travaux montrent que les hélices TH8 et TH9 sont capables à elles seules de former des canaux similaires (Silverman *et al.*, 1994a ; Oh *et al.*, 1996). Cependant, l'équipe de Finkelstein a démontré que la présence d'autres régions du domaine T améliore la conductance des canaux.

En effet, le groupe d'hélices TH5-TH7, et en particulier l'orientation transmembranaire de TH5 (Senzel *et al.*, 2000) participe à la fonction du canal. Les travaux sur l'état d'oligomérisation du pore formé par la DT, et donc la taille du canal, donne des résultats variables. La plupart des équipes ayant travaillé sur l'activité canal propose que la DT forme des oligomères de stoechiométrie variable (D'Silva & Lala, 2000 ; Steere & Eisenberg, 2000) et que la taille des pores dépend de l'état d'oligomérisation (Sharpe & London, 1999). Des travaux suggèrent que la DT se dimérise, permettant le passage de la DT d'une conformation fermée à une DT dimérique en conformation ouverte lors de l'acidification du pH (Kent *et al.*, 2007). Les auteurs proposent que seule la conformation dimérique ouverte permet d'accéder à une conformation de la DT liée puis insérée à la membrane.

Il a été proposé que l'hélice TH1 adopte une conformation transmembranaire en interaction avec les hélices TH8 et TH9 (D'Silva & Lala, 2000). Ce groupe d'hélices s'organiserait en multimères, par association avec les hélices TH1, TH8 et TH9 d'autres molécules de DT (figure 48), formant ainsi un canal correspondant, d'après les auteurs, à un

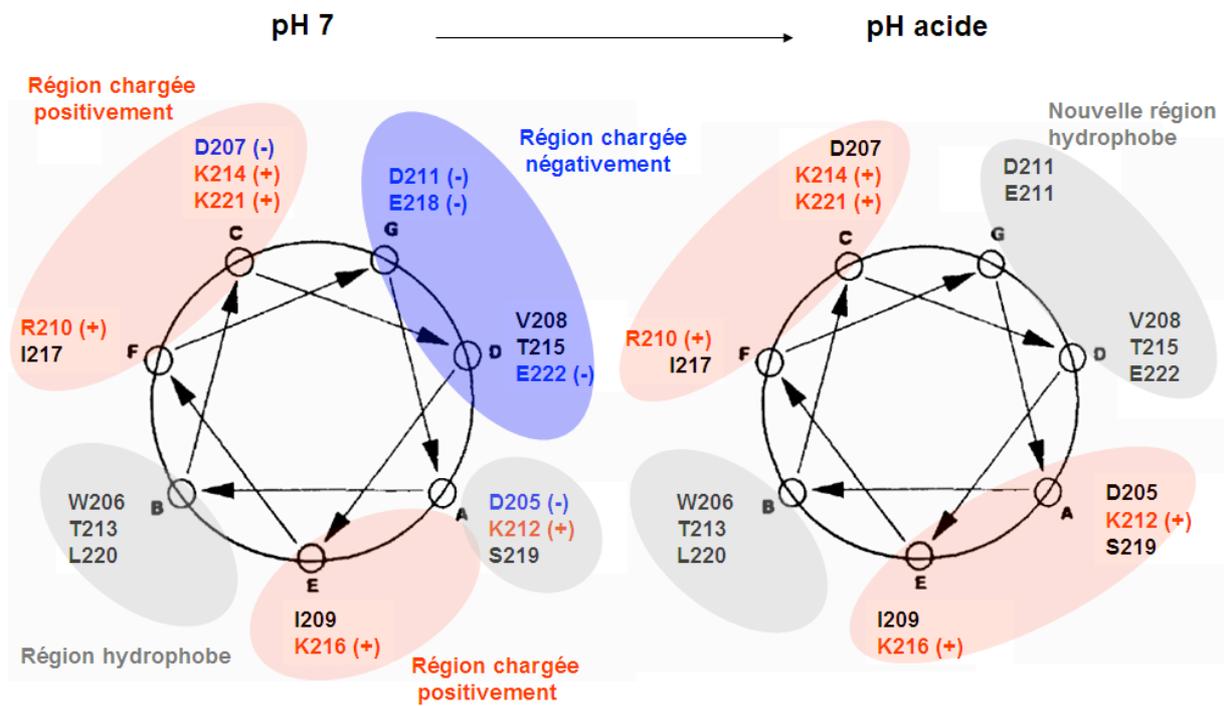


Figure 49 : Répartition des charges de l'hélice amphiphile TH1. À gauche, répartition des charges à pH 7. À droite, répartition des charges à pH acide. La région chargée négativement disparaît, permettant la création d'une nouvelle région hydrophobe, facilitant certainement l'insertion de l'hélice TH1 dans la membrane.

pore translocateur. Ces résultats sont contredits par les travaux de Finkelstein qui montrent que l'activité du canal n'implique pas une organisation multimérique de domaine T (Gordon & Finkelstein, 2001). Ce résultat remet en cause les modèles suggérant que TH1 adopte une position transmembranaire. En effet, d'un point de vue thermodynamique, l'orientation transmembranaire d'une hélice amphiphile est fortement défavorable.

Certains auteurs suggèrent que l'activité du canal est corrélée à la translocation du domaine C (Huynh *et al.*, 1997). Falnes et Olsnes proposent que l'évolution moléculaire ait modifié la fonction du domaine T, qui initialement aurait possédé une activité létale, caractérisée par la formation de pores dans les membranes cellulaires (Olsnes & Falnes, 2000).

Le mécanisme de translocation du domaine C de l'endosome précoce vers le cytoplasme n'est pas encore découvert, et la littérature présente des résultats contradictoires selon le type de membrane utilisé. Toutes les études s'accordent sur l'implication du domaine T dans la translocation, mais à des degrés divers. Certains suggèrent que le domaine T possède la machinerie nécessaire à la translocation du domaine C (Oh *et al.*, 1999a) tandis que d'autres proposent un mécanisme dépendant de l'ATP et de chaperones cytosoliques (Zhan *et al.*, 1995).

2.2.3.3. Passage de C à travers la membrane

La comparaison des résultats sur l'étude du passage de C à travers la membrane, obtenus soit sur des modèles membranaires variés, sont parfois contradictoires. Le domaine R n'est pas nécessaire à la translocation puisqu'il peut être remplacé par un domaine de liaison à un autre récepteur (Murphy & vanderSpek, 1995). Le domaine T est impliqué dans la translocation du domaine C à travers la membrane (Hu *et al.*, 1998 ; vanderSpek *et al.*, 1993). Les résultats de l'équipe de Finkelstein suggèrent que le domaine T possède, intrinsèquement, la machinerie nécessaire à la translocation du domaine C (Oh *et al.*, 1999a).

La partie N-terminale du domaine T est impliquée dans le mécanisme de translocation du domaine C (Madshus *et al.*, 1994). À pH neutre, TH1 possède neuf charges, quatre positives et cinq négatives (figure 49). Les résidus chargés de l'hélice TH1 sont disposés de manière remarquable, avec une séparation des résidus chargés négativement vers une

direction opposée aux résidus chargés positivement. Les charges négatives se situent à l'opposé d'une région hydrophobe, avec les résidus chargés négativement regroupés entre ces deux régions. À pH acide, les résidus chargés négativement sont neutralisés, créant une nouvelle face hydrophobe qui facilite l'insertion membranaire. Le caractère amphiphile de l'hélice TH1 est une caractéristique nécessaire à la translocation : en substituant les résidus chargés de l'hélice TH1 par des acides aminés neutres, polaires ou hydrophobes, la translocation du domaine C est fortement inhibée (Madhus, 1994). Le domaine T, isolé ou dans une construction C-T, possède la propriété de transloquer ses hélices TH1 à TH4 (Senzel *et al.*, 1998) et le domaine C (Oh *et al.*, 1999a). D'Silva et Lala ont observé un intermédiaire de translocation de la DT avec TH1 et un brin β (131-141) du domaine C inséré dans la membrane (figure 47). Les résidus C-terminaux du domaine C, N-terminaux du domaine T ainsi que le pont disulfure intercaténaire C₁₈₆-C₂₀₁ sont localisés du côté *trans* de la membrane (D'Silva & Lala, 2000).

Un domaine T chaperon du domaine C ?

L'équipe d'Olsnes a introduit des ponts disulfures intra-caténaux dans le domaine C afin de déterminer si l'encombrement stérique induit par ces ponts non natifs modifie la capacité du domaine C à être transloqué dans le cytosol (Falnes *et al.*, 1994 ; Falnes & Olsnes, 1995). La digestion à la pronase de la DT insérée dans la membrane révèle que la translocation du domaine C est bloquée en aval du pont introduit. La translocation serait donc initiée à son extrémité C-terminale, liée par le pont disulfure natif à l'extrémité N-terminale du domaine T au niveau de l'hélice TH1 (Falnes & Olsnes, 1995). Ces résultats suggèrent qu'à proximité de la membrane endosomale, le domaine C subit un changement de conformation lui conférant une plus grande flexibilité pour être transloqué (Falnes *et al.*, 1994).

Des travaux ont montré que le domaine T est capable de se lier, à pH acide, à des protéines en conformation MG (apomyoglobine, α -lactalbumine), et que cette liaison favorise un changement de conformation vers la conformation TM (Ren *et al.*, 1999a). Ce phénomène n'est pas observé avec le lysozyme et l'ovalbumine qui ne présentent pas de structure MG à pH acide. Les auteurs suggèrent que le domaine T agit comme un chaperon membranaire, en interagissant avec les séquences hydrophobes des protéines mal repliées. Ce modèle

a été critiqué par Hammond *et al.*, (2002) qui montre, par l'étude à pH acide de l'interaction du domaine T avec des peptides d'hydrophobicité variable, que le domaine T ne reconnaît pas toutes les séquences mal repliées. Les auteurs montrent qu'il n'existe pas de spécificité de séquence pour la liaison au peptide et que l'hydrophobicité est un élément déterminant (non exclusif) dans la liaison. En effet, la liaison au domaine T au domaine C est beaucoup plus forte qu'avec des peptides polyalanine.

Le rôle de chaperon membranaire du domaine T n'est pas encore démontré puisque la nature des interactions avec les protéines possédant peu de structure tertiaire n'est pas encore comprise. En effet, des liaisons de type hydrogène pourraient être créées avec des protéines dans une conformation MG, sans pour autant constituer un véritable mécanisme de reconnaissance d'une séquence mal repliée.

*Le passage du domaine C à travers la membrane reste peu clair. Les résultats parfois contradictoires sur les topologies des domaines insérés proviennent essentiellement de la variabilité expérimentale et des domaines constructions étudiées (C, T, CT, DT). Plusieurs modèles ont été proposés pour décrire la translocation : la translocation de C par l'extrémité terminale de T, la translocation de C par une gouttière formée par le composant B (Wang *et al.*, 1997a), et enfin la translocation de C à travers le canal formé par T. L'ensemble des résultats décrits dans ce chapitre convergent vers la première hypothèse.*

Implication de facteurs cytosoliques

Des travaux réalisés sur des endosomes purifiés à partir de cellules traitées avec la DT ont montré que la translocation du domaine C est dépendante de l'ATP et qu'elle est augmentée par l'addition de cytosol. Il est probable que la présence d'ATP soit nécessaire pour maintenir l'acidité dans l'endosome, en maintenant l'activité des ATPases. La translocation cytosol-dépendante est bloquée par des anticorps anti β -COP (Lemichez *et al.*, 1997). Plusieurs études suggèrent l'implication de la protéine β -COP qui interagirait avec une séquence dite T1 de dix acides aminés, située sur l'hélice TH1 de la DT (Ratts *et al.*, 2003). Ils proposent que cette interaction soit un événement précoce du processus de translocation du domaine C.

L'équipe de Murphy a par ailleurs montré que la translocation est dépendante d'un

facteur de translocation cytosolique comprenant les protéines Hsp90 et TrR-1 (Ratts *et al.*, 2003). Hsp90 fait partie de complexes de chaperons impliqués dans le repliement de protéines (Bijlmakers & Marsh, 2000). Cette protéine fait aussi partie de complexes qui interviennent dans la régulation du transport de protéines membranaires (Pratt *et al.*, 1999). Elle pourrait donc être impliquée dans le repliement du domaine C dans le cytosol. TrR-1 est une thioedoxine réductase. Bien que sa présence soit nécessaire à la translocation, son implication dans la réduction du pont disulfure entre C et T n'est pas démontrée.

La participation d'un complexe cytosolique dans la translocation peut sembler contradictoire avec les travaux de Oh (Oh *et al.*, 1999a) qui montrent que le domaine T peut transloquer seul le domaine C à travers une bicouche plane de phospholipides. Les conditions expérimentales étant cependant différentes, il est possible que le domaine T soit capable de transloquer le domaine C et que le complexe cytoplasmique intervienne dans le repliement du domaine C et améliore la translocation.

Le mécanisme de translocation du domaine C reste mal connu. Cependant, ce processus implique la région N-terminale du domaine T et probablement la participation de chaperones, d'ATP et de facteurs cytosoliques pour replier le domaine C dans le cytosol.

2.3.4. Activité enzymatique du domaine catalytique

La DT entière est une proenzyme qui libère dans le cytosol des cellules intoxiquées le domaine C, porteur d'une activité ADP-ribosyltransférase (Honjo *et al.*, 1968). Le site catalytique est accessible au cofacteur NAD^+ , ce qui explique l'activité NAD glycohydrolase de la DT. Cette activité ne semble pas présenter de fonction directe dans la toxicité et ne semble pas avoir de signification biologique (Kandel *et al.*, 1974). Le domaine C catalyse le transfert d'une molécule de NAD^+ à un résidu diphtamide du facteur EF-2 de la traduction. Le résidu diphtamide (2-[3-carboxyamido-3-(triméthylammonio)propyl]histidine) est une histidine modifiée post-traductionnellement (Van Ness *et al.*, 1980a ; Van Ness *et al.*, 1980b), largement conservée chez les eucaryotes et la plupart des eubactéries. L'ADP-ribosylation de ce résidu entraîne un arrêt de la synthèse des protéines et, par conséquent, la mort cellulaire. L'ADP-ribosylation de l'EF-2 est irréversible. Aucun mécanisme endogène n'est capable de rétablir la fonction de l'EF-2 (Falnes *et al.*, 2000). L'absence d'un mécanisme réparateur des

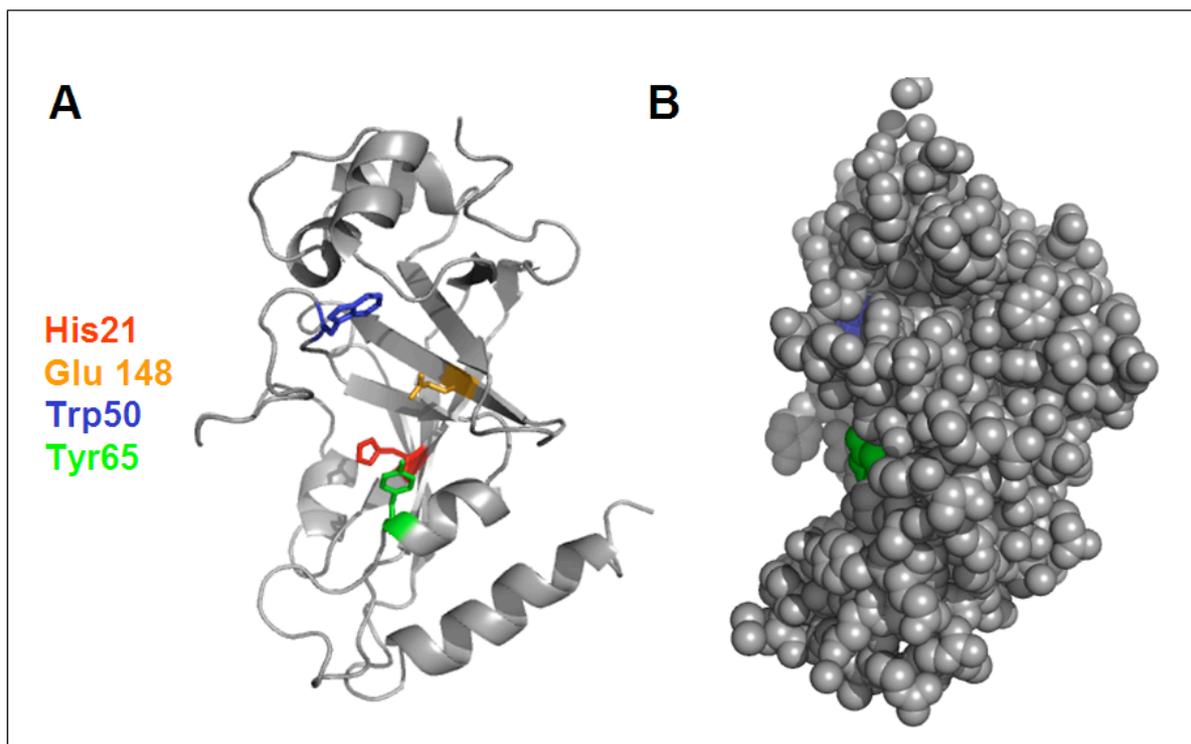


Figure 50 : Représentation tridimensionnelle du domaine catalytique de la DT. (A) Les acides aminés impliqués dans l'activité catalytique sont représentés. (B) Représentation des surfaces de van der Waals du domaine C de la DT.

dommages causés par le domaine C est probablement à l'origine de l'extrême toxicité de la DT, et expliquerait pourquoi un nombre élevé de toxines agissent en ADP-ribosylant des cibles intracellulaires (Menestrina *et al.*, 1994). Le site actif de l'enzyme est situé dans une poche formée par deux feuillets β antiparallèles du domaine C et les boucles L1 à L4 (Yates *et al.*, 2006) (figure 50). Le résidu Glu148 joue un rôle dans la catalyse. Glu148 est l'unique résidu conservé dans le site actif des toxines à activité ADP-ribosyltransférase, et est positionné près du site de liaison de NAD^+ dans la structure cristallographique (Carroll & Collier, 1984 ; Tweten *et al.*, 1985 ; Choe *et al.*, 1992). Le résidu His21 est impliqué dans la liaison au NAD^+ et dans l'activité catalytique (Papini *et al.*, 1989 ; Papini *et al.*, 1990). Tyr65 semble également jouer ces deux rôles (Papini *et al.*, 1991). Enfin, Tyr50 est impliquée et indispensable à l'activité maximale de la toxine. La mutation de Trp50Ala diminue fortement l'activité enzymatique (~100 fois) mais la substitution en Phe a peu d'effet. Ceci suggère l'importance de la présence d'un résidu aromatique à cette position (Wilson *et al.*, 1994).

Le domaine C lie le NAD^+ puis l'EF-2 (Chung & Collier, 1977). Lorsque le NAD^+ est lié au domaine C, la boucle L1 n'a pas la même position (Bell & Eisenberg, 1996). Il est probable qu'elle soit impliquée dans la reconnaissance de l'EF-2 après la liaison au NAD^+ . Dans le mécanisme enzymatique proposé (Wilson & Collier, 1992 ; Blanke *et al.*, 1994), les résidus His21 et Tyr65 positionnent le NAD^+ qui subit une attaque nucléophile par le résidu diptamide activé par le résidu Glu148.

Le domaine C de la DT catalyse l'ADP-ribosylation d'un résidu diptamide de l'EF-2. Cette modification irréversible inhibe l'étape de traduction des protéines et aboutit à la mort cellulaire.

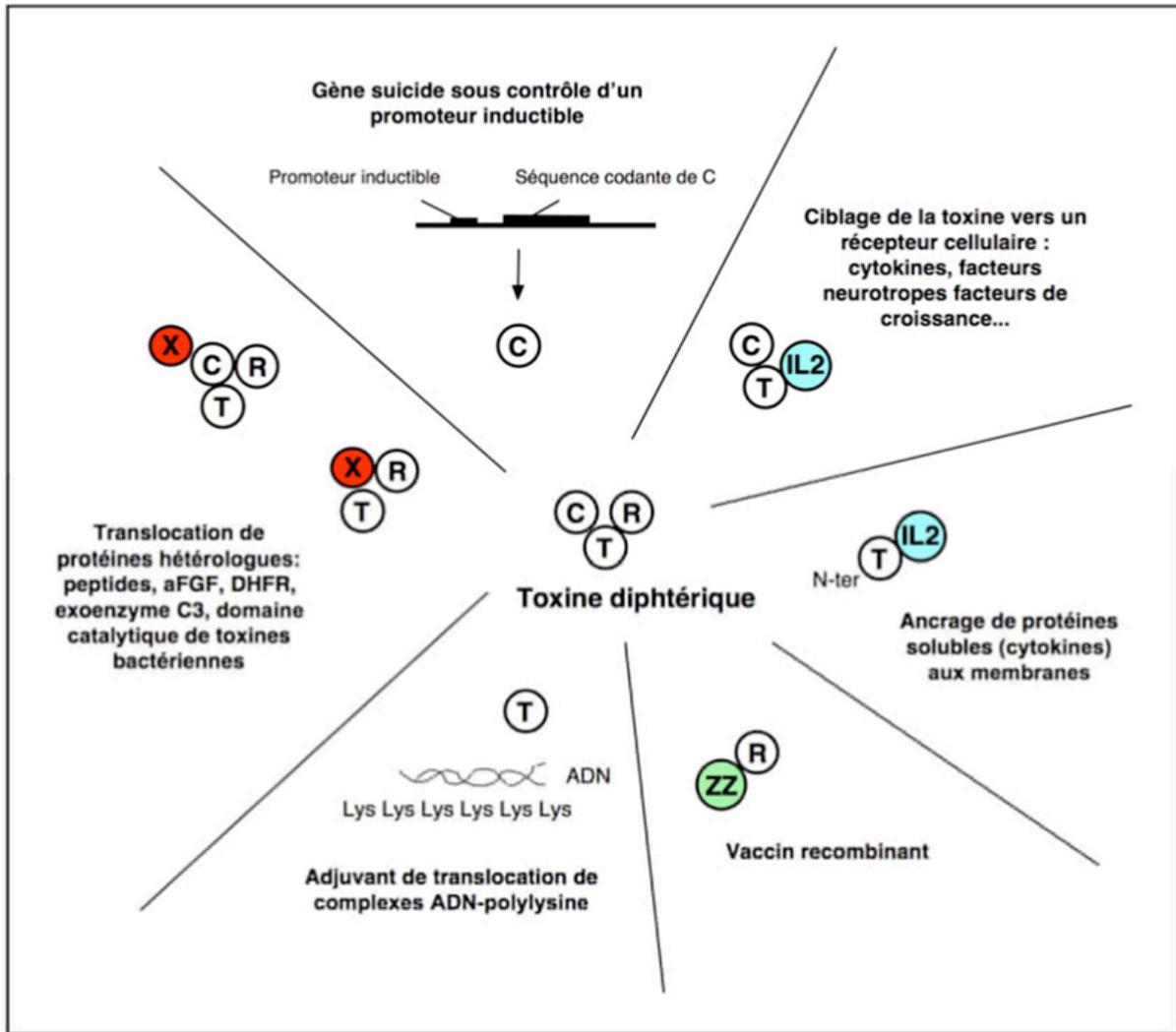


Figure 51 : Utilisation biotechnologique de la DT.

3. Utilisation de la DT en biotechnologies

Cinq agents ont été utilisés pour la thérapie anti-cancéreuse : les toxines protéiques, les cytokines, les radionucléides, des petites molécules en chimiothérapie et des enzymes. Les toxines sont des agents cytotoxiques puissants. Il a été reporté qu'une molécule de DT peut provoquer le mort d'une cellule (Yamaizumi *et al.*, 1978). L'avantage des toxines est qu'elles possèdent un « turnover » rapide. Un trait important est la stabilité des toxines et notamment de leurs domaines enzymatiques qui sont souvent résistants aux dégradations protéolytiques et notamment aux protéases cytosoliques. En effet, ce domaine doit être résistant jusqu'à son relargage dans le cytosol pour inhiber la synthèse protéique des cellules ciblées. Enfin, les toxines interagissent avec des éléments essentiels et très conservés des cellules humaines. C'est le cas de la DT, et de l'ETA qui interagissent avec des éléments très conservés présents dans la plupart des cellules et des tissus, ce qui permet d'envisager le traitement de plusieurs types de cancers.

Le domaine R de la DT peut être remplacé par un anticorps ou un ligand, (immunotoxine) afin de cibler une population de cellules particulières (figure 51). Les facteurs de croissance et les ligands possèdent souvent une meilleure affinité que les anticorps. Cette stratégie a été adoptée avec succès *in vitro* et *in vivo* sur des cellules exprimant des récepteurs divers. Des toxines chimériques, construites à partir de la DT entière, ont été mutées au niveau du domaine R afin de réduire la liaison aux cellules n'exposant pas la cible de surface. Le mutant CRM197 non toxique de la DT, ainsi que d'autres mutants ont été conjugués à des anticorps. Cependant, l'utilisation d'anticorps pose certains problèmes dus à leur grande taille, leur faible diffusion, ou leur immunogénicité. Les fragments Fv recombinants sont quant à eux difficiles à produire et possèdent une affinité souvent inférieure à celle de l'anticorps entier. Le travail de Murphy a introduit le concept de fusion de gène pour la conception de toxines chimères. Lors des essais cytotoxiques, la construction DT389-ligand, obtenue à partir de la fusion d'un ligand avec la DT tronquée au niveau du résidu Phe389 dans le domaine R, est plus active que la construction DT486-ligand, où la DT est tronquée au niveau du résidu Asn486. La construction DT389-ligand est donc la plus utilisée dans la conception de toxines chimères. Depuis ces travaux, plus d'une trentaine de protéines de fusion ont été décrites. La toxine couplée à l'IL-2 a été

approuvée par la Food and Drug Administration pour traiter le lymphome T cutané. Elle est nommée denileukin diftitox (Ontak®) (Eklund & Kuzel, 2005).

