

# **Thèse**

**Pour obtenir le grade de**

**Docteur de l'Université de Strasbourg**

**Discipline : Chimie**

**Présentée par :**

**Verica VIDOVIC**

**Institut de Chimie de Strasbourg (CNRS UMR 7177)**

**Laboratoire de RMN et biophysique des membranes**

**Production du peptide P-LAH<sub>4</sub> chez *E. coli* et  
études par RMN de ses propriétés  
antibactérienne et de transfection d'ADN.**

**Soutenue le 8 juillet 2011 devant la commission d'examen :**

**Dr Isabelle SCHALK: Examineur**

**Pr. Catherine SARAZIN: Rapporteur externe**

**Dr Antoine KICHLER: Rapporteur externe**

**Pr. Burkhard BECHINGER: Directeur de thèse**

## Remerciements

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé au sein du laboratoire de RMN et de biophysique des membranes (CNRS, UMR 7177) à Strasbourg. Je remercie le Pr. Burkhard Bechinger de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour la grande liberté dont j'ai bénéficié durant ces quatre années.

Je remercie le Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche qui a financé cette thèse en m'accordant un poste d'allocataire de recherche et de moniteur.

Isabelle Schalk, Catherine Sarazin et Antoine Kichler ont accepté d'évaluer ce travail. Qu'ils y trouvent toute ma gratitude.

Je tiens à remercier Sebastiaan, pour m'avoir encadré durant la première année, d'avoir été toujours disponible par la suite, et de m'avoir soutenu jusqu'au bout.

Je remercie également Philippe et Jésus pour m'avoir initié à la spectroscopie RMN et Arnaud pour son encadrement durant les expériences de spectroscopies optiques ainsi que pour sa bonne humeur et son humour.

Un grand merci aussi à Christopher, pour s'être intéressé à mon travail de thèse et pour sa grande disponibilité.

Merci aussi au reste de l'équipe : Marc, Barbara, Delphine, Elise, Evgeniy, ...et à toi Caroline un grand Merci, pour avoir toujours été là pour me faciliter les tâches administratives et notamment depuis mon départ de Strasbourg.

Mes remerciements vont aussi au Dr Andrew Atkinson qui m'a initié à la spectroscopie RMN tridimensionnelles et qui a commencé le projet de détermination de structure tridimensionnelle de P-LAH<sub>4</sub> avec moi.

Pour finir, merci à toute ma famille (*Mama, Tata, Antonia, Velemir i Valerija*), à Joëlle et à Daniel, pour leur soutien et tout particulièrement à mon fils Romain pour ses fous rires et ses sourires qui ont rendu cette période de rédaction plus joyeuse !



*A mon Fils Romain,*



<b>1 Chapitre 1 : Introduction</b>	<b>1</b>
1.1 Contexte de l'étude	1
1.1.1 La thérapie génique	1
1.1.1.1 Définition et principe	1
1.1.1.2 Les vecteurs non viraux de la thérapie génique	1
1.1.2 Les peptides antimicrobiens	12
1.1.2.1 Introduction	12
1.1.2.2 Les différents modèles de mécanismes d'actions des peptides antibactériens	14
1.1.3 LAH4 : un peptide multifonctionnel	18
1.1.3.1 Caractéristiques structurales de LAH4	18
1.1.3.2 Interactions du peptide LAH4 avec les membranes	20
1.1.3.3 Interactions avec l'ADN et transfection	22
1.2 Objectif et contribution du travail de thèse	28
<b>2 Chapitre 2 : Théorie</b>	<b>29</b>
2.1 Stratégie d'expression d'une protéine hétérologue chez E. coli	29
2.1.1 Le vecteur d'expression	30
2.1.2 Régulation de l'expression de la protéine d'intérêt	32
2.1.3 Paramètres responsables du niveau d'expression de la protéine hétérologue	35
2.1.3.1 La nature du gène à exprimer	35
2.1.3.2 La stabilité de l'ARNm	36
2.1.3.3 Dégradation de la protéine par les protéases	37
2.1.4 Localisation de la protéine exprimée	38
2.1.5 Les partenaires de fusion	39

2.2 La résonance magnétique nucléaire	41
2.2.1 Le phénomène de résonance magnétique nucléaire	41
2.2.1.1 Spin nucléaire et moment magnétique associé	41
2.2.1.2 Noyaux de spin $I=1/2$ dans un champ magnétique	42
2.2.1.3 Signal RMN	44
2.2.2 Les interactions nucléaires	47
2.2.2.1 Interaction de déplacement chimique	49
2.2.2.2 Couplage dipolaire : interaction spin-spin direct	52
2.2.2.3 Couplage scalaire : interaction spin-spin indirect	54
2.2.2.4 Interaction quadripolaire	54
2.2.3 Les expériences RMN du solide	54
2.2.3.1 Les échantillons orientés	54
2.2.3.2 Les expériences RMN statiques	58
2.2.3.3 Les expériences RMN en rotation à l'angle magique	62

## **3 Chapitre 3 : clonage, expression et purification du peptide P-LAH<sub>4</sub>** **73**

3.1 Introduction	73
3.2 Résultats préalables	75
3.3 Expression de LAH <sub>4</sub> avec la GST comme partenaire de fusion : effet des charges négatives sur l'expression	76
3.3.1 Introduction	76
3.3.2 Matériel et méthodes	76
3.3.3 Résultats et discussions	86
3.4 Expression de LAH <sub>4</sub> avec TAF12 comme partenaire de fusion	90

3.4.1 Matériel et méthodes	90
3.4.2 Résultats et discussions	94
3.5 P-LAH <sub>4</sub> : agent antibactérien et transfectant d'ADN	103
3.5.1 Matériel et méthodes	103
3.5.2 Résultat et discussions	104
3.6 Conclusions	106
<b>4 Chapitre 4 : attribution RMN et structure secondaire du peptide P-LAH<sub>4</sub> en milieu micellaire</b>	<b>109</b>
4.1 Introduction	109
4.2 Matériel et méthodes	110
4.2.1 Méthodes	110
4.2.1.1 Attribution des résonances du squelette peptidique	111
4.2.1.2 Détermination de la structure secondaire du peptide P-LAH <sub>4</sub>	117
4.2.2 Matériel	120
4.2.2.1 Marquage uniforme du peptide P-LAH <sub>4</sub> en <sup>15</sup> N et en <sup>13</sup> C	120
4.2.2.2 Préparations des échantillons RMN	121
4.2.2.3 Expériences RMN	121
4.2.2.4 Expériences de dichroïsme circulaire	122
4.3 Résultats et discussions	122
4.3.1 Attribution du squelette peptidique	122
4.3.2 Identification de la structure secondaire et prédiction d'angles	128
4.4 Discussions	136

## **5 Chapitre 5 : Etude de l'orientation et de la structure du peptide P-LAH<sub>4</sub> dans les bicouches de POPC par RMN du solide** **139**

5.1 Introduction	139
5.2 Matériel et méthodes	139
5.2.1 Préparation des échantillons RMN orientés	139
5.2.2 Acquisition des spectres RMN	141
5.3 Résultats	142
5.3.1 Structure et topologie du peptide P-LAH <sub>4</sub> dans les bicouches orientées de POPC à pH=5,5.	142
5.3.2 Structure et topologie du peptide P-LAH <sub>4</sub> dans les bicouches orientées de POPC à pH=6,9.	146
5.4 Discussions	151

## **6 Chapitre 6 : Etudes des interactions entre le peptide LAH<sub>4</sub> et l'ADN par expérience REDOR** **155**

6.1 Introduction	155
6.2 Matériel et méthodes	158
6.2.1 Synthèse peptidique	158
6.2.2 Préparation des complexes P-LAH <sub>4</sub> /ADN de sperme de saumon pour la RMN du solide	160
6.2.3 Expérience <sup>15</sup> N- <sup>31</sup> P REDOR	161
6.3 Résultats et discussions	164
6.3.1 Mesure des distances <sup>15</sup> N- <sup>31</sup> P par REDOR sur le diéthyl-N-phényl-phosphoramidate	164

6.3.2 Etude des interactions ADN/P-LAH <sub>4</sub> avec le peptide marqué uniformément en <sup>15</sup> N	167
6.3.3 Etude des interactions ADN-LAH <sub>4</sub> avec le peptide marqué spécifiquement sur une lysine à la fois	172
6.3.3.1 Contact entre les noyaux <sup>15</sup> N-Lysine et les noyaux <sup>31</sup> P de l'ADN pour les résidus K1 du peptide LAH <sub>4</sub> à pH= 5,5	174
6.3.3.2 Contact entre les noyaux <sup>15</sup> N-Lysine et les noyaux <sup>31</sup> P de l'ADN pour les résidus K2 du peptide LAH <sub>4</sub> à pH= 5,5	176
6.3.3.3 Contact entre les noyaux <sup>15</sup> N-Lysine et les noyaux <sup>31</sup> P de l'ADN pour les résidus K24 du peptide LAH <sub>4</sub> à pH= 5,5	177
6.3.3.4 Contact entre les noyaux <sup>15</sup> N-Lysine et les noyaux <sup>31</sup> P de l'ADN pour les résidus K25 du peptide LAH <sub>4</sub> à pH= 5,5	179
<b>6.4 Discussions</b>	<b>180</b>
6.4.1 Etude des interactions ADN/P-LAH <sub>4</sub> avec le peptide marqué uniformément en <sup>15</sup> N	180
6.4.2 Etude des interactions ADN-LAH <sub>4</sub> avec le peptide marqué spécifiquement sur une lysine à la fois	181
6.5 Conclusions	187
6.6 Perspectives	188
<b>7 Chapitre 7 : Conclusions Générales</b>	<b>189</b>
<b>Annexes</b>	<b>191</b>
<b>Références</b>	<b>197</b>
<b>Publication 1</b>	<b>214</b>
<b>Publication 2</b>	<b>221</b>

## *Abréviations*

<b>ADN</b>	Acide DésoxyRiboNucléique
<b>ARNm</b>	Acide RiboNucléique messenger
<b>ARNr</b>	Acide RiboNucléique ribosomique
<b>ARNsi</b>	Acide RiboNucléique « small interfering » (interférant)
<b>ARNt</b>	Acide RiboNucléique de transfert
<b>AU</b>	Unité Arbitraire
<b>CIP</b>	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
<b>CL</b>	CardioLipine
<b>ColE1</b>	Colicin E1
<b>CP</b>	Cross Polarization
<b>CSI</b>	Chemical Shift Index
<b>DC</b>	Dichroïsme Circulaire
<b>DO</b>	Densité Optique
<b>DOGS</b>	DiOctadécylamidoGlycylSpermine
<b>DOPE</b>	DiOléoylPhosphatidyl Ethanolamine
<b>DOSPA</b>	DiOléoyloxy[(Spermine-carboxyamido)éthyl]diméthylPropanAminium
<b>DOTAP</b>	DiOléoyloxypropylTriméthylAmmonium Propane
<b>DOTMA</b>	1,2-DiOléoyloxypropyl-3-TriMéthylAmmonium
<b>DPC</b>	DodécylPhosphoCholine
<b>DTT</b>	DiThioThréitol
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
<b>EK</b>	EntéroKinase
<b>FMOc</b>	FluorenylMéthylOxyCarbonyl
<b>GST</b>	Glutathion-S-Transférase

<b>HepG2</b>	Hepatocarcinome humain
<b>HisX6</b>	Tag contenant 6 Histidines consécutives
<b>HpK</b>	Polylysine hidtidylée
<b>HPLC</b>	High Pressure Liquid Chromatography
<b>HSPGs</b>	Heparan Sulfate Proteoglycans
<b>IPTG</b>	IsoPropyl- $\beta$ -D-1-ThioGalactopyranoside
<b>ITC</b>	Calorimétrie de Titration Isotherme
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>LB</b>	Line Broadening
<b>MALDI-TOF</b>	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation- Time-Of-Flight mass spectrometry
<b>MAS</b>	Magic Angle Spining
<b>MBP</b>	Maltose Binding Protein
<b>MCS</b>	Multiple Cloning Site
<b>NOE</b>	Nuclear Overhauser Effect
<b>NOESY</b>	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
<b>OmpT</b>	Outer Membrane Protein T
<b>PAGE</b>	PolyacrylAmide Gel Electrophoresis
<b>PAMAM</b>	PolyAMidoAMine
<b>PC</b>	PhosphatidylCholine
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PDB</b>	Protein Data Bank
<b>PE</b>	PhosphatidylEthanolamine
<b>PEI</b>	PolyEthylènImines
<b>PG</b>	PhosphatidylGlycérol
<b>PISEMA</b>	Polarization Inversion Spin Exchange at Magic Angle
<b>P-LAH<sub>4</sub>rec</b>	P-LAH <sub>4</sub> recombinant
<b>PLL</b>	Poly (L-lysine)
<b>POPC</b>	1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine

<b>POPS</b>	Palmitoyl-Oleoyl PhosphatidylSerine
<b>PS</b>	PhosphatidylSerine
<b>RBS</b>	Ribosomal Binding Site
<b>REDOR</b>	Rotationnal Echo DOuble Resonnance
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>rpm</b>	rotation par minute
<b>S</b>	Svedberg
<b>SDS</b>	Sodium Dodecyl Sulfate
<b>SM</b>	SphingoMyéline
<b>SM</b>	Spectre de Masse
<b>TAF12</b>	TATA box binding protein (TBP)-associated factor 12, Transcription initiation factor TFIID subunit 12
<b>TAF12 HFD</b>	Histone Fold Domain of TAF12
<b>TALOS</b>	Torsion Angle Likelihood Obtained from Shift and sequence similarity
<b>TFA</b>	TriFluoroAcetic acid
<b>TFE</b>	TriFluoroEthanol
<b>U</b>	Unité enzymatique
<b>UV</b>	Ultra Violet

# Chapitre 1 :

## Introduction

### 1.1-Contexte de l'étude

#### 1.1.1- La thérapie génique

##### 1.1.1.1-Définition et principe

La thérapie génique est une approche thérapeutique qui consiste à utiliser des acides nucléiques (ADN, ARN) dans le traitement ou la prévention de certaines pathologies comme par exemple le cancer, la mucoviscidose ou encore la myopathie. Ce type de thérapie consiste à introduire dans une cellule cible un « gène médicament », afin que celui-ci produise la protéine manquante dans le cas d'une cellule déficiente, ou encore un signal de mort cellulaire si la cellule est infectée ou cancéreuse. Cependant, l'ADN est une molécule anionique incapable d'entrer dans la plupart des cellules de façon efficace. Un des plus grands challenges consiste donc à élaborer des vecteurs spécifiques, efficaces et sécurisants qui auraient la capacité de faire pénétrer efficacement ce « gène médicament » dans les cellules en permettant à l'ADN de franchir les différentes barrières biologiques pour arriver jusqu'au noyau.

Compte-tenu de la capacité qu'ont les virus à introduire leur matériel génétique dans les cellules hôtes, la logique fût de les utiliser comme vecteurs pour la thérapie génique. Les principaux travaux menés sur ces vecteurs consistaient à fabriquer des virus atténués en ne conservant que les gènes qui ont pour fonction de délivrer du matériel génétique. Ainsi, différents types de virus modifiés, incluant les rétrovirus [1, 2], les adénovirus [3] ou encore les virus associés à l'adénovirus [4] ont été développés ces dernières années. Les vecteurs viraux de type rétrovirus sont les vecteurs les plus utilisés [1,2]. Ces virus ont la capacité d'introduire la séquence nucléotidique qu'ils transportent de façon aléatoire dans le génome de la cellule hôte. Cela permet de corriger le gène déficient ou défaillant. Cette intégration aléatoire du gène, peut également inactiver un gène fonctionnel ou encore activer des proto-oncogènes créant ainsi des cellules cancéreuses. Ce fût le cas, par exemple, lors du premier succès mondial de thérapie génique chez l'homme. En effet, l'équipe du Professeur Fischer à l'hôpital Necker a réussi à corriger l'immunodéficiência sévère (SCID)-X1 des « enfants

bulles » par thérapie génique mais malheureusement deux des enfants ont développé une leucémie à cause de l'intégration du vecteur à proximité du proto-oncogène LMO2 [5].

Les vecteurs viraux ont ainsi permis de valider le concept de thérapie génique et ils sont les principaux vecteurs utilisés pour les essais cliniques [6] car ils possèdent une bonne efficacité de transfection. Cependant ces vecteurs présentent certaines limites à cause de leur immunogénicité, de leur dangerosité, de la limite de la taille du gène qu'ils peuvent véhiculer (allant de 4,5 kb pour les virus associés aux adénovirus à 8 kb pour les rétrovirus) ou encore à cause de la difficulté de produire des lots cliniques à grande échelle. Toutes ces limitations ont poussé les chercheurs à développer des vecteurs non viraux.

### **1.1.1.2-Les vecteurs non viraux de la thérapie génique**

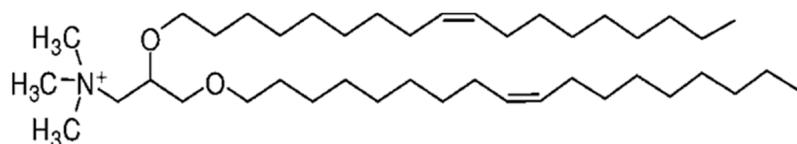
Les vecteurs non viraux ont été conçus de façon à reproduire les principales étapes utilisées par les virus pour infecter les cellules de mammifères. Ainsi ces vecteurs non viraux, doivent être capables de compacter l'ADN afin de le protéger de la dégradation par les nucléases, de le faire pénétrer dans la cellule par un mécanisme d'endocytose, de le libérer de l'endosome vers le cytoplasme et enfin de permettre son arrivée jusqu'au noyau pour que la transcription du gène exogène puisse avoir lieu.

Actuellement, il existe une multitude de vecteurs synthétiques. Ils sont principalement classés en trois groupes : les lipides cationiques, les polymères et les peptides. L'étape limitante de ces vecteurs réside principalement dans la libération de l'ADN des vésicules d'endocytose.

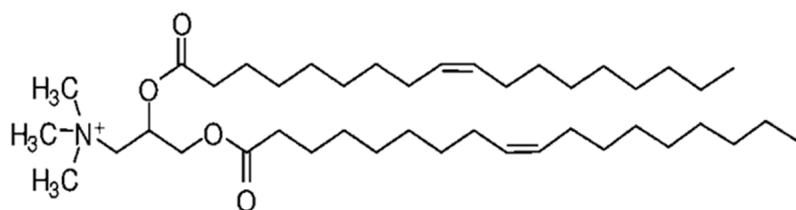
Dans un premier temps, nous citerons les différents vecteurs non viraux qui ont été développés durant ces dernières années ainsi que les mécanismes proposés pour expliquer la libération de l'ADN des vésicules d'endocytose. Pour finir, nous verrons les stratégies mises au point pour améliorer la sortie de l'ADN des vésicules d'endocytose.

### Les lipides cationiques :

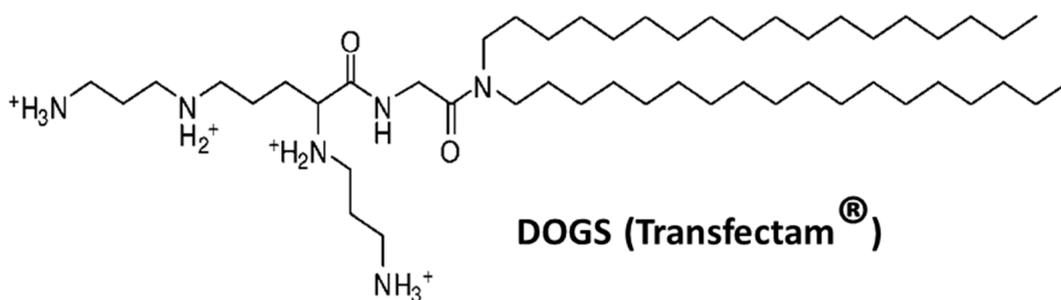
Les lipides cationiques sont constitués d'une tête cationique et d'une partie hydrophobe constituée par deux chaînes d'acides gras. Le premier lipide cationique, le DOTMA (1,2-dioléoyloxypropyl-3-triméthylammonium) fut développé par Felgner en 1987 [7]. D'autres lipides cationiques sont aussi fréquemment utilisés comme le DOTAP (dioléoyloxypropyltriméthylammonium propane), le DOSPA (trifluoroacétate de dioléoyloxy[(spermine-carboxyamido)éthyl]diméthylpropanaminium) ou encore la DOGS (acide trifluoroacétique dioctadécylamidoglycylspermine) (figure 1.1).



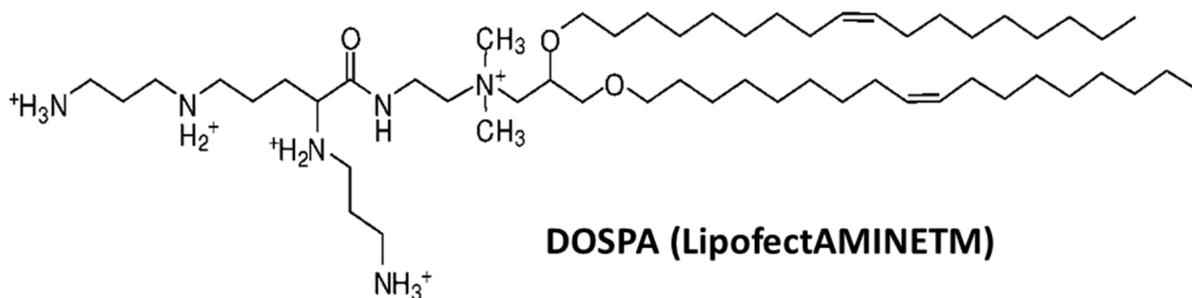
**DOTMA (Lipofectin<sup>TM</sup>)**



**DOTAP**



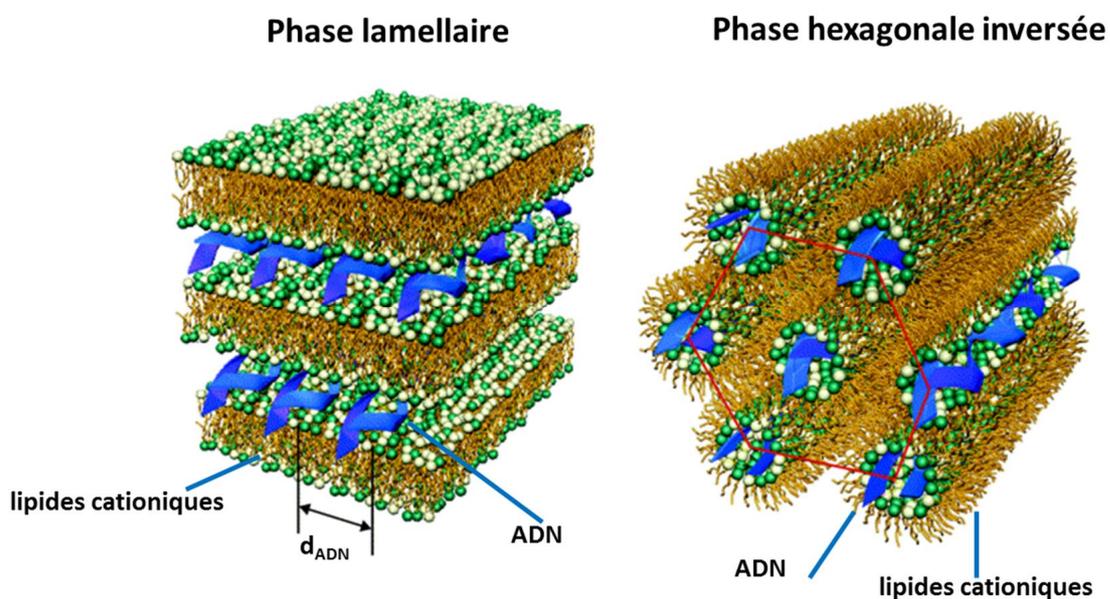
**DOGS (Transfectam<sup>®</sup>)**



**DOSPA (LipofectAMINETM)**

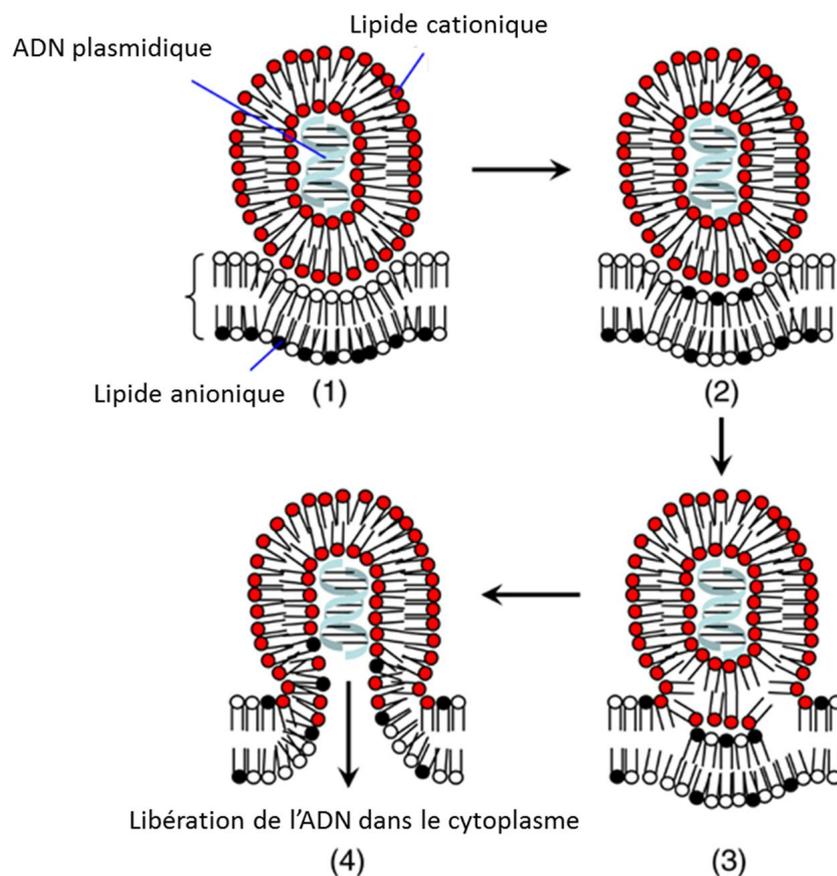
**Figure 1.1: Structure chimique de quelques lipides cationiques commercialisés [8].**

L'ADN réagit avec les lipides cationiques par des interactions électrostatiques entre la tête cationique du lipide et les charges négatives des phosphates de l'ADN. Ils sont généralement formulés sous forme de liposomes avec d'autres co-lipides neutres comme le DOPE (dioléoylphosphatidyl éthanolamine) ou encore du cholestérol. Ces co-lipides sont utilisés car ils facilitent la fusion du complexe ADN/liposomes cationiques (ou lipoplexes) avec la membrane mais permettent également une déstabilisation de la membrane de l'endosome [9]. Lorsque ces complexes possèdent une charge nette positive, la transfection est améliorée. Ces derniers peuvent en effet interagir avec les protéoglycans, les glycoprotéines et les glycérophosphates anioniques présents sur la membrane plasmique [10]. Lorsque l'ADN est ajouté à ces liposomes cationiques, il en résulte des structures lamellaires ou des structures en phase hexagonale inversée. Les structures lamellaires sont des structures condensées et globulaires dans lesquels l'ADN est pris en sandwich entre deux couches de lipides, et dont la distance entre deux hélices d'ADN est constante [11, 12, 13] (figure 1.2). Dans le cas de la structure hexagonale inversée, l'ADN est entouré d'une couche de lipides cationiques formant un réseau hexagonal [13]. Ces structures ont été obtenues par diffraction aux rayons X du synchrotron [12, 13]. L'ajout des co-lipides (DOPE, cholestérol) permet la conversion d'une structure lamellaire à une structure hexagonale inversée qui est connue comme étant la structure possédant un pouvoir de transfection plus efficace [13].



La taille de ces complexes varie avec le mode de préparation, mais ces complexes ont des tailles de l'ordre d'une centaine de nm [14].

Xu et Szoka ont montré que l'ajout de lipides anioniques déstabilisait le lipoplexe et conduisait au relargage de l'ADN. Ainsi, ils proposèrent un mécanisme de flip-flop pour expliquer la déstabilisation de la membrane de l'endosome et le relargage de l'ADN [15-16]. Selon ce mécanisme, le complexe déstabiliserait la membrane de l'endosome (figure 1.3-(1)) ce qui induirait un flip-flop des lipides anioniques, situés sur la membrane externe de l'endosome, vers la couche interne de l'endosome (figure 1.3-(2)). Ces lipides anioniques se mélangeraient ainsi avec les lipides cationiques du liposome. Les lipides anioniques diffuseraient dans le complexe et neutraliseraient la charge des lipides. Cette neutralisation de charges entraînerait un déplacement de l'ADN et permettrait sa libération dans le cytoplasme de la cellule (figure 1.3-(3) et (4)).



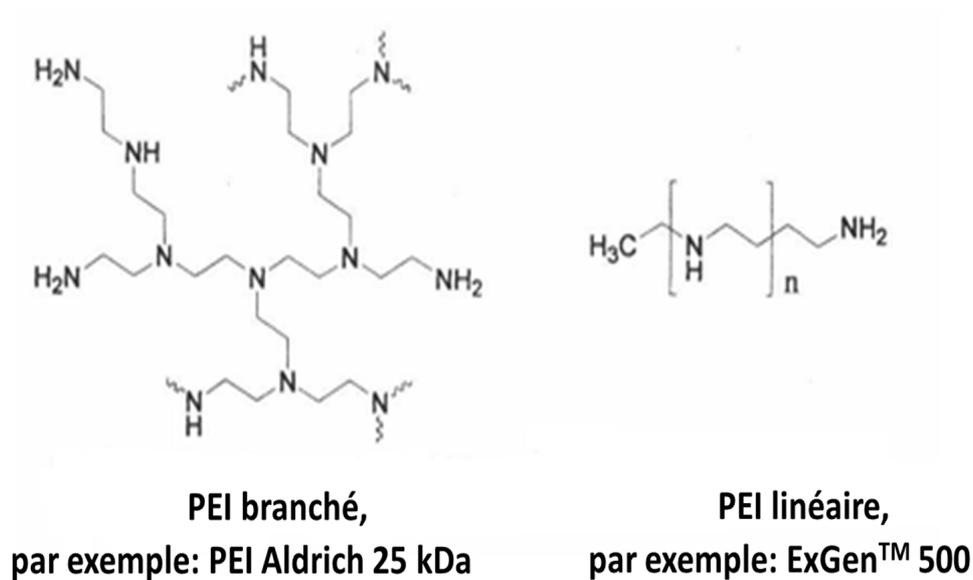
**Figure 1.3 : Mécanisme de rupture de la membrane de l'endosome par flip-flop. Voir le texte pour les explications. Adaptée de la référence [16].**

### Les polymères :

De nombreux polymères cationiques ont également été proposés comme vecteurs de transfection. La présence de groupement amines sur ces polymères leur permet de se complexer à l'ADN par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques. Parmi eux on trouve principalement les polyéthylènimines (PEI), les dendrimères et les poly (L-lysine) (PLL).

### *Les PEI :*

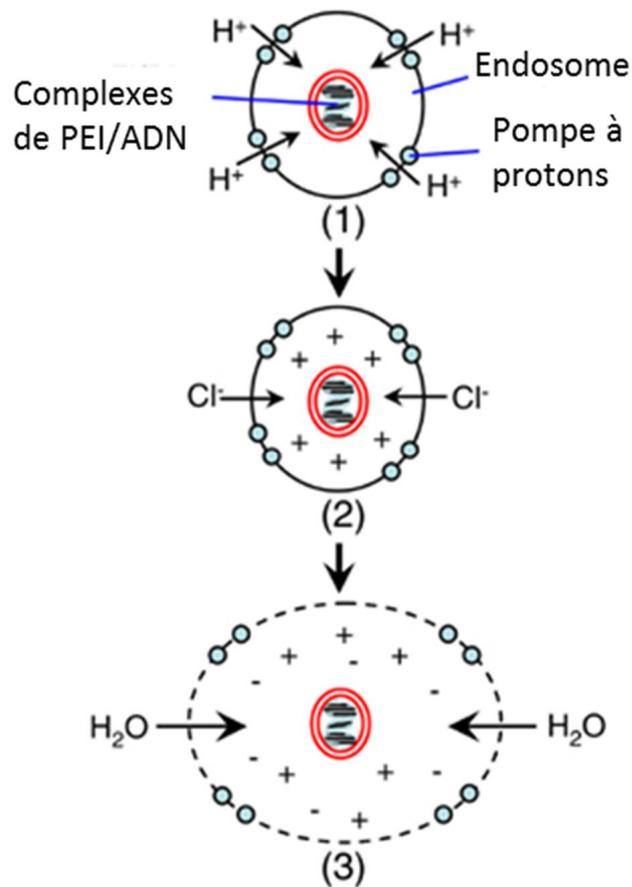
Les PEI ont été introduits comme vecteur de transfection non viraux pour la première fois par Behr en 1995 [17]. Les plus utilisés se trouvent sous forme branchés ou linéaire (figure 1.4).



**Figure 1.4 : Structure des polyéthylènimines (PEI) et exemples de formes commercialisées [18].**

Les complexes PEI/ADN forment des particules sphériques et homogènes de taille allant de 30 nm à 130 nm [19]. Ils transfectent efficacement les cellules *in vitro* et *in vivo* [17]. L'excès de charges positives au niveau des complexes PEI/ADN favorise son interaction avec les charges négatives présentes sur la membrane plasmique mais est aussi responsable de la toxicité de ce polymère ce qui limite son utilisation *in vivo* [20]. L'efficacité de transfection du PEI provient principalement de sa capacité à condenser l'ADN grâce à sa forte

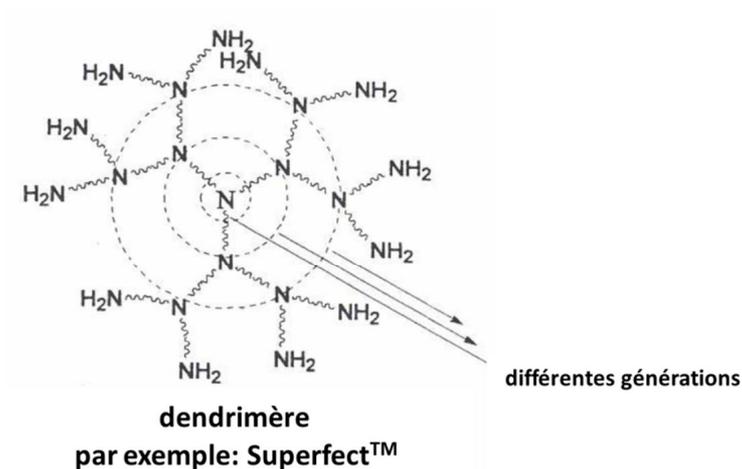
densité de charges positives mais également à la présence de groupements azotés qui sont protonables dans des conditions acides. En effet, lors de l'acidification de l'endosome, les protons se retrouvent piégés par les groupements amines du PEI, et par conséquent les ions chlorures et l'eau s'accumulent dans l'endosome provoquant ainsi la lyse de l'endosome et par conséquent la sortie de l'ADN dans le cytoplasme de la cellule. Ce mécanisme est connu sous le nom de « proton-sponge effect » ou « éponge à protons » [17, 21], (figure 1.5).



**Figure 1.5 : Mécanisme « d'éponge à protons ».** (1) : acidification de l'endosome par la pompe à proton ATPase  $H^+$  (2) : entrée passive d'ions chlorures, (3) : entrée d'eau provoquant un choc osmotique et lyse de l'endosome. Adapté de [16].

*Les dendrimères :*

Les dendrimères sont des polymères synthétiques de forme sphérique, hautement ramifiés et plurifonctionnalisés (figure 1.6).



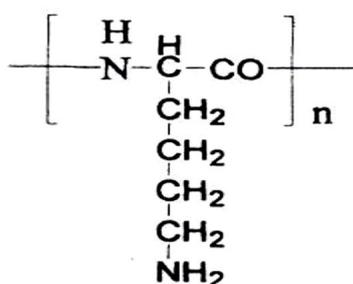
**Figure 1.6 : Structure d'un dendrimère et exemple d'une forme commercialisée [18].**

Les plus courants sont les polyamines, les polyamides ou encore les polyesters. Le plus répandu est le polyamidoamine ou PAMAM car il possède un pouvoir de transfection élevé [22, 23].

Les dendrimères exposent à leur surface des groupements amines primaire et des groupements amines tertiaires à l'intérieur. Les groupements amines primaires participent à la liaison avec l'ADN, à sa compaction et à l'entrée du complexe dans la cellule. Les groupements amines tertiaires participent à la libération de l'ADN de l'endosome par le mécanisme d' « éponge à protons ». La taille et le diamètre du dendrimère influencent l'efficacité de transfection. Les dendrimères de haute génération sont plus efficaces [24]. D'autre part, il a été montré que les PAMAM partiellement dégradés ont un pouvoir de transfection plus grand que les dendrimères intacts car leur structure serait plus flexible [25].

Les PLL :

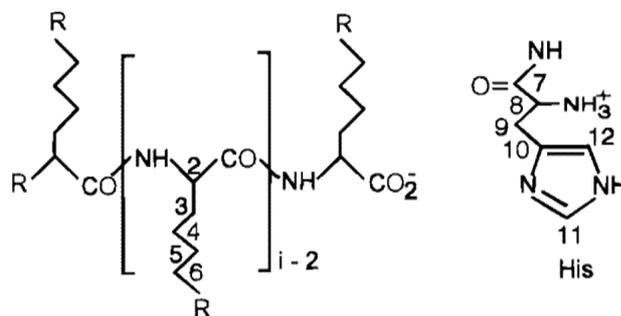
Les poly (L-lysine) ou PLL (figure 1.7) font partie des premiers polymères utilisés en tant que vecteur non viraux.



**Poly(L-lysine)**

**Figure 1.7 : Structure des poly (L-lysine) (PLL) [18].**

Ce polymère condense l'ADN grâce à la présence du groupement positif  $\epsilon$ -amine de la lysine. Il est biodégradable contrairement au PEI, ce qui est un avantage pour l'utilisation *in vivo*. Cependant, sa capacité de transfection reste inférieure à celle du PEI. La raison principale serait l'absence de groupement protonables à pH acide permettant la lyse de l'endosome [18]. Ainsi, différentes stratégies ont été développées dans le but d'améliorer la sortie d'ADN de l'endosome. Une stratégie a été proposée par Midoux et ses collaborateurs [26]. Celle-ci consiste à remplacer des résidus lysines par des résidus histidines sur la polylysine (figure 1.8) pour donner la polylysine histidylée (HpK). L'efficacité de transfection sur des cellules d'hépatocarcinome humain (HepG2) est 1000 à 10000 fois plus importante pour le HpK (pour un degré de polymérisation de 190 avec 35 à 50 % de résidues histidyles) que pour la PLL [26]. D'autre part, en présence de bafilomycine A1, un inhibiteur de la pompe à proton, l'efficacité de transfection est réduite. En présence de cet inhibiteur, l'endosome n'est plus acidifié et par conséquent les noyaux imidazoles ne sont plus protonés. Ce qui montre que les noyaux imidazoles sont impliqués dans le processus de transfection et plus précisément dans la libération de l'ADN dans le cytoplasme. Malgré tout, le mécanisme selon lequel l'ADN est libéré de l'endosome reste mal connu. L'hypothèse d'un mécanisme semblable au PEI reste probable.



**Figure 1.8 : Structure de la polylysine histidylée.  $i$ : degré de polymérisation et  $R$ = histidine [26].**

**Les peptides fusiogènes associés (tableau 1.1) :**

D'autres chercheurs ont eu l'idée d'utiliser des peptides induisant une déstabilisation des membranes en milieu acide, en conjugaison avec les complexes d'ADN/vecteur non-viraux. En effet, les premiers peptides utilisés ont été des peptides dérivés du segment N-terminal de la sous-unité HA-2 de l'hémagglutinine du virus de la grippe comme INF7 ou E5CA [27,28]. Ces peptides fusiogènes, se structurent en hélice  $\alpha$  à pH acide. Ils sont capables de déstabiliser les membranes de phospholipides. En addition avec les polyplexes [27, 29] ou les lipoplexes [30,31], ils ont montré augmenter significativement l'efficacité de transfection. La melittine, un peptide amphipathique de 26 acide aminés, incorporé aux complexes PEI/ADN améliore également l'efficacité de transfert de gènes [32]. Ce peptide formerait une hélice  $\alpha$  amphipathique capable de s'insérer dans la membrane en formant des pores toroïdaux [33]. Ainsi, toujours dans le but d'augmenter l'efficacité de lyse de l'endosome plusieurs autres peptides ont été développés comme JTS1 [34], encore GALA [35] qui rompraient la membrane de l'endosome en créant des pores. La plupart de ces peptides ne peuvent pas complexer l'ADN et sont donc en général associés à un vecteur de transfection (lipide ou polymère cationique). Désormais, l'un des objectifs consiste à développer des peptides multifonctionnels qui auraient la capacité à eux seuls de complexer et de compacter l'ADN, de faire pénétrer le complexe à l'intérieur de la cellule, de libérer l'ADN des vésicules d'endocytose et finalement de permettre le passage de l'ADN jusqu'au noyau.

NOM	Séquence	références
INF7	GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYG	27, 28
Melittine	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	32,33
JTS1	GLFEALLELLESLWLLEA	34
GALA	WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA	35

**Tableau 1.1 : Tableau regroupant les séquences de quelques peptides fusiogènes permettant d'augmenter l'efficacité de transfection.**

**Les peptides cationiques en tant que vecteurs de transfection (tableau 1.2) :**

Wyman et ses collaborateurs montrèrent que KALA, un peptide cationique amphipathique, était capable de transférer différentes lignées cellulaires sans nécessité la présence d'un polymère ou d'un lipide cationique. (WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALAKACEA) [36]. Ce peptide a été conçu à partir du peptide GALA en remplaçant les résidus glutamates par des résidus lysines. Ainsi, avec les charges positives des résidus lysines, ce peptide est capable de compacter l'ADN mais également de déstabiliser la membrane de l'endosome grâce à son caractère amphipathique. De la même manière, le peptide ppTG20 a été créé en substituant les résidus acides glutamiques par des arginines [34]. D'autres peptides comme Hel 11-7 [37] ou encore des peptides issus de séquences virales comme Vpr52-96 ont également été développés [38].

NOM	Séquence	références
<b>KALA</b>	WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALAKACEA	36
<b>Hel 11-7</b>	KLLKLLLKLWKKLLKLLK	37
<b>ppTG20</b>	GLFRALLRLLRSLWRLLLRA	34
<b>Vpr52-96</b>	DTWTGVEALIRILQQLLFHFHFRIGCRHSRIGIIQRRTRNGASKS	38

**Tableau 1.2 : Tableau regroupant les séquences de quelques peptides cationiques utilisés dans les expériences de transfection.**

Les vecteurs non viraux semblent donc être une piste prometteuse pour la thérapie génique car ils sont simples à élaborer, à utiliser et sont peu immunogènes. Ces quatre dernières années, l'utilisation des vecteurs non viraux dans les essais cliniques a augmenté de 3 % [8]. Cependant, leur grand handicap réside dans leur plus faible efficacité de transfection comparée aux vecteurs viraux. Malgré leur grande diversité, aujourd'hui encore, aucun vecteur « idéal » n'a été développé. Ainsi, plusieurs recherches se focalisent dans la compréhension des mécanismes d'action de ces vecteurs (interaction avec l'ADN, entrée dans la cellule, libération du complexe des vésicules d'endocytose, entrée dans le noyau) dans le but ultime de les améliorer.

En se basant sur les caractéristiques intéressantes que possèdent les résidus histidines et notamment un  $pK_a=6$  qui leur permet d'avoir un pouvoir tampon lors de l'acidification de l'endosome, notre laboratoire a développé des vecteurs peptidiques riches en histidines avec deux lysines à chaque extrémité. Un des représentants est LAH<sub>4</sub> (KKALLALALHHLAHLALHLALALKKA) [39, 40].

Le peptide LAH<sub>4</sub> possède un potentiel de transfection élevé [40, 45] mais également un pouvoir antibactérien [41-44]. Ces deux fonctions sont intéressantes dans le cas de pathologies génétiques accompagnées d'infections bactériennes comme c'est le cas, par exemple, pour la mucoviscidose [46]. Ainsi, nous présenterons les peptides antibactériens ainsi que les modèles qui expliqueraient leur(s) mécanisme(s) d'action. Pour finir, nous décrirons les caractéristiques du peptide LAH<sub>4</sub> qui a servi comme modèle dans les études structurales par RMN, ainsi que les études publiées portant sur la relation entre sa structure et son activité.

## **1.1.2- Les peptides antimicrobiens**

### **1.1.2.1- introduction**

A cause de l'augmentation des résistances des bactéries face aux composés antibactériens actuellement disponibles sur le marché, beaucoup de laboratoires travaillent sur la mise au point de nouvelles molécules comme par exemple les peptides antibactériens dont l'intérêt n'a cessé de croître depuis ces 20 dernières années.

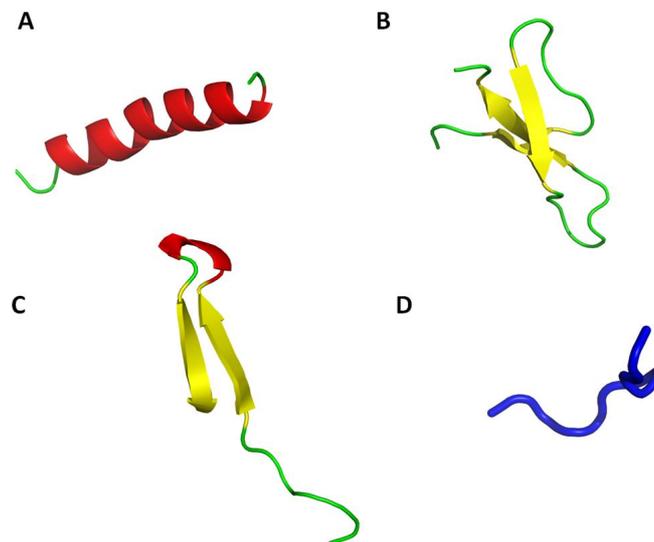
Les peptides antibactériens sont les constituants majeurs du système immunitaire inné et ils sont restés actifs depuis des millions d'années. Ils ont été tout d'abord découverts chez

les invertébrés (insectes, crustacés, mollusques...) puis chez les vertébrés (mammifères, reptiles, amphibiens...) [47, 48].

Au-delà de leur action antibactérienne, ces peptides sont capables d'agir sur les champignons et les protozoaires [49]. Certains sont même actifs sur les cellules cancéreuses, comme la magainine [50], NK-2 [51] ou encore sur les virus enveloppés comme la melittine et la cecropine [52].

La taille de ces peptides varie significativement allant de 9 à une centaine d'acides aminés. Cependant, ils possèdent tous des caractéristiques communes qui sont : (1) une large proportion d'acides aminés hydrophobes (> 50 %), (2) une charge nette positive, (3) la capacité d'adopter une conformation amphiphile en présence de membranes. Tous ces peptides qu'ils soient naturels ou synthétiques sont répertoriés dans une banque de données : Antibacterial Peptide Database (<http://aps.unmc.edu/AP/statistic/statistic.php>).

Du fait de la grande diversité de ces composés, il est difficile de les classer, mais ils peuvent cependant être regroupés en fonction de leur structure secondaire. Ainsi, on différencie quatre classes majeures : les peptides dont la structure correspond à des brins- $\beta$ , des hélices- $\alpha$ , à des boucles ou encore à des structures étendues (figure 1.9).



**Figure 1.9 : Les différentes classes des peptides antibactériens : A : structure en hélice- $\alpha$  de la magainine-2 (PDB : 2MAG), B : structure en feuillet- $\beta$  de la defensine-1 des reins de lapins (PDB : 1EWS), C : structure en boucle de la thanatine (PDB : 8TFV), D : structure étendue de l'indolicidine (PDB : 1G89).**

Si l'on considère désormais, les peptides antibactériens comme une famille prometteuse d'agents thérapeutiques, il est plus judicieux de les classer en fonction de leur spectre d'activité. On peut ainsi différencier deux classes :

- Les peptides très toxiques envers les microorganismes mais non actifs ou très peu toxiques envers les cellules de mammifères. Dans cette classe on trouve, les cecropines isolés du papillon de nuit *Hyalophora cecropia* ou encore les magainines [53] extraites de la peau de l'amphibien *Xenopus laevis*, les dermaseptines [54] et les cathélicidines [55].
- Les peptides qui sont toxiques aussi bien envers les microorganismes et les cellules de mammifères comme la melittine [56] issue du venin d'abeille, la pardaxine [57], certaines cathélicidines [58] et defensines [59].

Contrairement aux antibiotiques actuels, la plupart de ces peptides causent un dommage physique sur le microorganisme en perturbant et en augmentant la perméabilité de la membrane plasmique [60-62]. La différence de composition membranaire entre les cellules bactériennes et de mammifères constitue un point clé de la sélectivité des peptides envers les bactéries. En effet les membranes bactériennes sont chargées négativement avec la présence de lipides comme PG, CL, PS contrairement aux cellules de mammifères qui sont enrichies de phospholipides neutres (PE, PC, SM) ou encore de cholestérol [63]. De plus avec ce type de mécanisme d'action, l'apparition de résistances face à ces peptides semble improbable du fait du changement profond de structure que la membrane bactérienne devrait subir [47]. Ainsi, depuis ces dernières années, la compréhension du mécanisme d'action de ces peptides a été l'objet de nombreuses études.

#### **1.1.2.2- Les différents modèles de mécanismes d'actions des peptides antibactériens**

En 1989, Lehrer et ses collaborateurs étaient les premiers à démontrer un mécanisme de perméabilisation membranaire sur une bactérie intacte [64]. En effet, ils montrèrent que l'action bactéricide de la defensine du neutrophile humain était associée à une perméabilisation séquentielle de la membrane externe et interne et que la perméabilisation de la membrane interne apparaissait comme l'événement létal. Comme les principaux constituants de ces membranes sont les phospholipides, plusieurs études se basent sur l'interaction de ces peptides avec des membranes modèles de phospholipides [65, 66, 67].

Dans la littérature, il existe différents modèles qui décrivent le mode d'interaction entre ces peptides et les membranes. Les principaux modèles sont : de type « tapis », « douves de tonneaux », « pores toroïdaux » ou encore le modèle de type « détergent » (figure 1.10) [65].

- **Le modèle de type tapis :**

Les peptides qui agissent selon un modèle de type « tapis » (figure 1.10-A), se déposent parallèlement à la membrane, sous forme de monomères ou d'oligomères. Ils s'orientent de façon à ce que leur face hydrophobe soit en contact avec la membrane et leur face hydrophile en contact avec le solvant. A partir d'une concentration seuil en peptides, des amas de peptides recouvrent la membrane comme un « tapis », ce qui cause une tension locale à la surface. Tout ceci aboutit à la désorganisation des phospholipides et finalement à la rupture de la membrane avec formation de micelles. Dans ce type de mécanisme, les interactions électrostatiques semblent jouer un rôle clé car le peptide interagit avec la tête polaire des phospholipides. Ce modèle expliquerait l'activité antibactérienne de nombreux peptides comme la magainine 2 [68], les cecropines [69], LL-37 humain [70], la trichogines GA IV [71].

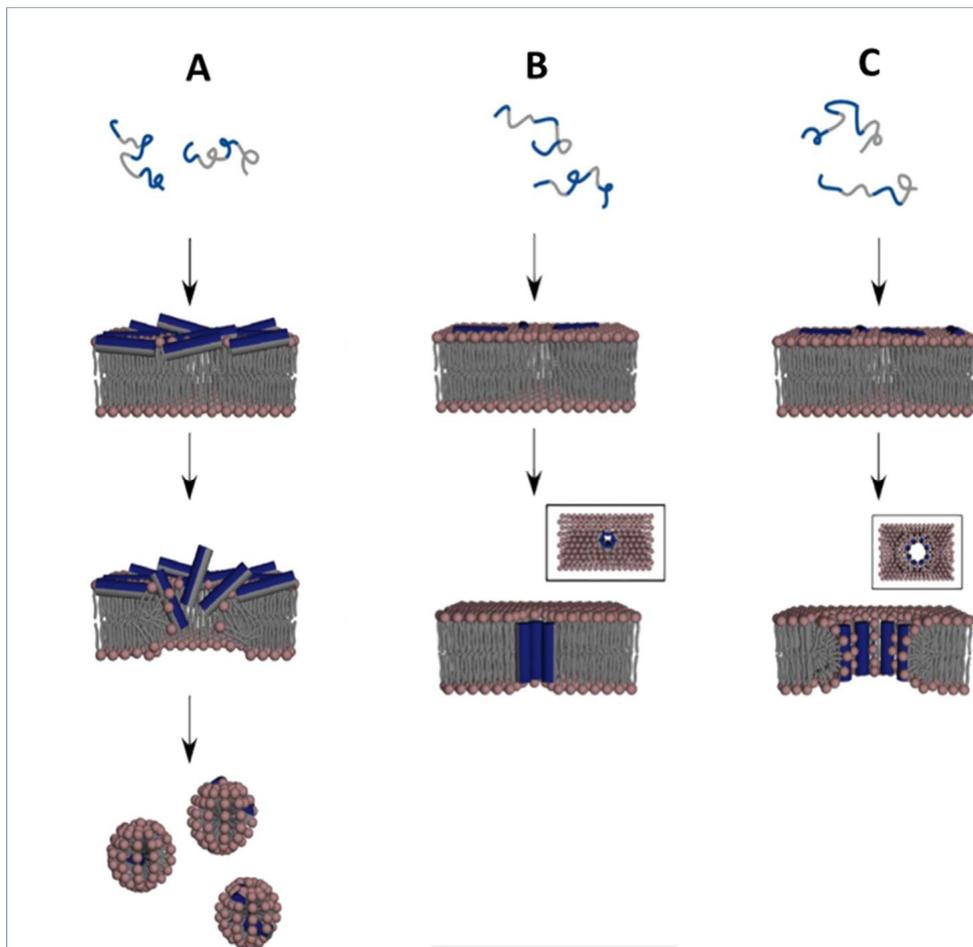
Dans les modèles de type « douves de tonneaux » ou encore « toroïdal », les peptides déstabilisent la membrane en formant un pore dont la constitution diffère d'un modèle à l'autre.

- **Le modèle de type « douves de tonneaux » :**

Dans ce modèle, les peptides s'insèrent dans la membrane et s'oligomèrisent pour former un pore (figure 1.10-B). Ce pore est constitué de peptides dont la face hydrophobe est en contact avec les acides gras des lipides et la face hydrophile est du côté intérieur du pore. Les interactions mises en jeu dans ce modèle seraient essentiellement hydrophobes afin de permettre l'insertion du peptide dans le cœur hydrophobe de la bicouche membranaire. D'autre part, le peptide doit avoir une certaine taille pour pouvoir s'insérer dans la membrane. Les peptides qui agissent selon ce modèle sont généralement toxiques envers tous les types cellulaires incluant les bactéries, les cellules de mammifères et les champignons. Ce mécanisme d'action semble le plus proche pour expliquer l'action des peptides comme l'alaméthicine [72-76], la melittine [72, 76] ou encore la pardaxine [77].