L'activité de liaison et de translocation du domaine T est aussi exploitée pour de nombreuses applications. Le domaine T est utilisé comme ancre membranaire pour accrocher des protéines solubles à la surface des cellules (Liger *et al.*, 1998 ; Nizard *et al.*, 2001a) sans l'utilisation d'agents de cross-linking ou de détergents qui interagissent avec les cellules, et sans transfection. Les études ont été réalisées avec l'IL-2 humaine, l'IL-3 de souris et la protéine ZZ, capable de lier les IgG. Ces protéines ont été fusionnées en position N-ou C-terminale du domaine T. Les propriétés structurales et fonctionnelles du domaine T et de la protéine fusionnée isolés sont conservées dans la protéine de fusion (Nizard *et al.*, 1998 ; Nizard *et al.*, 2001a ; Chenal *et al.*, 2002a). L'ancrage de cytokines (ou d'autres protéines) à la surface des cellules constitue une approche novatrice pour exposer des marqueurs à la surface des cellules, qui peuvent alors être détectés par d'autres cellules. Le domaine T a aussi été utilisé pour la transfection d'ADN. En effet, lorsqu'il est incorporé à des complexes d'ADN et de poly-cations, il favorise la transfection de cellules (Fisher & Wilson, 1997 ; Uherek *et al.*, 1998). Enfin, l'activité de translocation de la DT peut permettre dans certaines conditions de faire pénétrer des peptides ou des protéines dans les cellules. Des peptides fusionnés à l'extrémité N-terminale d'un mutant de la toxine dépourvu d'activité catalytique sont transloqués dans le cytosol. La DT ne peut transloquer que des protéines instables ou non repliés, capables de traverser la membrane (Wiedlocha *et al.*, 1992 Klingenberg & Olsnes, 1996).

Le domaine C a également été utilisé comme gène suicide sous le contrôle d'un promoteur inductible. Cette technique est notamment utilisée pour cibler des tissus spécifiques (en fonction du promoteur utilisé) et générer des modèles murins des maladies dégénératives. La transfection du gène du domaine C placé sous le contrôle d'un promoteur régulé par le HIV protège les cellules de l'infection (Dinges *et al.*, 1995 ; Banda *et al.*, 1998).

Les fonctions des trois domaines de la DT ont été exploitées pour la conception de molécules à usage thérapeutique. Jusqu'à présent, une seule molécule, constituée de la DT tronquée couplée à l'IL-2, a validé les tests cliniques et est utilisée pour traiter le lymphome T cutané.

PARTIE II :
RESULTATS -PUBLICATIONS

Cette deuxième partie est consacrée à l'exposé de mes travaux de thèse dans le laboratoire de Daniel Gillet, au CEA-Saclay.

Deux aspects sur le thème du mécanisme de translocation de la toxine diphtérique ont été abordés.

Un premier travail porte sur l'implication des résidus histidines lors des changements de conformation pH-dépendants du domaine T. Ce travail fait suite aux travaux de thèse d'Aurélié Perier et a été réalisé avec l'aide de Sylvain Pichard pour la production de protéines recombinantes. Ce travail a permis d'identifier des résidus clés du domaine T, sensibles au pH, et dont la protonation initie des changements de conformation permettant l'interaction avec la membrane. Ce premier travail a conduit à la publication de l'article I publié dans *The Journal of Biological Chemistry*.

Un deuxième travail concerne l'étude des effets réciproques des domaines C et T, en fonction du pH. Connaître le rôle du lien covalent entre ces deux domaines est essentiel pour comprendre comment le domaine T assiste la translocation du domaine C. Ce travail a permis de montrer que le domaine T, sensible au gradient de pH, accélère les changements de conformation du domaine C qui, seul, est incapable de passer du côté *trans* de la membrane. Ce travail a conduit à la rédaction de l'article II qui a été soumis au journal *The Journal of Biological Chemistry*.

Article I

La protonation concertée des histidines du domaine T de la toxine diphtérique déclenche son interaction avec la membrane

L'interaction du domaine T avec les membranes est liée à la formation d'un état MG identifiable en solution. Cet état dépend de la liaison d'au moins trois protons à la protéine, deux étant responsables du changement de conformation, un troisième (voire plus) stabilisant l'état MG (Chenal *et al.*, 2002b). Les valeurs de pK de protonation des résidus impliqués sont de 3.55, 3.7 et 6. Ces valeurs pourraient correspondre à des acides aspartiques ou glutamiques. Elles sont également compatibles avec des histidines dont le pK serait déplacé vers un pH plus acide, notamment si elles sont peu exposées au solvant ou impliquées dans des liaisons hydrogène. Or, la structure tridimensionnelle du domaine T montre que les histidines sont enfouies dans la protéine et que His257 est impliquée dans deux liaisons hydrogènes. La troisième protonation stabilisante a un pK de 6 et concernerait donc une histidine. Enfin, le domaine T se lie à la membrane dès pH 6, pH auquel a lieu la stabilisation de l'état MG. Nous avons donc fait l'hypothèse que la protonation des résidus His du domaine T est impliquée dans le déclenchement de son mécanisme de translocation.

Le domaine T contient six résidus His (figure 52) dont quatre sont groupés par paires : His223 et His257 sont empilées et situées dans les boucles entre les hélices TH1-2, et TH3-4 respectivement ; His322 et His323 sont vicinales et situées dans la boucle entre TH7 et TH8. His251 est dans TH3 et His372 dans TH9. Certaines de ces histidines sont donc localisées dans des boucles entre des groupes d'hélices qui pourraient fonctionner comme des zones charnières. Leur protonation pourrait induire une déstabilisation locale du domaine T et donc un changement de conformation permettant la formation d'un état MG déjà caractérisé en solution.

Afin de tester cette hypothèse, l'implication des His a été étudiée par mutagenèse dirigée en remplaçant les histidines par des phenylalanines (Phe). Ce résidu a été choisi car sa chaîne latérale n'est pas protonable et possède une géométrie comparable à celle de l'histidine. À pH 7, toutes les histidines du domaine T sont en principe déprotonées. Les

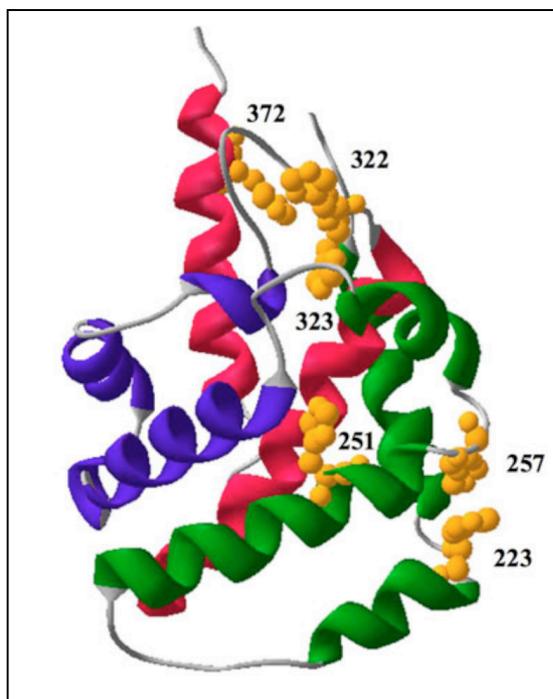


Figure 52 : Position des histidines dans la structure du domaine T isolé. Les histidines sont indiquées en jaune. Les trois couches d'hélices TH1-4, TH5-7 et TH8-9 sont respectivement colorées en vert, bleu, rouge.

Phe miment ainsi des histidines non protonées. Seize mutants ont été produits (article I, tableau S1), selon des combinaisons simples, doubles, triples, quadruples, quintuples, jusqu' à la mutation des six résidus His. Les mutations doubles ont été choisies afin de déterminer si les histidines proches dans l'espace agissent ensemble, et ont donc des actions régionales. La cumulation croissante du nombre de mutations a permis de montrer que la protonation des six résidus His se fait de manière concertée. La protonation de chaque histidine participe au changement de conformation du domaine T et à son interaction avec la membrane, certaines histidines étant plus impliquées que d'autres dans l'un ou l'autre de ces phénomènes.

Résultats

L'étude des mutants His>Phe du domaine T par dichroïsme circulaire dans l'UV lointain et proche à pH 7 et pH 3,5 indique que les mutants possèdent la même structure que le domaine T sauvage (Twt) à pH 7, et qu'ils adoptent également une structure MG à pH acide (Chenal *et al.*, 2002a ; Chenal *et al.*, 2002b). Cet état MG est compétent pour interagir avec les membranes.

Les mutations His>Phe abaissent le pH de transition vers l'état MG de manière additive

La transition du domaine T de l'état natif vers l'état MG, a été suivie en solution par fluorescence du Trp. Le principal effet observé est la modification du pH de demi-transition de formation de l'état MG ($pK_{1/2}^{MG}$). Pour tous les mutants, on observe une diminution du $pK_{1/2}^{MG}$ d'autant plus élevée que le nombre de mutations augmente (de $pK_{1/2}^{MG} = 5,3$ pour Twt à $pK_{1/2}^{MG} = 3,8$ pour TΔHis). Les mutations His223, His251 et His257 sont celles qui ont l'effet le plus fort, les autres n'ayant qu'un effet mineur. La transition de Twt en solution de l'état natif vers l'état MG indique une augmentation du λ_{max} de 336 nm à 341 nm, traduisant une exposition des deux Trp au solvant (Montagner *et al.*, 2007).

Tous les mutants présentent une augmentation de λ_{max} similaire. Ceci est en accord avec les observations des spectres de dichroïsme circulaire. Seul TΔHis présente une variation de λ_{max} plus faible (3 nm). Ceci est probablement dû à une compaction plus forte de la protéine induite par la présence des Phe. La transition vers un état MG (probablement altéré) a cependant lieu, ce qui est confirmé par les expériences de dichroïsme circulaire.

La protonation de tous les résidus His est impliquée dans la formation de l'état MG en solution selon un phénomène coopératif. Les His223, 251 et 257 constituent probablement des déclencheurs plus sensibles que les autres His.

Les mutations His>Phe abaissent le pK de liaison à la membrane de manière additive

L'interaction du domaine T avec des LUV anioniques (PC:PA en rapport 9:1) a été étudiée en fonction du pH par partition physique (centrifugation) et fluorescence du Trp. Le domaine T interagit avec les membranes selon un processus en deux étapes : liaison à la membrane puis pénétration dans la bicouche lipidique (Chenal *et al.*, 2002b). La première étape se caractérise par une augmentation du λ_{\max} de 336 nm à 344 nm traduisant une exposition des Trp au solvant. La seconde se caractérise par une diminution du λ_{\max} de 344 nm à 332 nm traduisant l'enfouissement des Trp dans la phase hydrophobe de la membrane. Le pH de demi-transition, de l'état soluble à l'état lié ($\text{pK}_{1/2}^{\text{B}}$) est utilisé pour comparer l'effet des mutations sur la liaison à la membrane. Pour tous les mutants, le $\text{pK}_{1/2}^{\text{B}}$ diminue (article I, figure 6). En revanche, la deuxième transition semble peu affectée. Elle est principalement masquée par le décalage de la première transition vers des pH plus acides. Les mutations ponctuelles affectant le plus le $\text{pK}_{1/2}^{\text{B}}$ correspondent aux positions 251, 322 et 323 avec des $\text{pK}_{1/2}^{\text{B}}$ de 6.2, 6.1, et 6.2 respectivement, en comparaison avec Twt dont le $\text{pK}_{1/2}^{\text{B}}$ est de 6.5. Plus on introduit de mutations dans le domaine T, plus le $\text{pK}_{1/2}^{\text{B}}$ est décalé vers des pH acides. L'effet maximal est observé pour le mutant TΔHis avec un $\text{pK}_{1/2}^{\text{B}}$ de 5.2.

Ces résultats suggèrent que la protonation coopérative des résidus His est impliquée dans la liaison à la membrane, avec un rôle prépondérant des His251, 322 et 323.

L'effet des mutations sur la sensibilité au pH n'est pas dû à une stabilisation de la protéine

L'effet des mutations sur les transitions en solution et en présence de membranes pourrait être dû non pas à la suppression de résidus protonables, mais à une stabilisation de la protéine liée à la présence des Phe par effet hydrophobe. La stabilité des mutants du domaine T a donc été étudiée par dénaturation au chlorure de guanidium à pH 7,5, suivie par la fluorescence des Trp. La dénaturation de tous les mutants s'opère selon un processus à 3 états

(article I, figure S1). Autrement dit, les protéines passent par un intermédiaire de dépliement. Un tel état intermédiaire avait également été observé lors de la dénaturation de Twt (Chenal *et al.*, 2002a). Les valeurs de ΔG_{01} (article I, tableau S1) correspondant à la première étape de dénaturation ont été utilisées pour comparer la stabilité de l'état natif des différents mutants à celle de Twt. Aucune corrélation n'a été observée entre la stabilité des mutants et les $pK_{1/2}^{MG}$ et $pK_{1/2}^B$. Il en résulte que l'effet des mutations est principalement dû à la perte de résidus protonables et non à un effet de stabilisation par les Phe introduites.

Effet des mutations du domaine T sur la perméabilisation de LUV

La seconde étape de l'interaction du domaine T avec les membranes correspond à sa pénétration dans la bicouche lipidique, qui s'accompagne d'une perméabilisation de celle-ci (Nizard *et al.*, 2001b ; Chenal *et al.*, 2002b). Afin de déterminer si les mutations ont un effet sur la perméabilisation des LUV, nous avons étudié les cinétiques de perforation des mutants les plus informatifs c'est-à-dire T223-257 et T322-323. En effet, la protonation d'un ou des deux His de chaque paire semble avoir le même effet sur le $pK_{1/2}^{MG}$ ou le $pK_{1/2}^B$. La cinétique de perforation de ces mutants a été étudiée de pH 7 à pH 4 par mesure de la fuite d'un fluorophore encapsulé dans les LUV. La constante cinétique apparente k_{obs} (s^{-1}) est utilisée pour comparer les mutants et Twt. Twt perméabilise dès pH 5,5 ($k_{obs} = 7,32 s^{-1}$). Les mutants aussi, mais avec une efficacité moindre ($k_{obs\text{pH}5,5} = 7,65, 1,06, 3,25$ et $1,3$ pour T251, T223-257, T322-323 et T Δ His respectivement). Ceci est d'autant plus remarquable pour T Δ His, pour lequel la perforation reste très faible à pH 4.

La mutation des His affecte l'insertion du domaine T dans la membrane. Or, la protonation des His intervient dans des événements précédant l'insertion, à des pH plus élevés : formation du MG et liaison à la membrane. La nature des mutations introduites pourrait affecter la perméabilisation plutôt que l'absence de protonation.

En conclusion, La protonation des résidus His du domaine T participe aux étapes pH-dépendantes de transition vers l'état MG en solution et d'interaction membranaire, de manière coopérative (figure 53). Lorsque toutes les His sont mutées, la transition vers l'état MG, la liaison et la perméabilisation des membranes ont toujours lieu, mais à des pH plus acides.

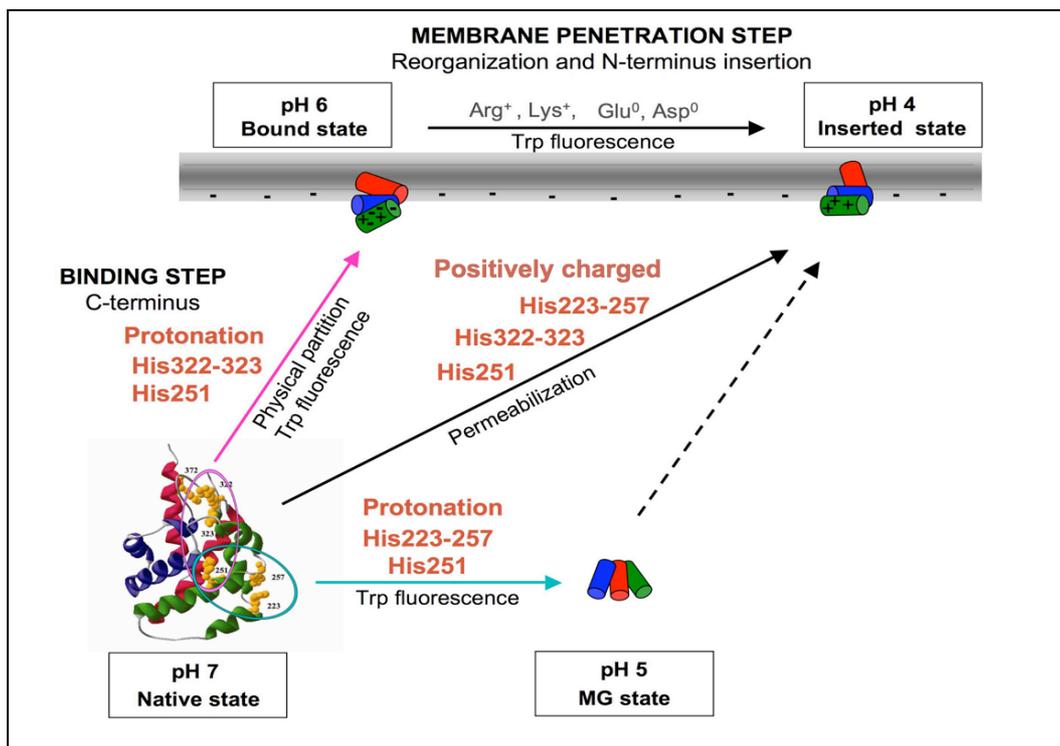


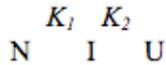
Figure 53: Illustration schématique des changements de conformation pH-dépendants du domaine T. Les cylindres vert, bleu et rouge représentent respectivement les couches d'hélices TH1-4, TH5-7 et TH8-9. Les cylindres sont utilisés pour simplifier la représentation et ne représentent pas des ensembles rigides. Les états natif, lié, molten globule et inséré du domaine T sont représentés aux pH où ils sont accumulés. Les résidus histidine du domaine T sont entourés de la même couleur que la flèche de la transition dans laquelle elles sont impliquées. Les résidus autres que les histidines certainement impliqués dans l'insertion membranaire des hélices N-terminales sont indiqués.

Ceci suggère que d'autres résidus protonables prennent le relais. L'observation de la structure du domaine T montre que la protonation de la paire His223-257 aurait pour fonction de déstabiliser le groupe d'hélices TH1-4. Celle de la paire His322-323 (et peut-être His372) déstabiliserait la région C-terminale de la protéine en désolidarisant les groupes d'hélices TH5-7 et TH8-9. Enfin, la protonation de His251 séparerait les groupes d'hélices TH1-4 et TH5-7.

SUPPLEMENTAL DATA

Table S1. Thermodynamic parameters for the GdnHCl-induced unfolding transitions of the WT and mutant T domains. D_1 and D_2 correspond to the concentration of denaturant (GdnHCl) at half transition for each observed unfolding transition.

GdnHCl-unfolding curves were analyzed by a three-state mechanism:



where N, I and U represent the native, intermediate and unfolded molecules, respectively, and K_1 and K_2 are the equilibrium constants for the native to intermediate and intermediate to unfolded states, respectively. The constant equilibrium of the transition is given by

$$K = [U] / [N] = ([I] / [N]) \cdot ([U] / [I]) = K_1 \cdot K_2 \quad (1)$$

The dependence of the equilibrium constants on the denaturant (D) concentration can be obtained from the free energy of unfolding G : $G = -RT \ln K = G_0 - m[D]$ (2)

where G_0 is the free energy of unfolding in water, and m is the coefficient of dependence on the denaturant concentration.

If the species present at each GdnHCl concentration are expressed as fraction (f), then the conservation of mass and the equilibrium constants can be expressed as follows: $f_N + f_I + f_U = 1$ (3)

By defining f_N , f_I and f_U in term of K_1 and K_2 , we have

$$f_N = 1 / (1 + K_1 + K_1 K_2) \quad (4)$$

$$f_I = K_1 / (1 + K_1 + K_1 K_2) \quad (5)$$

$$f_U = K_1 K_2 / (1 + K_1 + K_1 K_2) \quad (6)$$

The measured fluorescence signal S depend on the species composition at each GdnHCl concentration according to the following equation: $S = S_N f_N + S_I f_I + S_U f_U$ (7)

where S_N , S_I and S_U are the specific signal of native, intermediate, and unfolded protein, respectively.

The fitting equation is obtained by substituting equation (4), (5) and (6) into equation (7):

$$S = (S_N + S_I K_1 + S_U K_1 K_2) / (1 + K_1 + K_1 K_2)$$

K_1 and K_2 are defined from equation (2) as:

$$K_1 = \exp((-G_{01} + m_1[D])/RT)$$

$$K_2 = \exp((-G_{02} + m_2[D])/RT)$$

Curves were fitted using Kaleidagraph 3.6 (Synergy Software, Reading, PA).

Fig. S1. GdnHCl-induced denaturation of the mutant T domains at pH 7.5 monitored by Trp fluorescence. WT, closed circles; T251 (cross); T223-257 (open triangle), T322-323 (inverted open triangle); and T His, closed circles. Proteins were diluted at a concentration of 1 μ M in a 20 mM phosphate/citrate buffer at pH 8, containing the indicated GdnHCl concentration. After equilibration for at least two hours, the fluorescence signal was recorded and the GdnHCl concentration was determined by refractometry. Unfolding curves of $FI_{360/320}$ as a function of GdnHCl were analyzed by a three-state mechanism. Thermodynamic parameters and their calculation are given Table S1.

Fig. S2. Confrontation of the $pK_{1/2}^{MG}$ (A) and $pK_{1/2}^B$ (B) with the G_{01} of the GdnHCl-induced unfolding for the mutant T domains.

Table S1

	Transition 1			Transition 2			$G_{01} + G_{02}$ (kcal.mol ⁻¹)
	G_{01} (kcal.mol ⁻¹)	D_1 (M)	m_1 (kcal.mol ⁻¹ .M ⁻¹)	G_{02} (kcal.mol ⁻¹)	D_2 (M)	m_2 (kcal.mol ⁻¹ .M ⁻¹)	
Twt	9 +/- 1.2	1.5	6 +/- 0.8	8 +/- 3.2	2	3.9 +/- 1.4	17
T223	8 +/- 0.7	1.8	4.4 +/- 0.4	7 +/- 4.8	2.4	3.3 +/- 1.7	15.9
T251	12.5 +/- 2.8	2	6.2 +/- 1.6	10.1 +/- 5.5	2.4	4.1 +/- 0.2	22.6
T257	7.4 +/- 1.3	1.2	6 +/- 1.2	7.3 +/- 3.2	1.8	4 +/- 1.6	14.7
T322	6.4 +/- 3.2	1.6	4.1 +/- 2.1	4.6 +/- 5.1	2.6	1.8 +/- 1.6	11.1
T323	9.5 +/- 2	1.7	5.5 +/- 1.3	11 +/- 5.7	2.2	5 +/- 2.3	20.5
T372	5.6 +/- 0.5	1.5	3.7 +/- 0.3	5.9 +/- 2.1	2.7	2.1 +/- 0.7	11.5
T223-257	5.4 +/- 0.4	1.3	4 +/- 0.4	7.8 +/- 2.3	2.2	3.6 +/- 1	13.2
T251-257	10.6 +/- 2.7	1.9	5.7 +/- 1.6	7.3 +/- 4.7	2.2	3.3 +/- 1.7	18
T322-323	6.2 +/- 0.6	1.7	3.6 +/- 0.4	12 +/- 4.4	2.4	5 +/- 1.7	18.3
T223-257-372	2.5 +/- 0.5	1.6	1.5 +/- 0.4	2.1 +/- 7.6	3	7.1 +/- 1.6	4.6
T223-251-257	8.2 +/- 2.7	2.1	4 +/- 2.5	2.9 +/- 17.7	2.4	1.2 +/- 4.3	11.2
T322-323-372	6.4 +/- 0.3	1.9	3.4 +/- 0.2	9.5 +/- 5.9	3	3.2 +/- 1.9	16
T223-257-322-323	9 +/- 3.1	1.7	5.4 +/- 2.1	8.9 +/- 6.8	2.1	4.2 +/- 2.8	17.9
T251-322-323-372	9.1 +/- 1.6	1.3	4 +/- 0.8	5.6 +/- 6.7	3	1.9 +/- 1.8	14.7
T223-257-322-323-372	5 +/- 0.8	1.4	3.5 +/- 0.6	3 +/- 1.5	2.3	1.3 +/- 0.5	8.1
T His	10.9 +/- 2	2	5.4 +/- 1.1	6.5 +/- 6.3	2.6	2.6 +/- 2	17.5

Figure S1

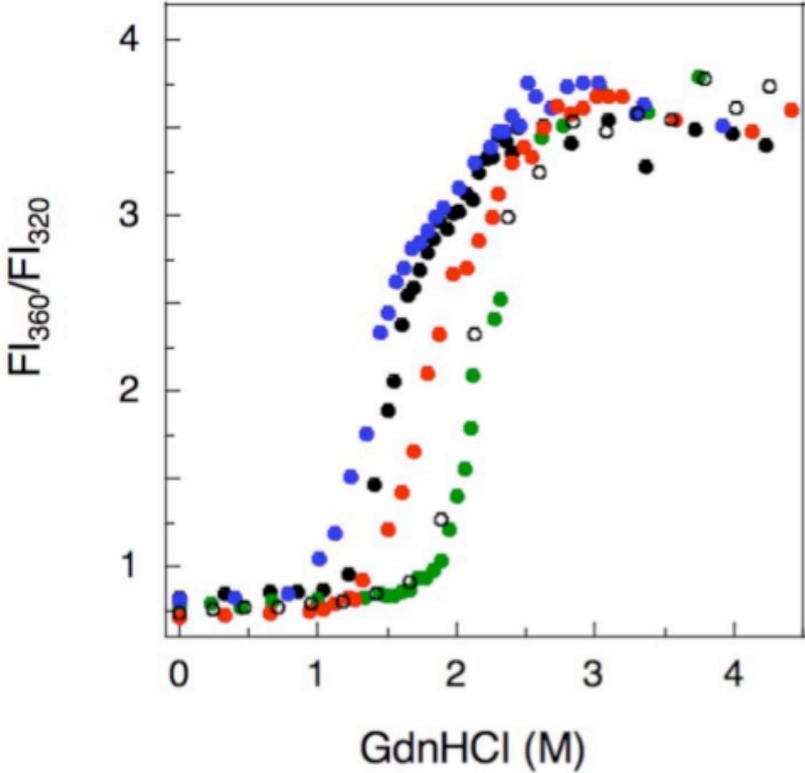
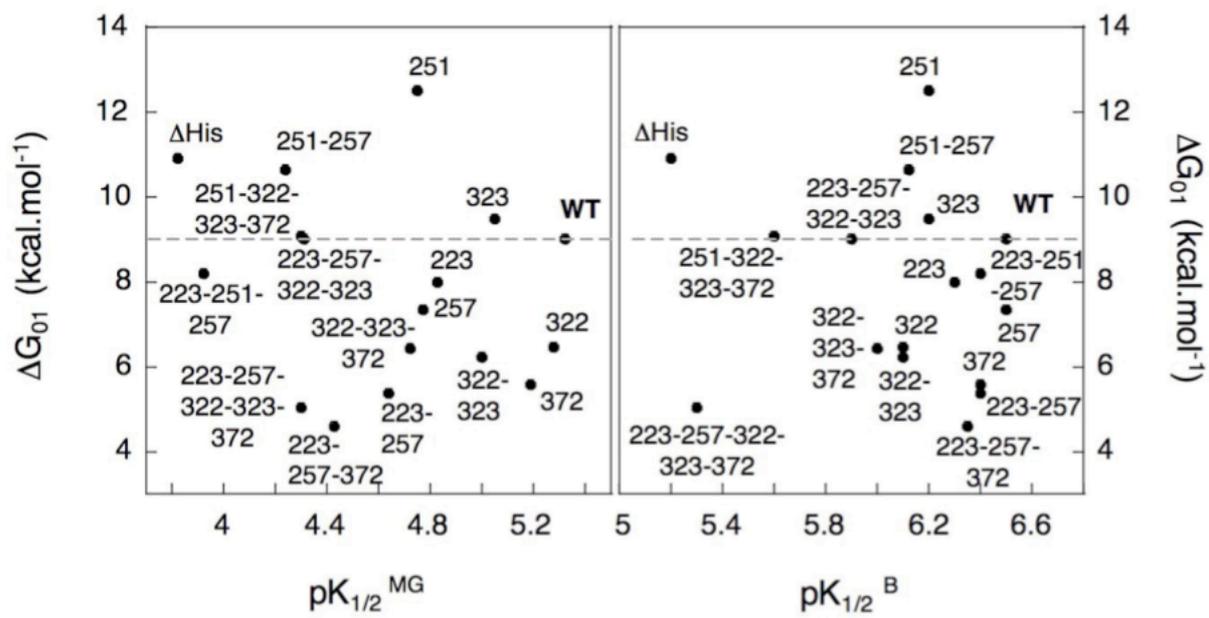


Figure S2



Article II

Le domaine T de la toxine diphtérique favorise la liaison à la membrane et la translocation du domaine C

Des études de dégradation protéolytique du domaine C en présence de membranes (Wolff *et al.*, 2004), et de marquage des résidus de la séquence du domaine C (Hayashibara & London, 2005), montrent qu'isolé, le domaine C s'insère peu profondément dans les membranes. De plus, C se déplie sous l'effet d'une dénaturation thermique ou sous l'effet du pH (Zhan *et al.*, 1994). Certaines études montrent que le domaine C adopte un état MG à pH acide. De nombreuses protéines nécessitent le passage par un état MG pour interagir avec les membranes. Le domaine C passe par cet état structural, mais qui n'est pas suffisant pour l'insertion dans la membrane, et donc pour la translocation. L'étude du rôle du domaine T sur le comportement du domaine C est donc nécessaire à la compréhension du mécanisme de translocation. L'objectif de nos travaux est de caractériser les changements conformationnels pH dépendants de ces deux domaines, en présence de membranes et en solution, et d'identifier le rôle du lien covalent entre C et T, c'est-à-dire les rôles respectifs d'un domaine sur l'autre.

Nous avons produit une protéine CT, correspondant à la DT tronquée au niveau de son domaine R (article II, figure 1). La protéine CT contient quatre Trp. Le domaine C en contient deux, Trp50 et Trp153, localisés respectivement dans les brins CB3 et CB6. Les Trp206 et 281 sont localisés respectivement dans les hélices TH1 et TH5 du domaine T.

Afin de suivre les changements de conformation des deux domaines par fluorescence du Trp, nous avons produit des mutants Trp>Phe de la protéine CT : le mutant CT_{W50/153F} permet de suivre la fluorescence de T, et inversement pour le mutant CT_{W206/281F}. Ainsi, les changements de conformation de C et T, isolés ou dans la protéine CT ont été étudiés en solution. Les transitions structurales de ces protéines en présence de LUV anioniques, leur liaison et leur insertion membranaires ont été étudiées. Les techniques utilisées sont la fluorescence du Trp, le dichroïsme circulaire, la partition physique par ultracentrifugation, l'extinction de fluorescence du Trp par le brome, et la cinétique de libération d'un

fluorophore encapsulé dans des vésicules lipidiques. L'équipe de London a étudié les changements conformationnels des deux composants de la DT en utilisant la même stratégie de mutation des Trp. Cependant, son étude porte sur deux mutants Trp>Phe, l'un correspondant au composant B muté, l'autre au composant A muté. La mutation des Trp50 et 153 du composant A permettait de suivre le comportement de B, et la mutation des Trp206, 281 et 398 du composant B permettait de suivre le comportement de la chaîne A (Wang *et al.*, 1997a). Les résultats ont conduit au modèle de la « gouttière », où A et B interagissent et où B protège les sites hydrophiles du domaine C dans la forme insérée dans la membrane à pH acide. Ce modèle proposé à pH 4 n'est pas en accord avec les résultats topologiques des autres études sur les domaines isolés, probablement à cause du signal de fluorescence des trois Trp de la chaîne B, difficile à interpréter puisque la contribution de chaque Trp est différente (Montagner *et al.*, 2007).

Le domaine R n'intervenant pas dans la translocation, notre étude se porte sur la DT tronquée de ce domaine.

Les travaux présentés ici ont permis de comprendre le rôle mutuel des domaines C et T dans la translocation. Les résultats montrent que le domaine T, qui possède un système de réactivité au pH, modifie le comportement du domaine C en initiant ses changements de conformation à pH plus élevé. En revanche, le domaine C ne modifie pas le comportement du domaine T. T pourrait agir comme un chaperon de C pendant la translocation.

Résultats

Le domaine T favorise la conformation MG du domaine C en solution

Les transitions pH-dépendantes des domaines T, C, et des mutants de la protéine CT ont été étudiées en solution de pH 7 à pH 3,5 par suivi de la fluorescence du Trp. Le λ_{\max} a été utilisé pour suivre les variations de polarité de l'environnement des Trp. En solution, le domaine C adopte un état MG vers pH 4, ce qui est confirmé par les spectres de dichroïsme circulaire (article II, figure 2). Lorsqu'il est lié de manière covalente au domaine T, cette

transition s'opère 0,9 unité de pH plus haut (article II, figure 3). Le domaine T favorise donc la transition du domaine C vers l'état MG et stabilise cet état à pH acide. La fluorescence sur la protéine CT non mutée et sur un mix des protéines C et T a été difficile à interpréter, certainement dû au fait que l'on mesure la fluorescence de quatre Trp qui contribuent chacun différemment. Deux transitions ont lieu pour le mix de C et T, et une transition à trois états apparaît pour la protéine CT. Cependant, ces transitions ne se superposent pas, et la seconde, qui correspond certainement à la transition du domaine C, a lieu à un pH supérieur.

Les résultats montrent que les deux domaines interagissent et que le domaine T joue un rôle de déstabilisation du domaine C, lui permettant d'adopter une structure MG à pH plus élevé.

Le domaine T favorise la liaison et l'insertion du domaine C dans les membranes

L'interaction des protéines C, T et CT avec des LUV anioniques a été étudiée en fonction du pH (article II, figure 4). Les expériences de partition physique montrent que les protéines C et T se lient de pH 6,0 à pH 4,5 et de pH 6,8 à pH 6,0 respectivement (article II, figure 4A). T se lie donc préférentiellement à la membrane. La liaison des mutants de la protéine CT a lieu de pH 7,1 à pH 5,0 et de pH 7,0 à pH 5,0, donc leur liaison commence au même pH que pour le domaine T mais elle est moins coopérative. Ce résultat ne permet pas de connaître quel domaine, C ou T se lie à la membrane en premier. Des expériences de FRET entre les groupements dansyl sur les têtes polaires des phospholipides et les Trp des protéines étudiées, n'ont pas permis de le déterminer.

Les transitions structurales des domaines C et T ont été étudiées par fluorescence du Trp en présence de LUV, en fonction du pH. Toutes les protéines suivent deux transitions pH-dépendantes (article II, figure 4B), déjà bien caractérisées pour T. La première correspond à une augmentation de λ_{\max} qui traduit l'exposition des Trp au solvant et donc le dépliement partiel de la protéine. La deuxième correspond à une diminution du λ_{\max} qui traduit un enfouissement des Trp dans un milieu apolaire, probablement la membrane, comme dans le cas du domaine T (Chenal *et al.*, 2002b ; Montagner *et al.*, 2007). Les transitions des protéines T et CT_{W50/153F} sont quasiment identiques et ont lieu au même pH, entre pH 7 et pH 5. La différence est la valeur maximale du λ_{\max} , inférieure de trois nanomètres pour CT_{W50/153F} en fin de première transition. Ceci peut s'expliquer par la faible coopérativité de la liaison de ce mutant aux LUV (article II, figure 4A). La première transition structurale du

mutant CT_{W50/153F} n'est donc pas achevée lorsque la deuxième commence. CT_{W206/281F} suit deux transitions structurales, de pH 6,4 à pH 5 et de pH 5 à pH 3,6 (article II, figure 4B). Ces transitions sont similaires à celles observées pour C isolé, mais ont lieu 0,9 unité de pH plus tôt. Ceci suggère que le domaine T favorise l'interaction du domaine C avec la membrane à pH plus basique.

Ces résultats sont confirmés par des expériences d'extinction de la fluorescence du Trp par des phospholipides portant des groupements brome en position C6 et C7 de leurs chaînes acyles (article II, figure 4C). Plus la protéine s'insère profondément dans la membrane, plus l'extinction de la fluorescence du Trp par le brome est importante. Les résultats montrent qu'isolé, C s'insère peu profondément dans la membrane (12% d'extinction à pH 4,6) alors que dans la protéine CT, C s'insère plus profondément (25% d'extinction à pH 3,8) et cette insertion a lieu dès pH 6. Le profil d'insertion du domaine T varie peu suivant que T est isolé ou non, avec 48% d'extinction pour T isolé à pH 3,8.

La perméabilisation de LUV est un indicateur de la pénétration du domaine T dans la membrane (Chenal *et al.*, 2002b ; Montagner *et al.*, 2007). Des expériences de perméabilisation de LUV contenant un fluorophore encapsulé, la sulforhodamine B, dont la fluorescence est mesurée lorsqu'elle est libérée, montrent que C isolé ne perméabilise pas les LUV. En revanche, la protéine CT perméabilise les LUV tout aussi efficacement que T (article II, figure 4.D). Ceci confirme que dans la protéine CT, le domaine T s'insère dans la membrane et est spécialisé dans la perméabilisation des membranes.

Le domaine T, isolé ou dans la protéine CT conserve les mêmes transitions structurales en présence de membranes. L'interaction du domaine et sa réorganisation dans la membrane ne sont pas affectées par la présence du domaine C. En revanche, l'interaction de C avec les membranes est favorisée en présence de T puisqu'elle a lieu environ une unité de pH plus basique.

À partir de ces résultats, nous avons fait l'hypothèse que le domaine T agit comme une chaperone du domaine C pour lui permettre d'adopter une conformation favorable à sa translocation. Dans cette étude, nous montrons que le domaine T favorise la conformation MG du domaine C et qu'il dirige toutes les étapes d'interaction de C avec la membrane. Ce phénomène pourrait avoir lieu par l'interaction des zones hydrophobes exposées de T à pH acide avec les zones hydrophobes exposées par C.

THE T DOMAIN OF DIPHTHERIA TOXIN DRIVES MEMBRANE BINDING AND PENETRATION OF THE C DOMAIN*

Anne Chassaing¹, Sylvain Pichard¹, Vincent Forge² and Daniel Gillet¹

Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), ¹Institut de Biologie et Technologies de Saclay (iBiTecS), Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines (SIMOPRO), Gif sur Yvette F-91191, France. ²Institut de Recherche en Technologies et Sciences pour le Vivant (IRTSV), Laboratoire de Chimie Biologie des Métaux (LCBM), Grenoble F-38054, France.

Running head : Membrane interaction of diphtheria toxin

Address correspondence to: Daniel Gillet, Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Institut de Biologie et Technologies de Saclay (iBiTecS), Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines (SIMOPRO), F-91191 Gif sur Yvette, France. E-mail: daniel.gillet@cea.fr. Tel.: (33) 1 69 08 76 46; Fax : (33) 1 69 08 90 71.

During cell intoxication by diphtheria toxin, endosome acidification triggers the translocation of the catalytic (C) domain into the cytoplasm. This event is mediated by the translocation (T) domain of the toxin. Using partitioning experiments with lipid vesicles, fluorescence spectroscopy, and lipid vesicle leakage assay, we characterized the successive steps by which the C and T domains of a CT protein (the toxin lacking the receptor-binding domain) interact with an anionic membrane as a function of pH. The protein binds to the membrane and partially unfolds from pH 7 to 5, starting with T and followed by C about 0.5 pH unit lower. The protein penetrates into the lipid bilayer and adopts a second conformational change, from pH 6 to 3.5, T preceding C again by about 0.5 pH unit. In contrast with T, however, the conformational changes of C do not strictly overlap membrane binding and penetration. The behavior of T is marginally modified by the presence or absence of C while that of C is greatly affected by the presence of T. All the steps leading to membrane insertion of the C domain are triggered at higher pH by the T domain, by 0.5 to 1.6 pH unit. T interacts with C, stabilizing partially folded states of C, thereby acting as a specialized chaperone for C. These results show that T is optimized to react to endosome acidification to drive the membrane interaction of C while C is not, needing T to initiate its translocation.

Diphtheria toxin is a protein secreted by *Corynebacterium diphtheriae* as a single

polypeptide chain of 58 kDa (1). During cell intoxication, it is cleaved by furin into two fragments, the A chain corresponding to the catalytic (C) domain and the B chain corresponding to the translocation (T) and receptor-binding domains. The C and T domains remain covalently linked by a disulfide bond. Following binding to its cell surface receptor, diphtheria toxin is internalized through the clathrin coated pathway. The acidic pH in the endosome triggers a conformational change leading to the insertion of the toxin in the membrane. The C domain is then translocated across the endosomal membrane into the cytosol. The C domain ADP-ribosylates the elongation factor 2, blocking protein translation and leading to cell death.

The translocation process by which the C domain crosses the membrane remains poorly characterized. Several models are proposed (1). One suggests that the C domain is translocated through the pore formed by the B chain (2,3). Other studies showed that both the C and T domains are in contact with the bilayer (4,5,6) and suggest that the hydrophilic surfaces of the C domain are hidden from the hydrophobic core of the membrane by its unfolding (7,8) or/and by the B chain, without translocating through the pore. Most studies have focused on the pH-dependant conformational changes of the isolated T or C domains (9,10,11), or the entire toxin (12) and their propensity to penetrate into the bilayer. In general, only limited pH conditions were explored instead of a continuous range of pH, which is indispensable to monitor the structural transitions of the toxin domains.

In the present study, our aim was to determine step by step how each of the C and T domains influences the membrane-interaction and the associated conformational changes of the other domain. We compared the pH sensitivity and the membrane interaction of the C and T domains, isolated or within the protein CT in which C is covalently linked to T. To this end, two CT proteins were produced mutated at both Trp positions of either T or C, respectively (12). Conformational changes in solution and upon interaction with lipid vesicles were measured as a function of pH, by fluorescence spectroscopy, as well as membrane binding, penetration into the polar head groups and acyl chain regions of the lipid bilayer.

The data allowed to describe the successive steps by which the T domain favors binding of the C domain to the membrane and penetration into the lipid bilayer.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Recombinant proteins - Expression and purification of the recombinant T domain containing mutation C201S (native diphtheria toxin numbering) has been described previously (9,10). Two DNA sequences coding for residues 1 to 380 of the native toxin (C and T domains) and residues 1 to 193 (C domain) were prepared by PCR and cloned into the pET-28a(+) vector (Novagen, Madison, WI, USA) using the *NdeI* and *SalI* restriction sites. The two resulting plasmids, CTpET-28a(+) and CpET-28a(+), encoded the proteins CT and C preceded by an amino-terminal His tag sequence. Cys186 in the C domain protein was mutated in Ser. Mutations W50F and W153F, or W206F and W281F were introduced by PCR mutagenesis in plasmid CTpET-28a(+). The sequences were checked by DNA sequencing.

Production and purification of the recombinant C protein was performed as described for the T protein (9,10). The proteins CT, CT_{W50/153F} and CT_{W206/281F} were expressed at 37°C in the *E. coli* strain BL21(DE3) as inclusion bodies. The inclusion bodies were solubilized in urea 8M, Tris-HCl 0.1M, EDTA 0.1 mM pH 8 and the proteins were purified by immobilized-nickel affinity chromatography. The proteins were folded by dialysis against a 20 mM sodium phosphate buffer at pH 8. The proteins were further purified on a Hi Load Superdex 26/60 size exclusion column (GE Healthcare, Orsay,

France) and finally the buffer was exchanged with NH₄HCO₃ on a G25SF column before lyophilization and storage at -20°C.

Lipid vesicles - L- α -phosphatidylcholine (EPC), phosphatidic acid (EPA) and 1-palmitoyl-2-stearoyl-(6-7)-dibromo-sn-glycero 3-phosphocholine (Br-PC) were from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Suspensions of anionic lipid bilayers at a lipid concentration of 20 mM were prepared in 5 mM citrate buffer pH 7.2 at a EPC:EPA molar ratio of 9:1. LUV and SUV were prepared as described in (13). In the presence of brominated lipids, the EPC:Br-PC:EPA ratio was 5:4:1 and the LUV were prepared at 37°C.

Circular dichroism spectropolarimetry - CD experiments on all the recombinant proteins were performed on a J-815 spectropolarimeter (Jasco, Tokyo, Japan) as described previously (10), at pH 7.2 and 3.5. Spectra were treated as previously described (10).

Fluorescence spectroscopy - Fluorescence measurements were performed with an FP-750 spectrofluorimeter (Jasco, Tokyo, Japan) as described previously (6). Proteins (1 μ M) were added in 5 mM sodium citrate, 200 mM NaCl at the indicated pH, and samples were incubated 2h at room temperature before measurements (Excitation wavelength 292 nm). Maximum emission wavelength (λ_{max}) represents the average of three values obtained from emission spectra that were corrected for blank measurements. For experiments with LUV, proteins (1 μ M) were mixed with LUV (500 μ M) in a 5 mM citrate buffer at the indicated pH. pH was always checked after measurements. Physical binding measurements were monitored as described in (6). The control was obtained by centrifugation of the proteins without LUV.

FRET experiments - Preparation of SUV containing dansyl-DHPE (Molecular Probes, Eugene, OR) has been described previously (10). Briefly, SUV were prepared from EPC, EPA, and dansyl-DHPE at a 9:1:0.5 molar ratio. For each pH, aliquots of protein (0.8 μ M) were added at a lipid/protein molar ratio of 80. FRET was measured (Ex./Em.: 292/520 nm) until fluorescence intensity reached a plateau. Fluorescence intensity (F_{dansyl}) was normalized to the initial fluorescence in the absence of protein (F_0). SUV were used instead of LUV because light scattering was less important.

Fluorescence Extinction in presence of Brominated lipids - LUV containing EPC, Br-PC

and EPA (Avantipolar lipids, Alabaster, AL) at 5:4:1 molar ratio were incubated 2 h at 37 °C in the presence of 1 µM of protein and 500 µM of LUV in a 5 mM citrate buffer at the indicated pH. The fluorescence extinction of Trp was evaluated using the ratio F/F_0 , where F and F_0 are the fluorescence in the presence or in the absence of LUV containing brominated lipids, respectively. The results represent the average of five measurements.

LUV leakage assay - LUV containing 50 mM of sulforhodamine B (SRB) (Molecular Probes, Eugene, OR) were prepared in a 5 mM citrate buffer, at pH 7.2. Unencapsulated SRB was removed by size exclusion chromatography on a Sephadex G-25 column equilibrated with 5 mM citrate, 50 mM NaCl buffer pH 7.2. Release of SRB was monitored by measuring the increase in fluorescence on a Jasco FP-750 spectrofluorimeter after addition of 9 nM protein to a 1.5 mL suspension of 9 µM of LUV in 5 mM citrate buffer at different pH (Ex./Em.: 565/586 nm) under stirring. SRB was selected as fluorescent probe because of its high quantum yield independently of the pH. Fluorescence was normalized as previously described (14). The initial rate (V_0) was deduced from the slope at the origin of the curves.

RESULTS

Recombinant proteins – Five recombinant proteins were used in this study: C and T corresponding to the isolated C and T domains, the protein CT corresponding to a truncated diphtheria toxin lacking the R domain, and two mutant forms of CT in which the Trp of either the T or C domain were mutated into Phe. These mutant CT proteins were produced for Trp fluorescence experiments. CT contains four Trp residues. Trp50 and Trp153 are located in the C domain, in beta strand CB3 and just after strand CB7, respectively, according to the crystal structure of diphtheria toxin (Fig.1) (15,16,17). Trp206 and Trp281 are located in the T domain in helices TH1 and TH5, respectively. Mutant CT_{W50/153F}, in which the Trp of the C domain were replaced by Phe allowed monitoring the conformational changes of the T domain within the CT protein. Mutant CT_{W206/281}, in which the Trp of the T domain were replaced by Phe allowed monitoring the conformational changes of the C domain within the CT protein.

Within the CT proteins, the C and T domains were folded at basic pH and adopted their known molten globule (MG) state at acid pH - We studied by CD spectropolarimetry in the far and near UV the secondary and tertiary structures of the five recombinant proteins at pH 7.2. At this pH, the toxin is considered to be in its native state (10). The CD spectra obtained for the protein C in the far UV, featuring low signals at 190, 210 and 222 nm as compared to the other proteins, indicated a mixed content of α -helices and β -sheets (Fig. 2A, red curve). The far UV CD spectra of the protein T (Fig. 2A, black curve) indicated a secondary structure mainly composed of α -helices, also in agreement with the crystal structure of the toxin. The spectra of the protein CT and its two mutants were identical and showed a mixed content of α and β structures compatible with a contribution of the C and T domains.

In the near UV, the CD spectra of the C domain showed a small positive signal between 280 and 300 nm, which can be attributed to Trp constrained in a rigid environment. Similarly, a double peak in the 260 to 270 nm region of the spectra can be attributed to Phe side chains. The spectra of the T domain showed a strong peak at 292 nm, attributed to Trp, as described previously (6,8). The spectra of the protein CT and its mutants exhibited both the signals of Phe from C and of Trp from C and/or T.

The secondary and tertiary structures of the five proteins were then studied at pH 3.5 at which both proteins C (5) and T (6,8) are known to adopt an MG state. In the far UV, the spectra of the protein C (Fig. 2C, red curve) appeared modified, with a loss of signal at 222 nm. This suggested some loss of α -helix content, in agreement with previous observations (18). The spectra of the T domain (Fig. 2C, black curve) were similar to that recorded at pH 7.2, (6,8,10) with a slight loss of α -helix content. The spectra of the three CT proteins were mainly unchanged, except for a small difference for the non mutated CT protein, probably due to some aggregation.

In the near UV, the signals found at pH 3.5 were greatly reduced (Fig. 2D). This indicated a release of the tertiary constraints on the aromatic residues of the proteins.

Altogether, the data suggested that all five recombinant proteins were folded at pH 7.2 and exhibited a native-like structure. They confirmed that the isolated C (5) and T (6, 10,19) domains adopted an MG conformation at acid pH. This

was also the case within the CT proteins, and showed that the mutations introduced did not alter this behavior.

The T domain favored the acid-induced MG transition of the C domain in solution when covalently linked together - The λ_{\max} of the Trp fluorescence was recorded to monitor the acid-induced conformational changes of the recombinant proteins (Fig. 3). All proteins showed a pH-dependant transition toward higher λ_{\max} , indicating exposure of their Trp to the solvent. The λ_{\max} of the C domain shifted from 338 nm to 343 nm between pH 4.8 and 3.9 ($pK_{1/2} \sim 4.2$) (Fig. 3, closed red triangles). The λ_{\max} of T shifted from 336 to 341 nm between pH 5.5 and 4.5 ($pK_{1/2} \sim 5.3$) (Fig. 3, closed black circles). Interestingly, the transition of the C domain within protein CT_{W206/281F} was profoundly modified as compared to the isolated C domain (Fig. 3, open orange triangles). The fluorescence shifted from 333 nm to 341 nm between pH 5.9 and 3.9 ($pK_{1/2} \sim 5.1$). This indicated that the Trp of C were in a more apolar environment within CT than isolated. This could be explained by the proximity of the two domains in CT. Most of all, the transition of C toward the MG state occurred 0.9 pH units higher than when isolated and was less cooperative. In contrast, the transition of the T domain within protein CT_{W50/153F} was very similar to that of the isolated T domain (Fig. 3, open blue circles). The $pK_{1/2}$ was near identical. The λ_{\max} in the native state was lower by 2 nm indicating that the Trp were less exposed to the solvent, probably due to the proximity of the C domain.