- Le modèle de type « pores toroïdaux » :

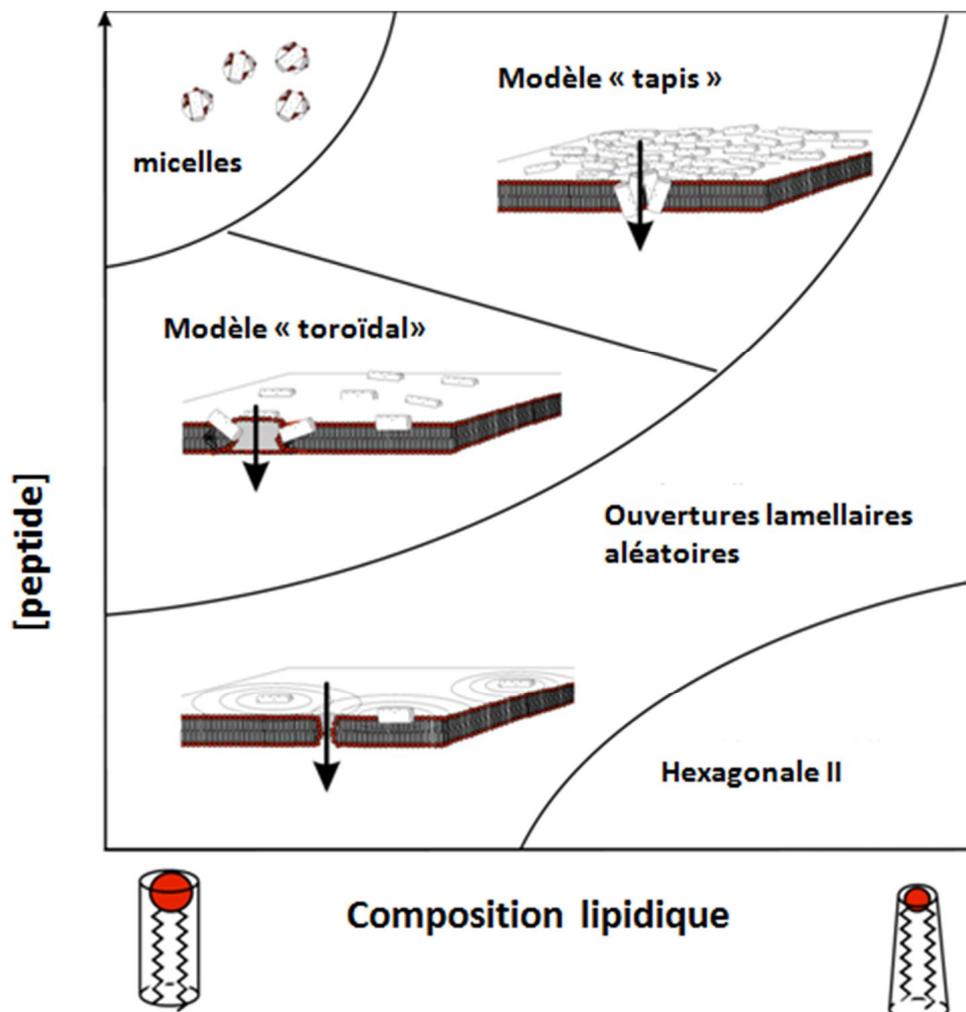
Dans ce modèle, les lipides font partie intégrante du pore (figure 1.10-C). Cette structure de pore qui implique les lipides et les peptides a été proposée pour la première fois par Matsuzaki et ses collaborateurs [78], en se basant sur le fait que la magainine-2 induit un flip-flop lipidiques rapide en même temps que la formation du pore. Les peptides, en s'insérant perpendiculairement à la membrane, induisent une réorientation de la monocouche lipidique entraînant une courbure de la tête polaire des phospholipides contribuant ainsi à la stabilisation du pore en réduisant les interactions répulsives entre charge positives des peptides. Les peptides qui agiraient selon ce modèle sont la melittine [79] ou LL-37 [80].



**Figure 1.10 : Représentation schématique des différents modèles d'action des peptides antimicrobiens de structure  $\alpha$ -hélicale. A- en tapis, B- en douve de tonneaux et C- toroïdal. Les peptides sont représentés sous forme de cylindre. La face hydrophobe du peptide et la face hydrophile sont représentées en gris et en bleu respectivement. Les vues de dessus des modèles B et C sont encadrées [81].**

*Le modèle de type « détergent » [82] :*

Les trois mécanismes d'action décrits précédemment s'ajoutent pour former un modèle plus complet qui tient compte de plusieurs paramètres comme la composition lipidique de la membrane cible et la concentration en peptide. Dans ce modèle, les peptides se comportent comme des molécules de détergents. Comme pour ces dernières, il est alors possible d'établir un diagramme de phase où les modèles de type « tapis », « douves de tonneaux » ou encore « toroïdales » représentent des cas particuliers (figure 1.11).



**Figure 1.11 : Représentation schématique du diagramme de phase montrant les structures supramoléculaires de mélange de peptide-lipide en fonction de la concentration en peptide et de la composition lipidique [83].**

Dire qu'un peptide va agir selon un modèle plutôt qu'un autre va dépendre essentiellement des conditions suivantes : du rapport molaire entre le peptide et les lipides, de la composition de la membrane cible, de la température ou encore du pH.

- **Actions des peptides sur des cibles intracellulaires**

D'autres études portent sur la relation entre la perméabilisation membranaire et la mort cellulaire. En effet, certaines montrent que même de très faible perturbation membranaire peuvent conduire à la mort cellulaire et par conséquent ces peptides pourraient agir sur des cibles intracellulaires. Par exemple, la buforine II, inhibe les fonctions cellulaires d'*E. coli* en se liant à l'ADN et à l'ARN [84]. D'autres inhibent les molécules chaperonnes DnaK responsable du repliement des protéines, c'est le cas par exemple des pyrrolicorine [85].

Ce mécanisme d'action pourrait agir indépendamment ou en synergie avec la perméabilisation membranaire. Néanmoins, le mécanisme qui aboutit à la mort cellulaire reste l'interaction des peptides antibactériens avec les membranes.

### **1.1.3-LAH<sub>4</sub> : un peptide multifonctionnel**

#### **1.1.3.1- Caractéristiques structurales de LAH<sub>4</sub>**

La conception du peptide LAH<sub>4</sub> a été inspirée de la magainine, un peptide antibactérien issu de la peau d'un amphibien *Xenopus laevis* [53]. En effet, ce peptide est considéré comme un modèle pour étudier l'interaction des peptides antibactériens  $\alpha$ -hélicaux avec les membranes.

LAH<sub>4</sub> est un peptide cationique, synthétique de 26 acides aminés [39]. Sa séquence primaire est composée de résidus hydrophobes, alanine et leucine interrompue par quatre histidines, et deux lysines à chaque extrémité. Le peptide possède une charge globale de + 9 à pH acide et de + 5 à pH neutre. (figure 1.12)



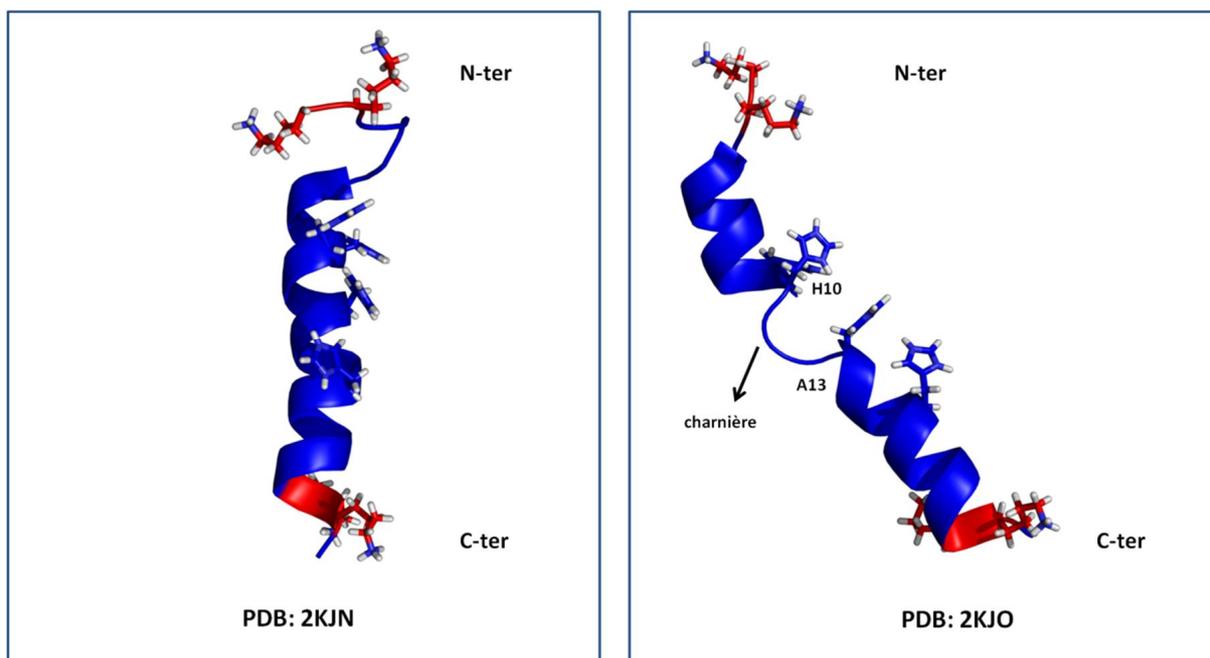
**Figure 1.12 : Séquence primaire du peptide LAH<sub>4</sub>**



### 1.1.3.2-Interactions du peptide LAH<sub>4</sub> avec les membranes

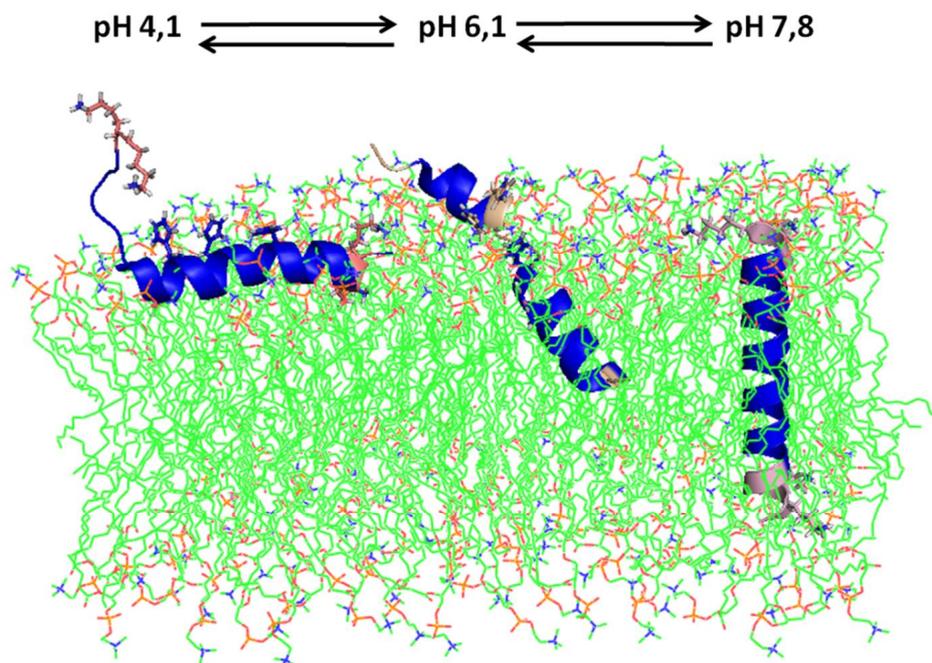
Dans un milieu membranaire (micelles, vésicules, bicouches orientées), le peptide se structure en hélice  $\alpha$  [39, 41, 86, 87].

La présence et la position des quatre histidines confèrent au peptide différentes topologies dans les membranes en fonction du pH. En effet, le peptide passe d'une configuration parallèle à la membrane à pH = 5, à une configuration transmembranaire à pH = 7,5 [39]. En effet, les noyaux imidazoles des histidines passent d'un état protoné à pH acide à un état déprotoné à pH neutre favorisant ainsi le passage d'une configuration à l'autre. Il a été montré que les pKa<sub>s</sub> des histidines 10, 11, 14 et 18 étaient de 5,8, 5,4, 5,7, et 6 respectivement lorsque le peptide interagissait avec des micelles de DPC [39]. La structure du peptide dans des micelles de DPC, a été résolue par le Dr Georgescu et ses collaborateurs, par RMN bidimensionnelle <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H à pH = 4,1 (PDB : 2KJN) et à pH = 6,1 ((PDB : 2KJO) (figure 1.14) [87]. Aux deux pH le peptide se trouve structuré en hélice  $\alpha$  avec une extrémité de 8 acides aminés non structurés du côté N-ter à pH = 4,1 et la présence d'une charnière entre deux hélices à pH = 6,1.



**Figure 1.14 : Structure du peptide LAH<sub>4</sub> dans des micelles de DPC à pH = 4,1 (PDB : 2KJN) et à pH = 6,1 (PDB : 2KJO)**

De plus, il semblerait que ce changement de conformation, dû à la variation de pH, est aussi accompagné d'un déplacement des régions hélicales du peptide. En effet, ces régions structurées en hélices  $\alpha$  sont présentes plus spécifiquement du côté C-terminal à pH = 4,1 (du résidu 9 à 24) et se déplacent du côté N-terminal lorsque le pH augmente (résidu 4 à 21 à pH=7,8). La structure à pH intermédiaire permettrait au peptide de s'ancrer à la membrane. Par analogie entre les structures obtenues par RMN en solution dans les micelles de DPC et l'alignement du peptide dans les bicouches de POPC, obtenu en mesurant, par RMN du solide, le déplacement chimique du noyau  $^{15}\text{N}$  de l'alanine 13 [39], la figure 1.15 représente le modèle d'ancrage du peptide LAH<sub>4</sub> dans des bicouches de lipides de POPC en fonction du pH. Le passage d'une conformation à l'autre se fait de manière réversible mais lentement sur une échelle de  $10^{-4}$  seconde, correspondant à l'interaction d'anisotropie de déplacement chimique [39, 65, 88].



**Figure 1.15 : Modèle représentant le changement de conformation du peptide LAH<sub>4</sub> dans des bicouches de POPC [89] en fonction du pH.**

L'activité antibactérienne de LAH<sub>4</sub> est plus prononcée à pH acide, lorsque le peptide s'aligne parallèlement à la membrane, qu'à pH neutre où celui-ci est transmembranaire [41, 44]. La configuration transmembranaire ne semble donc pas être nécessaire à son activité antibactérienne. Cependant, le peptide demeure actif aux deux pH et par conséquent il agirait par des mécanismes différents en fonction du pH. Le mécanisme d'action du peptide à pH acide, lorsque le peptide est orienté parallèlement à la membrane, serait donc plus performant. Les expériences de relargage de calcéine des vésicules par LAH<sub>4</sub> confirment également que le peptide est plus efficace à pH 5,5 qu'à pH 7 et montrent également que l'efficacité du peptide dépend de la composition lipidique [41, 86]. De plus, l'activité antibactérienne ne semble pas seulement être gouvernée par l'interaction du peptide avec les membranes mais aussi par la taille des agrégats formés par ces peptides dans les solutions aqueuses [86]. En effet, les agrégats de peptides de taille 20-40 nm libèrent plus efficacement la calcéine des vésicules de POPC et POPC/POPS (3/1) que les monomères. Tous ces résultats appuient le modèle selon lequel le peptide agirait comme un détergent en formant des « micelles de peptides ». D'autre part, le peptide agit en perturbant préférentiellement les chaînes d'acide gras des lipides anioniques, comme celle du POPS lorsqu'il est mis en contact avec des vésicules de POPC/POPS/cholestérol et cela à pH acide. Cela a été montré en incorporant des chaînes d'acides gras deutérées et en enregistrant des spectres <sup>2</sup>H du solide [90].

### **1.1.3.3-Interactions avec l'ADN et transfection**

En plus de son action antibactérienne, LAH<sub>4</sub> est capable de former des complexes avec l'ADN et de transférer efficacement les cellules *in vitro* avec une faible cytotoxicité [40, 41]. En effet, son efficacité de transfection est comparable à l'un des vecteurs synthétiques de transfert de gène le plus prometteur : PEI (25 kDa) [40]. Récemment, il a été montré que ce peptide était également capable de transférer des cellules avec des ARNsi [91]. Afin de mieux comprendre les mécanismes de transfection, plusieurs études biochimiques et biophysiques ont été réalisées. Ces études ont permis d'établir un modèle de transfection d'ADN par le peptide LAH<sub>4</sub>.

La présence de charges positives sur le peptide et de charges négatives sur l'ADN, laissa tout d'abord supposer que seule la charge globale du peptide était responsable de la complexation du peptide avec l'ADN. Cette hypothèse fut rapidement réfutée [40]. En effet, les auteurs montrèrent qu'au-delà de la charge, certaines conditions structurales devaient être remplies pour permettre la complexation du peptide avec l'ADN [40].

Ainsi, des études structurales du peptide à l'intérieur du complexe LAH<sub>4</sub>/ADN ont été entreprises. La détermination de la structure secondaire du peptide, par dichroïsme circulaire et par mesure du déplacement chimique du <sup>13</sup>Cβ des résidus alanines par RMN du solide à l'angle magique, montra que le peptide se structure en hélice α à l'intérieur du complexe [92].

D'autre part, ces complexes présentent un diamètre hydrodynamique allant de 100 nm dans 5 % de glucose à quelques micromètres en présence de 150 mM de NaCl et sont chargés positivement [93]. Il semblerait que la présence de cette charge globale positive permettrait aux complexes de se lier à la membrane cible par l'intermédiaire de ses protéoglycane sulfates héparane localisés à la surface des cellules cibles. En effet, l'utilisation de cellules déficientes en HSPGs, réduit l'efficacité de transfection [45].

Une autre étape nécessaire à la transfection est l'entrée des complexes à l'intérieur de la cellule. L'utilisation d'un inhibiteur de pompe à proton, comme la bafilomycine A1, montre une diminution de l'efficacité de transfection par LAH<sub>4</sub> et suggère donc que l'entrée des complexes dans la cellule se fait par endocytose. De plus, l'acidification de l'endosome semble nécessaire à la transfection.

Une fois endocyté, l'ADN doit être libéré dans le cytoplasme afin de pouvoir transmettre son information génétique à la cellule. Pour cela, plusieurs études biophysiques ont été réalisées pour comprendre ce mécanisme. Comme il a été indiqué auparavant, l'inhibition de l'acidification de l'endosome conduit à une baisse de l'efficacité de transfection, par conséquent, l'acidification de l'endosome et donc la protonation des noyaux imidazoles des quatre résidus histidines, est une étape importante lors de la transfection. Ainsi, le Dr Prongidi-Fix et ses collaborateurs ont étudié les changements d'interactions qui se produisent au niveau du complexe LAH<sub>4</sub>/ADN en fonction du pH, par Calorimétrie de Titration Isotherme (ITC). Ils ont montrés qu'à pH=7, lorsque l'ADN est complètement saturé par le peptide, le complexe est composé d'un peptide toutes les 2 paires de bases et que les interactions qui stabilisent les complexes sont de nature électrostatique. A ce pH, les chaînes latérales des histidines ne sont pas chargées, et par conséquent le peptide pourrait connecter deux sites distants sur le long brin l'ADN par l'intermédiaire de ces deux résidus lysines présent à chacune de ses extrémités ou encore rapprocher deux brins d'ADN différents pour permettre la condensation de l'ADN. Par contre, lorsque le pH passe à 5,5, le complexe LAH<sub>4</sub>/ADN est stabilisé par des interactions hydrophobes et de Van der Waals, en plus des interactions électrostatiques. Ce qui suggère que d'importants réarrangements se produisent au sein du complexe [92]. A ce pH, le peptide présente une charge globale de +9 et un autre

phénomène important se produit : environ la moitié des peptides complexés à l'ADN se retrouve libre dans l'endosome et prêt à interagir avec la membrane de celui-ci afin de libérer son contenu. D'où l'importance d'étudier l'interaction du peptide avec les membranes à pH < 6. Le Dr Mason et ses collaborateurs ont ainsi montré que les lipides anioniques jouent un rôle important dans la libération des complexes LAH<sub>4</sub>/ADN de l'endosome. En effet, ils montrèrent qu'il existe une corrélation entre la force d'interaction du peptide avec les lipides anioniques (au sein de membranes mixtes telles que POPC/POPS/cholestérol), à pH acide, et l'efficacité de transfection. Autrement dit, plus le peptide interagit efficacement avec les lipides anioniques, plus la transfection est bonne [90].

Les auteurs ont également tenté de comprendre les mécanismes de transfection du peptide à travers différents mutants de LAH<sub>4</sub> (tableau 1.3), dans le but d'identifier les résidus-clés de la séquence ainsi que leur position, les valeurs permises de l'angle correspondant à la surface hydrophobe ou encore d'établir un lien entre la structure secondaire du peptide et l'efficacité de transfection.

Ainsi, ils ont pu démontrer que la présence de quatre ou cinq résidus histidines ainsi que la position de ces résidus au centre du peptide étaient à l'origine d'une transfection efficace (LAH<sub>4</sub> vs LAK<sub>4</sub> et H<sub>4</sub>-LAK<sub>4</sub>) [40, 45].

La synthèse d'autres mutants a permis également de démontrer l'importance de la valeur de l'angle contenant les résidus hydrophobes. Cette valeur d'angle doit être au-delà de 240° pour permettre une transfection efficace. (LAH<sub>4</sub> vs LAH<sub>4</sub>-H15, LAH<sub>4</sub>-L1, LAH<sub>4</sub>-L3, LAH<sub>4</sub>-L4) [40, 90].

D'autre part, le pH pour lequel 50 % des peptides sont alignés parallèlement à la membrane et 50 % transmembranaire doit se situer autour de 6 (LAH<sub>4</sub> vs LAH<sub>4</sub>-A6, LAH<sub>4</sub>-L6) [40].

Pour finir, le peptide doit être structuré en hélice  $\alpha$  au milieu de sa séquence pour que la transfection soit efficace (LAH<sub>4</sub> vs LAH<sub>4</sub>-P15) [93].

L'ajout de résidus lysines aux extrémités ne permet pas d'augmenter l'efficacité de transfection. En effet, les interactions électrostatiques entre les lysines et les phosphates de l'ADN doivent être suffisantes pour complexer efficacement l'ADN mais aussi pas trop importantes afin de permettre sa libération (LAH<sub>4</sub> vs K2-LAH<sub>4</sub>-K2) [93].

Peptide	Séquence	Retard sur gel (µg) <sup>a</sup>	Efficacité de transfection/ LAH <sub>4</sub> <sup>b</sup>	références
LAH <sub>4</sub>	KKALLALALHHLAHLALHLALALKKA	2,5		40, 45, 93
LAH <sub>4</sub> -H15	KKALLALALHHLAHLALHLALALKKA	2,5	300 X moins bonne	93
LAH <sub>4</sub> -P15	KKALLALALHHLAHLALHLALALKKA	2,5-5	moins bonne	93
K2-LAH <sub>4</sub> -K2	KKKKALLALALHHLAHLALHLALALKKKK	2,5	moins bonne	93
LAH <sub>4</sub> -ΔN	KK-LALALHHLAHLALHLALALKKA	1,5	25 fois moins bonne	93
LAH <sub>4</sub> -ΔC	KKALLALALHHLAHLALHLAL-KK-	2	10 fois moins bonne	93
LAH <sub>1</sub>	KKLALALALALHALALALALKKA	2,5	10 fois moins bonne	40, 45
LAH <sub>2</sub>	KKLAHLALALALGLALAHAKKA	2,5	10 fois moins bonne	40, 45
LAH <sub>3</sub>	KKALALGLHLAHLALHLALALKKA	2,5	10 fois moins bonne	40, 45
LAH <sub>5</sub>	KKALLALALHHLAHLAHLALALKKA	2,5	Quasi aussi bonne que LAH <sub>4</sub>	40, 45
LAK <sub>4</sub>	KKLAKALAKALAKALKLALALAKK	2,5	Quasi nulle	40
LAH <sub>4</sub> -L1	KKALLAHLHLLALLAHLAHLALKKA	2,5	Aussi bonne	90
LAH <sub>4</sub> -L3	KKALLALALHHLALLAHLALALKKA	< 2,5	Aussi bonne	40
LAH <sub>4</sub> -L4	KKALLALALHHLALLAHLALHLKKA	1	2 fois moins bonne	40
LAH <sub>4</sub> -A6	KKKKALAHLHALAAHLHALAAAALKKK	2,5	10 fois moins bonne	40
LAH <sub>4</sub> -L6	KKKKALLHLHLLALHLHLLALLALKKK	2,5	100 fois moins bonne	40
LAH <sub>4</sub> -G6	KKKKALGHLHGLAGHLHGLAGGALKK	>50	quasi nulle	40
H <sub>4</sub> -LAK <sub>4</sub>	HHALLALALKKLAKLALKLALALHHA	1	50 fois moins bonne	40, 45

**Tableau 1.3 : Activité de quelques mutants de LAH<sub>4</sub>**

<sup>a</sup>: quantité de peptide (µg) nécessaire pour retarder complètement la migration de 1 µg d'ADN.

<sup>b</sup>: pour les cellules HepG2.

Pour conclure, le modèle de transfection suivant a été proposé pour le peptide LAH<sub>4</sub> (figure 1.16) :

- (1) L'ajout d'ADN plasmidique au peptide LAH<sub>4</sub> avec 1,4 peptide/ paire de bases (les résidus lysines sont en vert et les résidus histidines en gras) entraîne la formation de complexes LAH<sub>4</sub>/ADN positivement chargés. Il reste aussi des peptides libres dans le milieu.
- (2) Ces complexes ainsi que les peptides libres interagissent avec la membrane de la cellule et plus particulièrement avec les protéoglycanes présents à sa surface.
- (3) Les peptides libres et les complexes pénètrent dans la cellule par un mécanisme d'endocytose. A pH neutre, le peptide libre adopte une orientation transmembranaire dans la membrane de l'endosome.
- (4) Durant l'acidification de l'endosome, les chaînes latérales des résidus histidines se protonent et environ la moitié des peptides complexés à l'ADN se retrouvent libérés dans l'endosome. Les peptides adoptent désormais une orientation parallèle à la membrane de l'endosome.
- (5) La membrane est déstabilisée et par conséquent les molécules d'ADN (avec les molécules de peptides ?) se retrouvent dans le cytosol de la cellule.

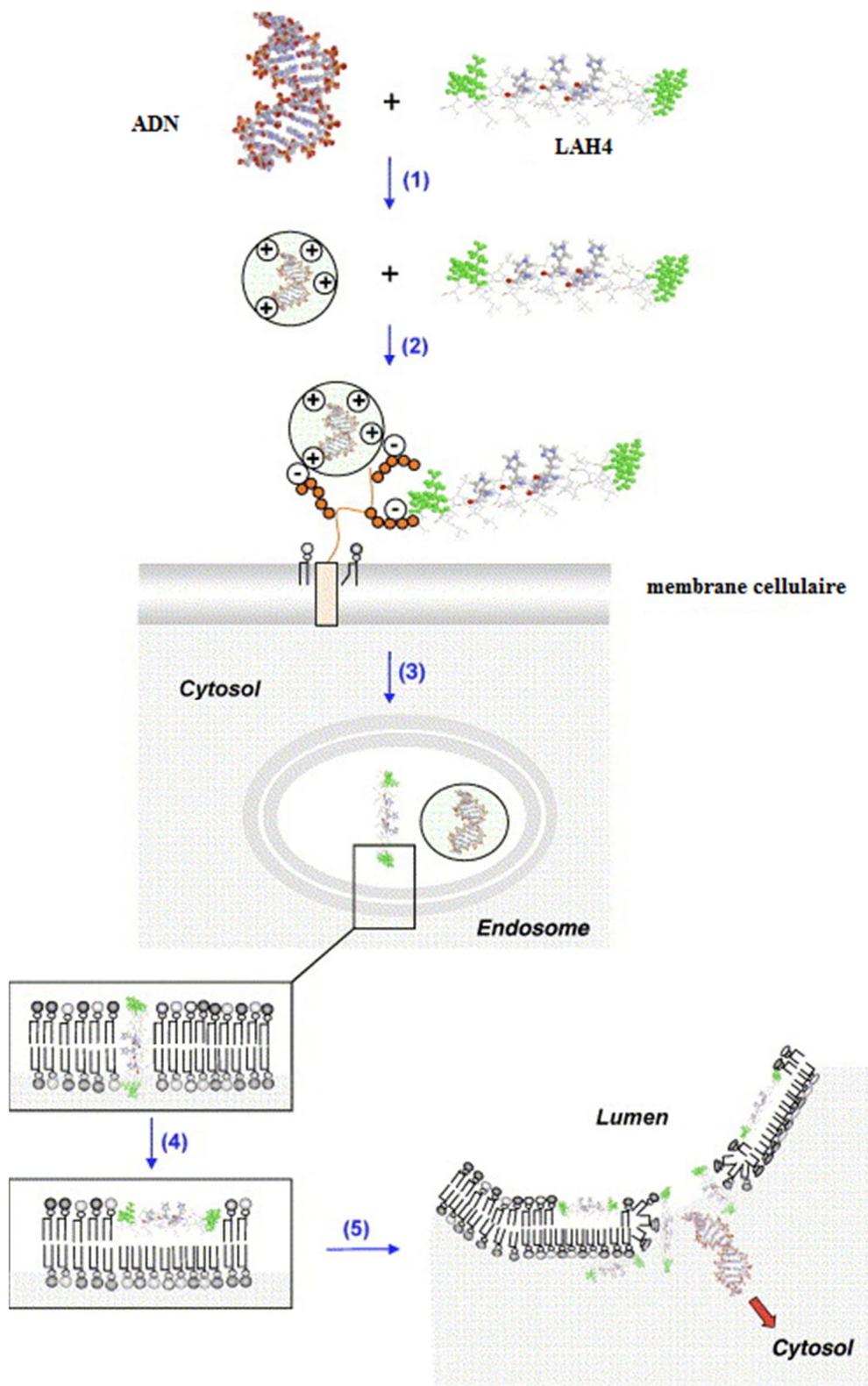


Figure 1.16 : Représentation schématique des étapes clés permettant le transport de l'ADN par le peptide LAH<sub>4</sub> dans les cellules eucaryotes [45].