The fluorescence transitions monitored for the non-mutated CT protein and for a mix of C and T domains were more difficult to interpret (not shown). This was due to the concomitant measure of the fluorescence of four Trp, each contributing differently in terms of λ_{\max} and fluorescence intensity (13). In the case of the C and T domain mix, two separate transitions could be seen, corresponding roughly to the respective transition of each domain monitored separately. In the case of CT, two overlapping transitions were detected. The second transition, occurring at the lowest pHs and probably corresponding to the C domain was shifted toward higher pH, as compared to that of the isolated C domain.

Altogether, the results indicated that within the CT protein, the MG transition of the T

domain was similar to that of the isolated T domain, whereas the MG transition of the C domain was shifted 0.9 pH units higher than when isolated. Thus, the T domain enabled the transition of the C domain to occur at higher pHs. This effect was possible only if C and T were covalently linked. Also, the results strongly suggested that the two domains interacted during the transitions.

The T domain favored the interaction of the C domain with the membrane - We then studied the interaction of the recombinant proteins with anionic LUV as a function of pH (Fig. 4). Binding was monitored using physical partition between the LUV and the solvent, by centrifugation and Trp fluorescence measurements.

The C and T proteins bound to the LUV from pH 6.0 to 4.5 and from pH 6.8 to 6.0, respectively (Fig. 4A), indicating preferential binding of T over C. The CT_{W50/153F} and CT_{W206/281F} proteins bound to the LUV from about pH 7.0 to 5.0. Thus, they started their binding transition at about the same pH as T, but it occurred over two pH units instead of one, showing a reduced cooperativity. However, for these proteins, one cannot determine from these data which domain bound first to the membrane: T, C or both.

These results indicated that the isolated C protein bound the membrane about one pH unit lower than the T protein. In contrast, the presence of the T domain covalently linked with C favored the interaction of C with the membrane, at a pH higher than when it is isolated.

The T domain favored the structural transitions of the C domain during interaction with the membrane - In order to investigate the structural transitions adopted by the C and T domains during interaction with the membrane, we monitored the fluorescence of the four proteins in the presence of anionic LUV as a function of pH. The λ_{\max} of the C domain shifted from 338 to 343 nm between pH 4.9 and 4.1 and then from 343 to 340 between pH 4.1 and 3.5 (Fig. 4B, closed red triangles). These two successive transitions have been observed previously (7). The increase of the λ_{\max} observed during the first transition could be attributed to an increased exposure of the Trp of C to the aqueous buffer. Thus, this first transition could

correspond to a partial unfolding of C, as this is the case for the T domain (6,8,13). The second transition indicating burial of the Trp in an apolar environment could correspond to the penetration of C in the membrane, as this is the case for the T domain (6,8,13).

The T domain interacted with the LUV according to the two-step process described previously (6,8,13) (Fig. 4B, closed black circles). The first transition was attributed to the binding of the T domain to the membrane and its unfolding with exposure of its N-terminal Trp to the buffer, the second transition to penetration into the bilayer.

The λ_{\max} of CT_{W50/153F} shifted from 335 to 340 nm between pH 7.1 and 6.0 and then from 340 to 333 nm between pH 6.0 and 4.3 (Fig. 4B, open blue circles), thereby following two transitions very similar to those of the isolated T domain (Fig. 4B, closed black circles). Between these two transitions, the λ_{\max} of CT_{W50/153F} was 3 nm lower than that of T. The first transition found for CT_{W50/153F} correlated with membrane binding (Fig. 4A, CT_{W50/153F}, open blue circles). Notably, this membrane binding transition was less cooperative than that of the isolated T domain (Fig. 4A, T, closed black circles). This may explain the decreased λ_{\max} found for CT_{W50/153F} as compared to T (Fig. 4B). Indeed, the first transition of the T domain within CT_{W50/153F} was not completed when the second transition started.

The λ_{\max} of CT_{W206/281F} shifted from 335 to 339 nm between pH 6.4 and 5.0 and then from 339 to 336 between pH 5.0 and 3.6 (Fig. 4B, open orange triangles). Thus, although the C domain within the CT protein followed two transitions similar to those of the isolated C domain, these transitions occurred at higher pH. This suggested that the T domain favored the interaction of C with the membrane when C was covalently linked to T. The λ_{\max} of CT_{W206/281F} was about 4 nm lower than that of the isolated C domain. Again, this suggested proximity or contacts between the C and T domains within CT, limiting exposure of the Trp to the environment.

Overall, both domains underwent two structural transitions upon binding and penetration into the membrane. While for T the first transition corresponded to binding and the second to membrane penetration, this is less obvious for C. Within CT, the presence of C did

not affect the transitions of T but the presence of T favored the transitions of C at higher pHs.

The T domain facilitated the insertion of the C domain in the membrane - To better characterize the environment of the Trp of the C and T domains within CT during the interaction with the membrane, we measured the quenching of the Trp fluorescence of T, C and the CT mutants by anionic LUV containing brominated phospholipids as a function of pH (Fig. 4C). We used Br-PC lipids with Br atoms covalently bound at positions C6 and C7 of the oleoyl chains.

The Trp fluorescence of the isolated C domain was slightly quenched below pH 4.6, up to 12% at pH 3.8 (Fig. 4C, closed red triangles). This may indicate a weak penetration of C in the hydrophobic layer of the membrane. In contrast, the fluorescence of the T domain was strongly quenched as pH decreased below 6, up to 48% at pH 3.8 (Fig. 4C, closed black circles). This confirmed similar experiments (13) indicating deep penetration of the T domain into the bilayer. Very similar values were obtained for CT_{W50/153F} (Fig. 4C, open blue circles), strongly suggesting that the T domain reached the same depth into the hydrophobic layer of the membrane, isolated or within the CT protein.

An intermediate situation was found with CT_{W206/281F} (Fig. 4C, open orange triangles). A significant fluorescence quenching was observed below pH 5.4, up to 25% at pH 3.8. This is twice the effect measured for C alone. Thus, the C domain penetrated deeper inside the bilayer when covalently linked to the T domain and this transition occurred at higher pH than when it was isolated.

Anionic LUV permeabilization was shown to be an indicator of penetration of the T domain into the membrane (6,8,9). While the isolated C domain did not permeabilize LUV significantly, the CT protein permeabilized LUV at least as efficiently as the T protein (Fig. 4D). This confirmed that the T domain within the CT protein was fully capable of penetrating the lipid bilayer.

DISCUSSION

Figure 5 summarizes the data collected in the present study. Various methods were used to probe the interaction of the C and T domains of diphtheria toxin with the membrane, alone or

covalently linked together. Binding to the membrane was revealed by centrifugation experiments (Fig. 4A; Fig. 5, black arrows). Conformational changes of the C and T domains were monitored by Trp fluorescence of the CT proteins mutated on the Trp of C or T (Fig. 4B; Fig. 5, transitions C1, C2 and T1, T2). Penetration into the fatty acid region of the bilayer was revealed by the quenching of the Trp fluorescence of the mutant CT proteins by Br-PC (Fig. 4C; Fig. 5, blue arrows). Permeabilization of the membrane was detected by fluorescent dye release from LUV (Fig. 4D; Fig. 5, yellow arrows). From all the data we describe the succession of steps leading to membrane-binding and membrane-penetration of both domains of the protein. In addition, we show that the T domain behaves relatively independently from the C domain, in solution (Fig. 3) and during membrane interaction (Fig. 4 and 5), while the C domain is highly influenced by the presence of the T domain.

The T domain drives the successive steps by which the C domain binds and penetrates the membrane - From pH 7 to 5, the protein CT binds to the membrane (Fig. 5). T is responsible for initiating binding because binding of T and CT starts at the same pH while binding of the isolated C domain starts one pH unit lower. Monitoring the conformational changes C1 and T1 (Fig. 5) associated with binding (Fig. 4A and B) lead to the same conclusion (see next section).

From pH 6 to 4 or below, both domains of CT penetrate into the membrane (Fig. 4C; Fig. 5, blue arrows). Again, T leads the way for the C domain. It is not influenced by the presence or absence of C while C is clearly influenced by the presence of T.

The T domain favors the conformational changes adopted by the C domain during binding to, and penetration into the membrane - The structural behavior of the T domain interacting with the membrane as a function of pH is quite similar whether it is isolated or linked to C. The only difference found is that binding is less cooperative for the protein CT than for T (Fig. 4A and 5, black arrows). As a result, binding seems to overlap both the unfolding of T (Fig. 5, structural transition T1) and its rearrangement in the membrane (Fig. 5, structural transition T2) (6,13). But in fact, a fraction of bound molecules already started

rearrangement in the membrane (T2) while a fraction of molecules, have not fully unfolded yet due to the decreased cooperativity of the reaction.

In contrast, the structural behavior of the C domain during interaction with the membrane is very different when it is isolated or connected with T. When it is isolated, its unfolding (Fig. 4B and Fig. 5, structural transition C1) does not coincide with binding (Fig. 4A and Fig. 5, black arrow). This indicates that C binds first to the membrane without conformational change and then unfolds in about the same pH range as in solution (Fig. 3). Then, it progressively penetrates the membrane to a shallow position (Fig. 4C and Fig. 5, blue arrow), finishing unfolding (Fig. 4B and Fig. 5, transition C1) before a second rearrangement of its structure (Fig. 4B and Fig. 5, transition C2).

When C is connected with T, T clearly favors unfolding of C in solution (Fig. 3) and during binding to the membrane (Fig. 4A and B and Fig. 5, structural transition C1 and black arrow). Thus, T favors the interaction of C with the membrane because it stabilizes its partially folded state (Fig. 5, C1). This strongly suggests that C binds the membrane concomitantly with T or at a pH not more than 0.5 units lower than that driving the binding of T. Then, T helps C to penetrate into the hydrophobic core of the membrane. During this step, C finishes its conformational change C1 (Fig. 4B and Fig. 5) and then undergoes conformational change C2 (Fig. 4B and Fig. 5) corresponding to deeper penetration into the acyl chain layer of the membrane, (Fig. 4C and Fig. 5, blue arrow), deeper than in the absence of T.

T but not C is specialized to permeabilize the membrane - The T domain permeabilizes the membrane (Fig. 4D; Fig. 5, yellow arrows) during the membrane-penetration step (Fig. 4C; Fig. 5, blue arrows). Deeper is inserted the T domain, stronger is the permeabilization. The results clearly show that the T domain is absolutely required for permeabilization, C alone being incapable of doing so (Fig. 4D). Interestingly, the penetration of C in the membrane does not impair its permeabilization by T. This suggests that the C domain does not plug the passageway formed by T in the bilayer. One cannot state however that this passageway is taken or not by C to cross the membrane. Nevertheless, these results indicate that T is

specialized to permeabilize the membrane while C is not, even though it is embedded in the bilayer. In other words, the membrane is not destabilized by the insertion of C.

T acts as a chaperone for C - It has been proposed that the T domain acts as a chaperone for the C domain, enabling its passage through the membrane at acid pH (4,5,12,13,20,21). Indeed, the T domain at acid pH in solution or into membranes was shown to bind proteins in an MG state or hydrophobic peptides (20,21). However, it was concluded that the chaperone model was not formerly demonstrated (21). The present work extends these studies by characterizing step by step the chaperone-like activity of T for C. It demonstrates that the T domain acts on the structural behavior of the C domain both in solution and in the membrane, shifting the conformation of C from native to partially unfolded.

T favors the interaction of C with the membrane because it brings C in the vicinity of the bilayer. T stabilizes the MG state of C in solution (Fig. 3), which is propitious to membrane insertion and/or translocation (22,23).

T exposes hydrophobic surfaces, which in turn may interact with similar surfaces on C. In that sense T acts as a chaperone for C. The membrane itself may also have a destabilizing effect on C: the interfacial pH is lower than in the bulk and the hydrophobic acyl chains may interact with hydrophobic regions of the protein.

Finally, T imposes its rule on C because it is more sensitive to pH. Indeed, it has an elaborate system of reactivity to a wide range of acid pH starting just below pH 7 involving its 6 histidine residues (8).

These findings emphasize the importance of the physicochemical properties a protein should bear in order to interact with, and penetrate into a membrane. They should be taken into consideration to evaluate or adapt the capacity of proteins to bind or cross a membrane.

Acknowledgements: we thank Dr Alain Lecoq for help with protein folding.

REFERENCES

1. Chenal, A., Nizard, P., Gillet, D. (2002) *J. Toxicol. Toxin Rev.* **21**, 321-359
2. Boquet, P., and Pappenheimer, A. M., Jr. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 5770-5778
3. London, E. (1992) *Biochim Biophys Acta* **1113**, 25-51
4. Papini, E., Colonna, R., Cusinato, F., Montecucco, C., Tomasi, M., and Rappuoli, R. (1987) *European journal of biochemistry / FEBS* **169**, 629-635
5. Zhao, J. M., and London, E. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 15369-15377
6. Chenal, A., Savarin, P., Nizard, P., Guillain, F., Gillet, D., and Forge, V. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 43425-43432
7. Hayashibara, M., and London, E. (2005) *Biochemistry* **44**, 2183-2196
8. Perier, A., Chassaing, A., Raffestin, S., Pichard, S., Masella, M., Menez, A., Forge, V., Chenal, A., and Gillet, D. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 24239-24245
9. Nizard, P., Chenal, A., Beaumelle, B., Fourcade, A., and Gillet, D. (2001) *Protein Eng.* **14**, 439-446
10. Chenal, A., Nizard, P., Forge, V., Pugniere, M., Roy, M. O., Mani, J. C., Guillain, F., and Gillet, D. (2002) *Protein Eng.* **15**, 383-391
11. Lai, B., Zhao, G., and London, E. (2008) *Biochemistry* **47**, 4565-4574
12. Wang, Y., Malenbaum, S. E., Kachel, K., Zhan, H., Collier, R. J., and London, E. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 25091-25098
13. Montagner, C., Perier, A., Pichard, S., Vernier, G., Menez, A., Gillet, D., Forge, V., and Chenal, A. (2007) *Biochemistry* **46**, 1878-1887
14. Faudry, E., Job, V., Dessen, A., Attree, I., and Forge, V. (2007) *Febs J.* **274**, 3601-3610
15. Choe, S., Bennett, M. J., Fujii, G., Curmi, P. M., Kantardjieff, K. A., Collier, R. J., and Eisenberg, D. (1992) *Nature* **357**, 216-222
16. Bennett, M. J., Choe, S., and Eisenberg, D. (1994) *Protein Sci.* **3**, 1444-1463
17. Weiss, M. S., Blanke, S. R., Collier, R. J., and Eisenberg, D. (1995) *Biochemistry* **34**, 773-781

18. Wolff, C., Wattiez, R., Ruyschaert, J. M., and Cabiaux, V. (2004) *Biochim Biophys Acta* **1661**, 166-177
19. Zhan, H., Oh, K. J., Shin, Y. K., Hubbell, W. L., and Collier, R. J. (1995) *Biochemistry* **34**, 4856-4863
20. Ren, J., Kachel, K., Kim, H., Malenbaum, S. E., Collier, R. J., and London, E. (1999) *Science* **284**, 955-957
21. Hammond, K., Caputo, G. A., and London, E. (2002) *Biochemistry* **41**, 3243-3253
22. van der Goot, F. G., Gonzalez-Manas, J. M., Lakey, J. H., and Pattus, F. (1991) *Nature* **354**, 408-410
23. Petros, A. M., Olejniczak, E. T., and Fesik, S. W. (2004) *Biochim Biophys Acta* **1644**, 83-94

FOOTNOTES

*The authors dedicate this work to the memory of Pr. André Ménez.

The abbreviations used are : Br-PC, 1-Palmitoyl-2-Stearoyl(6-7)dibromo-sn-glycero-3Phosphocholine; C, catalytic; CD, circular dichroism ; EPC, L- α -phosphatidylcholine; EPA, phosphatidic acid; FI, fluorescence intensity; LUV, large unilamellar vesicles ; λ_{\max} , maximum emission wavelength ; MG, molten globule; SRB, sulforhodamine B ; SUV, small unilamellar vesicles, T, translocation.

This work was supported by the Commissariat à l' Energie Atomique (Signalization and membrane transport program of the Life Science Division).

Author contribution: D.G. designed research, A.C. and S.P. performed the experiments, A.C. performed data processing, A.C., V.F. and D.G. discussed the results and their interpretation.

Key words : diphtheria toxin, translocation, conformational change, pH, molten globule, unfolding, membrane interaction.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Structure of the CT protein extracted from diphtheria toxin PDB file 1F0L : C domain (red), T domain (grey), connecting loop (blue). The Trp are indicated in orange.

Fig. 2. Far-UV (A&C) and near-UV (B&D) CD spectra of C (red), T (black), CT (light blue), CT_{W206/281F} (orange), CT_{W50/153F} (dark blue) and C mixed with T (green) in solution at pH 7.2 or 3.5. θ is the molar ellipticity in deg.cm².dmol⁻¹. For far UV, θ is the mean residue molar ellipticity.

Fig.3. Conformational changes of C, T, CT_{W206/281F} and CT_{W50/153F} monitored by Trp fluorescence as a function of pH. C (closed red triangles), T (closed black circles), CT_{W206/281F} (open orange triangles), CT_{W50/153F} (open blue circles). The best fit for each transition is represented.

Fig. 4. (A) Partition of C, T, CT_{W206/281F} and CT_{W50/153F} between the buffer and LUV as a function of pH studied by ultracentrifugation. (B) Trp fluorescence of C, T, CT_{W206/281F} and CT_{W50/153F} in the presence of anionic LUV as a function of pH. (C) Quenching of Trp fluorescence of C, T, CT_{W206/281F} and CT_{W50/153F} by LUV containing Br-PC. The results are expressed as the relative quenching efficiency as compared to the Trp fluorescence at pH 7. The lower the value, the closer the Trp from the quencher. (D) Permeabilization of anionic LUV by C, T and CT. CT_{W206/281F} and CT_{W50/153F} permeabilized LUV as efficiently as CT (not shown). C (closed red triangles), T (closed black circles), CT_{W206/281F} (open orange triangles), CT_{W50/153F} (open dark blue circles) and CT (open light blue circles).

Fig. 5. Schematic representation of the successive steps of the interaction of proteins C, T, CT_{W50/153F} and CT_{W206/281F} with anionic LUV. The transitions of the curves of Fig. 4 are indicated : binding data (black) are from Fig. 4A, Trp quenching by Br-PC data (blue) and permeabilization data (yellow) are from Fig. 4C and 4D, conformational changes of C (C1 and C2) and T (T1 and T2) observed by Trp fluorescence are from Fig. 4B. From top to bottom, isolated C domain, C within CT (CT_{W206/281F}), T within CT (CT_{W50/153F}) and isolated T domain.

FIGURES

Figure 1

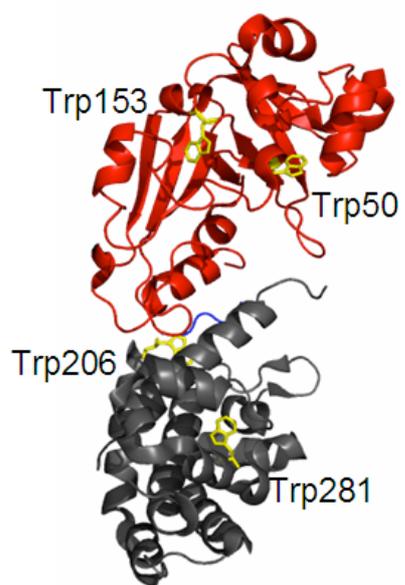


Figure 2

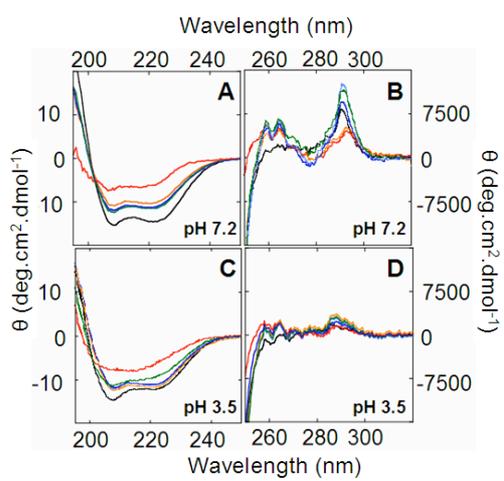


Figure 3

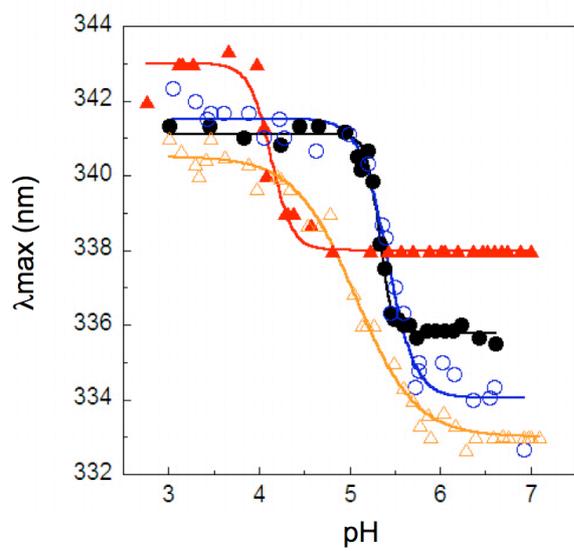


Figure 4

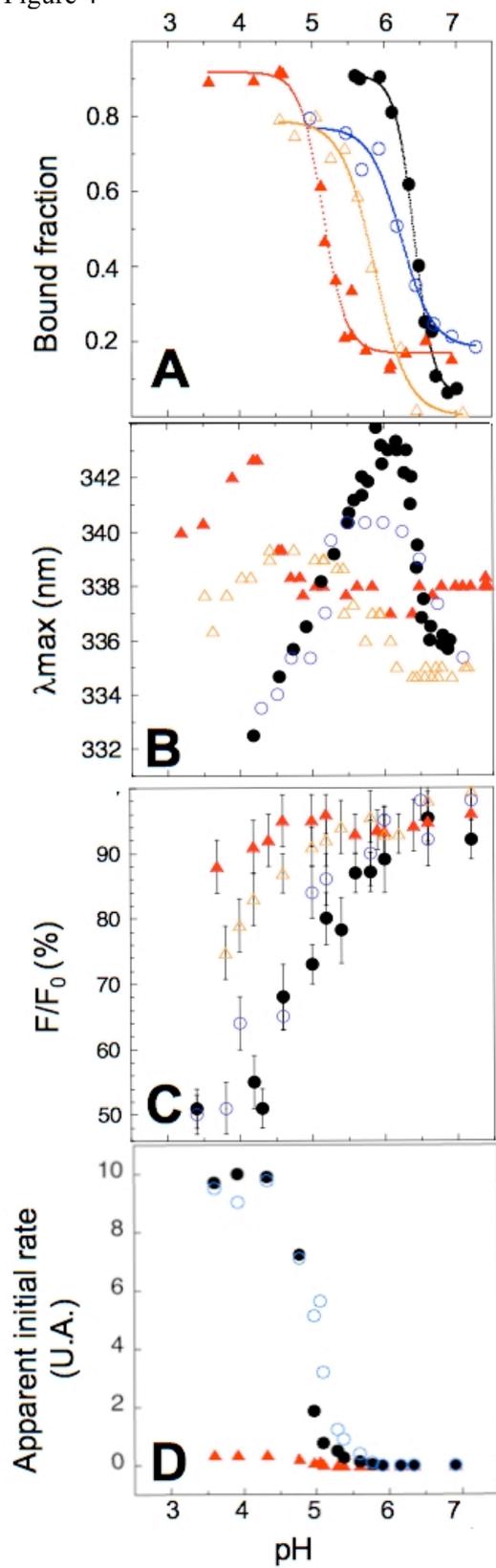
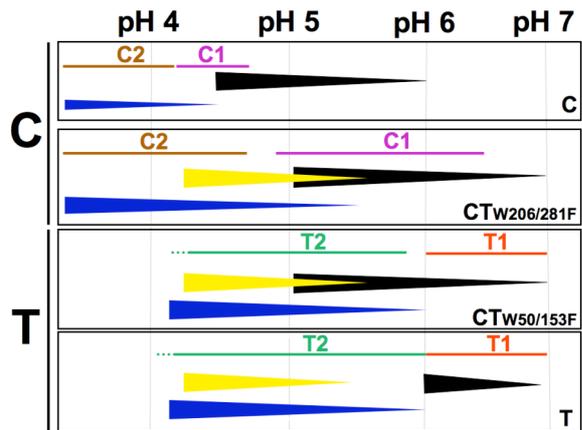


Figure 5



PARTIE III : CONCLUSIONS

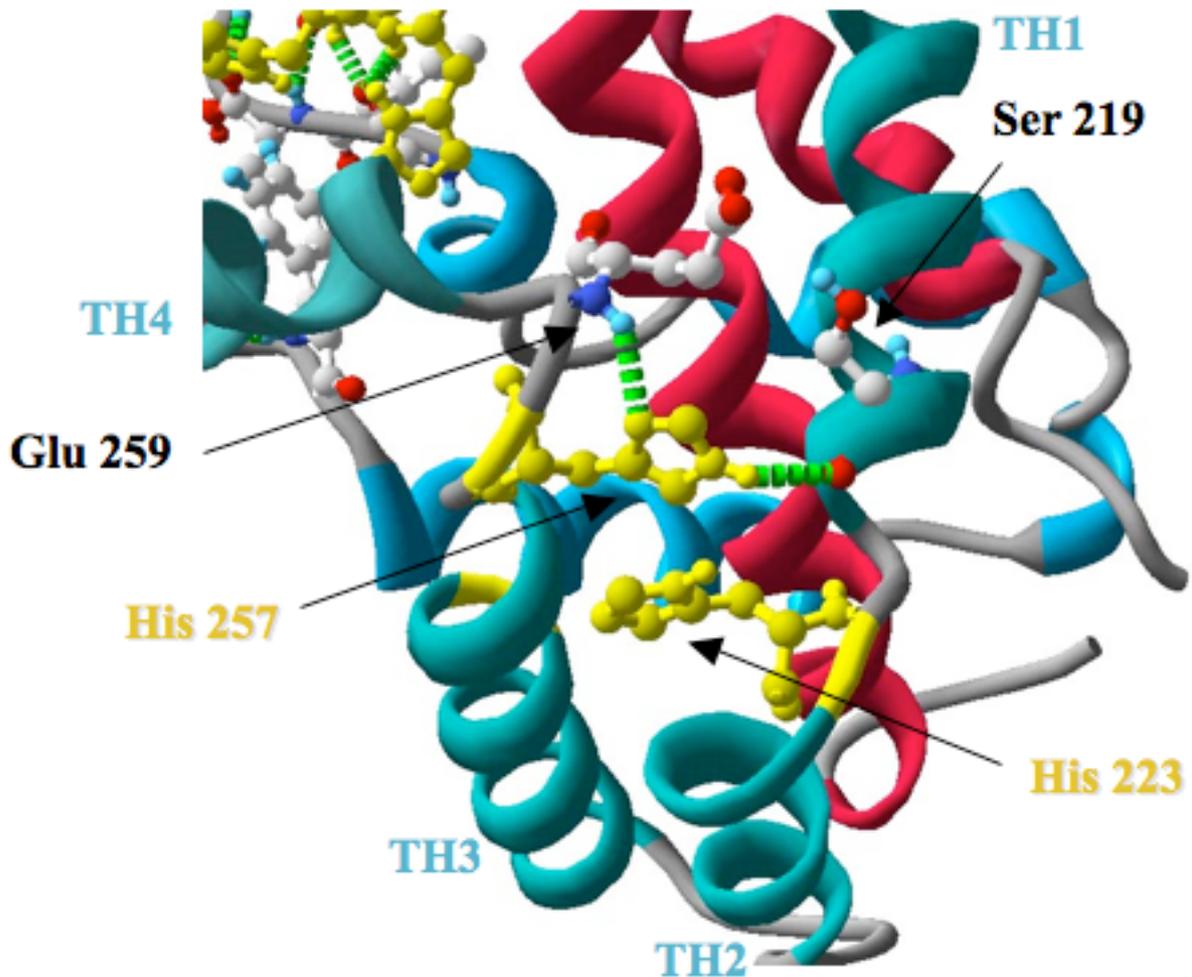


Figure 54 : Position de la paire d’histidine His223-257 dans la structure du domaine T. Les deux histidines sont stackées. L’histidine 257 partage deux liaisons hydrogène (vert) avec les résidus voisins Ser219 et Glu259. Les histidines sont représentées en jaune. Les groupes d’hélices TH1-4 et TH8-9 sont respectivement représentés en vert et rouge.