## 1.2-Objectif et contribution du travail de thèse

Nous avons vu qu'il existe de nombreux modèles permettant d'expliquer les mécanismes de transfection ou encore les mécanismes antibactériens. Cependant, très peu de données expérimentales permettent de les prouver. Ainsi, LAH<sub>4</sub> a été conçu comme un peptide modèle pour les étudier.

Notre laboratoire utilise essentiellement la Résonance Magnétique Nucléaire pour étudier ces mécanismes et particulièrement l'interaction des peptides avec les membranes. Cependant, le prérequis à de telles études est de disposer de peptides marqués par des isotopes comme le <sup>15</sup>N et/ ou le <sup>13</sup>C. Ainsi, le second chapitre introduit les méthodes d'expression des protéines hétérologues chez *E. coli* mais aussi les aspects théoriques des techniques RMN utilisés pour l'étude des interactions du peptide avec les membranes et avec l'ADN.

Le troisième chapitre, quant à lui expose les stratégies mises au point pour produire le peptide LAH<sub>4</sub> chez *E. coli*. En effet, le caractère antibactérien du peptide envers cet organisme apporte une toxicité supplémentaire lors de l'expression. Il a donc été nécessaire de mettre au point une stratégie d'expression pour contourner la toxicité du peptide envers cet organisme. Ce protocole de production a permis d'obtenir des quantités de peptides marqués en <sup>15</sup>N de l'ordre d'une dizaine de mg par litre de culture.

La compréhension du (des) mécanisme(s) d'action antibactérien mais aussi des mécanismes nécessaires au relargage de l'ADN dans le cytoplasme de la cellule, est cruciale pour pouvoir concevoir des peptides antibactériens et transfectant d'ADN de plus en plus efficaces. Ainsi, les deux chapitres suivants décrivent la structure et la topologie du peptide marqué uniformément en <sup>15</sup>N, en interaction avec des membranes artificielles (micelles, bicouches orientées) par RMN en solution et par RMN du solide. Le chapitre six, quant à lui présente les informations structurales précises, obtenues pour la première fois, au sein du complexe ADN/LAH<sub>4</sub> par RMN en rotation à l'angle magique.

## Chapitre 2 :

### Théorie

#### 2.1-Stratégie d'expression d'une protéine hétérologue chez *E. coli*.

*E. coli* est un des hôtes le plus souvent utilisé pour produire des grandes quantités de protéines qui sont nécessaires à la détermination de structures par RMN et par cristallographie. En effet, environ 60 % des protéines dont la structure tridimensionnelle a été résolue et soumise à la PDB (*Protein Data Bank*) en 2010, ont été produites par *E. coli*.

Ce système d'expression bactérien offre un moyen rapide et économique de produire des protéines. En effet, la génétique des bactéries est bien connue et ces cellules ont l'avantage de croître rapidement, avec des densités très hautes dans des milieux peu onéreux. De plus, la multitude de vecteurs d'expression et de souches bactériennes mutées commercialisées rend ce système d'expression très attractif. Cependant, malgré tous ces avantages, rien ne garantit que la protéine que l'on souhaite exprimer, sera produite en quantité suffisante. C'est essentiellement le cas des protéines ou peptides membranaires dont l'expression est difficile et aboutit souvent à des quantités insuffisantes pour des études structurales par RMN.

De façon générale, pour surexprimer une protéine chez *E. coli* il est nécessaire de cloner le gène qui code pour la protéine d'intérêt dans un vecteur d'expression dont les caractéristiques seront développées par la suite. Celui-ci est alors introduit dans la cellule hôte par méthode physique (électroporation) ou chimique ( $\text{CaCl}_2$ ). L'expression de la protéine d'intérêt est alors effectuée en détournant une partie de l'énergie de la cellule bactérienne. Ainsi, il est nécessaire de réguler l'expression de la protéine d'intérêt. Il est alors intéressant de voir quels sont les paramètres qui influencent le niveau d'expression d'une protéine.

### 2.1.1-Le vecteur d'expression

Les éléments génétiques essentiels, qui constituent tout vecteur d'expression [94] (figure 2.1) sont :

1. l'origine de réplication (Ori)
2. un marqueur de résistance à un antibiotique (par exemple Tet, pour la tétracycline)
3. un promoteur de transcription (P) ainsi qu'un terminateur (TT)
4. les régions d'initiation (RBS) et de terminaison de la traduction (codon STOP).

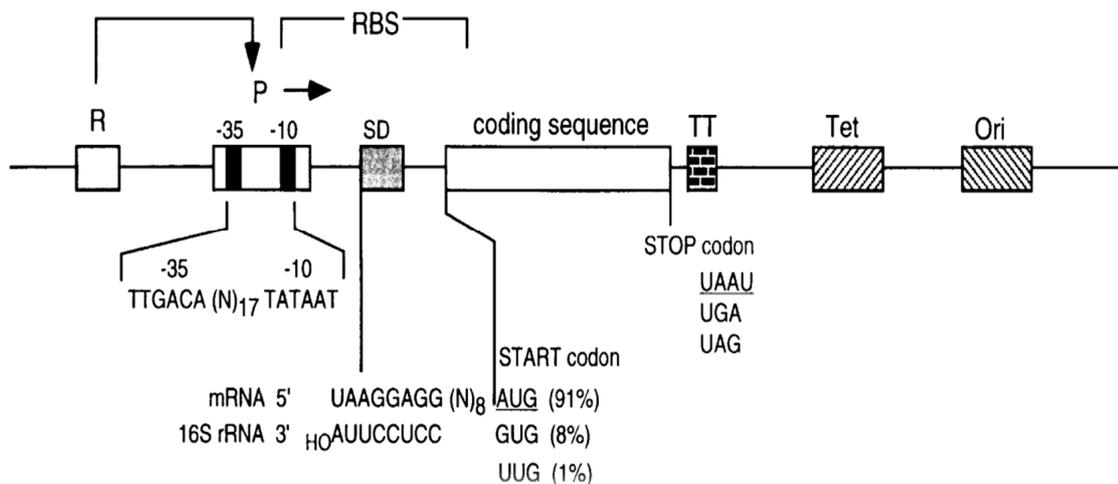
**L'origine de réplication** est l'élément qui détermine le nombre de copies du vecteur d'expression dans la cellule de l'hôte. En effet, c'est une séquence d'ADN qui permet à l'ADN plasmidique d'être répliqué indépendamment du chromosome bactérien. La plupart des vecteurs d'expression se dupliquent par le réplicon ColE1 et se définissent comme étant des plasmides multi-copies avec 10 à 50 copies par cellule. Ainsi, la présence de réplicon sur le vecteur d'expression permet d'augmenter le nombre de copie du gène d'intérêt et par conséquent le rendement de la protéine surexprimée. Mais d'autres facteurs, que nous citerons par la suite, jouent sur la quantité finale de protéine produite comme le dosage du gène, la force du promoteur, la stabilité de l'ARNm et l'efficacité de l'initiation de la traduction.

**Le marqueur de résistance** permet le maintien de ces plasmides multi-copies dans la bactérie. Ce sont généralement des marqueurs de résistance à un antibiotique comme l'ampicilline, la kanamycine, le chloramphénicol ou encore la tétracycline. Un plasmide qui contient le gène de résistance à l'ampicilline, exprime une enzyme dans le périplasme: la  $\beta$ -lactamase qui hydrolyse le noyau  $\beta$ -lactame. Ainsi, l'ampicilline présente dans les milieux de culture est susceptible d'être dégradée par cette enzyme et donc de disparaître du milieu. Par conséquent, il est préférable d'utiliser d'autres marqueurs de sélection qui nécessitent d'autres antibiotiques comme la kanamycine ou le chloramphénicol. Ces antibiotiques ne sont pas dégradés mais inactivés par des enzymes comme l'aminoglycoside phosphotransférase ou encore acetyl transférase.

**Le promoteur** est une séquence nucléique qui est située en amont de la séquence du gène d'intérêt et qui permet **l'initiation de la transcription** par la fixation de l'ARN polymérase. L'importance et le rôle du promoteur dans le cas de la production de protéines hétérologues seront détaillés par la suite. En aval du promoteur se trouve le site d'initiation de

la traduction, site où se fixent les ribosomes (RBS), c'est une séquence non codante qui est complémentaire à l'ARNr 16S et qui se trouve de 5 à 13 nucléotides en amont de l'ATG initiateur.

**Le site de terminaison de la transcription** se trouve après la région qui code le gène d'intérêt et il sert à la fois comme site de terminaison [95] mais aussi comme une séquence qui protège l'ARNm des exonucléases par sa structure en tige-boucle.



**Figure 2.1 : Représentation schématique des éléments essentiels à un vecteur d'expression procaryote [96].**

Le promoteur (P) (le promoteur hybride tac) est positionné en amont de la séquence codante (coding sequence). Il est sous le contrôle d'un gène régulateur (R) qui code pour un répresseur. Ce gène peut être présent sur le vecteur d'expression ou encore sur le chromosome de la cellule hôte. La flèche indique le sens de la transcription. La séquence de terminaison de la transcription (TT) sert à stabiliser l'ARNm. Le site de fixation du ribosome (RBS) contient la séquence de Shine-Dalgarno (SD) qui permet l'interaction de l'extrémité 5' de l'ARNm avec l'extrémité 3' de l'ARNr 16S du ribosome lors de l'initiation de la traduction. Les trois codons d'initiation (start codon) sont montrés avec leur fréquence d'apparition chez *E. coli* ainsi que les trois codons stop dont UAA suivi d'un U qui est le codon de terminaison de la traduction le plus efficace. Le marqueur de sélection (Tet) qui code un gène de résistance à la tétracycline, permet la sélection des souches bactériennes possédant le vecteur. Le nombre de copies du vecteur dans la cellule est fixé grâce à l'origine de réplication (Ori).

## 2.1.2- Régulation de l'expression de la protéine d'intérêt

La surexpression d'une protéine hétérologue est très coûteuse en énergie pour la cellule. La bactérie utilise les ressources nécessaires à son propre métabolisme pour pouvoir maintenir et exprimer le gène « étranger ». C'est une situation de stress pour la cellule hôte qui se traduit généralement par un ralentissement de l'augmentation de la biomasse [97] ou même parfois par la protéolyse de la protéine d'intérêt. Ainsi, la régulation de l'expression du gène étranger est nécessaire pour éviter tout stress à la bactérie et pour obtenir de grandes quantités de protéines de qualité.

Pour permettre la production de grandes quantités de protéines le promoteur idéal doit être fort, pour que l'initiation de la transcription se fasse à une fréquence élevée. Mais, il doit être aussi finement régulé afin d'éviter que la surexpression de la protéine ne soit néfaste à la cellule hôte, [98]. Ainsi, il est nécessaire de pouvoir choisir le moment où l'expression de la protéine va débiter. Cela se fait grâce à des promoteurs dit inductibles. Les promoteurs les plus utilisés pour la production de protéines hétérologues sont des promoteurs inductibles thermiquement ( $\lambda$ pL) [99] ou par des molécules chimiques (promoteur *lac* : IPTG, ou promoteur *araBAD* par le L-arabinose) [98]. Par la suite, nous décrirons en détail le mécanisme de régulation du système d'expression pET qui a été utilisé pour la production de notre peptide LAH<sub>4</sub> [100].

### *Le système d'expression pET*

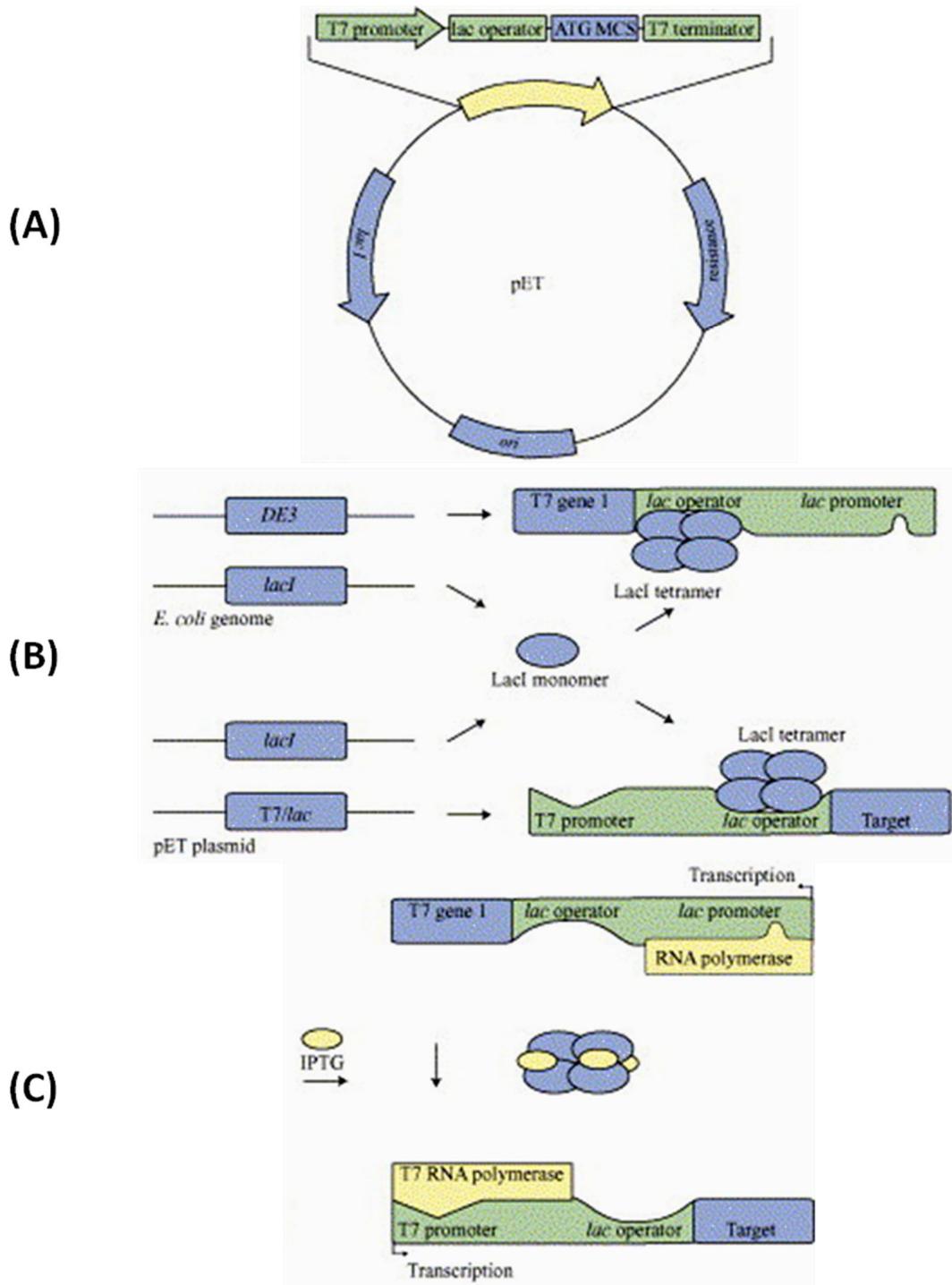
Le système d'expression qui utilise le vecteur pET, développé par Studier en 1990, représente plus de 90 % des systèmes de préparation protéique issus de la PDB en 2010. Ce vecteur (figure 2.2-A) contient une cassette de clonage multiple (MCS) qui permet l'insertion du gène d'intérêt ainsi que le terminateur de transcription (T7 terminator), un promoteur T7 (T7 promoter), le gène codant le represser *lacI* qui régule le promoteur T7 en se fixant sur l'opérateur *lac* (*lac operator*). Ce vecteur contient également un marqueur de résistance à un antibiotique (résistance) et une origine de répllication (*ori*).

Dans ce système d'expression (figure 2.2-B), l'ARN polymérase du bactériophage T7 est utilisée pour la transcription du gène codant la protéine d'intérêt. Cette enzyme a l'avantage, contrairement à l'ARN polymérase de la bactérie, de posséder une très haute processivité et d'être cinq fois plus rapide (230 nucléotides par seconde). Le gène (fragment DE3 du prophage) qui l'exprime se trouve sur le chromosome bactérien et il est sous le contrôle du promoteur *lacUV5* régulé par l'opérateur *lac*. Sur ce chromosome se trouve aussi le gène qui code pour le répresseur *lacI*. Celui-ci, sous forme de tétramère, se fixe sur l'opérateur *lac* ce qui empêche l'initiation de la transcription de l'ARN T7 polymérase.

Sur le vecteur pET, le promoteur T7 permet la transcription du gène à cloner par la fixation de l'ARN T7 polymérase. Ce promoteur est aussi régulé par l'opérateur *lac* et le plasmide possède le gène codant pour le répresseur *lacI* qui inhibe la transcription du gène d'intérêt.

Ces deux promoteurs (*lacUV5* et T7) sont inductibles (figure 2.2-C), c'est-à-dire que la fixation des ARN polymérases sur ces séquences nucléotidiques est possible, grâce à la présence d'un analogue du lactose, l'isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). En effet, l'IPTG se lie au répresseur *lacI*, libère l'opérateur *lac*, l'ARN polymérase de la bactérie peut ainsi se fixer sur le promoteur *lacUV5* et initier la transcription du gène codant l'ARN T7 polymérase. La présence d'IPTG permet aussi la fixation de l'ARN T7 polymérase exprimée sur le promoteur T7 du vecteur pET et par conséquent la production de la protéine hétérologue.

Dans les systèmes d'expression bactérien qui contiennent des promoteurs forts, il existe une « fuite » de l'expression de la protéine d'intérêt et cela en absence d'inducteur. On parle d'expression basale. Cette expression basale peut avoir pour conséquence une instabilité du vecteur d'expression qui pourrait aboutir à son expulsion de la cellule hôte. D'autre part, dans le cas de protéines toxiques, ceci peut conduire à la mort de la bactérie avant même l'induction.



**Figure 2.2 : Système d'expression pET [101].**

**A** - Configuration générale d'un plasmide pET montrant les éléments clés : origine de répliation (*ori*), marqueur de résistance (*resistance*), le gène codant le répresseur *lacI* qui régule le promoteur T7 en se fixant sur l'opérateur *lac* (*lac operator*), la cassette de clonage multiple (MCS) qui permet l'insertion du gène d'intérêt ainsi que le terminateur de transcription (T7 terminator). **B** - Mécanisme de répression du promoteur *lacUV5* (régulation de l'expression de l'ARN T7 polymérase) et du promoteur T7 (régulation de l'expression de la protéine d'intérêt), en absence d'IPTG. **C** - Mécanisme d'induction des promoteurs *lacUV5* et T7 par l'IPTG.

### **2.1.3-Paramètres responsables du niveau d'expression de la protéine hétérologue.**

Plusieurs facteurs, autres que la régulation du promoteur, influencent le niveau d'expression de la protéine hétérologue. En effet, le taux d'expression de la protéine est gouverné par la nature du gène à exprimer, la stabilité de l'ARNm et son efficacité de traduction ainsi que la dégradation potentielle de la protéine par les protéases cytoplasmique de la cellule hôte ou encore la toxicité de la protéine produite envers la bactérie.

#### **2.1.3.1- La nature du gène à exprimer**

Le taux d'expression d'un gène chez *E. coli* dépend de sa nature. Les gènes d'origine eucaryote s'expriment moins bien que les gènes d'origine procaryote. Ceci est dû à un usage des codons qui est différent selon les organismes. En effet, un même acide aminé peut être préférentiellement codé par un codon qui diffère en fonction du type de cellule. La fréquence d'utilisation des codons reflète l'abondance des ARNt correspondants présents dans le cytoplasme. Ainsi chez chaque organisme on distingue deux types de codons : les codons majeurs et les codons rares. Les codons majeurs se définissent comme ceux que l'on retrouve dans les gènes fortement exprimés tandis que les codons rares sont présents dans les gènes qui ont un faible niveau d'expression. Le tableau 2.1 regroupe les codons rares présents chez *E. coli*. Ils sont définis comme étant utilisés à une fréquence inférieure à 1 % [102]. Ainsi, l'expression de gènes « étrangers » contenant des codons rares, chez *E. coli* peut aboutir à des problèmes de traduction, comme l'incorporation du mauvais acide aminé, le changement du cadre de lecture ou encore une terminaison prématurée de la traduction [103]. Par conséquent, la quantité et/ou la qualité de la protéine à exprimer se trouve considérablement réduite. Les solutions les plus couramment utilisées pour contourner ce problème sont d'une part la co-transformation de la cellule bactérienne par un plasmide exprimant les ARNt de ces codons rares [104] ou encore la construction d'un gène synthétique où les acides aminés sont codés par les codons les plus en usage chez *E. coli*. C'est le cas pour notre peptide pour lequel le gène a été construit sur la base des codons les plus utilisés chez cet organisme.

<b>Codon(s)</b>	<b>Acide aminée</b>
<b>AGA, AGG, CGA, CGG</b>	<b>Arg</b>
<b>UGU, UGC</b>	<b>Cys</b>
<b>GGA, GGG</b>	<b>Gly</b>
<b>AUA</b>	<b>Ile</b>
<b>CUA, CUC</b>	<b>Leu</b>
<b>CCC, CCU, CCA</b>	<b>Pro</b>
<b>UCA, AGU, UCG, UCC</b>	<b>Ser</b>
<b>ACA</b>	<b>Thr</b>

**Tableau 2.1 : Tableau montrant les codons rares qui codent pour certains acides aminés chez *E. coli*.**

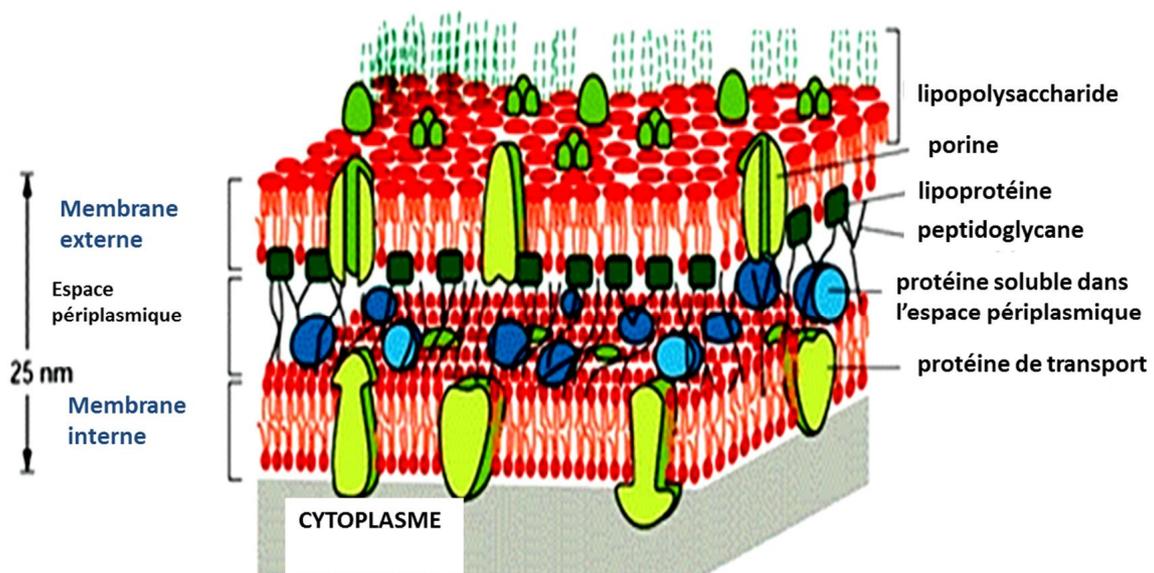
### **2.1.3.2-La stabilité de l'ARNm**

Le taux d'expression de la protéine dépend également de la stabilité l'ARNm [105]. En effet, plus il y aura d'ARNm plus il y aura de protéines exprimées. Il est donc important de pouvoir correctement contrôler la stabilité de l'ARNm dans les systèmes d'expression recombinants. La demi-vie d'un ARNm se situe entre 30 s et 20 minutes au maximum. Les principales enzymes responsables de sa dégradation sont les deux exonucléases 3'→5' RNase II et PNPase ainsi que l'endonucléase RNase E. La protection des ARNm dépend de sa structure, de sa protection par les ribosomes mais aussi de sa polyadénylation du côté 3' qui facilite sa dégradation [106]. Ainsi, dans les différents systèmes d'expression commercialisés, des séquences stabilisatrices en 5' et 3' de l'ARNm ont été introduites. C'est le cas du site de fixation des ribosomes (RBS) dépourvu de structures tige-boucle qui permet une initiation efficace de la traduction et par conséquent une protection ribosomal de l'ARNm [104] ou encore des séquences de terminaison de la transcription du côté 3' de l'ARNm, avec des structures secondaires en tige-boucle qui protègent l'ARNm contre éventuelles exonucléases. De plus, certaines souches bactériennes, permettant une augmentation de la stabilité de l'ARNm, sont disponibles. C'est le cas par exemple des souches BL21 star (Invitrogen) qui possèdent une mutation au niveau du gène codant l'endonucléase RNase [107].

### 2.1.3.3- Dégradation de la protéine par les protéases

La dégradation des protéines recombinantes lors de leur production dans la cellule hôte représente un problème majeur. La protéolyse joue un rôle physiologique important dans la cellule. C'est une voie catabolique utilisée pour régénérer les ressources de la cellule en recyclant les protéines mal repliées ou encore les protéines aberrantes en leurs acides aminés constitutifs [108]. Hors, la surexpression des protéines recombinantes est un processus coûteux en énergie et les protéines sont rapidement produites, et par conséquent n'ont pas le temps de se structurer et finalement deviennent des protéines cibles pour la protéolyse.

*E. coli* est une bactérie Gram négatif et possède par conséquent une double membrane : une membrane interne et une membrane externe séparé toute deux par le périplasma. La figure 2.3 montre une représentation schématique de la membrane bactérienne.



**Figure 2.3 : Représentation schématique de la membrane d'*Escherichia coli*. Adapté de la référence [115].**

Cette bactérie contient un nombre conséquent de protéases qui sont localisées dans le cytoplasme, le périplasma ou encore au niveau de la membrane externe et interne. Ces protéases ne sont pas présentes de manière homogène au niveau des différents compartiments cellulaires. En effet, elles sont beaucoup plus nombreuses dans le cytoplasme que dans le

périplasme [109]. Le mécanisme de dégradation des protéines reste encore mal connu et de plus toutes les protéases d'*E. coli* ne sont pas encore connues.