Le mécanisme de translocation de la DT est étudié depuis plusieurs années au laboratoire. Les publications d'Alexandre Chenal, Caroline Montagner au CEA de Grenoble, Aurélie Perier et moi-même ont permis de mieux comprendre les étapes sensibles au pH de ce processus et de proposer un modèle des étapes précoces de la translocation. La figure 55 synthétise les données acquises sur la translocation de la DT, à partir des articles du laboratoire. L'ensemble de ces résultats a permis de proposer un modèle d'interaction des domaines C et T de la protéine CT avec la membrane.

La DT est internalisée à la surface de la cellule puis est endocytée par la voie dépendante de la clathrine. Une fois dans l'endosome précoce (pH 6,5-6), la DT transloque son domaine catalytique dans le cytosol. Les différentes étapes de la translocation sont gouvernées par le pH.

De pH 7 et pH 6

La première étape est la déstabilisation du domaine T par protonation concertée des histidines. Les histidines His322, His323 et His251 jouent un rôle majeur dans l'interaction avec la membrane anionique (article I, figure 4). Leur protonation conduit à une déstabilisation du domaine T. En effet, les histidines His322 et His323 se situent dans une zone charnière entre les groupes d'hélices TH5-7 et TH8-9. Leur protonation pourrait désolidariser ces deux groupes d'hélices et augmenter la flexibilité du domaine T. L'His223 est impliquée dans des liaisons hydrogène avec Glu259 et Ser219 (figure 54). Sa protonation entraîne certainement une déstabilisation locale du domaine T, identifiable par l'exposition des Trp en milieu polaire. La protonation de chaque histidine de la paire pourrait avoir un effet cumulatif et générer une déstabilisation importante. Enfin, l'His251 est située dans l'hélice TH3 et fait face à l'hélice TH5 dans la structure native du domaine. La protonation de His251 pourrait jouer un rôle dans la séparation des deux groupes d'hélices TH1-4 et TH8-9. Les histidines sont donc situées dans la structure dans des zones stratégiques. Leur protonation induit une augmentation de la flexibilité du domaine T. Dans sa conformation protonée, le domaine T est compétent pour l'interaction avec les membranes (Chenal *et al.*, 2002b, Montagner *et al.*, 2007 ; Perier *et al.*, 2007).

En présence de membranes, il est fort probable que la liaison du domaine T passe par un état MG différent de celui observé en solution. Que le domaine T passe transitoirement ou

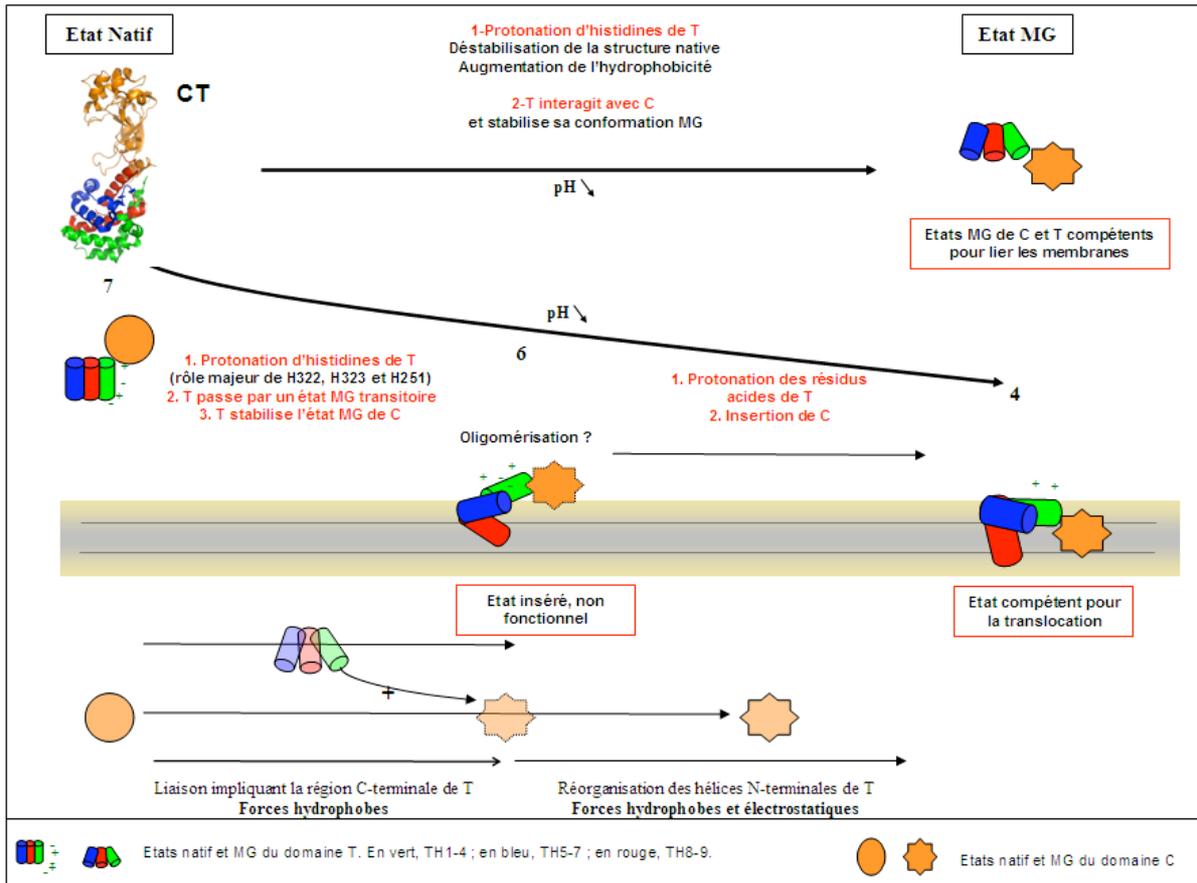


Figure 55 : Représentation schématique des étapes précoces de la translocation chez la DT.

pas par cet état, l'augmentation de la flexibilité et l'augmentation d'hydrophobicité induites par l'acidification sont des propriétés indispensables à sa liaison. Le fait que les effets des mutations et la liaison à la membrane ne soient pas corrélés (article I, figure 6) montre que la liaison dépend d'autres facteurs que le pH et la formation de l'état MG. La stabilité des états natifs et MG est certainement importante. L'acquisition de la forme compétente est indépendante de la présence du domaine C (article II, figures 3 et 4B). Les interactions impliquées dans cette première étape sont de nature hydrophobe et ont lieu entre le domaine C-terminal du domaine T et la membrane. L'état lié est caractérisé par une région N-terminale solvatée et une région C-terminale.

Entre pH 7 et pH 6, le domaine C est déstabilisé, et cette déstabilisation se poursuit à pH plus acide (article II, figure 4B). Le changement de conformation de C se traduit également par l'exposition des Trp au solvant. Isolé et en présence de membranes, ce domaine n'est déstabilisé qu'à partir de pH 5. Nous suggérons qu'entre pH 7 et pH 6, le domaine T, qui possède un système perfectionné de réactivité au pH, interagit avec les zones hydrophobes exposées du domaine C et stabilise ainsi l'état MG de C. À l'état MG, C est capable de se lier aux membranes anioniques seulement à un $pK_{1/2}$ de 5,2 lorsqu'il est isolé ((article II, figure 4A et (Hayashibara & London, 2005)). T agirait comme une chaperone du domaine C. À pH 6, le domaine T est lié à la membrane ((Chenal *et al.*, 2002b) et article I, figure 4A) et possède déjà des régions insérées.

De pH 6 à pH 4

À pH 6, les domaines C et T sont liés à la membrane. Le domaine T a terminé sa première transition structurale T1 (article II, figure 5) et commence une deuxième transition T2 caractérisée par l'enfouissement des Trp dans la membrane. Cette transition, sensible à la présence de NaCl fait intervenir des interactions électrostatiques. Des études de FRET entre les Trp du domaine T et des groupement dansyl marquant les têtes polaires de SUV anioniques, montrent que le domaine T interagit avec la région superficielle de la membrane dès pH 6,5 (Chenal *et al.*, 2002b), et qu'il pénètre dans la région des chaînes acyles dès pH 6 ((Montagner *et al.*, 2007). La pénétration dans le cœur hydrophobe de la membrane a lieu au même pH en présence ou absence du domaine C (article II, figures 4C et 5). Cette deuxième transition T2 correspond à une réorganisation des hélices N-terminales TH1-4. En effet, la

formation de l'état fonctionnel du domaine T est liée à l'insertion des hélices N-terminales dans la membrane. Les peptides correspondant aux hélices TH1, TH3 et TH4 ont des propriétés de liaison à la membrane, dépendantes du pH. L'hélice TH1 joue un rôle important. Elle possède une structure particulière : une face hydrophobe séparée d'une face chargée négativement par deux régions chargées positivement (figure 49). À pH 6, TH1 reste à la surface de la membrane. Puis, lorsque le pH s'acidifie, les charges négatives sont neutralisées par la protonation des résidus acides, permettant son insertion. Elle adopte probablement une position interfaciale, avec la face hydrophobe en contact avec les chaînes acyles des phospholipides (Chenal *et al.*, 2002b ; Montagner *et al.*, 2007). Lorsque TH1 est transloquée du côté cytosolique de la membrane, elle se retrouve dans un environnement à pH 7,2. Les résidus acides de l'hélice TH1 sont susceptibles d'être déprotonés. La réapparition de charges négatives bloquerait alors l'hélice TH1 dans le cytosol. D'après Senzel *et al.* (2000), la translocation concerne l'ensemble des hélices TH1-4, l'hélice TH5 adoptant une conformation transmembranaire (Senzel *et al.*, 2000). En présence d'un gradient électrochimique, la translocation des hélices N-terminales favoriserait l'insertion membranaire du domaine C et son passage du côté *trans* de la membrane (Oh *et al.*, 1999a). TH1 interagit avec la protéine cytosolique β -COP, et cette interaction favorise la translocation de C. Le passage des hélices TH1 à TH4 à travers la membrane est possible grâce à une déstabilisation de la bicouche lipidique. De la même manière que les peptides antibiotiques, il est possible que la liaison à la membrane induise un étirement de la bicouche, facilitant la translocation (Sato & Feix, 2006). Plusieurs travaux suggèrent que cette étape s'accompagne d'une oligomérisation de la DT (Sharpe & London, 1999 ; D'Silva & Lala, 2000 ; Steere & Eisenberg, 2000). L'équipe de Kent a étudié par réflexion de neutrons sur le mutant CRM197 les transitions structurales de l'état lié à des membranes anioniques (Kent *et al.*, 2007). Ils observent que la toxine liée s'oligomérisse avec l'augmentation de la concentration en DT, et que seule la forme oligomérique subit une large extension, qui correspond à son insertion dans la membrane. Les auteurs suggèrent que cette extension correspond une transition de la DT liée monomérique vers une conformation ouverte, normale au plan de la membrane, et capable de s'y insérer. D'autres études ont suggéré que la liaison au récepteur favorise la dimérisation de la toxine (Louie *et al.*, 1997).

Un aspect encore mal connu de la translocation est la conformation exacte de l'état lié et partiellement inséré de la toxine à pH 6, du fait de grandes différences expérimentales telles la nature des membranes, la concentration en protéine, l'utilisation des protéines T, CT ou

DT, et enfin la présence ou non du récepteur HB-EGF. Ce dernier pourrait favoriser l'oligomérisation de la DT.

À pH 6, le domaine C n'a pas terminé sa première transition (article II, figures 4B et 5). Celle-ci se poursuit jusqu'à pH 5. Le domaine C initie ensuite sa deuxième transition qui correspond à la pénétration dans la membrane. Cette étape a lieu grâce à l'interaction entre les domaines C et T, qui permet au domaine T de déstabiliser le domaine C, sa liaison, et son insertion membranaire.

Les travaux présentés dans cette thèse permettent de comprendre plus finement les étapes précoces du mécanisme de translocation de la DT. L'étude du comportement de la protéine CT en fonction du pH nous a permis d'identifier les propriétés du domaine C, qui en font une protéine translocable par le domaine T et transitoirement membranaire. Ces informations sont indispensables lors de l'utilisation du domaine T comme vecteur de protéines hétérologues. La protéine à transloquer doit être déstabilisée à pH acide et exposer des surfaces hydrophobes capables d'interagir avec le domaine T. La DT a déjà été utilisée pour la vectorisation de protéines thérapeutiques (Chapitre III et figure 50). L'objectif est de cibler une population cellulaire en modifiant le domaine R et de transloquer dans le cytosol une protéine hétérologue, substituée au domaine C.

Quatre protéines ont été transloquées avec succès : la chaîne A de la ricine (Sundan *et al.*, 1982), l'exoenzyme C3 de *C. botulinum* (Aullo *et al.*, 1993), le facteur de croissance fibroblastique acide (Wiedlocha *et al.*, 1992 ; Wiedlocha *et al.*, 1994) et la dihydrofolate réductase (Klingenberg & Olsnes, 1996). De nombreux essais ont cependant été infructueux, suggérant que le domaine T ne peut transloquer que des protéines respectant certaines propriétés. Les quatre protéines transloquées avec succès partagent la caractéristique de subir un dépliement partiel de leur structure sous l'effet du pH acide et la proximité de la membrane. Les résultats de l'article II permettent de comprendre comment le domaine T utilise cette propriété pour transloquer la protéine, en agissant comme un chaperon.

Enfin, l'étude des effets respectifs des domaines C et T l'un sur l'autre pourrait être étendue aux autres toxines de type RTC, notamment la BoNT/A pour laquelle aucun changement de structure secondaire et tertiaire significative du domaine T n'a été détecté lors de l'insertion dans des vésicules lipidiques (Galloux *et al.*, 2008).

LISTE DES ABREVIATIONS

AP : Protéine adaptatrice
BoNT : Neutotoxine botulique de *Clostridium botulinum*
CaM : Calmodulin
CMG2 : Capillary morphogenesis protein 2
CNF : Facteur cytotoxique nécrosant
CST : Toxine ADP-ribosylante de *Clostridium spiroforme*
CT : Protéine constituée des domaines C et T de la toxine diphtérique liés covalamment
CTx : Toxine cholérique de *Vibrio cholerae*
CyaA : Adénylate cyclase de *Bordetella pertussis*
DNT : Toxine dermonecrotique de *Bordetella pertussis*
DT : Toxine diphtérique
EF : Facteur oedémateux
ERAD : Système de dégradation protéique associé au réticulum endoplasmique
ETA : Exotoxine A de *Pseudomonas diphtheriae*
EF-2 : Facteur eucaryotique d'élongation 2
Gb3 : Globotriosyl céramide
GM1 : Monosialoganglioside
GPI : Glycophosphatidylinositol
GUV : Vésicule unilamellaire géante
HSP : Protéine de choc thermique
HB-EGF : Heparin binding epidermal growth factor
LUV : Large unilamellar vesicle
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MIDAS : Site d'adhésion dépendant d'un ion métallique
MG : Molten globule
MLV : Vésicule multi lamellaire
NAD⁺ : Nicotinamide adenosyl di-phosphate
NT : Neurotoxine
LF : Facteur léthal
LRP1 : Low density lipoprotein related receptor
EPA : Acide phosphatidique d'oeuf
EPC : Phosphatidyl choline d'oeuf
PA : Antigène protecteur de *Bacillus anthracis*
PCC : Protein conducting channel
PTX : Toxine pertussique
RE : Réticulum endoplasmique
RTX : Repeat in toxin
SUV : Small unilamellar vesicle
STx : Toxine de Shiga
SubAB : Subtilase AB₅
SV2 : Protéine des vésicules synaptiques 2
Syt : Synaptotagmine
TEM8 : Tumor endothelial marker-8
TeNT : Neurotoxine tétanique de *Clostridium tetani*
TGN : Réseau *trans*-golgien
Tm : Température de fusion

LISTE DES FIGURES

PARTIE I : CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Chapitre I : Toxines à activité intracellulaire

Figure 1 : Structure des toxines bactériennes de type AB.

Figure 2 : Homologies de séquences entre les toxines CNF1 et DNT.

Figure 3 : Structure de l'adényl cyclase de *B. pertussis*.

Figure 4: Représentations tridimensionnelles des trois protéines constituant le complexe toxique du charbon.

Figure 5 : Mécanismes d'action des toxines à activité intracellulaire de type AB.

Figure 6 : Schéma de la synthèse des gangliosides.

Figure 7 : Topologie des protéines SV2 et localisation des résidus conservés entre les isoformes.

Figure 8 : Classification des voies d'endocytose.

Figure 9: Marqueurs des principales voies d'endocytose.

Figure 10: Clichés de microscopie électronique représentant les étapes précoces de l'endocytose dépendante de la clathrine.

Figure 11: Effet de la palmitoylation des récepteurs du complexe toxique du charbon sur l'internalisation de la toxine.

Figure 12: Voies d'internalisation de la TeNT et de la transferrine dans les motoneurons.

Figure 13 : Clichés de microscopie électronique représentant l'endocytose par les cavéoles.

Figure 14 : Modes d'entrée de la toxine cholérique dans les cellules.

Figure 15 : Internalisation et trafic intracellulaire des toxines Shiga et de type Shiga.

Figure 16 : Les deux grande voies de trafic intracellulaire.

Figure 17: Eléments de la machinerie moléculaire impliquée dans le transport rétrograde des endosomes au réseau trans-golgien.

Figure 18: Différentes voies d'endocytose et de trafic intracellulaire exploitées par les toxines.

Figure 19 : Eléments de trafic intracellulaire.

Figure 20 : Représentation schématique du réseau tubulaire endosomal.

Figure 21 : Trafic intracellulaire du récepteur de l'EGF.

Figure 22 : Désorganisation du cytosquelette d'actine induite par l'action de toxines bactériennes.

Figure 23 : Modification des petites protéines G par les toxines bactériennes.

Chapitre II : Membranes biologiques et translocation des toxines bactériennes

Figure 24 : Distribution asymétrique des phospholipides dans la membrane des érythrocytes humains.

Figure 25 : Structure d'une bicouche lipidique fluide de dioléophosphatidylcholine (DOPC).

Figure 26 : Taille des vésicules lipidiques.

Figure 27: Représentation schématique des adaptations permettant de réduire ou d'abolir le « mismatch » hydrophobe entre une hélice transmembranaire et la bicouche lipidique.

Figure 28: Couplage partition/repliement de la mélittine dans une membrane de POPC.

Figure 29: Formation des hélices et association à la membrane.

Figure 30: Structures des domaines de translocation de quelques toxines de type AB_{RTC}.

Figure 31 : Domaines fonctionnels des toxines CNF1 et DNT.

Figure 32 : Structures des heptamères formés par la toxine du charbon et la toxine C2-II.

Figure 33 : Modèle de translocation du domaine catalytique de la BoNT à travers son composant B.

Figure 34 : Protéines impliquées dans la machinerie Sec suivant leur localisation membranaire.

Figure 35 : Organisation de l'heptamère formé par le complexe toxique du charbon, et rôle dans la translocation.

Chapitre III : La toxine diphtérique

Figure 36 : Structure de la toxine diphtérique.

Figure 37 : Représentation schématique du récepteur de la toxine diphtérique, le proHB-EGF.

Figure 38 : Interaction du domaine R de la toxine diphtérique avec l'HB-EGF.

Figure 39 : Trafic intracellulaire de la toxine diphtérique biotinylée.

Figure 40 : Structure du domaine catalytique de la DT à pH 5 et séquence.

Figure 41 : Modèle d'insertion membranaire du domaine C de la toxine diphtérique à pH 5, proposé par Wolff *et al.*, 2004.

Figure 42 : Structure tridimensionnelle et séquence du domaine T de la toxine diphtérique.

Figure 43 : Topologie du domaine T de la toxine diphtérique, inséré dans les membranes selon les états P et TM.

Figure 44: Modèle d'insertion membranaire du domaine T.

Figure 45 : Capacité de partition dans la membrane des hélices N-terminales du domaine T de la DT.

Figure 46 : Illustration schématique de la hiérarchie des interactions entre les hélices lors de l'insertion du domaine T de la toxine diphtérique.

Figure 47 : Modèle topologique de l'insertion de la DT dans des membranes modèles à pH 5,2.

Figure 48 : Modèle du pore formé par la multimérisation des domaines T insérés dans les membranes.

Figure 59 : Répartition des charges de l'hélice amphiphile TH1.

Figure 50 : Représentation tridimensionnelle du domaine catalytique de la DT.

Figure 51 : Utilisation biotechnologique de la DT.

PARTIE II : RESULTATS-PUBLICATIONS

Figure 52 : Position des histidines dans la structure du domaine T isolé.

Figure 53 : Illustration schématique des changements de conformation pH-dépendants du domaine T.

PARTIE III : CONCLUSIONS

Figure 54 : Position de la paire d'histidines 223-257 dans la structure du domaine T.

Figure 55 : Représentation schématique des étapes précoces de la translocation chez la DT.

LISTE DES TABLEAUX

PARTIE I : CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Chapitre I : Toxines à activité intracellulaire

Tableau 1 : Toxines formatrices de pores.

Tableau 2 : Propriétés fonctionnelles des toxines de type AB.

Tableau 3 : Récepteurs de quelques toxines à activité intracellulaire.

Tableau 4 : Gangliosides impliquées dans la liaison des BoNTs.

Tableau 5 : Voies d'internalisation empruntées par les toxines de type AB.

Chapitre II : Membranes biologiques et translocation des toxines bactériennes

Tableau 6 : Composition lipidique de différentes membranes biologiques.

Tableau 7 : Composition lipidique des membranes des organites de *S. cerevisiae*.

Tableau 8 : Propriétés de quelques canaux formés par les toxines à activité intracellulaire.

Tableau 9 : Caractéristiques des systèmes de translocation post-traductionnels.

BIBLIOGRAPHIE

- Abrami, L., Liu, S., Cosson, P., Leppla, S. H. & van der Goot, F. G. (2003). Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. *J Cell Biol* 160, 321-328.
- Abrami, L., Leppla, S. H. & van der Goot, F. G. (2006). Receptor palmitoylation and ubiquitination regulate anthrax toxin endocytosis. *J Cell Biol* 172, 309-320.
- Aktories, K., Barmann, M., Ohishi, I., Tsuyama, S., Jakobs, K. H. & Habermann, E. (1986). Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin. *Nature* 322, 390-392.
- Allured, V. S., Collier, R. J., Carroll, S. F. & McKay, D. B. (1986). Structure of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3.0-Angstrom resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 1320-1324.
- Alouf, J. E. (2000). Bacterial protein toxins. An overview. *Methods Mol Biol* 145, 1-26.
- Anderson, R. G. (1998). The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67, 199-225.
- Arighi, C. N., Hartnell, L. M., Aguilar, R. C., Haft, C. R. & Bonifacino, J. S. (2004). Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Cell Biol* 165, 123-133.
- Ascenzi, P., Visca, P., Ippolito, G., Spallarossa, A., Bolognesi, M. & Montecucco, C. (2002). Anthrax toxin: a tripartite lethal combination. *FEBS Lett* 531, 384-388.
- Ashcroft, R. G., Coster, H. G. & Smith, J. R. (1981). The molecular organisation of bimolecular lipid membranes. The dielectric structure of the hydrophilic/hydrophobic interface. *Biochim Biophys Acta* 643, 191-204.
- Aullo, P., Giry, M., Olsnes, S., Popoff, M. R., Kocks, C. & Boquet, P. (1993). A chimeric toxin to study the role of the 21 kDa GTP binding protein rho in the control of actin microfilament assembly. *Embo J* 12, 921-931.
- Bajjalieh, S. M., Frantz, G. D., Weimann, J. M., McConnell, S. K. & Scheller, R. H. (1994). Differential expression of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms. *J Neurosci* 14, 5223-5235.
- Banda, N. K., Akkina, R. K., Terrell, K., Shpall, E. J., Tomczak, J., Campain, J., Claman, H., Cagle, L. & Harrison, G. S. (1998). Diphtheria toxin A gene-mediated HIV-1 protection of cord blood-derived T cells in the SCID-hu mouse model. *J Hematother* 7, 319-331.
- Barbieri, J. T., Riese, M. J. & Aktories, K. (2002). Bacterial toxins that modify the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18, 315-344.
- Barth, H., Aktories, K., Popoff, M. R. & Stiles, B. G. (2004). Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 373-402, table of contents.
- Bauche, C., Chenal, A., Knapp, O., Bodenreider, C., Benz, R., Chaffotte, A. & Ladant, D. (2006). Structural and functional characterization of an essential RTX subdomain of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *The Journal of biological chemistry* 281, 16914-16926.

- Bell, C. E. & Eisenberg, D. (1996). Crystal structure of diphtheria toxin bound to nicotinamide adenine dinucleotide. *Biochemistry* 35, 1137-1149.
- Bellalou, J., Sakamoto, H., Ladant, D., Geoffroy, C. & Ullmann, A. (1990). Deletions affecting hemolytic and toxin activities of Bordetella pertussis adenylate cyclase. *Infect Immun* 58, 3242-3247.
- Bennett, M. J., Choe, S. & Eisenberg, D. (1994). Refined structure of dimeric diphtheria toxin at 2.0 Å resolution. *Protein Sci* 3, 1444-1463.
- Bennett, M. J. & Eisenberg, D. (1994). Refined structure of monomeric diphtheria toxin at 2.3 Å resolution. *Protein Sci* 3, 1464-1475.
- Benz, R., Maier, E., Ladant, D., Ullmann, A. & Sebo, P. (1994). Adenylate cyclase toxin (CyaA) of Bordetella pertussis. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of Escherichia coli. *The Journal of biological chemistry* 269, 27231-27239.
- Bijlmakers, M. J. & Marsh, M. (2000). Hsp90 is essential for the synthesis and subsequent membrane association, but not the maintenance, of the Src-kinase p56(lck). *Mol Biol Cell* 11, 1585-1595.
- Blanke, S. R., Huang, K., Wilson, B. A., Papini, E., Covacci, A. & Collier, R. J. (1994). Active-site mutations of the diphtheria toxin catalytic domain: role of histidine-21 in nicotinamide adenine dinucleotide binding and ADP-ribosylation of elongation factor 2. *Biochemistry* 33, 5155-5161.
- Blaustein, R. O. & Finkelstein, A. (1990). Voltage-dependent block of anthrax toxin channels in planar phospholipid bilayer membranes by symmetric tetraalkylammonium ions. Effects on macroscopic conductance. *J Gen Physiol* 96, 905-919.
- Blewitt, M. G., Chung, L. A. & London, E. (1985). Effect of pH on the conformation of diphtheria toxin and its implications for membrane penetration. *Biochemistry* 24, 5458-5464.
- Bonifacino, J. S. & Rojas, R. (2006). Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat Rev Microbiol* 7, 568-579.
- Boquet, P. (2001). The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from Escherichia coli. *Toxicon* 39, 1673-1680.
- Broeck, D. V., Lagrou, A. R. & De Wolf, M. J. (2007). Distinct role of clathrin-mediated endocytosis in the functional uptake of cholera toxin. *Acta Biochim Pol* 54, 757-767.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3, 238-250.
- Brooke, J. S., Cha, J. H. & Eidels, L. (1998). Diphtheria toxin:receptor interaction: association, dissociation, and effect of pH. *Biochem Biophys Res Commun* 248, 297-302.
- Brown, J. G., Almond, B. D., Naglich, J. G. & Eidels, L. (1993). Hypersensitivity to diphtheria toxin by mouse cells expressing both diphtheria toxin receptor and CD9 antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8184-8188.
- Brunger, A. T., Breidenbach, M. A., Jin, R., Fischer, A., Santos, J. S. & Montal, M. (2007). Botulinum neurotoxin heavy chain belt as an intramolecular chaperone for the light chain. *PLoS Pathog* 3, 1191-1194.

- Buetow, L., Flatau, G., Chiu, K., Boquet, P. & Ghosh, P. (2001). Structure of the Rho-activating domain of Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1. *Nat Struct Biol* 8, 584-588.
- Bullens, R. W., O'Hanlon, G. M., Wagner, E., Molenaar, P. C., Furukawa, K., Furukawa, K., Plomp, J. J. & Willison, H. J. (2002). Complex gangliosides at the neuromuscular junction are membrane receptors for autoantibodies and botulinum neurotoxin but redundant for normal synaptic function. *J Neurosci* 22, 6876-6884.
- Bychkova, V. E., Dujsekina, A. E., Klenin, S. I., Tiktopulo, E. I., Uversky, V. N. & Ptitsyn, O. B. (1996). Molten globule-like state of cytochrome c under conditions simulating those near the membrane surface. *Biochemistry* 35, 6058-6063.
- Cabiaux, V., Quertenmont, P., Conrath, K., Brasseur, R., Capiiau, C. & Ruysschaert, J. M. (1994). Topology of diphtheria toxin B fragment inserted in lipid vesicles. *Mol Microbiol* 11, 43-50.
- Carlton, J., Bujny, M., Peter, B. T., Oorshot, V. M., Rutherford, A., Mellor, H., Klumperman, J., McMahon, H. T., Cullen, P. J. (2004). Sorting nexin-1 mediates tubular endosome-to-TGN transport through coincidence sensing of high- curvature membranes and 3-phosphoinositides. *Curr Biol* 14, 1791-1800.
- Carroll, S. F. & Collier, R. J. (1984). NAD binding site of diphtheria toxin: identification of a residue within the nicotinamide subsite by photochemical modification with NAD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 3307-3311.
- Castro, M. G., McNamara, U. & Carbonetti, N. H. (2001). Expression, activity and cytotoxicity of pertussis toxin S1 subunit in transfected mammalian cells. *Cell Microbiol* 3, 45-54.
- Cha, J. H., Brooke, J. S. & Eidels, L. (1998). Toxin binding site of the diphtheria toxin receptor: loss and gain of diphtheria toxin binding of monkey and mouse heparin-binding, epidermal growth factor-like growth factor precursors by reciprocal site-directed mutagenesis. *Mol Microbiol* 29, 1275-1284.
- Chamberlain, L. H., Burgoyne, R. D. & Gould, G. W. (2001). SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5619-5624.
- Chardin, P., Paris, S., Antonny, B., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Jackson, C. L. & Chabre, M. (1996). A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature* 384, 481-484.
- Chenal, A., Nizard, P., Forge, V., Pugniere, M., Roy, M. O., Mani, J. C., Guillain, F. & Gillet, D. (2002a). Does fusion of domains from unrelated proteins affect their folding pathways and the structural changes involved in their function? A case study with the diphtheria toxin T domain. *Protein engineering* 15, 383-391.
- Chenal, A., Savarin, P., Nizard, P., Guillain, F., Gillet, D. & Forge, V. (2002b). Membrane protein insertion regulated by bringing electrostatic and hydrophobic interactions into play. A case study with the translocation domain of diphtheria toxin. *The Journal of biological chemistry* 277, 43425-43432.
- Chenal, A., Nizard, P., Gillet, D. (2002). *J Toxicol Toxin Rev* 21, 321-359.
- Chinnapen, D.J., Chinnapen, H., Saslowsky, D., Lencer, W.L. (2007) Rafting with cholera toxin : endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER. *FEMS Microbiol Lett.* 266, 129-137.

- Choe, S., Bennett, M. J., Fujii, G., Curmi, P. M., Kantardjieff, K. A., Collier, R. J. & Eisenberg, D. (1992). The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature* 357, 216-222.
- Chong, C., Paton, J. C., Thorpe, C. M. & Paton, A. (2008). Clathrin-dependent trafficking of subtilase cytotoxin, a novel AB₅ toxin that targets the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Cell Microbiol* 10, 795-806.
- Chung, D. W. & Collier, R. J. (1977). The mechanism of ADP-ribosylation of elongation factor 2 catalyzed by fragment A from diphtheria toxin. *Biochim Biophys Acta* 483, 248-257.
- Collier, R. J. (1967). Effect of diphtheria toxin on protein synthesis: inactivation of one of the transfer factors. *J Mol Biol* 25, 83-98.
- Contamin, S., Galmiche, A., Doye, A., Flatau, G., Benmerah, A. & Boquet, P. (2000). The p21 Rho-activating toxin cytotoxic necrotizing factor 1 is endocytosed by a clathrin-independent mechanism and enters the cytosol by an acidic-dependent membrane translocation step. *Mol Biol Cell* 11, 1775-1787.
- Cosson, P. & Letourneur, F. (1997). Coatamer (COPI)-coated vesicles: role in intracellular transport and protein sorting. *Curr Opin Cell Biol* 9, 484-487.
- D'Silva, P. R. & Lala, A. K. (1998). Unfolding of diphtheria toxin. Identification of hydrophobic sites exposed on lowering of pH by photolabeling. *The Journal of biological chemistry* 273, 16216-16222.
- D'Silva, P. R. & Lala, A. K. (2000). Organization of diphtheria toxin in membranes. A hydrophobic photolabeling study. *The Journal of biological chemistry* 275, 11771-11777.
- De Haan, L. & Hirst, T. R. (2004). Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms (Review). *Mol Membr Biol* 21, 77-92.
- de Planque, M. R. & Killian, J. A. (2003). Protein-lipid interactions studied with designed transmembrane peptides: role of hydrophobic matching and interfacial anchoring. *Mol Membr Biol* 20, 271-284.
- Deeks, E. D., Cook, J. P., Day, P. J., Smith, D. C., Roberts, L. M. & Lord, J. M. (2002). The low lysine content of ricin A chain reduces the risk of proteolytic degradation after translocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Biochemistry* 41, 3405-3413.
- Deinhardt, K., Berninghausen, O., Willison, H. J., Hopkins, C. R. & Schiavo, G. (2006). Tetanus toxin is internalized by a sequential clathrin-dependent mechanism initiated within lipid microdomains and independent of epsin1. *J Cell Biol* 174, 459-471.
- del Pozo, M. A., Balasubramanian, N., Alderson, N. B., Kiosses, W. B., Grande-Garcia, A., Anderson, R. G. & Schwartz, M. A. (2005). Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat Cell Biol* 7, 901-908.
- Demaurex, N. (2002). pH Homeostasis of cellular organelles. *News Physiol Sci* 17, 1-5.
- Dinges, M. M., Cook, D. R., King, J., Curiel, T. J., Zhang, X. Q. & Harrison, G. S. (1995). HIV-regulated diphtheria toxin A chain gene confers long-term protection against HIV type 1 infection in the human promonocytic cell line U937. *Hum Gene Ther* 6, 1437-1445.

- Dong, M., Richards, D. A., Goodnough, M. C., Tepp, W. H., Johnson, E. A. & Chapman, E. R. (2003). Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J Cell Biol* 162, 1293-1303.
- Dong, M., Yeh, F., Tepp, W. H., Dean, C., Johnson, E. A., Janz, R. & Chapman, E. R. (2006). SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science* 312, 592-596.
- Drum, C. L., Yan, S. Z., Bard, J., Shen, Y. Q., Lu, D., Soelaiman, S., Grabarek, Z., Bohm, A. & Tang, W. J. (2002). Structural basis for the activation of anthrax adenyl cyclase exotoxin by calmodulin. *Nature* 415, 396-402.
- Duesbery, N. S., Webb, C. P., Leppla, S. H. & other authors (1998). Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science* 280, 734-737.
- Dufour, E., Bertrand-Harb, C. & Haertle, T. (1993). Reversible effects of medium dielectric constant on structural transformation of beta-lactoglobulin and its retinol binding. *Biopolymers* 33, 589-598.
- Eisenberg, M., Gresalfi, T., Riccio, T. & McLaughlin, S. (1979). Adsorption of monovalent cations to bilayer membranes containing negative phospholipids. *Biochemistry* 18, 5213-5223.
- Eklund, J. W. & Kuzel, T. M. (2005). Denileukin diftitox: a concise clinical review. *Expert Rev Anticancer Ther* 5, 33-38.
- el Baya, A., Linnemann, R., von Olleschik-Elbheim, L., Robenek, H. & Schmidt, M. A. (1997). Endocytosis and retrograde transport of pertussis toxin to the Golgi complex as a prerequisite for cellular intoxication. *Eur J Cell Biol* 73, 40-48.
- Eriksen, S., Olsnes, S., Sandvig, K. & Sand, O. (1994). Diphtheria toxin at low pH depolarizes the membrane, increases the membrane conductance and induces a new type of ion channel in Vero cells. *Embo J* 13, 4433-4439.
- Evans, H. R., Sutton, J. M., Holloway, D. E., Ayriss, J., Shone, C. C. & Acharya, K. R. (2003). The crystal structure of C3stau2 from *Staphylococcus aureus* and its complex with NAD. *The Journal of biological chemistry* 278, 45924-45930.
- Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A. & other authors (2005). A comprehensive classification system for lipids. *Journal of lipid research* 46, 839-861.
- Falguieres, T., Mallard, F., Baron, C., Hanau, D., Lingwood, C., Goud, B., Salamero, J. & Johannes, L. (2001). Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. *Mol Biol Cell* 12, 2453-2468.
- Falnes, P. O., Madshus, I. H., Sandvig, K. & Olsnes, S. (1992). Replacement of negative by positive charges in the presumed membrane-inserted part of diphtheria toxin B fragment. Effect on membrane translocation and on formation of cation channels. *The Journal of biological chemistry* 267, 12284-12290.
- Falnes, P. O., Choe, S., Madshus, I. H., Wilson, B. A. & Olsnes, S. (1994). Inhibition of membrane translocation of diphtheria toxin A-fragment by internal disulfide bridges. *The Journal of biological chemistry* 269, 8402-8407.
- Falnes, P. O. & Olsnes, S. (1995). Cell-mediated reduction and incomplete membrane translocation of diphtheria toxin mutants with internal disulfides in the A fragment. *The Journal of biological chemistry* 270, 20787-20793.

- Falnes, P. O., Ariansen, S., Sandvig, K. & Olsnes, S. (2000). Requirement for prolonged action in the cytosol for optimal protein synthesis inhibition by diphtheria toxin. *The Journal of biological chemistry* 275, 4363-4368.
- Falnes, P. O. & Sandvig, K. (2000). Penetration of protein toxins into cells. *Curr Opin Cell Biol* 12, 407-413.
- Fisher, A. & Montal, M. (2006). Characterization of Clostridial botulinum neurotoxin channels in neuroblastoma cells. *Neurotox Res* 9, 93-100.
- Fisher, K. J. & Wilson, J. M. (1997). The transmembrane domain of diphtheria toxin improves molecular conjugate gene transfer. *Biochem J* 321 (Pt 1), 49-58.
- Fraser, M. E., Chernaia, M. M., Kozlov, Y. V. & James, M. N. (1994). Crystal structure of the holotoxin from *Shigella dysenteriae* at 2.5 Å resolution. *Nat Struct Biol* 1, 59-64.
- Fujinaga, Y., Wolf, A. A., Rodighiero, C. & other authors (2003). Gangliosides that associate with lipid rafts mediate transport of cholera and related toxins from the plasma membrane to endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 14, 4783-4793.
- Gambale, F., Montal, M. (1988). Characterization of the channel properties of tetanus toxin in planar lipid bilayers. *Biophys J* 53, 771-783.
- Galloux, M., Vitrac, H., Montagner, C., Raffestin, S., Popoff, M. R., Chenal, A., Forge, V., Gillet, D. (2008). Membrane interaction of botulinum neurotoxin A T domain : The belt region is a regulatory loop for membrane interaction. *J Biol Chem*. In press.
- Gambale, F., Rauch, G., Belmonte, G., Menestrina, G. (1992). Properties of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A ionic channel incorporated in planar lipid bilayers. *FEBS Lett* 306, 41-45.
- Geny, B. & Popoff, M. R. (2006). Bacterial protein toxins and lipids: pore formation or toxin entry into cells. *Biol Cell* 98, 667-678.
- Gething, M. J. (1999). Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* 10, 465-472.
- Gibert, M., Petit, L., Raffestin, S., Okabe, A. & Popoff, M. R. (2000). *Clostridium perfringens* iota-toxin requires activation of both binding and enzymatic components for cytopathic activity. *Infect Immun* 68, 3848-3853.
- Gill, D. M. & Dinius, L. L. (1971). Observations on the structure of diphtheria toxin. *The Journal of biological chemistry* 246, 1485-1491.
- Gill, D. M., Uchida, T. & Singer, R. A. (1972). Expression of diphtheria toxin genes carried by integrated and nonintegrated phage beta. *Virology* 50, 664-668.
- Girod, A., Storrie, B., Simpson, J. C., Johannes, L., Goud, B., Roberts, L. M., Lord, J. M., Nilsson, T. & Pepperkok, R. (1999). Evidence for a COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol* 1, 423-430.
- Glaser, P., Sakamoto, H., Bellalou, J., Ullmann, A. & Danchin, A. (1988). Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *Embo J* 7, 3997-4004.

- Gordon, V. M., Klimpel, K. R., Arora, N., Henderson, M. A., Leppla, S. H. (1995). Proteolytic activation of bacterial toxins by eukaryotic cells is performed by furin and by additional cellular proteases. *Infect Immun* 63, 82-87.
- Gordon, M. & Finkelstein, A. (2001). The number of subunits comprising the channel formed by the T domain of diphtheria toxin. *J Gen Physiol* 118, 471-480.
- Gray, M. C., Lee, S. J., Gray, L. S., Zaretzky, F. R., Otero, A. S., Szabo, G. & Hewlett, E. L. (2001). Translocation-specific conformation of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* inhibits toxin-mediated hemolysis. *J Bacteriol* 183, 5904-5910.
- Greenfield, L., Johnson, V. G. & Youle, R. J. (1987). Mutations in diphtheria toxin separate binding from entry and amplify immunotoxin selectivity. *Science* 238, 536-539.
- Griffiths, S. L., Finkelstein, R. A. & Critchley, D. R. (1986). Characterization of the receptor for cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin in rabbit intestinal brush borders. *Biochem J* 238, 313-322.
- Gruenberg, J. (2001). The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Microbiol* 2, 721-730.
- Guermontprez, P., Khelef, N., Blouin, E., Rieu, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Guiso, N., Ladant, D. & Leclerc, C. (2001). The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *J Exp Med* 193, 1035-1044.
- Guo, Q., Shen, Y., Lee, Y. S., Gibbs, C. S., Mrksich, M. & Tang, W. J. (2005). Structural basis for the interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin with calmodulin. *Embo J* 24, 3190-3201.
- Gupta, P., Singh, A., Chauhan, V. & Bhatnagar, R. (2001). Involvement of residues 147VYYEIGK153 in binding of lethal factor to protective antigen of *Bacillus anthracis*. *Biochem Biophys Res Commun* 280, 158-163.
- Habermann, E. & Dreyer, F. (1986). Clostridial neurotoxins: handling and action at the cellular and molecular level. *Curr Top Microbiol Immunol* 129, 93-179.
- Hale, M. L., Marvaud, J. C., Popoff, M. R. & Stiles, B. G. (2004). Detergent-resistant membrane microdomains facilitate I_b oligomer formation and biological activity of *Clostridium perfringens* iota-toxin. *Infect Immun* 72, 2186-2193.
- Hammond, C. & Helenius, A. (1995). Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol* 7, 523-529.
- Han, S., Arvai, A. S., Clancy, S. B. & Tainer, J. A. (2001). Crystal structure and novel recognition motif of rho ADP-ribosylating C3 exoenzyme from *Clostridium botulinum*: structural insights for recognition specificity and catalysis. *J Mol Biol* 305, 95-107.
- Hausman, S. Z. & Burns, D. L. (1992). Interaction of pertussis toxin with cells and model membranes. *The Journal of biological chemistry* 267, 13735-13739.
- Hayashibara, M. & London, E. (2005). Topography of diphtheria toxin A chain inserted into lipid vesicles. *Biochemistry* 44, 2183-2196.
- Hazes, B., Boodhoo, A., Cockle, S. A. & Read, R. J. (1996). Crystal structure of the pertussis toxin-ATP complex: a molecular sensor. *J Mol Biol* 258, 661-671.

- Hazes, B. & Read, R. J. (1997). Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells. *Biochemistry* 36, 11051-11054.
- Hebert, D. N., Simons, J. F., Peterson, J. R. & Helenius, A. (1995). Calnexin, calreticulin, and Bip/Kar2p in protein folding. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 60, 405-415.
- Herrerros, J., Ng, T. & Schiavo, G. (2001). Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Mol Biol Cell* 12, 2947-2960.
- Hessler, J. L. & Kreitman, R. J. (1997). An early step in *Pseudomonas* exotoxin action is removal of the terminal lysine residue, which allows binding to the KDEL receptor. *Biochemistry* 36, 14577-14582.
- Higashiyama, S., Abraham, J. A., Miller, J., Fiddes, J. C. & Klagsbrun, M. (1991). A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* 251, 936-939.
- Higashiyama, S., Iwamoto, R., Goishi, K., Raab, G., Taniguchi, N., Klagsbrun, M. & Mekada, E. (1995). The membrane protein CD9/DRAP 27 potentiates the juxtacrine growth factor activity of the membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *J Cell Biol* 128, 929-938.
- Honjo, T., Nishizuka, Y. & Hayaishi, O. (1968). Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *The Journal of biological chemistry* 243, 3553-3555.
- Honjo, T., Nishizuka, Y. & Hayaishi, O. (1969). Adenosine diphosphoribosylation of aminoacyl transferase II by diphtheria toxin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 34, 603-608.
- Hooper, K. P. & Eidels, L. (1996). Glutamic acid 141 of the diphtheria toxin receptor (HB-EGF precursor) is critical for toxin binding and toxin sensitivity. *Biochem Biophys Res Commun* 220, 675-680.
- Hotze, E. M., Heuck, A. P., Czajkowsky, D. M., Shao, Z., Johnson, A. E. & Tweten, R. K. (2002). Monomer-monomer interactions drive the prepore to pore conversion of a beta-barrel-forming cholesterol-dependent cytolysin. *The Journal of biological chemistry* 277, 11597-11605.
- Hu, H. Y., Huynh, P. D., Murphy, J. R. & vanderSpek, J. C. (1998). The effects of helix breaking mutations in the diphtheria toxin transmembrane domain helix layers of the fusion toxin DAB389IL-2. *Protein engineering* 11, 811-817.
- Huynh, P. D., Cui, C., Zhan, H., Oh, K. J., Collier, R. J. & Finkelstein, A. (1997). Probing the structure of the diphtheria toxin channel. Reactivity in planar lipid bilayer membranes of cysteine-substituted mutant channels with methanethiosulfonate derivatives. *J Gen Physiol* 110, 229-242.
- Iwamoto, R., Senoh, H., Okada, Y., Uchida, T. & Mekada, E. (1991). An antibody that inhibits the binding of diphtheria toxin to cells revealed the association of a 27-kDa membrane protein with the diphtheria toxin receptor. *The Journal of biological chemistry* 266, 20463-20469.
- Iwamoto, R., Higashiyama, S., Mitamura, T., Taniguchi, N., Klagsbrun, M. & Mekada, E. (1994). Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity. *Embo J* 13, 2322-2330.