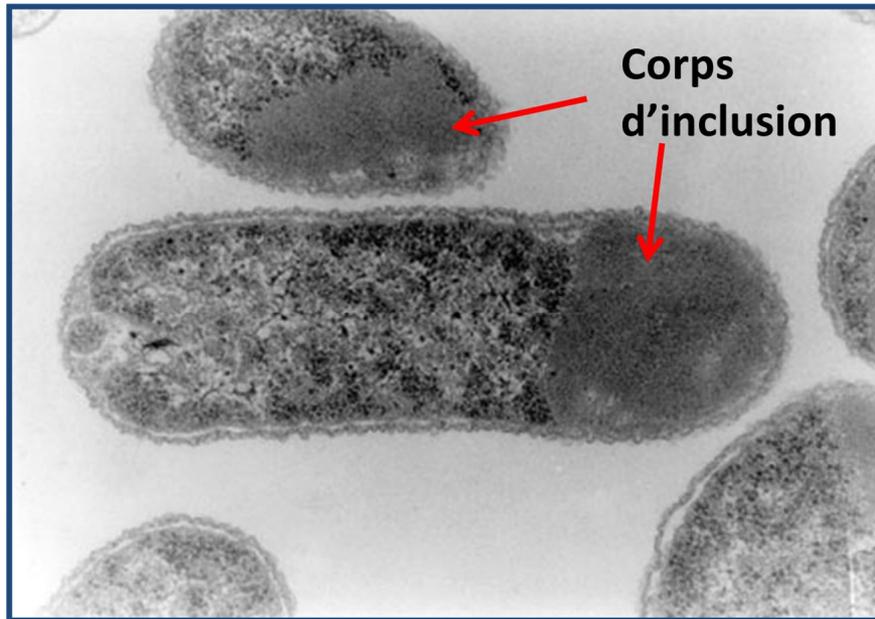
Ainsi, afin de minimiser la protéolyse des protéines recombinantes produites chez *E. coli* plusieurs stratégies peuvent être employées. La première est l'utilisation de souches mutées au niveau des gènes codants pour ces protéases [110]. C'est le cas de la souche *lon<sup>-</sup>*, déficiente en protéase *La*, qui est la principale protéase cytoplasmique responsable de la dégradation des protéines mal repliées [111]. Il existe aussi des souches *ompT* qui sont dépourvues de protéases OmpT (*Outer Membrane Protease T*). Ces protéases se trouvent au niveau de la membrane externe de la bactérie et seraient responsable de la dégradation des protéines lors de la lyse des cellules [112]. Une autre alternative à la protéolyse est d'exprimer la protéine en fusion traductionnelle N- ou C- avec une autre protéine [113, 114].

#### **2.1.4- Localisation de la protéine exprimée**

La protéine surexprimée peut se retrouver dans différents compartiments cellulaires. Ainsi, la protéine surexprimée peut se retrouver au niveau du cytoplasme, des membranes, du périplasme ou encore dans le milieu de culture.

La surproduction des protéines hétérologues dans le cytoplasme est souvent accompagnée d'un mauvais repliement de la protéine et d'une ségrégation sous forme d'agrégats insolubles connus sous le nom de corps d'inclusion. Les corps d'inclusion (figure 2.4) sont des particules denses de protéines agrégées d'environ 1 µm de diamètres. La protéine surexprimée représente en général environ 50 % de ces corps d'inclusions [116, 117].

L'expression sous forme de corps d'inclusion possède certains avantages. La purification est facilitée, la protéine est protégée contre d'éventuelles protéases et enfin cette forme d'expression est idéale dans le cas de protéine toxiques envers la cellule hôte comme c'est le cas pour les peptides antibactériens. Cependant lorsque la protéine s'exprime dans les corps d'inclusion, il est nécessaire de les solubiliser à l'aide d'agents dénaturants comme l'urée à 8 M ou encore de l'hydrochlorure de guanidine à 6 M. La protéine devra alors être renaturée sous sa forme active.



**Figure 2.4 : Cellules d'*E. coli* 6 heures après l'induction de l'expression de la chaîne lourde de l'anticorps MAK33 visualisés par microscopie électronique. Les corps d'inclusions sont les structures amorphes en gris clair. [118]**

### **2.1.5- Les partenaires de fusion**

Les partenaires de fusion possèdent trois avantages majeurs. Le premier consiste à augmenter la solubilité de la protéine d'intérêt, de faciliter sa purification mais aussi de masquer la toxicité de protéines toxiques envers *E. coli*. Actuellement, les systèmes d'expression en fusion traductionnelle principalement utilisés sont : la Gluthation-S-Transférase (GST), la Maltose Binding Protein (MBP) ou encore la Thiorédoxine. Ces partenaires de fusion sont utilisés car ils agissent comme des « solubilisateurs » de protéines de fusion qui se retrouvent généralement correctement repliées et par conséquent moins sujettes aux protéases [96,98]. Ils sont le plus souvent placés en amont du gène d'intérêt. En effet, le fort niveau d'expression de ces protéines peut souvent être « transmis » à la protéine d'intérêt surtout grâce à la stabilisation de l'ARNm. D'autre part, ces protéines facilitent la purification de la protéine de fusion. Par exemple, les protéines en fusion avec la GST pourront être purifiées sur résine Glutathion-Sépharose. Par contre, pour les autres partenaires de fusion qui ne possèdent pas cette fonction, il sera nécessaire d'introduire un « tag », c'est-à-dire une séquence permettant la purification de la protéine de fusion. Le « tag » le plus souvent utilisé est le HisX6 qui correspond à une succession de six histidines. Cette séquence permet la purification de la protéine de fusion par chromatographie d'affinité sur résine de

cobalt ou de nickel. De plus, elle permet la purification de la protéine dans des conditions dénaturantes (jusqu'à 8 M d'urée), ce qui est intéressant lorsque l'on souhaite purifier une protéine qui s'exprime de façon insoluble. C'est généralement le cas pour l'expression des peptides antibactériens que l'on retrouve le plus souvent exprimés sous forme d'agrégats. Les stratégies d'expression de ces peptides seront abordées dans le chapitre 3.

Après expression de la protéine de fusion, il est nécessaire de séparer la protéine d'intérêt du partenaire de fusion. Ceci est possible grâce à une étape de clivage de la protéine de fusion. Celle-ci peut se faire soit par des méthodes chimiques soit par des méthodes enzymatiques. Cela nécessite l'introduction d'un site de clivage entre les deux protéines. Le tableau 2.2 montre les principales méthodes de clivage chimique et enzymatique ainsi que leur site de reconnaissance. Dans le cas des coupures chimiques, les séquences de reconnaissance sont très courtes et par conséquent ces sites pourront se retrouver plus fréquemment ailleurs sur la protéine de fusion. Il est cependant parfois possible de supprimer ce site non désiré par mutagenèse dirigée. Un autre problème provient du fait qu'à la suite de ce clivage, un acide aminé supplémentaire peut être ajouté du côté N-ter de la protéine d'intérêt. C'est le cas par exemple pour l'acide formique qui libère une proline du côté N-ter de la protéine d'intérêt. Malgré tout, l'acide formique, hormis d'être peu coûteux (comparé aux prix des protéases), présente l'avantage de pouvoir cliver les protéines de fusion qui sont sous forme agrégée. En effet, celles-ci sont souvent solubles dans l'acide formique.

Les sites de reconnaissance des coupures enzymatiques sont plus spécifiques. Ces enzymes clivent en général du côté C-ter du site de coupure et il n'y a pas d'acide aminé en N-ter de la protéine d'intérêt. Par contre, ces méthodes de clivage ne peuvent être réalisées en conditions dénaturantes dans le cas où la protéine de fusion s'exprimerait de façon insoluble. De plus, les protéases sont plus sensibles à l'encombrement stérique et le site de clivage devra donc être accessible. Après cette étape de clivage, la protéine d'intérêt devra être récupérée du milieu par purification.

	Méthode de clivage	Séquence de reconnaissance	Références
ENZYMATIQUE/CHIMIQUE	Hydroxylamine	-Asn-Gly-	122
	Bromure de cyanogène	-Met-	119, 120
	Acide formique	-Asp-Pro-	121
	Facteur Xa	-Ile-Glu-Gly-Arg-	123,124
	Thrombine	-Gly-Pro-Arg-	123
	enterokinase	-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-	125

**Tableau 2.2 : Tableau énumérant les agents chimiques et les enzymes les plus utilisés pour le clivage des protéines de fusion**

Ainsi, pour obtenir des quantités suffisantes de protéines ou de peptides de qualités chez *E. coli*, il faut tenir compte de tous les paramètres décrits précédemment et trouver la bonne « combinaison » entre souche bactérienne, système d'expression, partenaire de fusion (exprimer la protéine de manière soluble ou insoluble ?), méthode de clivage et purification.

## 2.2- La Résonance magnétique nucléaire

Dans le cadre de ma thèse, la RMN a été « l'outil » utilisé pour obtenir des informations structurales sur le peptide LAH<sub>4</sub> dans un environnement membranaire mais aussi pour obtenir des informations de distances au sein du complexe de transfection LAH<sub>4</sub>/ADN.

### 2.2.1- Le phénomène de Résonance magnétique nucléaire

*La découverte de la Résonance magnétique Nucléaire a valu le Prix Nobel de Physique en 1952 à E.M Purcell et F.Bloch.*

#### 2.2.1.1-Spin nucléaire et moment magnétique associé

La Résonance Magnétique Nucléaire est une technique de spectroscopie qui s'applique aux noyaux qui possèdent un moment angulaire intrinsèque appelé spin nucléaire, noté  $\vec{I}$ , et donc un moment magnétique  $\vec{\mu}$  non nuls. Ces deux moments  $\vec{I}$  et  $\vec{\mu}$  sont colinéaires. Le facteur de proportionnalité  $\gamma$  est le rapport gyromagnétique caractéristique d'un noyau donné tel que :

$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \hbar \vec{I} \quad (2.1)$$

$\hbar$  est la constante de Planck divisée par  $2\pi$  ( $\hbar = 1,054 \cdot 10^{-34}$  J.S).

### 2.2.1.2-Noyaux de spin $I = 1/2$ dans un champ magnétique

Les noyaux les plus étudiés en biologie sont le  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  et  $^{15}\text{N}$ . Ils possèdent tous un spin  $I = 1/2$ . Les propriétés individuelles de quelques noyaux sont présentées dans le tableau 2.3.

Noyau	Rapport gyromagnétique $\gamma$ ( $10^8 \text{ rad.s}^{-1} \cdot \text{T}^{-1}$ )	I	Abondance naturelle
$^1\text{H}$	2,674	1/2	99,98
$^{13}\text{C}$	0,672	1/2	1,108
$^{15}\text{N}$	-0,271	1/2	0,37
$^{19}\text{F}$	2,516	1/2	100
$^{31}\text{P}$	1,083	1/2	100

**Tableau 2.3 : Tableau montrant les valeurs des rapports gyromagnétiques  $\gamma$ , le nombre de spin I ainsi que l'abondance naturelle de quelques noyaux.**

Lorsque ces noyaux sont placés dans le champ magnétique statique  $B_0$ , leur aimantation précesse autour de  $B_0$  à la fréquence de Larmor :

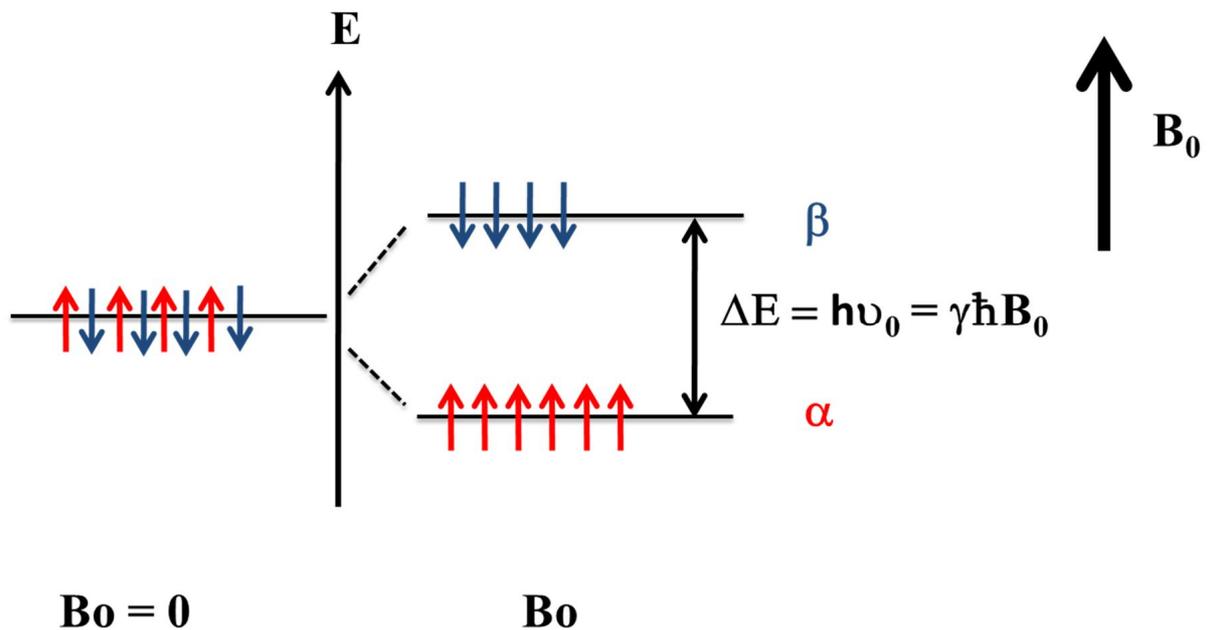
$$\nu_0 = \gamma \frac{B_0}{2\pi} \quad (2.2)$$

$\nu_0$  représente la fréquence (Hz) de précession de l'aimantation autour du champ  $B_0$  (T),  $\gamma$  est le rapport gyromagnétique du noyau en  $\text{rad.s}^{-1} \cdot \text{T}^{-1}$ .

Pour un spin  $1/2$ , il existe deux états : l'état  $\alpha$  (+1/2) et l'état  $\beta$  (-1/2). En l'absence de champ magnétique, la différence d'énergie entre les deux états est nulle, les niveaux d'énergie sont dits dégénérés. Par contre, en présence d'un champ magnétique  $B_0$  l'interaction entre  $B_0$  et le moment magnétique du noyau lève la dégénérescence des niveaux d'énergie : c'est l'effet Zeeman (figure 2.5). L'écart entre les niveaux d'énergie vaut :

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 \quad (2.3)$$

avec E : l'énergie (J),  $\gamma$  : rapport gyromagnétique ( $\text{rad.s}^{-1} \cdot \text{T}^{-1}$ .) et  $B_0$  : le champ magnétique (T).



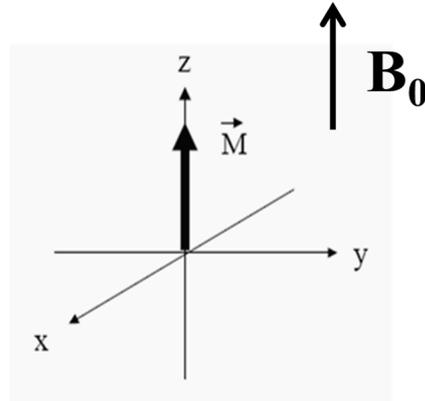
**Figure 2.5 : Eclatement des niveaux d'énergie pour un spin  $\frac{1}{2}$  par application d'un champ magnétique statique  $B_0$  : Effet Zeeman.**

A l'équilibre, la différence de population entre les deux niveaux d'énergie  $N_+$  (pour le niveau  $\alpha$ ) et  $N_-$  (pour le niveau  $\beta$ ) est caractérisée par un très faible excès des noyaux sur le niveau  $\alpha$ . En effet, les spins se répartissent sur les niveaux d'énergies selon la loi de Boltzmann :

$$N_+/N_- = e^{-\Delta E/kT} \quad (2.4)$$

avec  $k$  est la constante de Boltzmann ( $1,3805 \cdot 10^{-23}$  J/Kelvin) et  $T$  la température en Kelvin.

Du fait du léger excès de la population des spins sur le niveau  $\alpha$ , l'aimantation macroscopique résultante, notée  $\vec{M}$  (qui correspond à la somme des moments magnétiques) possède la même direction et le même sens que le champ magnétique  $B_0$  (figure 2.6).



**Figure 2.6 : Représentation de l'aimantation macroscopique  $\vec{M}$ , à l'équilibre, dans le champ magnétique  $B_0$ .**

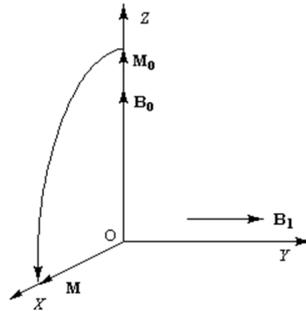
### 2.2.1.3-Signal RMN

#### Perturbation de l'équilibre :

Pour observer un signal, il faut rompre l'équilibre entre les deux niveaux d'énergie en induisant des transitions entre les niveaux. L'énergie nécessaire à une transition vaut :

$$\Delta E = h\nu_0 \quad (2.5)$$

L'équilibre est perturbé par l'application d'un champ de radiofréquence  $B_1$  (oscillant). Ce champ magnétique  $B_1$  est animé d'un mouvement de rotation dans le plan  $(x,y)$  appartenant au référentiel du laboratoire  $(x, y, z)$ . On définit ainsi un repère  $(x', y', z)$  tournant autour de  $z$  à la même vitesse angulaire de sorte que le champ  $B_1$  y apparaisse stationnaire. Ce champ est produit par une bobine placée perpendiculairement à  $B_0$ , le long de l'axe des  $y$ , par exemple, pendant une impulsion de durée  $\tau = \frac{\theta}{\gamma B_1}$ . Pour que l'impulsion soit efficace il faut que sa fréquence soit égale à  $\nu_0$  (figure 2.7). A partir de maintenant on se place dans le référentiel tournant et on omet la notation en '.



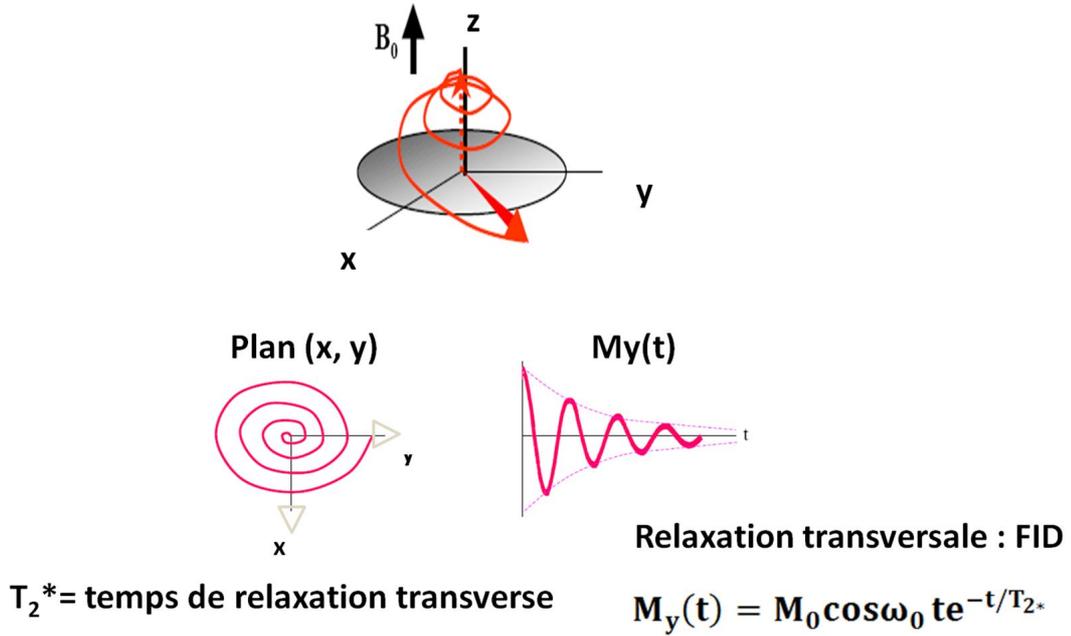
**Figure 2.7 : Basculement de l'aimantation  $M$  d'un angle  $\theta = \frac{\pi}{2}$  le long de l'axe  $x$  après impulsion d'un champ  $B_1$  sur l'axe  $y$ .**

Le signal RMN correspond au retour à l'équilibre de l'aimantation.

**Relaxation :**

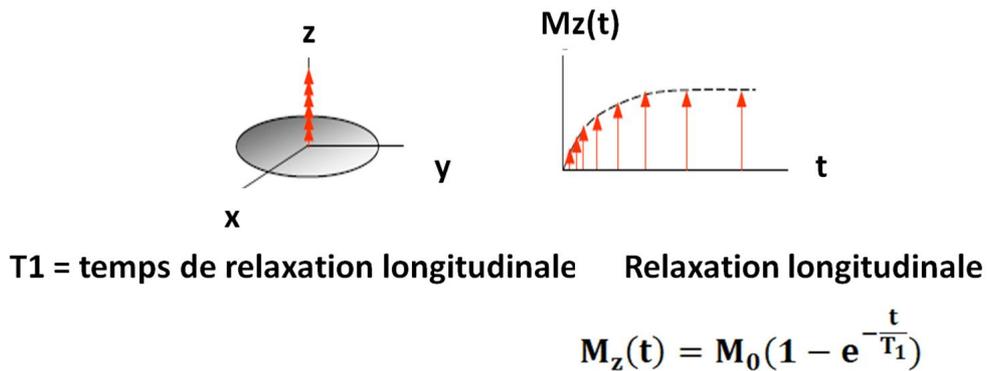
Après l'impulsion de RF, l'aimantation est ramenée vers sa position d'équilibre suivant  $B_0$ , par des phénomènes de relaxation décrit par Bloch :

- Le temps de relaxation transversal ou spin-spin,  $T_2$ , décrit l'évolution de la précession dans le plan  $(x, y)$  et dépend des interactions entre les noyaux (figure 2.8). Cependant, on parle plutôt de temps de relaxation effectif noté  $T_2^*$  à cause de l'inhomogénéité de  $B_0$  dans l'échantillon.



**Figure 2.8 : Retour à l'équilibre de l'aimantation après arrêt de  $B_1$  suivant le plan (x,y) : phénomène de relaxation transversale.**

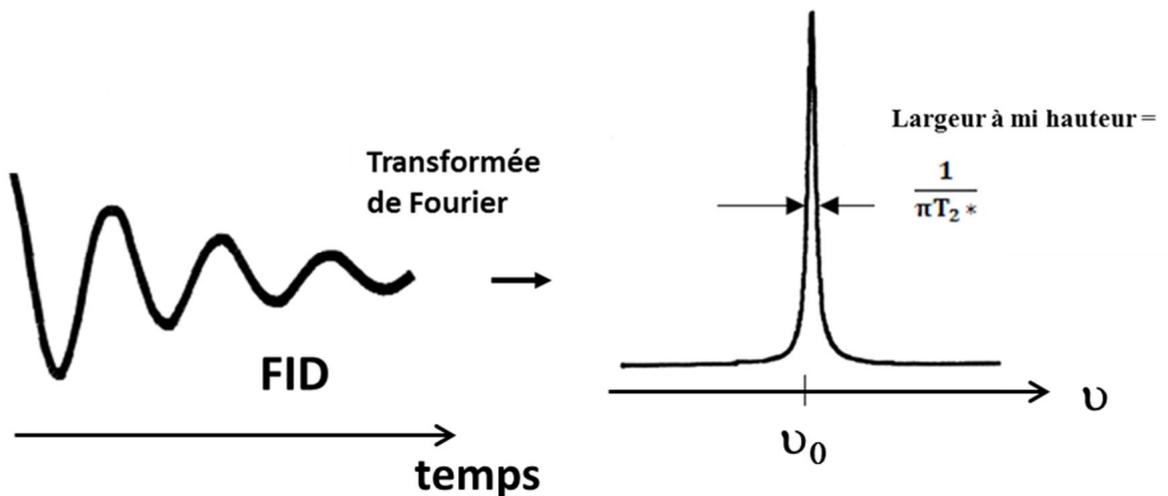
- Le temps de relaxation longitudinal ou spin-réseau, noté  $T_1$ , caractérise le temps de retour à l'équilibre de l'aimantation le long de l'axe z (figure 2.9). La valeur de  $T_1$  dépend des mouvements moléculaires. Pour des mouvements lents  $T_1$  est court et long pour des mouvements rapides.



**Figure 2.9 : Retour à l'équilibre de l'aimantation après arrêt de  $B_1$  suivant l'axe (Oz) : phénomène de relaxation longitudinale.**

### Spectre RMN :

Le signal temporel transverse du retour à l'équilibre est enregistré dans la bobine réceptrice/émettrice : c'est la FID (Free Induction Delay). Le spectre RMN correspond à une transformée de Fourier de la FID (figure 2.10). Pour obtenir un spectre avec un bon rapport signal/bruit (S/B), il faut accumuler plusieurs FID : pour  $n$  mesures le rapport S/B augmente d'un facteur  $\sqrt{n}$ . Le temps d'attente  $d1$  entre deux FID doit être suffisamment long pour que le système de spins soit totalement revenu à l'équilibre ( $d1 = 3 \text{ à } 5 T1$ ).



**Figure 2.10: Passage de la FID (signal temporel) au spectre RMN (signal en fréquence) par la transformée de Fourier.**

### 2.2.2- Les interactions nucléaires

Précédemment nous avons vu que les spins nucléaires étaient affectés par le champ magnétique statique  $B_0$  : c'est l'interaction Zeeman mais d'autres interactions internes sont responsables de fluctuations du champ magnétique ressenti par le noyau. Toutes ces interactions sont caractérisées par un Hamiltonien  $\hat{H}$  :

$$\hat{H} = \hat{H}_{\text{int}} + \hat{H}_z + \hat{H}_{\text{rf}} \quad (2.6)$$

avec  $\hat{H}$  : Hamiltonien total,  $\hat{H}_{\text{int}}$  : Hamiltonien dû aux interactions internes,  $\hat{H}_z$  : Hamiltonien de Zeeman et  $\hat{H}_{\text{rf}}$  : Hamiltonien qui correspond aux impulsions et qui vaut 0 pendant les périodes de précession libres.

$$\hat{H}_z = -\mu \cdot B_0 \quad (2.7)$$

$$\widehat{H}_{\text{int}} = \widehat{H}_{\text{ADC}} + \widehat{H}_{\text{D}} + \widehat{H}_{\text{Q}} + \widehat{H}_{\text{J}} \quad (2.8)$$

avec  $\widehat{H}_{\text{ADC}}$ : Hamiltonien d'anisotropie de déplacement chimique,  $\widehat{H}_{\text{D}}$ : Hamiltonien du couplage dipolaire,  $\widehat{H}_{\text{Q}}$ : Hamiltonien quadripolaire et  $\widehat{H}_{\text{J}}$ : Hamiltonien du couplage scalaire.

Les interactions à considérer ne sont pas équivalentes et dépendent de la nature de l'échantillon (liquide ou solide) et du noyau étudié. Le tableau 2.4 regroupe les ordres de grandeurs des Hamiltoniens (en Hertz) pour un échantillon liquide et solide.

interaction	solides	liquides
Zeeman $\widehat{H}_{\text{Z}}$	$10^8$	$10^8$
Spin-spin direct $\widehat{H}_{\text{D}}$	$10^4$	0
Spin-spin indirect $\widehat{H}_{\text{J}}$	$10^2$	$10^2$
Blindage électronique $\widehat{H}_{\text{ADC}}$	$10^4$	$10^4$
Quadrupolaire $\widehat{H}_{\text{Q}}$	$10^6$	0

**Tableau 2.4 : ordres de grandeurs des Hamiltoniens (en Hertz) pour un échantillon liquide et solide.**

Toutes ces interactions ont un caractère anisotrope c'est-à-dire qu'elles dépendent de l'orientation du noyau dans le champ magnétique. Ainsi il est nécessaire de distinguer deux référentiels :

- Le référentiel qui correspond à l'orientation de l'interaction considérée, dans une molécule : c'est le référentiel PAS (*Principal Axis System*).
- Le référentiel du laboratoire qui décrit l'orientation de cette interaction par rapport au champ  $B_0$  dirigé selon l'axe des z. Les angles d'Euler  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  permettent de le passage du référentiel PAS au référentiel du laboratoire.

### 2.2.2.1-Interaction de déplacement chimique

En réponse à  $B_0$ , le nuage électronique autour du noyau génère un champ magnétique local. Le noyau ne ressent plus le champ  $B_0$  mais un champ effectif  $B_{\text{eff}}$  :

$$B_{\text{eff}} = B_0 - B_{\text{local}} \quad (2.9)$$

avec  $B_{\text{local}} = \sigma \cdot B_0$  et  $\sigma$  : constante d'écran qui dépend de l'environnement du noyau. La fréquence de résonance vaut alors :

$$\nu = \frac{(1 - \sigma)\gamma \cdot B_0}{2\pi} \quad (2.10)$$

La fréquence de résonance d'un noyau va donc dépendre du champ magnétique  $B_0$  et du paramètre d'écran  $\sigma$ . De plus, le champ local  $B_{\text{local}}$  est très petit devant  $B_0$ . Ainsi, la mesure de l'écart relatif de la fréquence observée ( $\nu$ ) par rapport à la fréquence d'une référence ( $\nu_{\text{ref}}$ ) va permettre d'obtenir une échelle relative indépendante de la valeur du champ  $B_0$ . Les signaux RMN sont ainsi caractérisés par le déplacement chimique ( $\delta$ ) exprimé en partie par millions (ppm), qui dépend seulement de l'environnement dans lequel le noyau se trouve :

$$\delta = \frac{10^6 \cdot (\nu - \nu_{\text{ref}})}{\nu_{\text{ref}}} \quad (2.11)$$

La constante d'écran  $\sigma$  a un caractère anisotrope c'est-à-dire que sa valeur varie en fonction de l'orientation de la molécule par rapport au champ magnétique. Cette dépendance est décrite par un tenseur anisotrope qui mathématiquement est représenté par une matrice 3 X 3.

$$\sigma = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{xy} & \sigma_{xz} \\ \sigma_{yx} & \sigma_{yy} & \sigma_{yz} \\ \sigma_{zx} & \sigma_{zy} & \sigma_{zz} \end{pmatrix} \quad (2.12)$$

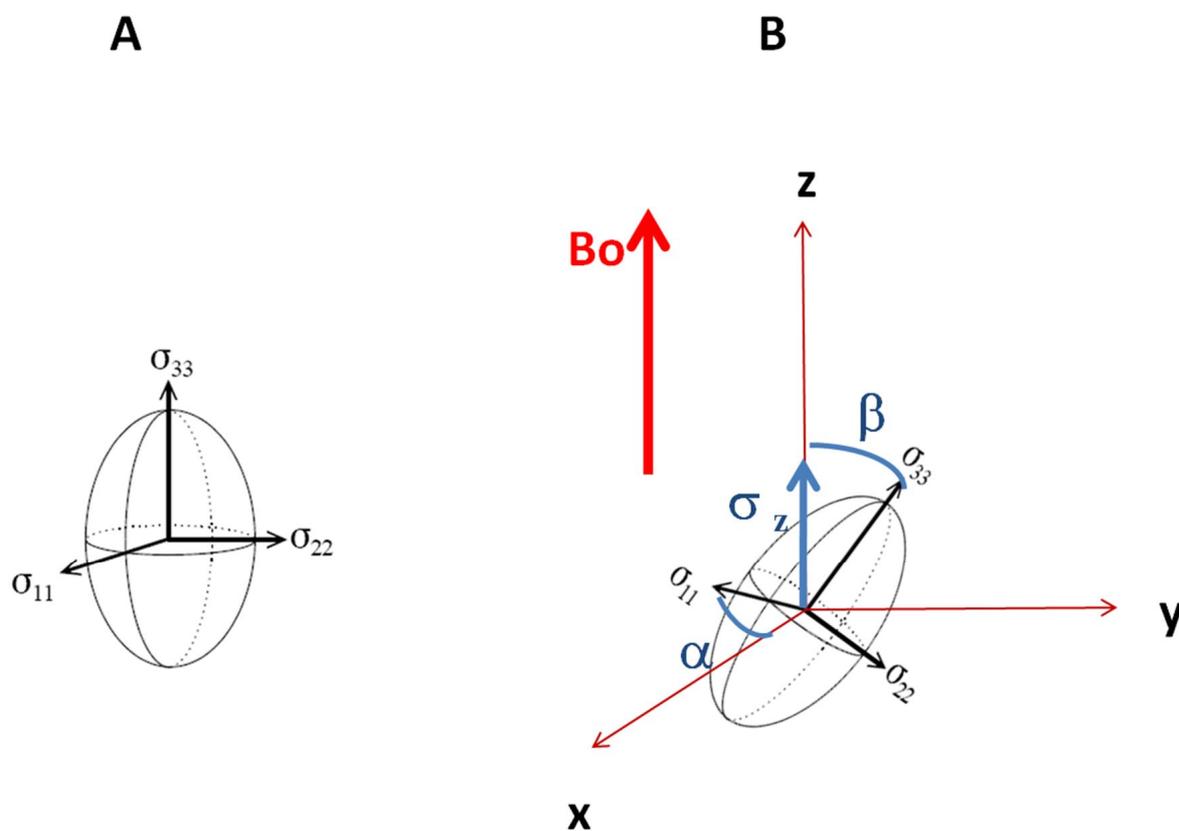
Ce tenseur est diagonal dans le système d'axe principaux (PAS) c'est-à-dire que toutes les valeurs de  $\sigma$  sont nulles hormis les valeurs diagonales :  $\sigma_{xx}$ ,  $\sigma_{yy}$ ,  $\sigma_{zz}$ .

Généralement les valeurs diagonales se notent  $\sigma_{11}$ ,  $\sigma_{22}$ ,  $\sigma_{33}$  et décrivent la direction de la constante d'écran la plus faible, intermédiaire et la plus forte respectivement.

$$\sigma_{PAS} = \begin{pmatrix} \sigma_{11} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{22} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{33} \end{pmatrix} \quad (2.13)$$

Ce tenseur peut être représenté par une ellipse où les axes principaux du tenseur sont confondus avec les axes principaux de l'ellipse (figure 2.11-A).

La valeur de déplacement chimique mesurée en RMN correspond à la composante  $\sigma_{zz}$  du tenseur de déplacement chimique dans le référentiel du laboratoire (x, y, z). Ainsi, il est nécessaire de décrire les coordonnées du tenseur dans le référentiel du laboratoire à partir de l'orientation des axes principaux  $\sigma_{11}$ ,  $\sigma_{22}$  et  $\sigma_{33}$ . Celles-ci sont obtenues en appliquant des rotations avec les angles d'Euler (figure 2.11-B).



**Figure 2.11 : A- Représentation du tenseur de déplacement chimique dans le référentiel PAS. B- Représentation du tenseur de déplacement chimique dans le référentiel du laboratoire décrit par les angles d'Euler ( $\alpha$ ,  $\beta$ ).**

Ainsi, quelle que soit la valeur de  $\gamma$ ,  $\sigma_{zz}$  peut s'écrire :

$$\sigma_{zz}(\alpha, \beta) = \sigma_{iso} + \frac{\delta}{2}(3\cos^2\beta - 1 - \eta\sin^2\beta\cos 2\alpha) \quad (2.14)$$

avec  $\sigma_{iso}$  définissant le déplacement chimique isotrope de valeur:

$$\sigma_{iso} = \frac{(\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33})}{3} \quad (2.15)$$

$\eta$  est le paramètre d'asymétrie avec  $\eta = (\sigma_{22} - \sigma_{11})/(\sigma_{33} - \sigma_{iso})$ ,  $\delta$  est le paramètre d'anisotropie avec  $\delta = (\sigma_{33} - \sigma_{iso})$ .

Si  $\eta = 0$  alors  $\sigma_{22} = \sigma_{11}$  et le tenseur possède une symétrie axiale.

En général, dans un solide, les noyaux sont orientés aléatoirement par rapport au champ magnétique et les mouvements moléculaires sont lents et les spectres larges, surtout si la symétrie est faible autour du noyau. On parle dans ce cas-là de spectre de poudre dont la forme est gouvernée par les valeurs de  $\sigma_{11}$ ,  $\sigma_{22}$ ,  $\sigma_{33}$ . La variation de la forme du spectre dépend du paramètre d'asymétrie  $\eta$  du tenseur de déplacement chimique anisotrope (figure 2.12).

Par contre dans un liquide, les mouvements sont rapides dans toutes les directions, les interactions sont moyennées et les spectres sont constitués de raies fines. Le déplacement chimique est moyenné par le mouvement moléculaire et sa valeur vaut  $\sigma_{iso}$  (équation 2.15).

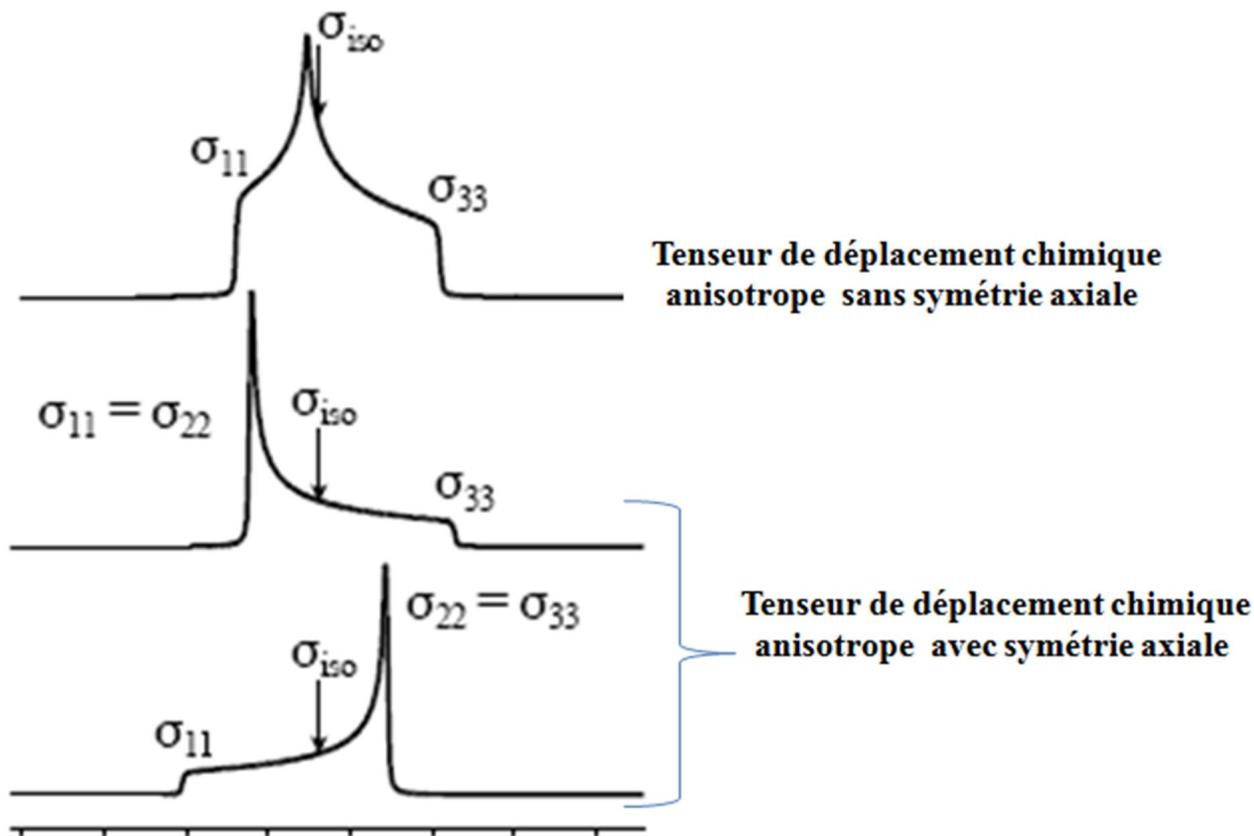
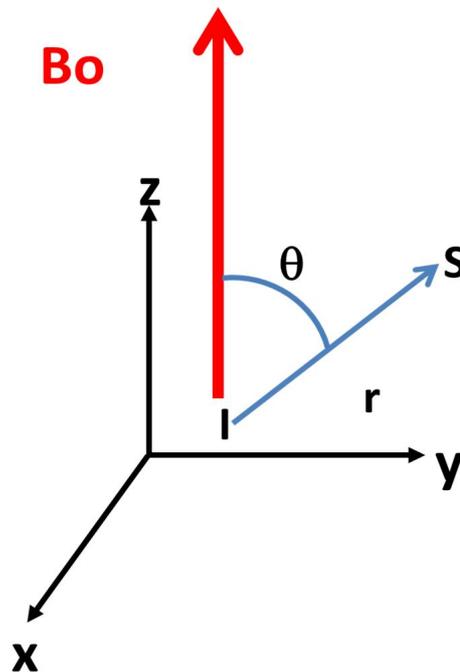


Figure 2.12 : Paramètres d'asymétrie influençant la forme du spectre

### 2.2.2.2-Couplage dipolaire : interaction spin-spin direct

Un spin nucléaire crée un champ magnétique local qui peut être ressenti par les spins voisins. Cette interaction correspond à l'interaction dipôle-dipôle. Pour deux noyaux I et S, la force de cette interaction dépend de la distance  $r$  entre ces deux noyaux, et de l'orientation relative du vecteur reliant les deux spins S et I par rapport à la direction du champ magnétique  $B_0$  (Figure 2.13).



**Figure 2.13 : Représentation schématique du couplage dipolaire entre deux noyaux S et I distant de  $r$  et dont le vecteur  $\overrightarrow{IS}$  fait un angle  $\theta$  avec le champ  $B_0$ .**

Le couplage dipolaire, notée  $D$ , pour deux noyaux I et S est défini par:

$$D = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right) \frac{\hbar\gamma_S\gamma_I}{r_{IS}^3} (3\cos^2\theta - 1) \quad (2.16)$$

$\gamma_I$  et  $\gamma_S$  sont les rapports gyromagnétiques des noyaux I et S,  $\hbar$  la constante de Planck divisée par  $2\pi$  et  $\theta$  l'angle entre le vecteur internucléaire et la direction du champ magnétique  $B_0$ .

La valeur du couplage dipolaire dépend donc non seulement de la distance internucléaire en  $1/r^3$ , mais également de l'angle entre le vecteur internucléaire et le champ magnétique statique  $B_0$ . Ainsi, avec la dépendance en  $1/r^3$ , plus les spins sont proches, plus le couplage dipolaire est fort pour une même orientation. Par exemple, la valeur du couplage dipolaire entre le noyau  $^{15}\text{N}$  et le noyau  $^1\text{H}$  de la liaison peptidique à des valeurs comprises entre -20 kHz et 10 kHz. Dans le cas de molécules animées de mouvements isotropes rapides l'interaction dipolaire est moyennée à 0.

### **2.2.2.3-Couplage scalaire : interaction spin-spin indirect**

Lorsque les moments magnétiques nucléaires de deux noyaux sont couplés à travers leurs électrons de liaison, on parle alors de couplage indirect spin-spin. Ces interactions sont présentes à travers les liaisons chimiques et elles mettent en jeu des énergies de l'ordre d'une centaine d'Hertz au maximum. Pour les protéines, la valeur du couplage N-H dans la liaison peptidique vaut 92 Hertz. Ainsi, dans les spectres RMN du solide où les raies sont larges, elles sont rarement observables. En liquide par contre, ces informations sont visibles et exploitables. Elles permettent d'obtenir des informations structurales sur les angles de torsion par exemple.

### **2.2.2.4-Interaction quadripolaire**

Les noyaux de spins  $I=1/2$ , comme le  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  ou encore le  $^{31}\text{P}$ , ont une distribution sphérique des charges positives des protons. Par contre, les noyaux comme le  $^2\text{H}$ ,  $^{14}\text{N}$  ou  $^{17}\text{O}$  qui ont un spin  $I>1/2$  possèdent une distribution non sphérique des charges positives. Par conséquent ces derniers possèdent un moment quadripolaire ( $eQ$ ). L'interaction quadripolaire est due à l'interaction entre le moment quadripolaire d'un noyau et le gradient de champ électrique local, crée par l'environnement des charges extérieures du noyau.

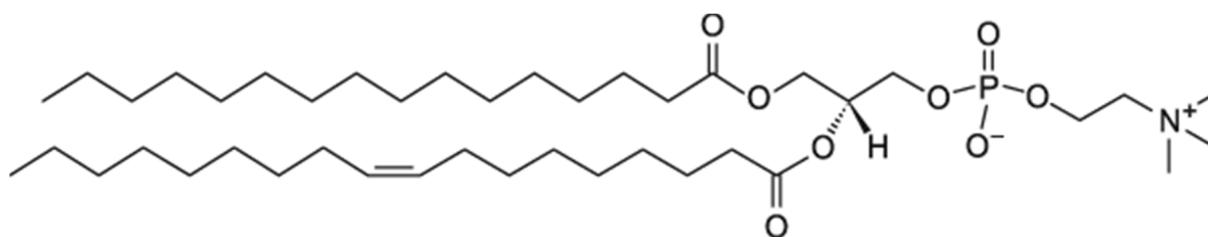
## **2.2.3-Les expériences RMN du solide**

### **2.2.3.1-Les échantillons orientés statiques [126, 127, 128]**

La RMN d'échantillons orientés est une technique puissante lorsque l'on souhaite étudier la topologie, la structure et la dynamique des peptides dans leur environnement membranaire. Cette technique est très utilisée dans le but d'obtenir des informations quant au mécanisme d'action des peptides antibactériens par exemple. Cette technique nécessite de disposer de peptides marqués en  $^{15}\text{N}$  au niveau de la liaison amide. Ces peptides peuvent être obtenus soit par synthèse peptidique soit par expression bactérienne. Les deux noyaux étudiés sont le  $^{31}\text{P}$  car il permet de vérifier l'orientation de la bicouche par rapport au champ  $B_0$ , et le noyau  $^{15}\text{N}$  car il fournit des informations structurales sur le peptide dans son environnement membranaire.

## → Le Phosphore 31

La RMN du phosphore-31 est une technique particulièrement intéressante pour l'étude des phospholipides membranaires car l'abondance naturelle du phosphore est de 100 % et donc, il n'est pas nécessaire d'utiliser des marqueurs spécifiques. De plus, l'enregistrement du spectre  $^{31}\text{P}$  se fait en quelques minutes contrairement à celui du spectre  $^{15}\text{N}$  (2 à 3 jours). L'enregistrement d'un tel spectre permet de contrôler l'orientation des bicouches de phospholipides par rapport au champ magnétique  $B_0$  et d'étudier l'effet du peptide sur les bicouches. Pour l'étude de notre peptide, nous avons réalisé des bicouches orientés de POPC (1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine) (figure 2.14).

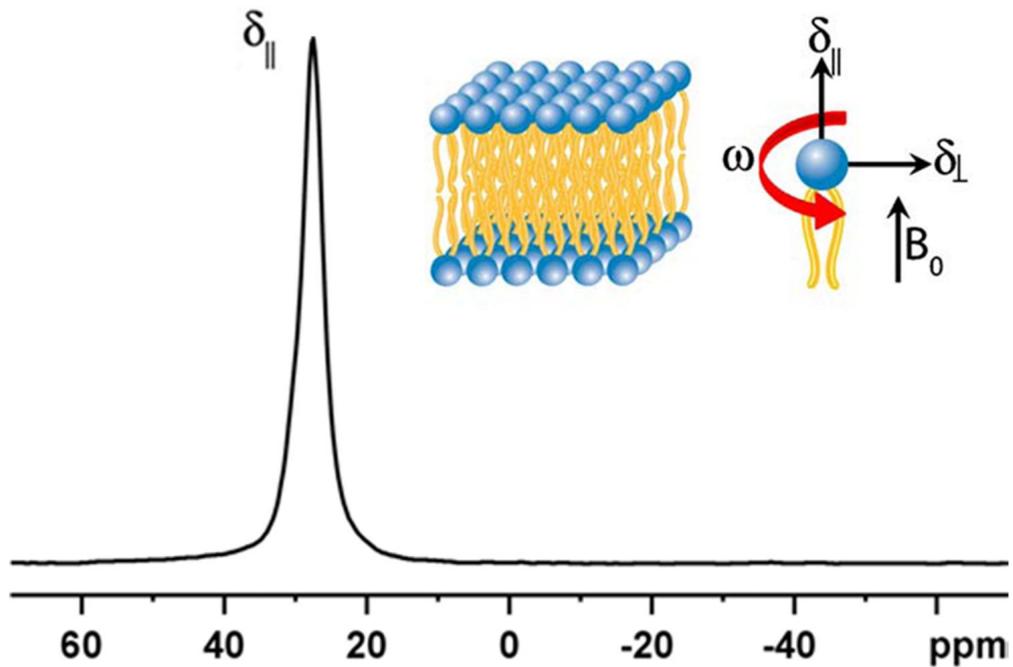


**Figure 2.14 : Formule chimique du POPC**

Le tenseur anisotrope de déplacement chimique du phosphore appartenant au POPC vaut [129] :

$$\delta = \begin{pmatrix} -19 & 0 & 0 \\ 0 & -19 & 0 \\ 0 & 0 & 28 \end{pmatrix}$$

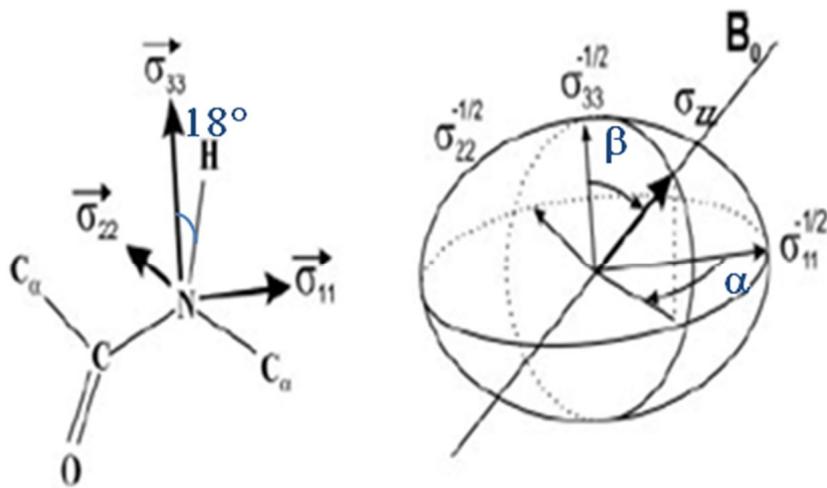
Les phospholipides en phase fluide possèdent un axe principal de rotation qui correspond à l'axe longitudinal de la molécule. Cette rotation rapide a pour conséquence :  $\sigma_{11} = \sigma_{22} = \sigma_{\perp}$  (valeur du tenseur perpendiculaire à la normale de la bicouche) et  $\sigma_{33} = \sigma_{\parallel}$  (valeur du tenseur parallèle à la normale à la bicouche) (figure 2.15). Ainsi, des bicouches de POPC correctement orientées donnent un spectre  $^{31}\text{P}$  avec un pic à 30 ppm environ lorsque la normale à la bicouche est parallèle à  $B_0$  (figure 2.15).



**Figure 2.15 : Spectre  $^{31}\text{P}$ -découplé  $^1\text{H}$ , de membranes orientées (avec la normale à la membrane parallèle au champ magnétique  $B_0$ ).**

**→ L'azote 15**

La figure 2.16 représente le tenseur de déplacement chimique du noyau  $^{15}\text{N}$  appartenant à une liaison peptidique présente dans une hélice  $\alpha$ . L'angle entre le vecteur NH et  $\sigma_{33}$  vaut environ  $18^\circ$ . Tout les deux sont orientés presque parallèlement à l'axe de l'hélice. Les valeurs de  $\sigma_{22}$ ,  $\sigma_{11}$  et  $\sigma_{33}$  sont respectivement de 85 ppm, 65 ppm et 230 ppm. Grace à ces caractéristiques particulières, il est possible de mesurer approximativement l'orientation de l'hélice  $\alpha$  dans des bicouches de phospholipides orientés (avec la normale à la bicouche parallèle à  $B_0$ ) en mesurant la valeur de déplacement chimique de l'azote 15 appartenant à une liaison peptidique.



**Figure 2.16 : Représentation du tenseur de déplacement chimique de l'azote  $^{15}\text{N}$  d'une liaison peptidique participant à une structure en hélice  $\alpha$  [127]**

En effet, lorsqu'une hélice  $\alpha$  adopte une orientation transmembranaire dans des bicouches de phospholipides (dont la normale  $\vec{n}$  est parallèle à  $B_0$ ) le champ magnétique  $B_0$  et  $\sigma_{33}$  sont parallèles (figure 2.17-A) et en supposant que l'axe de l'hélice et  $\sigma_{33}$  sont confondus, alors la valeur de déplacement chimique du noyau  $^{15}\text{N} > 200$  ppm.

Par contre, lorsque l'hélice  $\alpha$  est parallèle à la membrane,  $\sigma_{33}$  est perpendiculaire à  $B_0$  et par conséquent la valeur de déplacement chimique du noyau  $^{15}\text{N}$  est due principalement à la contribution de  $\sigma_{11}$  et  $\sigma_{22}$ . Ainsi, sa valeur de déplacement chimique est cette fois-ci  $< 90$  ppm (figure 2.17-B).

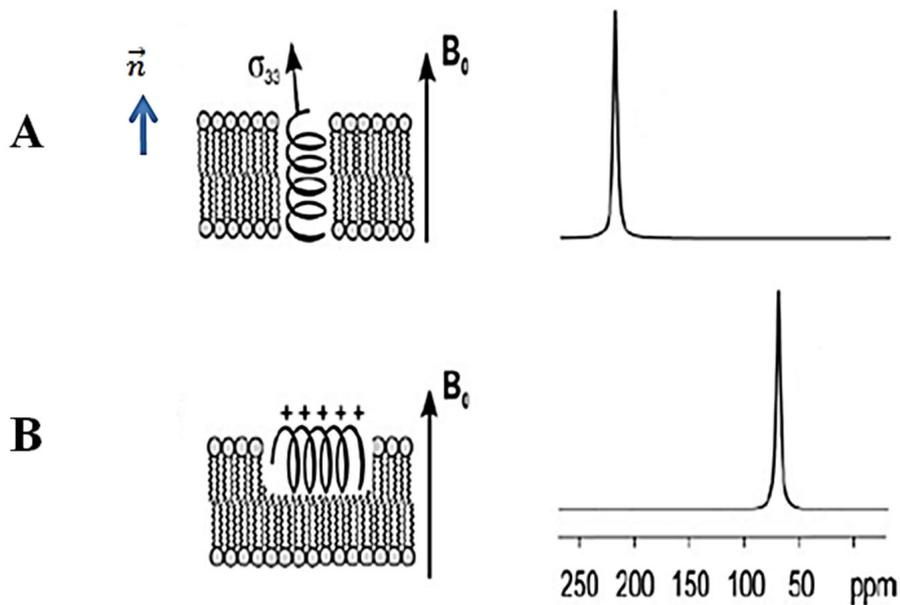


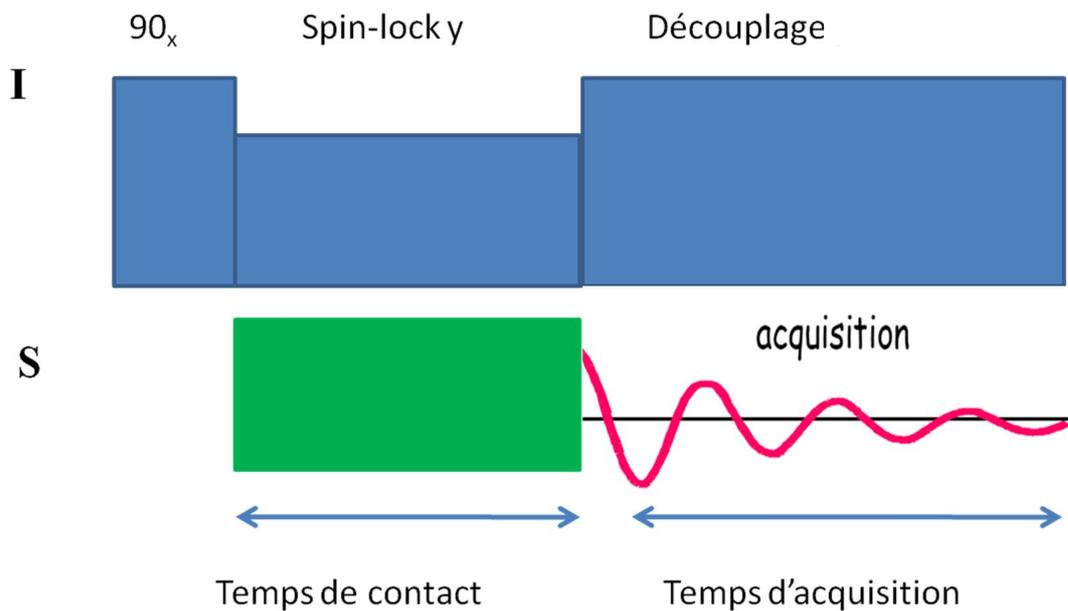
Figure 2-17 : A- Orientation transmembranaire du peptide. B- Orientation dans le plan du peptide [127].