- Jackson, M. & Mantsch, H. H. (1995). The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30, 95-120.
- Jackson, M. E., Simpson, J. C., Girod, A., Pepperkok, R., Roberts, L. M. & Lord, J. M. (1999). The KDEL retrieval system is exploited by *Pseudomonas* exotoxin A, but not by Shiga-like toxin-1, during retrograde transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 112 (Pt 4), 467-475.
- Jackson, M. R., Nilsson, T. & Peterson, P. A. (1993). Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 121, 317-333.
- Jacobs, R. E. & White, S. H. (1989). The nature of the hydrophobic binding of small peptides at the bilayer interface: implications for the insertion of transbilayer helices. *Biochemistry* 28, 3421-3437.
- Janz, R. & Sudhof, T. C. (1999). SV2C is a synaptic vesicle protein with an unusually restricted localization: anatomy of a synaptic vesicle protein family. *Neuroscience* 94, 1279-1290.
- Johannes, L. & Goud, B. (1998). Surfing on a retrograde wave: how does Shiga toxin reach the endoplasmic reticulum? *Trends Cell Biol* 8, 158-162.
- Johannes, L. (2002). The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. I. Shiga toxin B-subunit system: retrograde transport, intracellular vectorization, and more. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283, G1-7.
- Johnson, J. E. & Cornell, R. B. (1999). Amphitropic proteins: regulation by reversible membrane interactions (review). *Mol Membr Biol* 16, 217-235.
- Kachel, K., Ren, J., Collier, R. J. & London, E. (1998). Identifying transmembrane states and defining the membrane insertion boundaries of hydrophobic helices in membrane-inserted diphtheria toxin T domain. *The Journal of biological chemistry* 273, 22950-22956.
- Kandel, J., Collier, R. J. & Chung, D. W. (1974). Interaction of fragment A from diphtheria toxin with nicotinamide adenine dinucleotide. *The Journal of biological chemistry* 249, 2088-2097.
- Karimova, G., Fayolle, C., Gmira, S., Ullmann, A., Leclerc, C. & Ladant, D. (1998). Charge-dependent translocation of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin into eukaryotic cells: implication for the in vivo delivery of CD8(+) T cell epitopes into antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12532-12537.
- Kaul, P., Silverman, J., Shen, W. H., Blanke, S. R., Huynh, P. D., Finkelstein, A. & Collier, R. J. (1996). Roles of Glu 349 and Asp 352 in membrane insertion and translocation by diphtheria toxin. *Protein Sci* 5, 687-692.
- Kent, M., Yim, H., Murton, J., Satija, S., Majewski, J. & Kuzmenko, I. (2007). Oligomerization of membrane-bound diphtheria toxin (CRM197) facilitates a transition to the open form and deep insertion. *Biophys J*.
- Kirchhausen, T. (1999). Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 705-732.
- Kirkham, M., Fujita, A., Chadda, R. & other authors (2005). Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. *J Cell Biol* 168, 465-476.

- Klimpel, K. R., Arora, N. & Leppla, S. H. (1994). Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. *Mol Microbiol* 13, 1093-1100.
- Klingenberg, O. & Olsnes, S. (1996). Ability of methotrexate to inhibit translocation to the cytosol of dihydrofolate reductase fused to diphtheria toxin. *Biochem J* 313 (Pt 2), 647-653.
- Knapp, O., Benz, R., Gibert, M., Marvaud, J. C. & Popoff, M. R. (2002). Interaction of *Clostridium perfringens* iota-toxin with lipid bilayer membranes. Demonstration of channel formation by the activated binding component Ib and channel block by the enzyme component Ia. *The Journal of biological chemistry* 277, 6143-6152.
- Kobayashi, T., Startchev, K., Whitney, A. J. & Gruenber, J. (2001). Localization of lysobisphosphatidic acid-rich membrane domains in late endosomes. *Biol Chem* 382, 483-485.
- Koriazova, L. K. & Montal, M. (2003). Translocation of botulinum neurotoxin light chain protease through the heavy chain channel. *Nat Struct Biol* 10, 13-18.
- Kornfeld, R. & Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54, 631-664.
- Krantz, B. A., Melnyk, R. A., Zhang, S., Juris, S. J., Lacy, D. B., Wu, Z., Finkelstein, A. & Collier, R. J. (2005). A phenylalanine clamp catalyzes protein translocation through the anthrax toxin pore. *Science* 309, 777-781.
- Krantz, B. A., Finkelstein, A. & Collier, R. J. (2006). Protein translocation through the anthrax toxin transmembrane pore is driven by a proton gradient. *J Mol Biol* 355, 968-979.
- Krasilnikov, O. V., Muratkhodjaev, J. N., Voronov, S. E. & Yezepchuk, Y. V. (1991). The ionic channels formed by cholera toxin in planar bilayer lipid membranes are entirely attributable to its B-subunit. *Biochim Biophys Acta* 1067, 166-170.
- Krivan, H. C., Clark, G. F., Smith, D. F. & Wilkins, T. D. (1986). Cell surface binding site for *Clostridium difficile* enterotoxin: evidence for a glycoconjugate containing the sequence Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc. *Infect Immun* 53, 573-581.
- Kundu, S. & Jernigan, R. L. (2004). Molecular mechanism of domain swapping in proteins: an analysis of slower motions. *Biophys J* 86, 3846-3854.
- Lacy, D. B., Tepp, W., Cohen, A. C., DasGupta, B. R. & Stevens, R. C. (1998). Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat Struct Biol* 5, 898-902.
- Lacy, D. B., Mourez, M., Fouassier, A. & Collier, R. J. (2002). Mapping the anthrax protective antigen binding site on the lethal and edema factors. *The Journal of biological chemistry* 277, 3006-3010.
- Lacy, D. B., Wigelsworth, D. J., Melnyk, R. A., Harrison, S. C. & Collier, R. J. (2004). Structure of heptameric protective antigen bound to an anthrax toxin receptor: a role for receptor in pH-dependent pore formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13147-13151.
- Ladant, D. & Ullmann, A. (1999). Bordetella pertussis adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol* 7, 172-176.

- Ladokhin, A. S. & White, S. H. (1999). Folding of amphipathic alpha-helices on membranes: energetics of helix formation by melittin. *J Mol Biol* 285, 1363-1369.
- Lai, B., Zhao, G. & London, E. (2008). Behavior of the deeply inserted helices in diphtheria toxin T domain: helices 5, 8, and 9 interact strongly and promote pore formation, while helices 6/7 limit pore formation. *Biochemistry* 47, 4565-4574.
- Lalli, G., Bohnert, S., Deinhardt, K., Verastegui, C. & Schiavo, G. (2003). The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. *Trends Microbiol* 11, 431-437.
- Lang, T., Margittai, M., Holzler, H. & Jahn, R. (2002). SNAREs in native plasma membranes are active and readily form core complexes with endogenous and exogenous SNAREs. *J Cell Biol* 158, 751-760.
- LaPointe, P., Wei, X. & Garipey, J. (2005). A role for the protease-sensitive loop region of Shiga-like toxin 1 in the retrotranslocation of its A1 domain from the endoplasmic reticulum lumen. *The Journal of biological chemistry* 280, 23310-23318.
- Lauvrak, S. U., Torgersen, M. L. & Sandvig, K. (2004). Efficient endosome-to-Golgi transport of Shiga toxin is dependent on dynamin and clathrin. *J Cell Sci* 117, 2321-2331.
- Lauvrak, S. U., Wälchli S., Iversen, T. G., Slagsvold, H. H., Torgersen, M. L., Spilsberg, B. & Sandvig, K. (2006). Shiga toxin regulated its entry in a Syk-dependent manner. *Mol Biol Cell* 17, 1096-1109.
- Lazzell, D. R., Belizaire, R., Thakur, P., Sherry, D. M. & Janz, R. (2004). SV2B regulates synaptotagmin 1 by direct interaction. *The Journal of biological chemistry* 279, 52124-52131.
- Lemichez, E., Bomsel, M., Devilliers, G., vanderSpek, J., Murphy, J. R., Lukianov, E. V., Olsnes, S. & Boquet, P. (1997). Membrane translocation of diphtheria toxin fragment A exploits early to late endosome trafficking machinery. *Mol Microbiol* 23, 445-457.
- Lencer, W. I., Constable, C., Moe, S., Jobling, M. G., Webb, H. M., Ruston, S., Madara, J. L., Hirst, T. R. & Holmes, R. K. (1995). Targeting of cholera toxin and Escherichia coli heat labile toxin in polarized epithelia: role of COOH-terminal KDEL. *J Cell Biol* 131, 951-962.
- Levine, Y. K. & Wilkins, M. H. (1971). Structure of oriented lipid bilayers. *Nature: New biology* 230, 69-72.
- Lewis, M. J. & Pelham, H. R. (1992). Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell* 68, 353-364.
- Leyton, L., Schneider, P., Labra, C. V., Ruegg, C., Hetz, C. A., Quest, A. F. & Bron, C. (2001). Thy-1 binds to integrin beta(3) on astrocytes and triggers formation of focal contact sites. *Curr Biol* 11, 1028-1038.
- Li, L. & Singh, B. R. (1998). Isolation of synaptotagmin as a receptor for types A and E botulinum neurotoxin and analysis of their comparative binding using a new microtiter plate assay. *J Nat Toxins* 7, 215-226.
- Liger, D., Nizard, P., Gaillard, C., vanderSpek, J. C., Murphy, J. R., Pitard, B. & Gillet, D. (1998). The diphtheria toxin transmembrane domain as a pH sensitive membrane anchor for human interleukin-2 and murine interleukin-3. *Protein engineering* 11, 1111-1120.

- Llewelyn, M. & Cohen, J. (2002). Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. *Lancet Infect Dis* 2, 156-162.
- Lombardi, D., Soldati, T., Riederer, M. A., Goda, Y., Zerial, M. & Pfeffer, S. R. (1993). Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *Embo J* 12, 677-682.
- London, E. (1992). Diphtheria toxin: membrane interaction and membrane translocation. *Biochim Biophys Acta* 1113, 25-51.
- Louie, G. V., Yang, W., Bowman, M. E. & Choe, S. (1997). Crystal structure of the complex of diphtheria toxin with an extracellular fragment of its receptor. *Molecular cell* 1, 67-78.
- Lu, Q., Wei, W., Kowalski, P. E., Chang, A. C. & Cohen, S. N. (2004). EST-based genome-wide gene inactivation identifies ARAP3 as a host protein affecting cellular susceptibility to anthrax toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17246-17251.
- Madshus, I. H. (1994). The N-terminal alpha-helix of fragment B of diphtheria toxin promotes translocation of fragment A into the cytoplasm of eukaryotic cells. *The Journal of biological chemistry* 269, 17723-17729.
- Madshus, I. H., Wiedlocha, A. & Sandvig, K. (1994). Intermediates in translocation of diphtheria toxin across the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* 269, 4648-4652.
- Mahrhold, S., Rummel, A., Bigalke, H., Davletov, B. & Binz, T. (2006). The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett* 580, 2011-2014.
- Majoul, I., Sohn, K., Wieland, F. T., Pepperkok, R., Pizza, M., Hillemann, J. & Soling, H. D. (1998). KDEL receptor (Erd2p)-mediated retrograde transport of the cholera toxin A subunit from the Golgi involves COPI, p23, and the COOH terminus of Erd2p. *J Cell Biol* 143, 601-612.
- Majoul, I., Schmidt, T., Pomasanova, M., Boutkevich, E., Kozlov, Y. & Soling, H. D. (2002). Differential expression of receptors for Shiga and Cholera toxin is regulated by the cell cycle. *J Cell Sci* 115, 817-826.
- Malenbaum, S. E., Collier, R. J. & London, E. (1998). Membrane topography of the T domain of diphtheria toxin probed with single tryptophan mutants. *Biochemistry* 37, 17915-17922.
- Malhotra, V., Serafini, T., Orci, L., Shepherd, J. C. & Rothman, J. E. (1989). Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell* 58, 329-336.
- Mallard, F., Antony, C., Tenza, D., Salamero, J., Goud, B. & Johannes, L. (1998). Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of shiga toxin B-fragment transport. *J Cell Biol* 143, 973-990.
- Mallard, F., Tang, B. L., Galli, T. & other authors (2002). Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J Cell Biol* 156, 653-664.
- Massol, R. H., Larsen, J. E., Fujinaga, Y., Lencer, W. I. & Kirchhausen, T. (2004). Cholera toxin toxicity does not require functional Arf6- and dynamin-dependent endocytic pathways. *Mol Biol Cell* 15, 3631-3641.
- Matlack, K. E., Mothes, W. & Rapoport, T. A. (1998). Protein translocation: tunnel vision. *Cell* 92, 381-390.

- Matsuzawa, T., Kashimoto, T., Katahira, J. & Horiguchi, Y. (2002). Identification of a receptor-binding domain of Bordetella dermonecrotic toxin. *Infect Immun* 70, 3427-3432.
- Matsuzawa, T., Fukui, A., Kashimoto, T., Nagao, K., Oka, K., Miyake, M. & Horiguchi, Y. (2004). Bordetella dermonecrotic toxin undergoes proteolytic processing to be translocated from a dynamin-related endosome into the cytoplasm in an acidification-independent manner. *The Journal of biological chemistry* 279, 2866-2872.
- Mayor, S. & Pagano, R. E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Microbiol* 8, 603-612.
- Menestrina, G., Schiavo, G. & Montecucco, C. (1994). Molecular mechanisms of action of bacterial protein toxins. *Mol Aspects Med* 15, 79-193.
- Menetrey, J., Flatau, G., Stura, E. A., Charbonnier, J. B., Gas, F., Teulon, J. M., Le Du, M. H., Boquet, P. & Menez, A. (2002). NAD binding induces conformational changes in Rho ADP-ribosylating clostridium botulinum C3 exoenzyme. *The Journal of biological chemistry* 277, 30950-30957.
- Mere, J., Morlon-Guyot, J., Bonhoure, A., Chiche, L. & Beaumelle, B. (2005). Acid-triggered membrane insertion of Pseudomonas exotoxin A involves an original mechanism based on pH-regulated tryptophan exposure. *The Journal of biological chemistry* 280, 21194-21201.
- Merritt, E. A., Sarfaty, S., van den Akker, F., L'Hoir, C., Martial, J. A. & Hol, W. G. (1994). Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide. *Protein Sci* 3, 166-175.
- Merritt, E. A. & Hol, W. G. (1995). AB5 toxins. *Curr Opin Struct Biol* 5, 165-171.
- Merritt, E. A., Kuhn, P., Sarfaty, S., Erbe, J. L., Holmes, R. K. & Hol, W. G. (1998). The 1.25 Å resolution refinement of the cholera toxin B-pentamer: evidence of peptide backbone strain at the receptor-binding site. *J Mol Biol* 282, 1043-1059.
- Miller, C. E., Majewski, J., Faller, R., Satija, S. & Kuhl, T. L. (2004). Cholera toxin assault on lipid monolayers containing ganglioside GM1. *Biophys J* 86, 3700-3708.
- Mindell, J. A., Silverman, J. A., Collier, R. J. & Finkelstein, A. (1992). Locating a residue in the diphtheria toxin channel. *Biophys J* 62, 41-44.
- Mindell, J. A., Silverman, J. A., Collier, R. J. & Finkelstein, A. (1994). Structure function relationships in diphtheria toxin channels: II. A residue responsible for the channel's dependence on trans pH. *The Journal of membrane biology* 137, 29-44.
- Minshall, R. D., Tiruppathi, C., Vogel, S. M., Niles, W. D., Gilchrist, A., Hamm, H. E. & Malik, A. B. (2000). Endothelial cell-surface gp60 activates vesicle formation and trafficking via G(i)-coupled Src kinase signaling pathway. *J Cell Biol* 150, 1057-1070.
- Mitamura, T., Umata, T., Nakano, F., Shishido, Y., Toyoda, T., Itai, A., Kimura, H. & Mekada, E. (1997). Structure-function analysis of the diphtheria toxin receptor toxin binding site by site-directed mutagenesis. *The Journal of biological chemistry* 272, 27084-27090.
- Montagner, C., Perier, A., Pichard, S., Vernier, G., Menez, A., Gillet, D., Forge, V. & Chenal, A. (2007). Behavior of the N-Terminal Helices of the Diphtheria Toxin T Domain during the Successive Steps of Membrane Interaction. *Biochemistry* 46, 1878-1887.

- Montecucco, C., Rossetto, O. & Schiavo, G. (2004). Presynaptic receptor arrays for clostridial neurotoxins. *Trends Microbiol* 12, 442-446.
- Mori, T., Kiyokawa, N., Katagiri, Y. U. & other authors (2000). Globotriaosyl ceramide (CD77/Gb3) in the glycolipid-enriched membrane domain participates in B-cell receptor-mediated apoptosis by regulating lyn kinase activity in human B cells. *Exp Hematol* 28, 1260-1268.
- Morris, R. E., Gerstein, A. S., Bonventre, P. F. & Saelinger, C. B. (1985). Receptor-mediated entry of diphtheria toxin into monkey kidney (Vero) cells: electron microscopic evaluation. *Infect Immun* 50, 721-727.
- Moya, M., Dautry-Varsat, A., Goud, B., Louvard, D. & Boquet, P. (1985). Inhibition of coated pit formation in Hep2 cells blocks the cytotoxicity of diphtheria toxin but not that of ricin toxin. *J Cell Biol* 101, 548-559.
- Munro, P., Kojima, H., Dupont, J. L., Bossu, J. L., Poulain, B. & Boquet, P. (2001). High sensitivity of mouse neuronal cells to tetanus toxin requires a GPI-anchored protein. *Biochem Biophys Res Commun* 289, 623-629.
- Murphy, J. R., Michel, J. L. & Teng, M. (1978). Evidence that the regulation of diphtheria toxin production is directed at the level of transcription. *J Bacteriol* 135, 511-516.
- Murphy, J. R. & vanderSpek, J. C. (1995). Targeting diphtheria toxin to growth factor receptors. *Semin Cancer Biol* 6, 259-267.
- Na, X., Kim, H., Moyer, M. P., Pothoulakis, C. & LaMont, T. (2008). gp96 is a Human Colonocyte Plasma Membrane Binding Protein for Clostridium difficile Toxin A. *Infection and Immunity* 76, 2862-2871.
- Naglich, J. G., Metherall, J. E., Russell, D. W. & Eidels, L. (1992). Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell* 69, 1051-1061.
- Nguyen, T. L. (2004). Three-dimensional model of the pore form of anthrax protective antigen. Structure and biological implications. *J Biomol Struct Dyn* 22, 253-265.
- Nichols, B. J., Kenworthy, A. K., Polishchuk, R. S., Lodge, R., Roberts, T. H., Hirschberg, K., Phair, R. D. & Lippincott-Schwartz, J. (2001). Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *J Cell Biol* 153, 529-541.
- Nishiki, T., Tokuyama, Y., Kamata, Y., Nemoto, Y., Yoshida, A., Sato, K., Sekiguchi, M., Takahashi, M. & Kozaki, S. (1996a). The high-affinity binding of Clostridium botulinum type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides GT1b/GD1a. *FEBS Lett* 378, 253-257.
- Nishiki, T., Tokuyama, Y., Kamata, Y., Nemoto, Y., Yoshida, A., Sekiguchi, M., Takahashi, M. & Kozaki, S. (1996b). Binding of botulinum type B neurotoxin to Chinese hamster ovary cells transfected with rat synaptotagmin II cDNA. *Neurosci Lett* 208, 105-108.
- Nizard, P., Liger, D., Gaillard, C. & Gillet, D. (1998). Anchoring antibodies to membranes using a diphtheria toxin T domain-ZZ fusion protein as a pH sensitive membrane anchor. *FEBS Lett* 433, 83-88.
- Nizard, P., Chenal, A., Beaumelle, B., Fourcade, A. & Gillet, D. (2001a). Prolonged display or rapid internalization of the IgG-binding protein ZZ anchored to the surface of cells using the diphtheria toxin T domain. *Protein engineering* 14, 439-446.

- Nizard, P., Gross, D. A., Chenal, A., Beaumelle, B., Kosmatopoulos, K. & Gillet, D. (2001b). [Anchoring cytokines to cancer cells using diphtheria toxin: better than immunotherapy by gene transfer?]. *J Soc Biol* 195, 229-234.
- Oh, K. J., Zhan, H., Cui, C., Hideg, K., Collier, R. J. & Hubbell, W. L. (1996). Organization of diphtheria toxin T domain in bilayers: a site-directed spin labeling study. *Science* 273, 810-812.
- Oh, K. J., Senzel, L., Collier, R. J. & Finkelstein, A. (1999a). Translocation of the catalytic domain of diphtheria toxin across planar phospholipid bilayers by its own T domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8467-8470.
- Oh, K. J., Zhan, H., Cui, C., Altenbach, C., Hubbell, W. L. & Collier, R. J. (1999b). Conformation of the diphtheria toxin T domain in membranes: a site-directed spin-labeling study of the TH8 helix and TL5 loop. *Biochemistry* 38, 10336-10343.
- Olsnes, S. & Falnes, P. O. (2000). Probing pores with peptide plugs. Topology of membrane-inserted diphtheria toxin. *J Gen Physiol* 115, 417-420.
- Orlandi, P. A. & Fishman, P. H. (1998). Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol* 141, 905-915.
- Osickova, A., Osicka, R., Maier, E., Benz, R. & Sebo, P. (1999). An amphipathic alpha-helix including glutamates 509 and 516 is crucial for membrane translocation of adenylate cyclase toxin and modulates formation and cation selectivity of its membrane channels. *The Journal of biological chemistry* 274, 37644-37650.
- Oswald, E. & De Rycke, J. (1990). A single protein of 110 kDa is associated with the multinucleating and necrotizing activity coded by the Vir plasmid of Escherichia coli. *FEMS Microbiol Lett* 56, 279-284.
- Palade, G. (1975). Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis. *Science* 189, 867.
- Pannifer, A. D., Wong, T. Y., Schwarzenbacher, R. & other authors (2001). Crystal structure of the anthrax lethal factor. *Nature* 414, 229-233.
- Papini, E., Sandona, D., Rappuoli, R. & Montecucco, C. (1988). On the membrane translocation of diphtheria toxin: at low pH the toxin induces ion channels on cells. *Embo J* 7, 3353-3359.
- Papini, E., Schiavo, G., Sandona, D., Rappuoli, R. & Montecucco, C. (1989). Histidine 21 is at the NAD⁺ binding site of diphtheria toxin. *The Journal of biological chemistry* 264, 12385-12388.
- Papini, E., Schiavo, G., Rappuoli, R. & Montecucco, C. (1990). Histidine-21 is involved in diphtheria toxin NAD⁺ binding. *Toxicon* 28, 631-635.
- Papini, E., Santucci, A., Schiavo, G., Domenighini, M., Neri, P., Rappuoli, R. & Montecucco, C. (1991). Tyrosine 65 is photolabeled by 8-azidoadenine and 8-azidoadenosine at the NAD binding site of diphtheria toxin. *The Journal of biological chemistry* 266, 2494-2498.
- Parton, R. G. (1994). Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae. *J Histochem Cytochem* 42, 155-166.
- Parton, R. G. & Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Microbiol* 8, 185-194.

- Pastrana, D. V., Hanson, A. J., Knisely, J., Bu, G. & Fitzgerald, D. J. (2005). LRP 1 B functions as a receptor for Pseudomonas exotoxin. *Biochim Biophys Acta* 1741, 234-239.
- Paton, A. W., Beddoe, T., Thorpe, C. M., Whisstock, J., C., Wilce, M. C. J., Rossjohn, J., Talbot, U. M. & Paton, J. C. (2006). AB 5 subtilase cytotoxin inactivated the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Nature* 2006, 548-552.
- Pei, S., Doye, A. & Boquet, P. (2001). Mutation of specific acidic residues of the CNF1 T domain into lysine alters cell membrane translocation of the toxin. *Mol Microbiol* 41, 1237-1247.
- Pelkmans, L. & Zerial, M. (2005). Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature* 436, 128-133.
- Perelle, S., Gibert, M., Boquet, P. & Popoff, M. R. (1993). Characterization of Clostridium perfringens iota-toxin genes and expression in Escherichia coli. *Infect Immun* 61, 5147-5156.
- Perelle, S., Scalzo, S., Kochi, S., Mock, M. & Popoff, M. R. (1997). Immunological and functional comparison between Clostridium perfringens iota toxin, C. spiroforme toxin, and anthrax toxins. *FEMS Microbiol Lett* 146, 117-121.
- Perier, A., Chassaing, A., Raffestin, S., Pichard, S., Masella, M., Menez, A., Forge, V., Chenal, A. & Gillet, D. (2007). Concerted protonation of key histidines triggers membrane interaction of the diphtheria toxin T domain. *The Journal of biological chemistry* 282, 24239-24245.
- Petosa, C., Collier, R. J., Klimpel, K. R., Leppla, S. H. & Liddington, R. C. (1997). Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature* 385, 833-838.
- Popoff, M. R. & Boquet, P. (1988). Clostridium spiroforme toxin is a binary toxin which ADP-ribosylates cellular actin. *Biochem Biophys Res Commun* 152, 1361-1368.
- Popoff, M. R., Milward, F. W., Bancillon, B. & Boquet, P. (1989). Purification of the Clostridium spiroforme binary toxin and activity of the toxin on HEp-2 cells. *Infect Immun* 57, 2462-2469.
- Popot, J. L. & Engelman, D. M. (1990). Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry* 29, 4031-4037.
- Prats, M., Tocanne, J. F. & Teissie, J. (1987). Lateral proton conduction at a lipid/water interface. Effect of lipid nature and ionic content of the aqueous phase. *Eur J Biochem* 162, 379-385.
- Prats, M., Tocanne, J. F. & Teissie, J. (1989). Lateral proton conduction along a lipid-water interface layer: a molecular mechanism for the role of hydration water molecules. *Biochimie* 71, 33-36.
- Pratt, W. B., Silverstein, A. M. & Galigniana, M. D. (1999). A model for the cytoplasmic trafficking of signalling proteins involving the hsp90-binding immunophilins and p50cdc37. *Cell Signal* 11, 839-851.
- Predescu, S. A., Predescu, D. N., Timblin, B. K., Stan, R. V. & Malik, A. B. (2003). Intersectin regulates fission and internalization of caveolae in endothelial cells. *Mol Biol Cell* 14, 4997-5010.
- Quertenmont, P., Wattiez, R., Falmagne, P., Ruyschaert, J. M. & Cabiliaux, V. (1996). Topology of diphtheria toxin in lipid vesicle membranes: a proteolysis study. *Mol Microbiol* 21, 1283-1296.