### 2.2.3.2-Les expériences RMN statiques

#### → La polarisation croisée

En 1962, Hartmann et Hahn ont proposé une technique qui permet de transférer l'aimantation des spins abondants vers les spins rares, dans le référentiel tournant, par l'intermédiaire de l'interaction dipolaire : C'est la polarisation croisée de type Hartmann-Hahn. Cette technique est très utilisée en RMN du solide car elle permet d'augmenter le rapport signal/bruit d'un facteur  $\gamma_I/\gamma_S$ , où I représente les spins abondants et S les spins rares. En effet, plus le rapport gyromagnétique du noyau est faible, plus la technique est efficace.

Cette expérience commence par la polarisation du  $^1\text{H}$  par une impulsion de  $90^\circ$ , ensuite les deux noyaux I et S sont « spin-lockés » en appliquant simultanément des champs de radiofréquence suivant y sur les spins I ( $B_1^I$ ) et S ( $B_1^S$ ) pendant le temps de contact. On enregistre ensuite le signal des spins rares S en découplant les spins abondants (figure 2.18).



**Figure 2.18 : séquence de polarisation croisée de type Hartmann-Hahn**

On impose également les conditions de Hartman-Hahn :

$$\gamma^I B_1^I = \gamma^S B_1^S \quad (2.17)$$

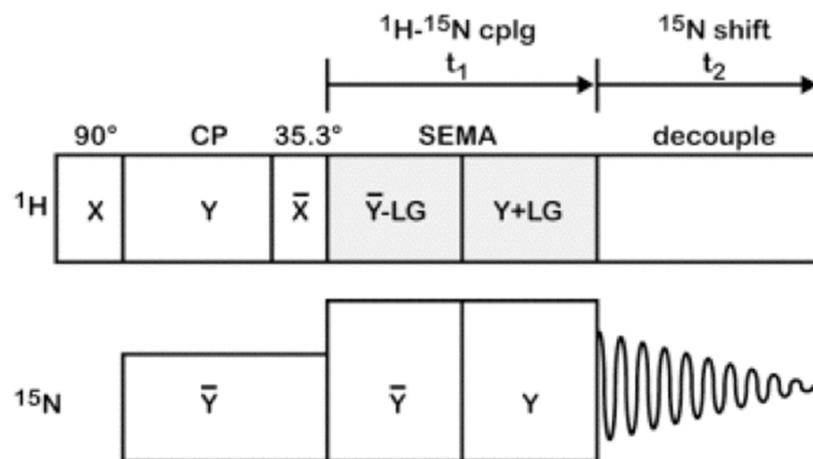
Dans les échantillons de protéines les spins rares sont les spins  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$  et les spins abondants les  $^1\text{H}$ . Ainsi, cette technique permet d'augmenter, en théorie, le signal en  $^{15}\text{N}$  d'un facteur 10 et d'un facteur 4 le signal en  $^{13}\text{C}$ . De plus, un autre avantage majeur du transfert d'aimantation entre le  $^1\text{H}$  et le  $^{15}\text{N}$ , par exemple, et que le retour à l'équilibre de l'aimantation de l'azote n'est plus gouverné par le  $T_1$  de l'azote ( $T_1$  de l'ordre de 10 s) mais par le  $T_1$  du proton qui est de l'ordre de 1s. Ainsi le délai entre deux FID est plus court et par conséquent on peut accumuler le même nombre de FID en moins de temps.

➔ **PISEMA (Polarization Inversion Spin Exchange at Magic Angle) [130]**

Le PISEMA est une expérience RMN qui permet d'obtenir des informations sur la structure secondaire des protéines ou peptides dans un environnement membranaire ainsi que la valeur de l'angle d'inclinaison de la protéine/peptide par rapport à la normale à la bicouche. C'est une expérience à deux dimensions qui corrèle le couplage dipolaire  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  avec le déplacement chimique en  $^{15}\text{N}$  du peptide. Elle peut se faire en mode statique ou en rotation à l'angle magique en utilisant des protéines/peptides marqués uniformément ou sélectivement

en  $^{15}\text{N}$ . C'est une méthode intéressante car on obtient des informations structurales sans avoir recours à l'attribution des noyaux de la protéine.

La séquence d'impulsion est montrée sur la figure 2.19. Cette séquence est composée de trois étapes. La première consiste à augmenter le signal en  $^{15}\text{N}$  en effectuant un transfert de polarisation entre le proton et l'azote. Ensuite, un pulse de  $35,3^\circ$  envoie la magnétisation du  $^1\text{H}$  à l'angle magique. Pendant le temps  $t_1$ , l'aimantation évolue uniquement sous l'influence de l'interaction dipolaire. Contrairement au spin lock du CP, les protons sont « spin lockés » à l'angle magique, ce qui permet de supprimer les couplages homonucléaires  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ . Finalement, l'acquisition en  $^{15}\text{N}$  se fait pendant le temps  $t_2$  en découplant le  $^1\text{H}$ .



**Figure 2.19 : Séquence d'impulsion de l'expérience PISEMA 2D qui corrèle le couplage dipolaire  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  avec le déplacement chimique  $^{15}\text{N}$  [130].**

L'allure des spectres PISEMA de protéines orientés dans les membranes va dépendre de l'orientation de l'hélice par rapport à la normale à la bicouche, de la valeur du tenseur du noyau  $^{15}\text{N}$  de chaque liaison amide, des angles dièdres ainsi que de la longueur de liaison N-H.

La figure 2.20 montre les spectres PISEMA simulés pour une hélice  $\alpha$  de 18 résidus possédant des angles dièdres  $(\phi, \psi) = (-65^\circ, -40^\circ)$  en fonction de l'angle d'inclinaison ( $\theta$ ) de l'hélice par rapport à la normale à la membrane.

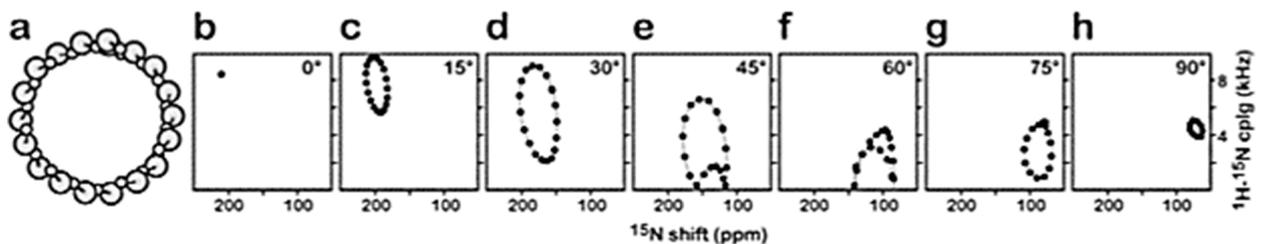
Lorsque l'axe de l'hélice est parallèle à la normale à la bicouche ( $\theta=0^\circ$ ), toutes les liaisons N-H sont orientées de la même manière par rapport au champ magnétique  $B_0$  et les

fréquences de résonances en  $^{15}\text{N}$  approchent leurs valeurs maximales. Par conséquent, on observe un seul pic sur le spectre 2D (figure 2.20-b).

Pour les autres valeurs d'angles  $\theta$  inférieurs à  $40^\circ$  (figure 2.20-c et 2.20-d), les vecteur N-H de l'hélice ont différentes orientations et on observe donc une dispersion des fréquences de résonances des noyaux  $^{15}\text{N}$  et du couplage dipolaire  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ . Cela se traduit par l'apparition d'un signal qui a la forme d'une ellipse ou encore nommé « PISA wheels ». Ces pics fournissent l'information sur la structure secondaire et la topologie du peptide dans son environnement membranaire.

Les hélices dont l'angle d'inclinaison  $\theta$  est supérieur à  $40^\circ$  possèdent des vecteurs N-H qui adoptent une orientation proche de l'angle magique ( $\theta = 55^\circ$ ), et par conséquent ont des résonances avec un couplage dipolaire proche de 0 kHz. D'autres de ces vecteurs sont orientés de telle sorte que la valeur du couplage dipolaire change de signe. Or, le spectre PISEMA ne permet pas de distinguer entre des valeurs positives et négatives du couplage dipolaire et par conséquent on aboutit à des spectres, non plus sous la forme d'ellipse mais comme ceux présentés sur la figure 2.20-e et 2.20-f ( $\theta$  compris entre  $40^\circ$  et  $60^\circ$ ).

Finalement, quand l'hélice est parallèle à la membrane ( $\theta=90^\circ$ ) les vecteurs N-H sont orientés perpendiculairement au champ magnétique et par conséquent, les signaux de résonances se superposent et le spectre PISEMA donne un pic intense autour de 75 ppm et 5 kHz (figure 2.20-h) [130].



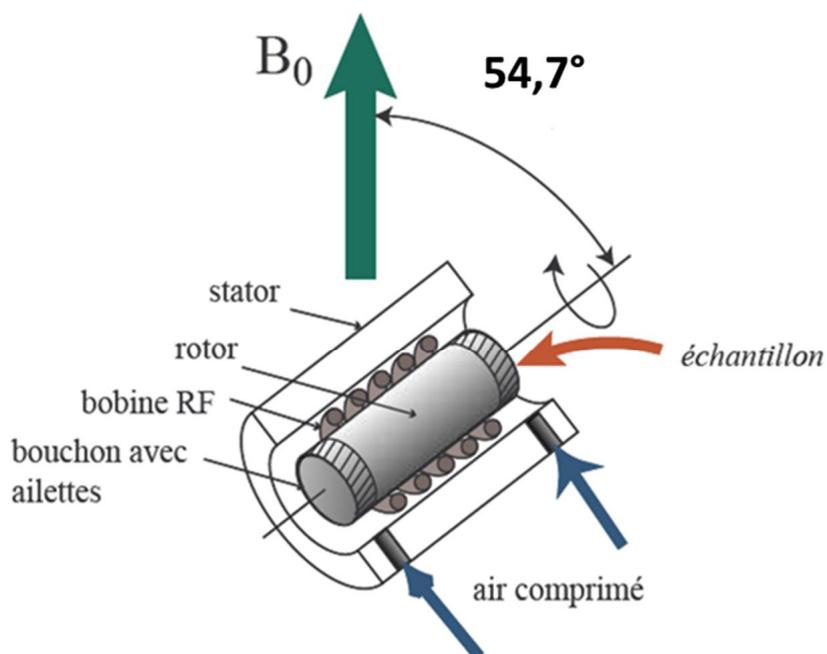
**Figure 2.20 : Spectres PISEMA simulés pour une hélice  $\alpha$  de 18 résidus possédant des angles dièdres  $(\varphi, \psi) = (-65^\circ, -40^\circ)$  en fonction de l'inclinaison ( $\theta$ ) de l'hélice par rapport à la normale à la membrane [130].**

### 2.2.3.3-Les expériences RMN en rotation à l'angle magique

#### ➔ Principe de la rotation à l'angle magique [131]

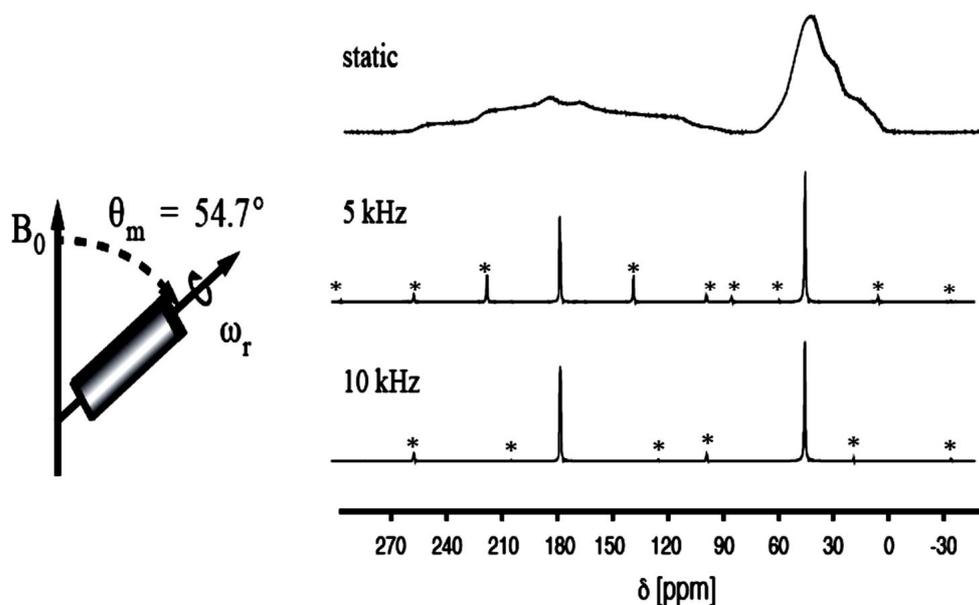
L'anisotropie des interactions nucléaires est caractérisée par la présence de bandes larges sur le spectre RMN et donc à des signaux mal résolus et difficilement interprétables. Ce phénomène d'anisotropie pose généralement des problèmes dans le cas d'échantillon solide. En effet, en milieu liquide, le mouvement rapide des molécules pendant l'échelle de mesure RMN permet de moyenniser ces interactions nucléaires contrairement à un solide où la mobilité est considérablement réduite. Cet élargissement de bandes sur le spectre peut être facilement observé, citons l'exemple de l'eau où le spectre  $^1\text{H}$  donne une raie fine de largeur de 0,1 Hz alors que le spectre  $^1\text{H}$  de la glace donne une raie large de  $10^5\text{Hz}$ .

Afin d'obtenir une résolution comparable à celle du liquide, Andrew (1958) et Lowe (1959) ont développé une technique qui consiste à faire tourner un rotor (qui contient l'échantillon) incliné de  $54,7^\circ$  par rapport au champ magnétique statique  $B_0$ . La figure 2.21 montre le rotor dans son environnement de mesure.



**Figure 2.21 : Composants nécessaires à la rotation d'un échantillon à l'angle magique. Le stator, incliné de  $54,7^\circ$ , contient la bobine émettrice de RF et est capable de recevoir le rotor contenant l'échantillon. Le rotor possède des ailettes à ses extrémités. La rotation de l'échantillon est provoquée par l'arrivée d'air comprimé au niveau des ailettes.**

Cette technique est aujourd'hui appelée rotation à l'angle magique. Elle est utilisée pour éliminer l'interaction d'anisotropie de déplacement chimique ainsi que celle du couplage dipolaire et par conséquent d'obtenir des spectres plus résolus. Par exemple, la figure 2.22 compare le spectre d'une poudre de glycine marquée uniformément en  $^{13}\text{C}$  avec les spectres du même échantillon mais cette fois-ci en rotation à l'angle magique ( $\theta_m = 54,7^\circ$ ) avec une fréquence de rotation de l'échantillon  $\omega_r$  de 5 kHz ou de 10 kHz.



**Figure 2.22 : Comparaison entre le spectre  $^{13}\text{C}$  statique et les spectres en rotation à l'angle magique à différentes fréquences de rotation d'une poudre de glycine marqué uniformément en  $^{13}\text{C}$  [132]. Les astérisques représentent les bandes de rotations.**

Cependant lorsque la vitesse de rotation de l'échantillon est inférieure à la valeur de l'interaction d'anisotropie de déplacement chimique, on peut observer des « bandes de rotation » (spinning sidebands), marquées d'un astérisque sur la figure 2.22, espacées par des multiples de la fréquence de rotation.

Voyons comment évolue l'interaction dipolaire lorsque l'échantillon est en rotation à l'angle magique, car c'est cette interaction qui nous intéressera par la suite pour introduire la technique du REDOR. Nous avons vu précédemment que la valeur de l'interaction dipolaire est proportionnelle à  $(3\cos^2 \theta - 1)$  où l'angle  $\theta$  représente l'angle entre le vecteur reliant les deux spins  $S$  et  $I$  et le champ magnétique statique  $B_0$ . Il est facile de se rendre compte que si cet angle vaut  $54,7^\circ$  alors la valeur de l'interaction dipolaire vaut 0. Il faudrait donc que toutes

les paires de spins I-S de l'échantillon solide soient orientées de  $54,7^\circ$  par rapport à  $B_0$ . Ce n'est pas le cas pour un échantillon solide où toutes les paires de spins sont orientées dans toutes les directions (figure 2.23-A). Par contre, si on fait tourner le rotor, incliné de  $54,7^\circ$  par rapport à  $B_0$ , à une vitesse supérieure à celle de la valeur du couplage dipolaire, l'interaction dipolaire est alors moyennée à zéro sur une période de rotor.

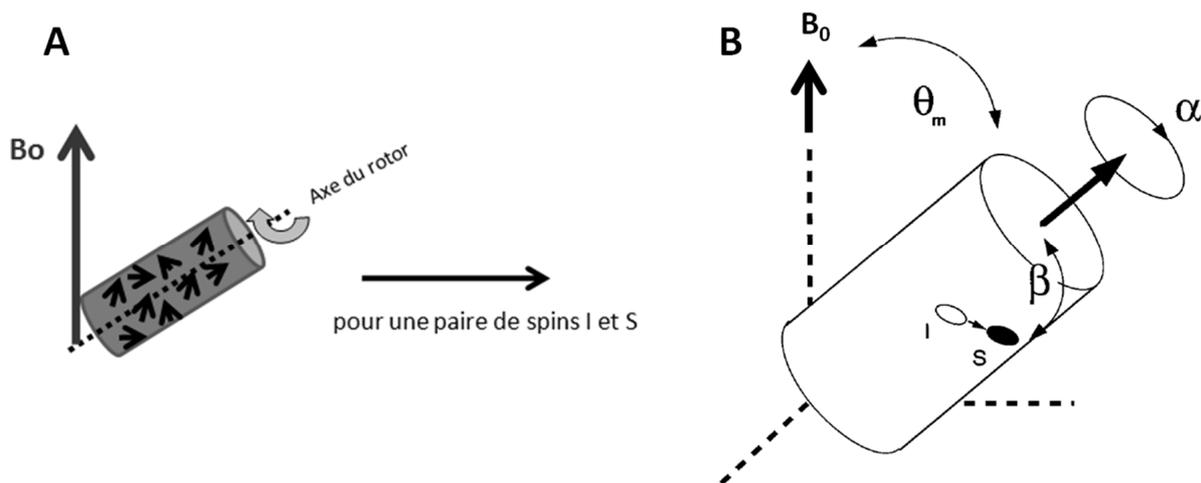
En effet, l'Hamiltonian décrivant l'interaction dipolaire pour un échantillon tournant à l'angle magique en fonction du temps est défini par :

$$\mathbf{H} = \mathbf{d}(t)\mathbf{S}_z\mathbf{I}_z \quad (2.18)$$

$$\text{avec } d(t) = d [\sin^2\beta\cos 2(\omega_r t + \alpha) - \sqrt{2\sin 2\beta\cos(\omega_r t + \alpha)}]$$

$$\text{et } d = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\hbar\gamma_S\gamma_I}{r_{IS}^3}$$

où  $\mu_0$  représente la perméabilité du vide,  $\gamma_I$  et  $\gamma_S$  les rapports gyromagnétiques des spins I,  $\hbar$  la constante de Planck divisé par  $2\pi$ ,  $r$  la distance internucléaire entre les spins I et S. La fréquence de rotation de l'échantillon  $\omega_r$  est reliée à la période du rotor notée  $T_r$  par  $\omega_r = 2\pi/T_r$ . L'orientation du vecteur  $\overline{IS}$  (figure 2.23-B) reliant les deux spins est définie dans le repère du rotor par les deux angles  $\alpha$  et  $\beta$  et à chacun de ces vecteurs correspond un couple d'angles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), qui dépend de l'orientation du vecteur dans le repère du rotor. L'équation 2.18 montre que sur une période de rotor  $T_r$  la valeur de l'interaction dipolaire est nulle quelque soit l'orientation de chaque paire de spins et donc quelque soit la valeur des couples d'angles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ).



**Figure 2.23 : A-**représentation des vecteurs  $\vec{IS}$  dans le rotor orienté de  $54,7^\circ$  par rapport au champ  $B_0$ . **B-** Angles d'Euler décrivant l'orientation d'une paire de spin I-S d'un échantillon tournant à l'angle magique. L'axe du rotor est aligné à l'angle magique  $\theta_m$  par rapport à  $B_0$ . Les angles polaire et azimutal,  $\beta$  et  $\alpha$  respectivement, décrivent l'orientation du vecteur  $\vec{IS}$  qui est fixe dans le référentiel du rotor. Adaptée de [133].

### ➔ REDOR : Rotationnel Echo Double Resonance [134, 135]

Nous avons vu précédemment que l'application de la technique de rotation des échantillons à l'angle magique permettait d'obtenir des spectres de haute résolution. Cependant ce gain en résolution s'effectue au prix d'une perte d'information (suppression de l'anisotropie de déplacement chimique et des interactions dipolaires). Or, la connaissance de la valeur de l'interaction dipolaire permet de remonter aux valeurs de distances internucléaires qui sont d'importantes informations structurales. Il faut donc « réintroduire » l'interaction dipolaire si l'on souhaite obtenir ces informations. La technique REDOR est la méthode de recouplage hétéronucléaire la plus utilisée. Cette technique a été introduite par Schaefer et Guillon en 1989 [134,135]. Elle permet de déterminer la valeur de l'interaction dipolaire  $D$ , entre deux spins  $S$  et  $I$ , et par conséquent de mesurer la distance internucléaire, car celle-ci est proportionnelle à  $1/r^3$ . Nous avons vu précédemment que la rotation à l'angle magique moyenne la valeur de l'interaction dipolaire à zéro à chaque période de rotor. Un moyen de réintroduire uniquement l'interaction dipolaire, en laissant toutes les autres interactions agissant sur le spin  $S$  inchangées, consiste à appliquer des pulses  $\pi$  synchronisés sur les périodes de rotors sur le spin  $I$ , en observant le spin  $S$ .

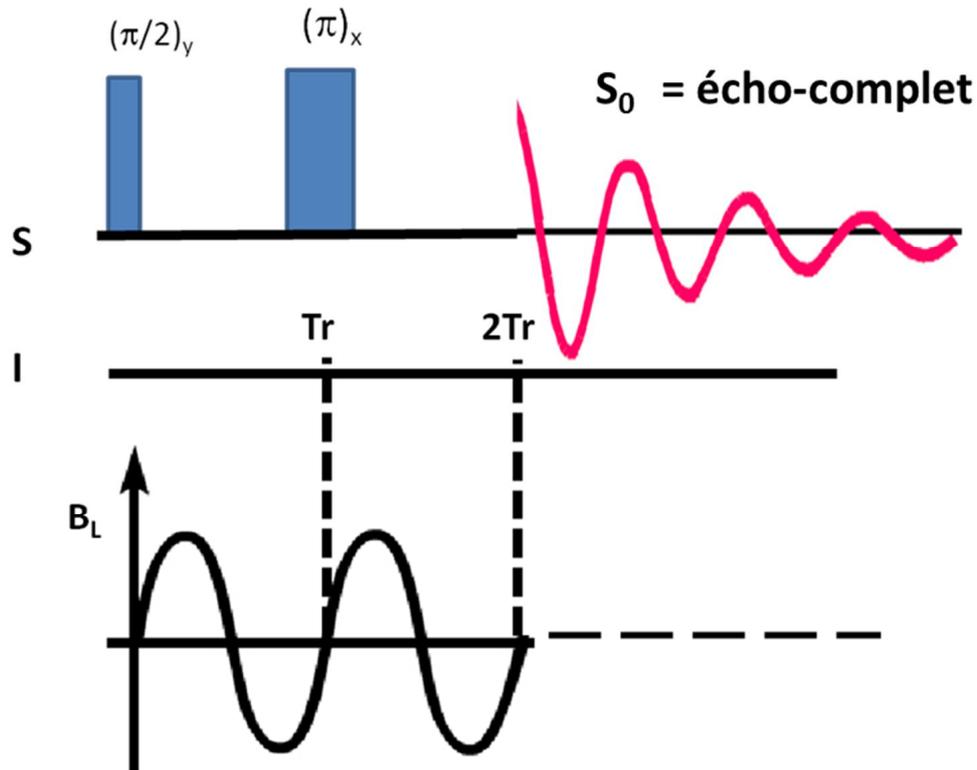
La technique REDOR consiste à enregistrer deux types d'expérience :

- « l'écho-complet,  $S_0$  » consiste à mesurer l'aimantation des spins S sans éliminer le couplage dipolaire. C'est une expérience de contrôle qui permet de tenir compte de l'effet de relaxation T2 du noyau considéré.
- « l'écho-réduit,  $S_r$  » permet d'enregistrer la réduction de l'aimantation des spins S, due à l'application des impulsions  $\pi$  sur le spin I. Cette réduction du signal est uniquement due à l'interaction dipolaire entre les spins I et S.

Pour des raisons de simplification décrivons l'expérience REDOR sur deux périodes de rotor.

***Principe de l'expérience d'Echo-complet :***

La figure 2.24 montre une expérience d'écho-complet de spin synchronisé avec la rotation de l'échantillon. Un pulse  $\pi$  est appliqué sur le spin S après la première période de rotor et l'acquisition débute à la fin de la deuxième période de rotor. L'interaction dipolaire n'a pas d'effet sur l'amplitude du signal car comme nous l'avons vu précédemment la valeur de l'interaction dipolaire sur une période de rotor est nulle. Le champ dipolaire local,  $B_L$ , est positif sur la première demi-période de rotor puis négatif jusqu'à la fin de la première période de rotor. Pendant la première demi-période de rotor, lorsque  $B_L$  est positif, il se produit un déphasage dipolaire du spin S. Durant la deuxième demi période de rotor,  $B_L$  change de signe et devient négatif et par conséquent le sens de précession du spin S est inversé. A la fin d'une période de rotor, l'aimantation du spin S est réalignée sur l'axe des x. Pendant la deuxième période de rotor, le spin S subit la même trajectoire que celle suivie pendant la première période de rotor et il en résulte un écho rotationnel.

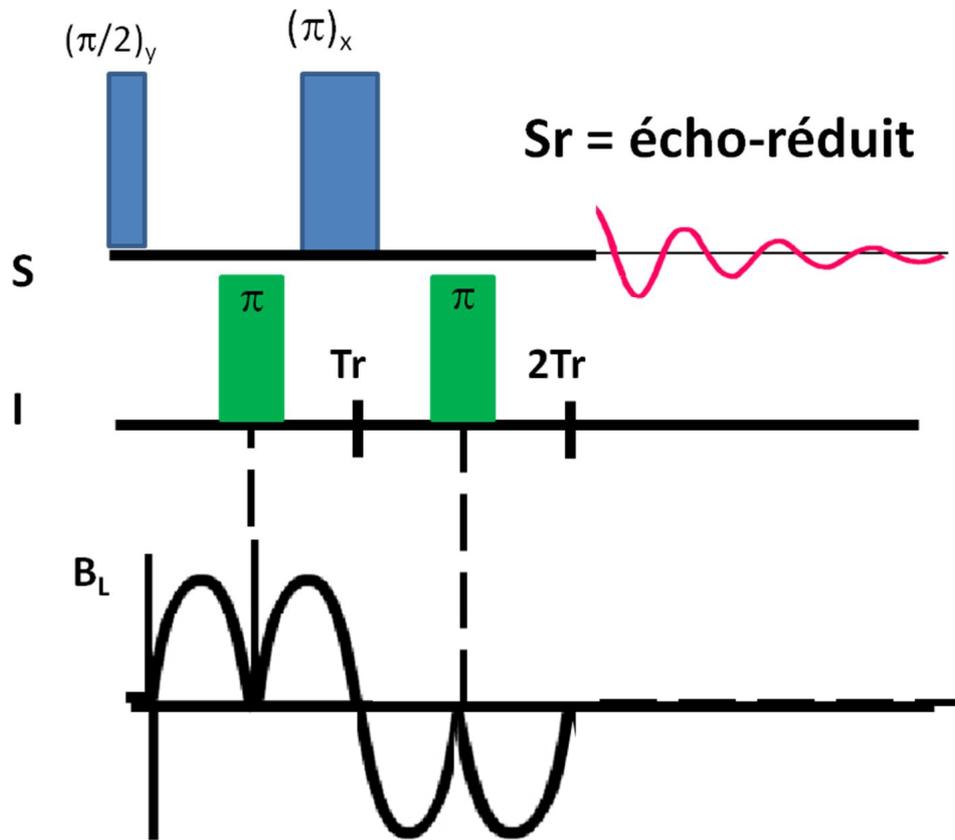


**Figure 2.24 :** Principe de l'expérience d'écho complet pendant la rotation de l'échantillon. L'évolution du champ local  $B_L$  généré par le spin I sur le spin S pendant l'expérience est indiquée.