- Quertenmont, P., Wolff, C., Wattiez, R., Vander Borgh, P., Falmagne, P., Ruyschaert, J. M. & Cabiaux, V. (1999). Structure and topology of diphtheria toxin R domain in lipid membranes. *Biochemistry* 38, 660-666.
- Quinn, C. P., Singh, Y., Klimpel, K. R. & Leppla, S. H. (1991). Functional mapping of anthrax toxin lethal factor by in-frame insertion mutagenesis. *The Journal of biological chemistry* 266, 20124-20130.
- Ramsay, G., Montgomery, D., Berger, D. & Freire, E. (1989). Energetics of diphtheria toxin membrane insertion and translocation: calorimetric characterization of the acid pH induced transition. *Biochemistry* 28, 529-533.
- Ramsay, G. & Freire, E. (1990). Linked thermal and solute perturbation analysis of cooperative domain interactions in proteins. Structural stability of diphtheria toxin. *Biochemistry* 29, 8677-8683.
- Ratts, R., Zeng, H., Berg, E. A., Blue, C., McComb, M. E., Costello, C. E., vanderSpek, J. C. & Murphy, J. R. (2003). The cytosolic entry of diphtheria toxin catalytic domain requires a host cell cytosolic translocation factor complex. *J Cell Biol* 160, 1139-1150.
- Ren, J., Kachel, K., Kim, H., Malenbaum, S. E., Collier, R. J. & London, E. (1999a). Interaction of diphtheria toxin T domain with molten globule-like proteins and its implications for translocation. *Science* 284, 955-957.
- Ren, J., Sharpe, J. C., Collier, R. J., London, E. Membrane translocation of charged residues at the tips of hydrophobic helices in the T domain of diphtheria toxin. (1999b). *Biochemistry* 38, 976-84.
- Riederer, M. A., Soldati, T., Shapiro, A. D., Lin, J. & Pfeffer, S. R. (1994). Lysosome biogenesis requires Rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 125, 573-582.
- Rigaud, J., Chami, M., Lambert, O., Levy, D. & Ranck, J. (2000). Use of detergents in two-dimensional crystallization of membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1508, 112-128.
- Rigaud, J. L., Bluzat, A. & Buschlen, S. (1983). Incorporation of bacteriorhodopsin into large unilamellar liposomes by reverse phase evaporation. *Biochem Biophys Res Commun* 111, 373-382.
- Rogel, A., Schultz, J. E., Brownlie, R. M., Coote, J. G., Parton, R. & Hanski, E. (1989). Bordetella pertussis adenylate cyclase: purification and characterization of the toxic form of the enzyme. *Embo J* 8, 2755-2760.
- Rogel, A. & Hanski, E. (1992). Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane. *The Journal of biological chemistry* 267, 22599-22605.
- Romer, W., Berland, L., Chambon, V. & other authors (2007). Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature* 450, 670-675.
- Ronnberg, B. J. & Middlebrook, J. L. (1989). Cellular regulation of diphtheria toxin cell surface receptors. *Toxicon* 27, 1377-1388.
- Rosconi, M. P. & London, E. (2002). Topography of helices 5-7 in membrane-inserted diphtheria toxin T domain: identification and insertion boundaries of two hydrophobic sequences that do not form a stable transmembrane hairpin. *The Journal of biological chemistry* 277, 16517-16527.

- Rosconi, M. P., Zhao, G. & London, E. (2004). Analyzing topography of membrane-inserted diphtheria toxin T domain using BODIPY-streptavidin: at low pH, helices 8 and 9 form a transmembrane hairpin but helices 5-7 form stable nonclassical inserted segments on the cis side of the bilayer. *Biochemistry* 43, 9127-9139.
- Rose, T., Sebo, P., Bellalou, J. & Ladant, D. (1995). Interaction of calcium with Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *The Journal of biological chemistry* 270, 26370-26376.
- Roy, C. R. (2002). Exploitation of the endoplasmic reticulum by bacterial pathogens. *Trends Microbiol* 10, 418-424.
- Rubin, E. J., Gill, D. M., Boquet, P. & Popoff, M. R. (1988). Functional modification of a 21-kilodalton G protein when ADP-ribosylated by exoenzyme C3 of Clostridium botulinum. *Mol Cell Biol* 8, 418-426.
- Russell, M. R., Nickerson, D. P. & Odorizzi, G. (2006). Molecular mechanisms of late endosome morphology, identity and sorting. *Curr Opin Cell Biol* 18, 422-428.
- Rybak, S. L., Lanni, F. & Murphy, R. F. (1997). Theoretical considerations on the role of membrane potential in the regulation of endosomal pH. *Biophys J* 73, 674-687.
- Saint-Pol, A., Yelamos, B., Amessou, M. & other authors (2004). Clathrin adaptor epsinR is required for retrograde sorting on early endosomal membranes. *Dev Cell* 6, 525-538.
- Saleh, M. T., Ferguson, J., Boggs, J. M. & Garipey, J. (1996). Insertion and orientation of a synthetic peptide representing the C-terminus of the A1 domain of Shiga toxin into phospholipid membranes. *Biochemistry* 35, 9325-9334.
- Sandvig, K., Sundan, A. & Olsnes, S. (1985). Effect of potassium depletion of cells on their sensitivity to diphtheria toxin and pseudomonas toxin. *J Cell Physiol* 124, 54-60.
- Sandvig, K. & Olsnes, S. (1988). Diphtheria toxin-induced channels in Vero cells selective for monovalent cations. *The Journal of biological chemistry* 263, 12352-12359.
- Sandvig, K., Garred, O., Prydz, K., Kozlov, J. V., Hansen, S. H. & van Deurs, B. (1992). Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature* 358, 510-512.
- Sandvig, K. (2001). Shiga toxins. *Toxicon* 39, 1629-1635.
- Sato, H. & Feix, J. B. (2006). Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 1758, 1245-1256.
- Schivell, A. E., Mochida, S., Kensel-Hammes, P., Custer, K. L. & Bajjalieh, S. M. (2005). SV2A and SV2C contain a unique synaptotagmin-binding site. *Mol Cell Neurosci* 29, 56-64.
- Schleberger, C., Hochmann, H., Barth, H., Aktories, K. & Schulz, G. E. (2006). Structure and action of the binary C2 toxin from Clostridium botulinum. *J Mol Biol* 364, 705-715.
- Schmid, A., Benz, R., Just, I. & Aktories, K. (1994). Interaction of Clostridium botulinum C2 toxin with lipid bilayer membranes. Formation of cation-selective channels and inhibition of channel function by chloroquine. *The Journal of biological chemistry* 269, 16706-16711.

Schmid, S. L., McNiven, M. A. & De Camilli, P. (1998). Dynamin and its partners: a progress report. *Curr Opin Cell Biol* 10, 504-512.

Schmitz, A., Herrgen, H., Winkeler, A. & Herzog, V. (2000). Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex. *J Cell Biol* 148, 1203-1212.

Senzel, L., Huynh, P. D., Jakes, K. S., Collier, R. J. & Finkelstein, A. (1998). The diphtheria toxin channel-forming T domain translocates its own NH₂-terminal region across planar bilayers. *J Gen Physiol* 112, 317-324.

Senzel, L., Gordon, M., Blaustein, R. O., Oh, K. J., Collier, R. J. & Finkelstein, A. (2000). Topography of diphtheria Toxin's T domain in the open channel state. *J Gen Physiol* 115, 421-434.

Sever, S., Damke, H. & Schmid, S. L. (2000). Garrotes, springs, ratchets, and whips: putting dynamin models to the test. *Traffic* 1, 385-392.

Shajahan, A. N., Tirupathi, C., Smrcka, A. V., Malik, A. B. & Minshall, R. D. (2004). Gbetagamma activation of Src induces caveolae-mediated endocytosis in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 279, 48055-48062.

Sharma, D. K., Brown, J. C., Choudhury, A., Peterson, T. E., Holicky, E., Marks, D. L., Simari, R., Parton, R. G. & Pagano, R. E. (2004). Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol. *Mol Biol Cell* 15, 3114-3122.

Sharpe, J. C. & London, E. (1999). Diphtheria toxin forms pores of different sizes depending on its concentration in membranes: probable relationship to oligomerization. *The Journal of membrane biology* 171, 209-221.

Shatursky, O., Heuck, A. P., Shepard, L. A., Rossjohn, J., Parker, M. W., Johnson, A. E. & Tweten, R. K. (1999). The mechanism of membrane insertion for a cholesterol-dependent cytolysin: a novel paradigm for pore-forming toxins. *Cell* 99, 293-299.

Shen, W. H., Choe, S., Eisenberg, D. & Collier, R. J. (1994). Participation of lysine 516 and phenylalanine 530 of diphtheria toxin in receptor recognition. *The Journal of biological chemistry* 269, 29077-29084.

Shishido, Y., Sharma, K. D., Higashiyama, S., Klagsbrun, M. & Mekada, E. (1995). Heparin-like molecules on the cell surface potentiate binding of diphtheria toxin to the diphtheria toxin receptor/membrane-anchored heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor. *The Journal of biological chemistry* 270, 29578-29585.

Shogomori, H. & Futerman, A. H. (2001). Cholesterol depletion by methyl-beta-cyclodextrin blocks cholera toxin transport from endosomes to the Golgi apparatus in hippocampal neurons. *J Neurochem* 78, 991-999.

Silverman, J. A., Mindell, J. A., Finkelstein, A., Shen, W. H. & Collier, R. J. (1994a). Mutational analysis of the helical hairpin region of diphtheria toxin transmembrane domain. *The Journal of biological chemistry* 269, 22524-22532.

Silverman, J. A., Mindell, J. A., Zhan, H., Finkelstein, A. & Collier, R. J. (1994b). Structure-function relationships in diphtheria toxin channels: I. Determining a minimal channel-forming domain. *The Journal of membrane biology* 137, 17-28.

- Silverman, J. A., Mindell, J. A., Zhan, H., Finkelstein, A. & Collier, R. J. (1994c). Structure-function relationships in diphtheria toxin channels: I. Determining a minimal channel-forming domain. *The Journal of membrane biology* 137, 17-28.
- Simon, P. D., McConnell, J., Zurakowski, D., Vorwerk, C. K., Naskar, R., Grosskreutz, C. L. & Dreyer, E. B. (1999). Thy-1 is critical for normal retinal development. *Brain Res Dev Brain Res* 117, 219-223.
- Simons, K. & Ikonen, E. (2000). How cells handle cholesterol. *Science* 290, 1721-1726.
- Simons, K. & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Microbiol* 1, 31-39.
- Simpson, J. C., Roberts, L. M., Romisch, K., Davey, J., Wolf, D. H. & Lord, J. M. (1999). Ricin A chain utilises the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter the cytosol of yeast. *FEBS Lett* 459, 80-84.
- Simpson, J.C., Smith, D. C., Roberts, L. M., Lord, J. M. (1998). Expression of mutant dynamin protects cells against diphtheria toxin but not against ricin. *Exp Cell Res* 239, 292-300.
- Sixma, T. K., Pronk, S. E., Kalk, K. H., Wartna, E. S., van Zanten, B. A., Witholt, B. & Hol, W. G. (1991). Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. *Nature* 351, 371-377.
- Smart, O. S., Breed, J., Smith, G. R. & Sansom, M. S. (1997). A novel method for structure-based prediction of ion channel conductance properties. *Biophys J* 72, 1109-1126.
- Smith, D. C., Lord, J. M., Roberts, L. M., Tartour, E. & Johannes, L. (2002). 1st class ticket to class I: protein toxins as pathfinders for antigen presentation. *Traffic* 3, 697-704.
- Spooner, R.A., Smith, D.C., Easton, A.J., Roberts, L.M., Lord, J.M. (2006) Retrograde transport pathways utilised by viruses and protein toxins. *Virology* 7, 3-26.
- Steere, B. & Eisenberg, D. (2000). Characterization of high-order diphtheria toxin oligomers. *Biochemistry* 39, 15901-15909.
- Stein, P. E., Boodhoo, A., Tyrrell, G. J., Brunton, J. L. & Read, R. J. (1992). Crystal structure of the cell-binding B oligomer of verotoxin-1 from *E. coli*. *Nature* 355, 748-750.
- Stein, P. E., Boodhoo, A., Armstrong, G. D., Cockle, S. A., Klein, M. H. & Read, R. J. (1994). The crystal structure of pertussis toxin. *Structure* 2, 45-57.
- Strauss, N. & Hendee, E. D. (1959). The effect of diphtheria toxin on the metabolism of HeLa cells. *J Exp Med* 109, 145-163.
- Sudhof, T. C. (2002). Synaptotagmins: why so many? *The Journal of biological chemistry* 277, 7629-7632.
- Sundan, A., Olsnes, S., Sandvig, K. & Pihl, A. (1982). Preparation and properties of chimeric toxins prepared from the constituent polypeptides of diphtheria toxin and ricin. Evidence for entry of ricin A-chain via the diphtheria toxin pathway. *The Journal of biological chemistry* 257, 9733-9739.
- Swaminathan, S. & Eswaramoorthy, S. (2000). Crystallization and preliminary X-ray analysis of *Clostridium botulinum* neurotoxin type B. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56, 1024-1026.

- Tai, G., Lu, L., Wang, T. L., Tang, B. L., Goud, B., Johannes, L. & Hong, W. (2004). Participation of the syntaxin 5/Ykt6/GS28/GS15 SNARE complex in transport from the early/recycling endosome to the trans-Golgi network. *Mol Biol Cell* 15, 4011-4022.
- Tamayo, A. G., Bharti, A., Trujillo, C., Harrison, R. & Murphy, J. R. (2008). COPI coatomer complex proteins facilitate the translocation of anthrax lethal factor across vesicular membranes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5254-5259.
- Tamm, L. K. & Tatulian, S. A. (1997). Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers. *Q Rev Biophys* 30, 365-429.
- Tamura, M., Nogimori, K., Murai, S., Yajima, M., Ito, K., Katada, T., Ui, M. & Ishii, S. (1982). Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry* 21, 5516-5522.
- Taupiac, M. P., Alami, M. & Beaumelle, B. (1996). Translocation of full-length Pseudomonas exotoxin from endosomes is driven by ATP hydrolysis but requires prior exposure to acidic pH. *The Journal of biological chemistry* 271, 26170-26173.
- Teissie, J., Prats, M., Soucaille, P. & Tocanne, J. F. (1985). Evidence for conduction of protons along the interface between water and a polar lipid monolayer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 3217-3221.
- Teter, K., Allyn, R. L., Jobling, M. G. & Holmes, R. K. (2002). Transfer of the cholera toxin A1 polypeptide from the endoplasmic reticulum to the cytosol is a rapid process facilitated by the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. *Infect Immun* 70, 6166-6171.
- Teter, K. & Holmes, R. K. (2002). Inhibition of endoplasmic reticulum-associated degradation in CHO cells resistant to cholera toxin, Pseudomonas aeruginosa exotoxin A, and ricin. *Infect Immun* 70, 6172-6179.
- Tomkiewicz, D., Nouwen, N. & Driessen, A. J. (2007). Pushing, pulling and trapping--modes of motor protein supported protein translocation. *FEBS Lett* 581, 2820-2828.
- Torgersen, M. L., Skretting, G., van Deurs, B. & Sandvig, K. (2001). Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. *J Cell Sci* 114, 3737-3747.
- Tortorella, D., Sesardic, D., Dawes, C. S. & London, E. (1995). Immunochemical analysis of the structure of diphtheria toxin shows all three domains undergo structural changes at low pH. *The Journal of biological chemistry* 270, 27439-27445.
- Tsai, B., Rodighiero, C., Lencer, W. I. & Rapoport, T. A. (2001). Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell* 104, 937-948.
- Tsai, B. & Rapoport, T. A. (2002). Unfolded cholera toxin is transferred to the ER membrane and released from protein disulfide isomerase upon oxidation by Ero1. *J Cell Biol* 159, 207-216.
- Tsuneoka, M., Nakayama, K., Hatsuzawa, K., Komada, M., Kitamura, N., Mekada, E. (1993). Evidence for involvement of furin in cleavage and activation of diphtheria toxin. *J Biol Chem* 268, 26461-26465.
- Tweten, R. K., Barbieri, J. T. & Collier, R. J. (1985). Diphtheria toxin. Effect of substituting aspartic acid for glutamic acid 148 on ADP-ribosyltransferase activity. *The Journal of biological chemistry* 260, 10392-10394.

- Uherek, C., Fominaya, J. & Wels, W. (1998). A modular DNA carrier protein based on the structure of diphtheria toxin mediates target cell-specific gene delivery. *The Journal of biological chemistry* 273, 8835-8841.
- Valdivia, R. H., Baggott, D., Chuang, J. S., Schekman, R. W. (2002). The yeast clathrin adaptor protein complex 1 is required for the efficient retention of a subset of late Golgi membrane proteins. *Dev Cell* 2, 283-294.
- Van Dyke, R. W., Hornick, C. A., Belcher, J., Scharschmidt, B. F. & Havel, R. J. (1985). Identification and characterization of ATP-dependent proton transport by rat liver multivesicular bodies. *The Journal of biological chemistry* 260, 11021-11026.
- van Meer, G. (1998). Lipids of the Golgi membrane. *Trends Cell Biol* 8, 29-33.
- Van Ness, B. G., Howard, J. B. & Bodley, J. W. (1980a). ADP-ribosylation of elongation factor 2 by diphtheria toxin. Isolation and properties of the novel ribosyl-amino acid and its hydrolysis products. *The Journal of biological chemistry* 255, 10717-10720.
- Van Ness, B. G., Howard, J. B. & Bodley, J. W. (1980b). ADP-ribosylation of elongation factor 2 by diphtheria toxin. NMR spectra and proposed structures of ribosyl-diphthamide and its hydrolysis products. *The Journal of biological chemistry* 255, 10710-10716.
- vanderSpek, J. C., Mindell, J. A., Finkelstein, A. & Murphy, J. R. (1993). Structure/function analysis of the transmembrane domain of DAB389-interleukin-2, an interleukin-2 receptor-targeted fusion toxin. The amphipathic helical region of the transmembrane domain is essential for the efficient delivery of the catalytic domain to the cytosol of target cells. *The Journal of biological chemistry* 268, 12077-12082.
- vanderSpek, J. C., Howland, K., Friedman, T. & Murphy, J. R. (1994). Maintenance of the hydrophobic face of the diphtheria toxin amphipathic transmembrane helix 1 is essential for the efficient delivery of the catalytic domain to the cytosol of target cells. *Protein engineering* 7, 985-989.
- Vaz, W. L., Nisksch, A. & Jahnig, F. (1978). Electrostatic interactions at charged lipid membranes. Measurement of surface pH with fluorescent lipid pH indicators. *Eur J Biochem* 83, 299-305.
- Veithen, A., Raze, D. & Loch, C. (2000). Intracellular trafficking and membrane translocation of pertussis toxin into host cells. *Int J Med Microbiol* 290, 409-413.
- von Eichel-Streiber, C., Sauerborn, M. & Kuramitsu, H. K. (1992). Evidence for a modular structure of the homologous repetitive C-terminal carbohydrate-binding sites of *Clostridium difficile* toxins and *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. *J Bacteriol* 174, 6707-6710.
- Wang, J., Rosconi, M. P. & London, E. (2006). Topography of the hydrophilic helices of membrane-inserted diphtheria toxin T domain: TH1-TH3 as a hydrophilic tether. *Biochemistry* 45, 8124-8134.
- Wang, Y., Kachel, K., Pablo, L. & London, E. (1997a). Use of Trp mutations to evaluate the conformational behavior and membrane insertion of A and B chains in whole diphtheria toxin. *Biochemistry* 36, 16300-16308.
- Wang, Y., Malenbaum, S. E., Kachel, K., Zhan, H., Collier, R. J. & London, E. (1997b). Identification of shallow and deep membrane-penetrating forms of diphtheria toxin T domain that are regulated by protein concentration and bilayer width. *The Journal of biological chemistry* 272, 25091-25098.

- Waters, M. G., Serafini, T. & Rothman, J. E. (1991). 'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature* 349, 248-251.
- Wei, W., Lu, Q., Chaudry, G. J., Leppla, S. H. & Cohen, S. N. (2006). The LDL receptor-related protein LRP6 mediates internalization and lethality of anthrax toxin. *Cell* 124, 1141-1154.
- Weiss, M. S., Blanke, S. R., Collier, R. J. & Eisenberg, D. (1995). Structure of the isolated catalytic domain of diphtheria toxin. *Biochemistry* 34, 773-781.
- Werner, E. D., Brodsky, J. L. & McCracken, A. A. (1996). Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13797-13801.
- Wesche, J., Rapak, A. & Olsnes, S. (1999). Dependence of ricin toxicity on translocation of the toxin A-chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *The Journal of biological chemistry* 274, 34443-34449.
- White, J., Johannes, L., Mallard, F. & other authors (1999). Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *J Cell Biol* 147, 743-760.
- White, S. H. & Wimley, W. C. (1999). Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28, 319-365.
- Wiedlocha, A., Madshus, I. H., Mach, H., Middaugh, C. R. & Olsnes, S. (1992). Tight folding of acidic fibroblast growth factor prevents its translocation to the cytosol with diphtheria toxin as vector. *Embo J* 11, 4835-4842.
- Wiedlocha, A., Falnes, P. O., Madshus, I. H., Sandvig, K. & Olsnes, S. (1994). Dual mode of signal transduction by externally added acidic fibroblast growth factor. *Cell* 76, 1039-1051.
- Wiener, M. C., King, G. I. & White, S. H. (1991). Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. I. Scaling of neutron data and the distributions of double bonds and water. *Biophys J* 60, 568-576.
- Wiener, M. C. & White, S. H. (1992). Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. III. Complete structure. *Biophys J* 61, 434-447.
- Wilcke, M., Johannes, L., Galli, T., Mayau, V., Goud, B. & Salamero, J. (2000). Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-golgi network. *J Cell Biol* 151, 1207-1220.
- Wilde, C. & Aktories, K. (2001). The Rho-ADP-ribosylating C3 exoenzyme from *Clostridium botulinum* and related C3-like transferases. *Toxicon* 39, 1647-1660.
- Wilson, B. A. & Collier, R. J. (1992). Diphtheria toxin and *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A: active-site structure and enzymic mechanism. *Curr Top Microbiol Immunol* 175, 27-41.
- Wilson, B. A., Blanke, S. R., Reich, K. A. & Collier, R. J. (1994). Active-site mutations of diphtheria toxin. Tryptophan 50 is a major determinant of NAD affinity. *The Journal of biological chemistry* 269, 23296-23301.

- Wimalasena, D. S., Cramer, J. C., Janowiak, B. E., Juris, S. J., Melnyk, R. A., Anderson, D. E., Kirk, K. L., Collier, R. J. & Bann, J. G. (2007). Effect of 2-Fluorohistidine Labeling of the Anthrax Protective Antigen on Stability, Pore Formation, and Translocation. *Biochemistry* 46, 14928-14936.
- Wolff, C., Wattiez, R., Ruyschaert, J. M. & Cabiaux, V. (2004). Characterization of diphtheria toxin's catalytic domain interaction with lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1661, 166-177.
- Xu, Y. & Barbieri, J. T. (1996). Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of Gi-2 and Gi-3 in CHO cells is modulated by inhibitors of intracellular trafficking. *Infect Immun* 64, 593-599.
- Yahiro, K., Morigana, N., Satoh, M., Matsuura, G., Tomogona, T., Nomura, F., Moss, J. & Noda, M. (2006) *Mol Microbiol* 62, 480-490.
- Yamaizumi, M., Mekada, E., Uchida, T. & Okada, Y. (1978). One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell* 15, 245-250.
- Yates, S. P., Jorgensen, R., Andersen, G. R. & Merrill, A. R. (2006). Stealth and mimicry by deadly bacterial toxins. *Trends Biochem Sci* 31, 123-133.
- Young, J. A. & Collier, R. J. (2007). Anthrax Toxin: Receptor Binding, Internalization, Pore Formation, and Translocation. *Annu Rev Biochem* 76, 243-265.
- Zachowski, A. (1993). Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J* 294 (Pt 1), 1-14.
- Zakharov, S. D. & Cramer, W. A. (2002). Insertion intermediates of pore-forming colicins in membrane two-dimensional space. *Biochimie* 84, 465-475.
- Zhan, H., Choe, S., Huynh, P. D., Finkelstein, A., Eisenberg, D. & Collier, R. J. (1994). Dynamic transitions of the transmembrane domain of diphtheria toxin: disulfide trapping and fluorescence proximity studies. *Biochemistry* 33, 11254-11263.
- Zhan, H., Oh, K. J., Shin, Y. K., Hubbell, W. L. & Collier, R. J. (1995). Interaction of the isolated transmembrane domain of diphtheria toxin with membranes. *Biochemistry* 34, 4856-4863.
- Zhang, R. G., Scott, D. L., Westbrook, M. L., Nance, S., Spangler, B. D., Shipley, G. G. & Westbrook, E. M. (1995). The three-dimensional crystal structure of cholera toxin. *J Mol Biol* 251, 563-573.
- Zhao, G. & London, E. (2005). Behavior of diphtheria toxin T domain containing substitutions that block normal membrane insertion at Pro345 and Leu307: control of deep membrane insertion and coupling between deep insertion of hydrophobic subdomains. *Biochemistry* 44, 4488-4498.
- Zhao, J. M. & London, E. (1988). Conformation and model membrane interactions of diphtheria toxin fragment A. *The Journal of biological chemistry* 263, 15369-15377.
- Zinser, E., Sparka-Gottlieb, C. D., Fasch, E. V., Kohlwein, S. D., Paltauf, F., Daum, G. Phospholipid Synthesis and Lipid Composition of Subcellular Membranes in the Unicellular Eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. (1991). *J Bacteriol* 173, 2026-2034.