### *Principe de l'expérience d'Echo-réduit*

La figure 2.25 montre une expérience d'écho-réduit synchronisé avec la rotation de l'échantillon. Cette fois ci, en plus du pulse  $\pi$  sur le spin S, des pulses  $\pi$  sont appliqués sur le spin I au temps  $Tr/2$  et au temps  $3Tr/2$ . Pendant le temps  $Tr/2$ , le champ dipolaire local sur le spin S est positif. Après  $Tr/2$ ,  $B_L$  ne devient pas négatif comme précédemment, car l'impulsion  $\pi$  sur le spin I a pour effet de changer l'orientation du champ  $B_L$  ressenti par le spin S.  $B_L$  reste donc positif jusqu'à la fin de la première période de rotor. Ainsi pendant toute cette durée, le sens de précession du spin S est inchangé et il en résulte donc un déphasage dipolaire. Ce déphasage devient plus prononcé après la deuxième période de rotor. En effet, la nature périodique de l'interaction dipolaire fait que  $B_L$  devient négatif après  $Tr$  et le reste jusqu'à la fin de la deuxième période de rotor (suite à l'impulsion  $\pi$  sur le spin I au temps  $3Tr/2$ ). Ainsi, à la fin de la deuxième période de rotor, l'aimantation du spin S ne se refocalise

pas sur l'axe des x comme pour l'expérience de l'écho-complet mais il en résulte un déphasage dipolaire du spin S. La projection de l'aimantation du spin S sur l'axe des x donne un signal réduit.

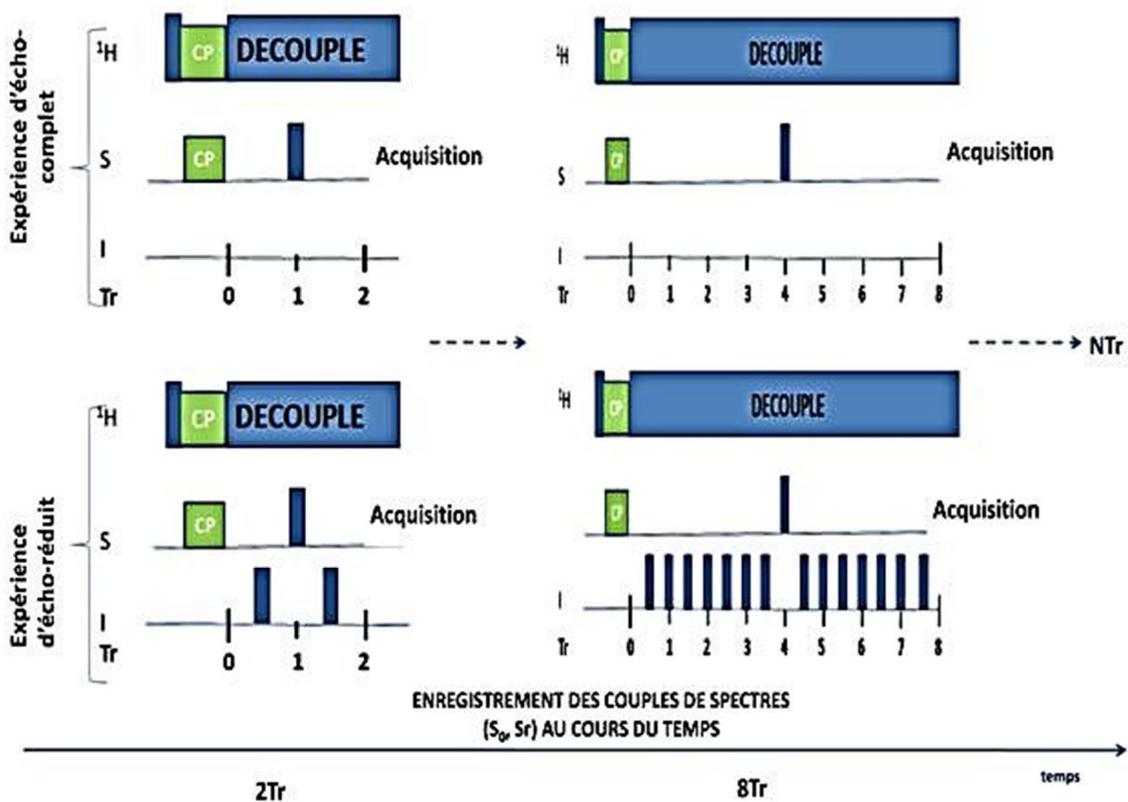


**Figure 2.25 : Principe de l'expérience d'écho-réduit pendant la rotation de l'échantillon. L'évolution du champ local  $B_L$  généré par le spin I sur le spin S pendant l'expérience est indiquée.**

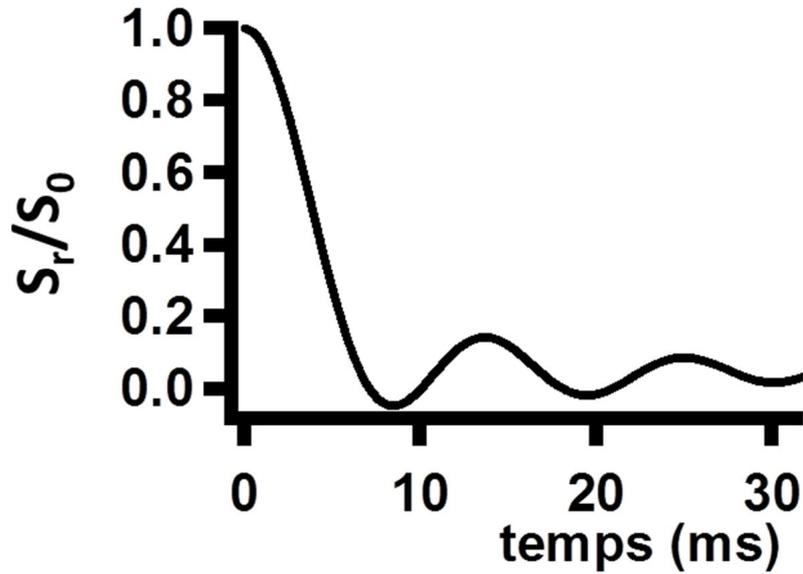
Ainsi, si on augmente le nombre de périodes de rotor, le déphasage dipolaire devient de plus en plus important et donc la diminution de l'écho de plus en plus intense.

**Principe de l'expérience REDOR :**

La séquence d'impulsion REDOR la plus courante pour un couple de spin I-S est montrée sur la figure 2.26. Les protons sont utilisés pour augmenter l'aimantation du spin observé S à travers une étape de transfert de polarisation croisée. Le  $^1\text{H}$  est ensuite découplé jusqu'à la fin de l'acquisition de l'aimantation S. On enregistre le signal des spins S sans appliquer les pulses  $\pi$  sur les spins I, c'est l'écho-complet ( $S_0$ ) puis on enregistre l'écho-réduit ( $S_r$ ) en appliquant cette fois ci des impulsions  $\pi$  toutes les demi-périodes de rotor sur les spins I. En incrémentant le nombre de périodes de rotor par  $2\text{Tr}$  pour chacune des deux expériences (on ajoute une période de rotor avant et après l'impulsion  $\pi$  sur le spin S), on peut tracer la courbe de déphasage REDOR  $S_r/S_0$  au cours du temps (figure 2.27).



**Figure 2.26 : Séquence d'impulsion REDOR pour deux périodes de rotor puis pour 8 périodes de rotor.**



**Figure 2.27** : Courbe de déphasage REDOR simulée avec SIMPSON/SIMMOL [136] pour une paire de spin isolée ( $I=1/2$ ) avec une valeur de couplage dipolaire hétéronucléaire  $D= 200$  Hz.

*Cas d'une paire de spins I-S isolée :*

L'orientation de ces paires de spins est définie dans le référentiel du rotor par des couples d'angles ( $\alpha, \beta$ ). Si l'on considère une paire de spin I-S isolée, d'un échantillon de poudre, les paires de spins I-S sont orientées dans toutes les directions et toutes ces paires contribuent au déphasage de la courbe REDOR. L'expression analytique de la courbe de déphasage est :

$$\frac{S_r}{S_0} = \frac{1}{4\pi} \int_{\alpha=0}^{2\pi} \int_{\beta=0}^{\pi} \cos(NDTr4\sqrt{2} \sin\beta \cos\beta \sin\alpha) \sin\beta d\beta d\alpha \quad (2.19)$$

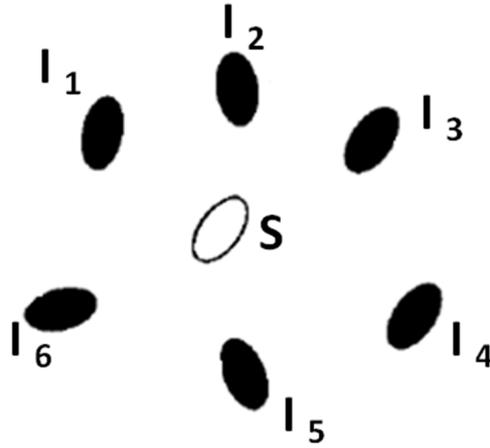
Où  $N$  est le nombre de périodes de rotor,  $Tr = 1/\omega_r$  (avec  $\omega_r$  la fréquence de rotation en Hertz) et  $D$  est la constante de couplage dipolaire hétéronucléaire en Hz qui vaut :

$$D = \frac{h\gamma_I\gamma_S}{r_{IS}^3 4\pi^2}$$

La fréquence des oscillations de la courbe (figure 2.28) est fonction de la valeur de l'interaction dipolaire. On peut ainsi obtenir sa valeur en faisant la transformée de Fourier du déphasage REDOR. En effet, l'écart entre les deux épaulements du spectre est égal à :  $\frac{2\sqrt{2}}{\pi}D$ .

**Cas multispins [133]:**

Cependant, dans la très grande majorité des échantillons, on ne trouve pas de paires de spins isolées. En effet, le spin S observé est couplé à N spins I comme le montre la figure 2.28. Dans ce cas-là, on parle d'un système multispins.



**Figure 2.28 : Exemple de système multispins [133].**

Il faut alors tenir compte de l'orientation de chaque paire de spins par rapport aux autres contrairement au cas d'une paire de spins isolée. En supposant que les interactions homonucléaires (I-I) et (S-S) sont négligeables, la courbe de déphasage après N périodes de rotation d'un tel système est donnée par :

$$\frac{S_r}{s_0} = \frac{1}{8\pi^2} \int_{\alpha=0}^{2\pi} \int_{\gamma=0}^{2\pi} \int_{\beta=0}^{\pi} \prod_{k=1}^{N_I} \cos\left(\frac{2\sqrt{2}}{3}ND_k T_r (C_1^{(k)} \sin\gamma - S_1^{(k)} \cos\gamma)\right) \sin\beta d\beta d\gamma d\alpha \quad (2.20)$$

$D_k$  est la constante de couplage dipolaire hétéronucléaire entre le spin S et le spin  $I_k$ , les coefficients  $S_1^{(k)}$  et  $C_1^{(k)}$  qui sont donnés par :

$$C_1^{(k)} = 3(1 - 2\cos^2\beta)\sin 2\chi_k \cos\Gamma_k + 3(\sin^2\chi_k \cos 2\Gamma_k - 3\cos^2\chi_k + 1)\sin\beta \cos\beta$$

$$S_1^{(k)} = 3(\sin 2\chi_k \sin\Gamma_k \cos\beta - \sin^2\chi_k \sin 2\Gamma_k \sin\beta)$$

Où les angles entre le système d'axes principaux de l'interaction dipolaire  $k$  et le référentiel de la molécule sont définis par  $(\Psi_k, \chi_k, \zeta_k)$ . Ce référentiel est lui-même repéré dans le système des axes du rotor par les angles  $(\alpha, \beta, \gamma)$ . De plus, on pose :  $\Gamma_k = \alpha + \zeta_k$ .

Le calcul du déphasage REDOR est possible pour un nombre  $k$  de spins  $I$ , si l'on connaît les positions de tous ces spins.

## Chapitre 3 :

# Clonage, expression et purification du peptide P-LAH<sub>4</sub>

### 3.1-Introduction

Afin de comprendre le mécanisme d'action antibactérien ou encore de transfection du peptide LAH<sub>4</sub> il est nécessaire de disposer de peptides marqués par des isotopes <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>2</sup>H pour pouvoir faire des études structurales par RMN. Jusqu'à présent, la production du peptide ne s'est faite que par synthèse peptidique et permettait des marquages sélectifs seulement sur certains résidus car le marquage uniforme devient rapidement cher.

Le marquage des peptides dans un système recombinant comme *E. coli* est devenu une alternative face à la synthèse peptidique en phase solide qui de plus requiert l'utilisation de solvants chers et toxiques. En outre, ce système d'expression permet le marquage uniforme des protéines à un coût largement réduit comparé à la synthèse peptidique. Mais malheureusement rien ne garantit la production de la protéine d'intérêt. En effet, l'expression de gènes étrangers par *E. coli* échoue souvent à cause de la toxicité de la protéine d'intérêt envers son hôte. Ce qui est encore plus vrai lorsque l'on souhaite produire des peptides antimicrobiens, comme c'est le cas pour notre peptide LAH<sub>4</sub> (KKALLALALHHLAHLALHLALALKKA). En effet, il a été montré que ce peptide était capable d'inhiber complètement la croissance des bactéries *E. coli* à partir de 10 μM à pH=5,5 et à partir de 350 μM à pH= 7,5 [41]. La stratégie employée pour contourner la toxicité des peptides antimicrobiens pendant l'expression, est l'utilisation d'un partenaire de fusion [145], qui aboutit à la production d'une plus grande protéine, contenant la séquence peptidique d'intérêt, qu'il faudra cliver par la suite pour récupérer le peptide antibactérien.

Les partenaires de fusion employés pour l'expression de ces peptides permettent de produire le peptide de manière soluble en utilisant par exemple la GST [140], ou encore la thioredoxine [148,149]. Mais, dans la plus grande majorité des cas, l'expression des peptides antibactériens se fait de façon insoluble [137, 142-144, 146, 147, 151] car la formation de corps d'inclusion semble être un bon moyen de neutraliser leur toxicité. Pour cela, plusieurs peptides antibactériens ont été produits en utilisant des partenaires de fusion insoluble comme la polyedrine du baculovirus [137], la ketostéroïde isomérase [144] ou encore un fragment de

l'opéron tryptophane [143]. Parfois, même en utilisant des protéines de fusion soluble la protéine s'exprime sous forme de corps d'inclusion [142]. Le tableau 3.1 résume la production de quelques peptides antibactériens et montre les partenaires de fusion utilisés, les méthodes de clivage, ainsi que les quantités obtenues.

Peptide Antimicrobien	Partenaire de fusion	Nature de la protéine	Clivage	Quantité de peptide purifié ( mg/L de culture)	références
Halocidin-18	Polyedrine du baculovirus	insoluble	Hydroxylamine	0,52	[137]
Derivé de magainine MSI-344	Amidophosphorybosyle Transferase tronquée	insoluble	Hydroxylamine	150	[145]
LF12	Ketostéroïde isomérase	insoluble	Bromure de Cynogene	6	[144]
Piscidine	Ubiquitine	insoluble	YUH ( yeast ubiquitin hydrolase )	1,5	[142]
défensine- $\alpha$	Fragment de l'opéron tryptophane	insoluble	CNBr	2 à 3	[143]
P2	Prochymosine Bovine	insoluble	CNBr	0,37	[151]
Perinerin	thiorédoxine	soluble	Factor Xa	1,2	[149]
défensine - $\beta$ humaine	Thioredoxine A	soluble	entérokinase	210	[148]
LL-37	GST	soluble	Factor-Xa	0,3	[140]
Buforin II	Peptide avec résidus acides	insoluble	CNBr	107	[147]

**Tableau 3.1 : Tableau résumant les partenaires de fusion, la solubilité, les méthodes de clivage utilisées ainsi que les quantités obtenues pour l'expression de quelques peptides antimicrobiens chez E. coli.**

La première tentative de production du peptide LAH<sub>4</sub> chez *E. coli* a été réalisée par le Dr. Prongidi-Fix. Elle a montré que l'expression du peptide en fusion avec la GST était possible. La protéine s'exprimait alors de façon insoluble et se trouvait dans les corps d'inclusion et cela malgré la solubilité de la GST. Mais des difficultés concernant la purification et le clivage de la protéine de fusion ont été rencontrées à cause de l'agrégation du peptide (les détails seront donnés dans la partie 3.2). Il était donc nécessaire de mettre au point un protocole complet et efficace pour pouvoir produire le peptide en quantité suffisante (quelques mg) pour pouvoir faire des études structurales par RMN.

Dans ce chapitre, nous décrivons les différentes stratégies qui ont été utilisées (choix du site de clivage, méthodes de purification, choix du partenaire de fusion) pour contourner les problèmes rencontrés précédemment. Nous verrons aussi les méthodes qui ont permis une production optimale du peptide LAH<sub>4</sub> chez *E. coli* (10 mg/L de culture) et montreront que celle-ci sont applicables à d'autres peptides antimicrobiens.

### **3.2-Résultats préalables**

Des études préalables ont montré que le peptide LAH<sub>4</sub> s'exprime avec la GST comme partenaire de fusion. Un site de clivage enzymatique entérokinase (DDDDK) a été introduit entre la séquence codant la GST et LAH<sub>4</sub> afin de pouvoir libérer le peptide. La protéine de fusion GST-EK-LAH<sub>4</sub> s'exprime dans les corps d'inclusion mais le problème majeur était sa renaturation afin de pouvoir la purifier sur résine d'affinité Gluthation-S-transférase (Thèse Prongidi-Fix, 2005, ULP, Strasbourg). La solution apportée était donc de rajouter une séquence tag contenant six histidines consécutives (HisX6) afin de pouvoir purifier la protéine dans des conditions dénaturantes. La nouvelle protéine de fusion GST- HisX6-EK-LAH<sub>4</sub> a été exprimée et se trouve dans la fraction insoluble. Cette protéine a été resolubilisée dans 8M urée et purifiée sur résine de cobalt. Pour pouvoir cliver la protéine de fusion, il était nécessaire de diminuer la concentration en urée, car le clivage par l'entérokinase n'est efficace que pour des concentrations inférieures à 2 M d'urée. La concentration d'urée dans laquelle se trouve la protéine purifiée a donc été diminuée par dialyse. Pour des concentrations inférieures à 4 M d'urée la protéine s'agrège. Le clivage enzymatique par l'entérokinase a été testé, mais il n'est pas suffisamment efficace dans ces conditions dénaturantes et par conséquent ne permet pas la production de quelques mg de LAH<sub>4</sub>.

La solution apportée à ce problème était donc d'introduire un site de clivage chimique (site méthionine : clivage par le bromure de cyanogène) qui permettrait de couper la protéine de fusion dans des conditions dénaturantes. Mais cette fois-ci, la protéine GST-HisX6-Met-LAH<sub>4</sub> n'était plus détectable sur gel de polyacrylamide 15 % (V.Vidovic, stage Master 2).

### **3.3-Expression de LAH<sub>4</sub> avec la GST comme partenaire de fusion : effet des charges négatives sur l'expression.**

#### **3.3.1- Introduction**

Afin de pouvoir continuer à cliver dans des conditions dénaturantes, le site de clivage méthionine a été remplacé par un autre site de clivage chimique : site DP (clivage par de l'acide formique) qui laisse cependant une proline du côté N-ter du peptide.

Deux nouveaux vecteurs d'expression ont été construits possédant tous deux un site de clivage chimique DP mais dont un possède en plus un site entérokinase (EK), qui correspond à la séquence anionique DDDDK. En effet, un des vecteurs code pour la protéine de fusion : GST-HisX6-DP-LAH<sub>4</sub> et l'autre, pour la GST-HisX6-EK-DP-LAH<sub>4</sub>. Ensuite des tests d'expression des différentes protéines de fusion différant par leur site de clivage (EK, méthionine, DP) et par la présence du site DDDDK, ont été réalisés.

#### **3.3.2-Matériel et Méthodes**

##### **3.3.2.1- Matériel.**

**Souches Bactériennes** : One shot TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA), BL21 (DE3) (Invitrogen).

**Enzymes** : *NotI*, *BamHI*, *SacI*, Vent Polymérase, T4 DNA ligase et la phosphatase alcaline intestinale de veau (CIP) proviennent de New England Biolabs (Ipswich, MA).

La DNase I et le lysozyme proviennent de Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO).

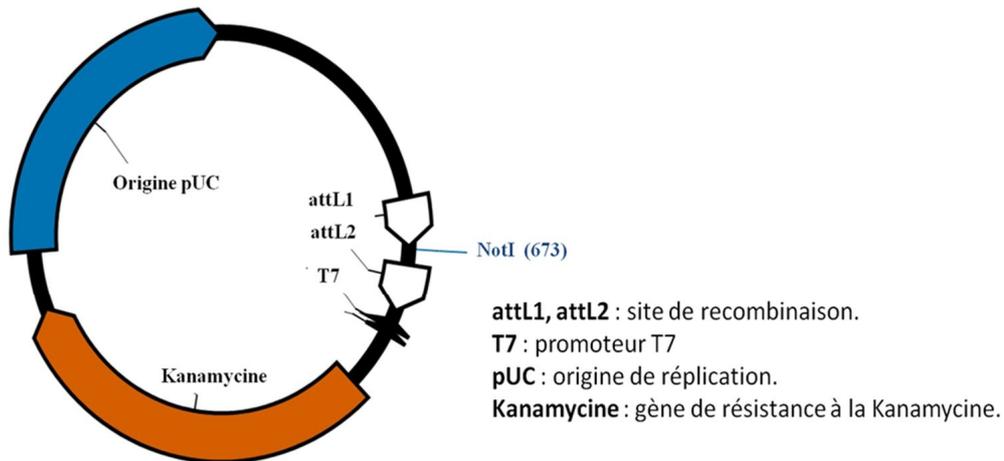
**Purification d'ADN** : Qiaquick gel extraction kit provient de Qiagen (Venlo, Pays-Bas).

**Préparation plasmidique**: Nucleospin Plasmid, Macherey Nagel (Dueren, Allemagne).

**Plasmides** : Les plasmides utilisés sont répertoriés dans le tableau 3.2.

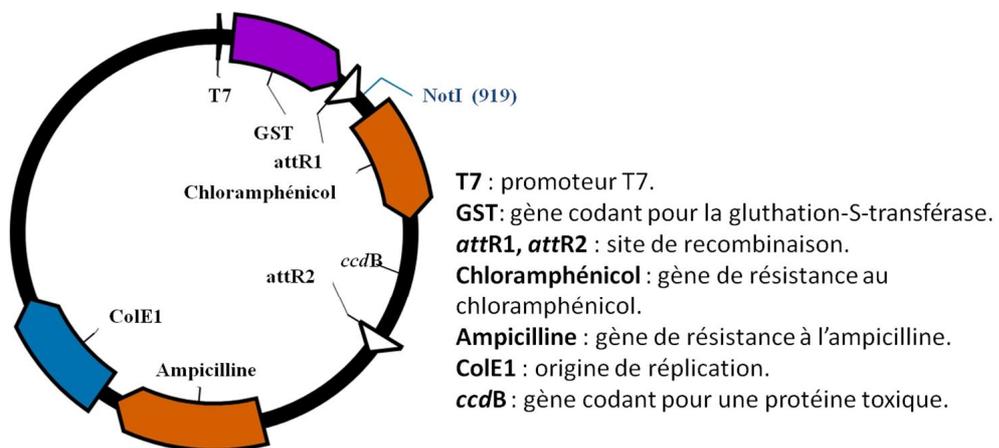
<b>Plasmides</b>	<b>caractéristiques</b>	<b>Provenance/ schéma</b>
<b>pENTR/D-TOPO</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vecteur linéaire avec la topoisomérase liée de façon covalente sur ses deux extrémités</li> <li>- Site de recombinaison attL1 et attL2</li> <li>- Résistance à la kanamycine</li> <li>- Origine de répllication pUC</li> </ul>	Invitrogen Figure 3.1
<b>pDEST15</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Résistance à l'ampicilline, chloramphénicol</li> <li>- Promoteur T7</li> <li>- Fusion avec la GST en N-ter</li> <li>- Site de recombinaison attR1 et attR2</li> </ul>	Invitrogen Figure 3.2
<b>pDEST15- HisX6 - EK-LAH<sub>4</sub></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Résistance à l'ampicilline</li> <li>- Promoteur T7</li> <li>- exprime la protéine GST-HisX6-LAH<sub>4</sub></li> <li>- clivage de la fusion par l'entérokinase</li> </ul>	Laboratoire Figure 3.3
<b>pDEST15- HisX6 - Met-LAH<sub>4</sub></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Résistance à l'ampicilline</li> <li>- Promoteur T7</li> <li>- exprime la protéine GST-HisX6-LAH<sub>4</sub></li> <li>- Clivage de la fusion par le bromure de cyanogène</li> </ul>	Laboratoire le site EK est remplacé par une méthionine.

**Tableau 3.2 : Tableau regroupant les plasmides utilisés ainsi que leurs caractéristiques.**



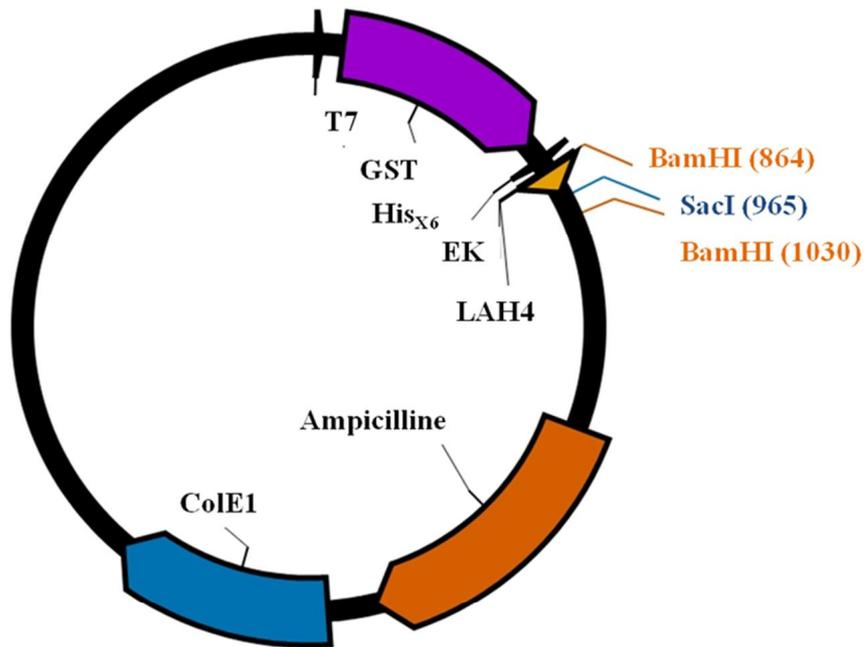
**pENTR/D-TOPO**  
 2580 bp

**Figure 3.1 : Représentation schématique du vecteur d'entrée pENTR/D-TOPO**



**pDEST15**  
 7013 bp

**Figure 3.2 : Représentation schématique du vecteur de destination pDEST15.**

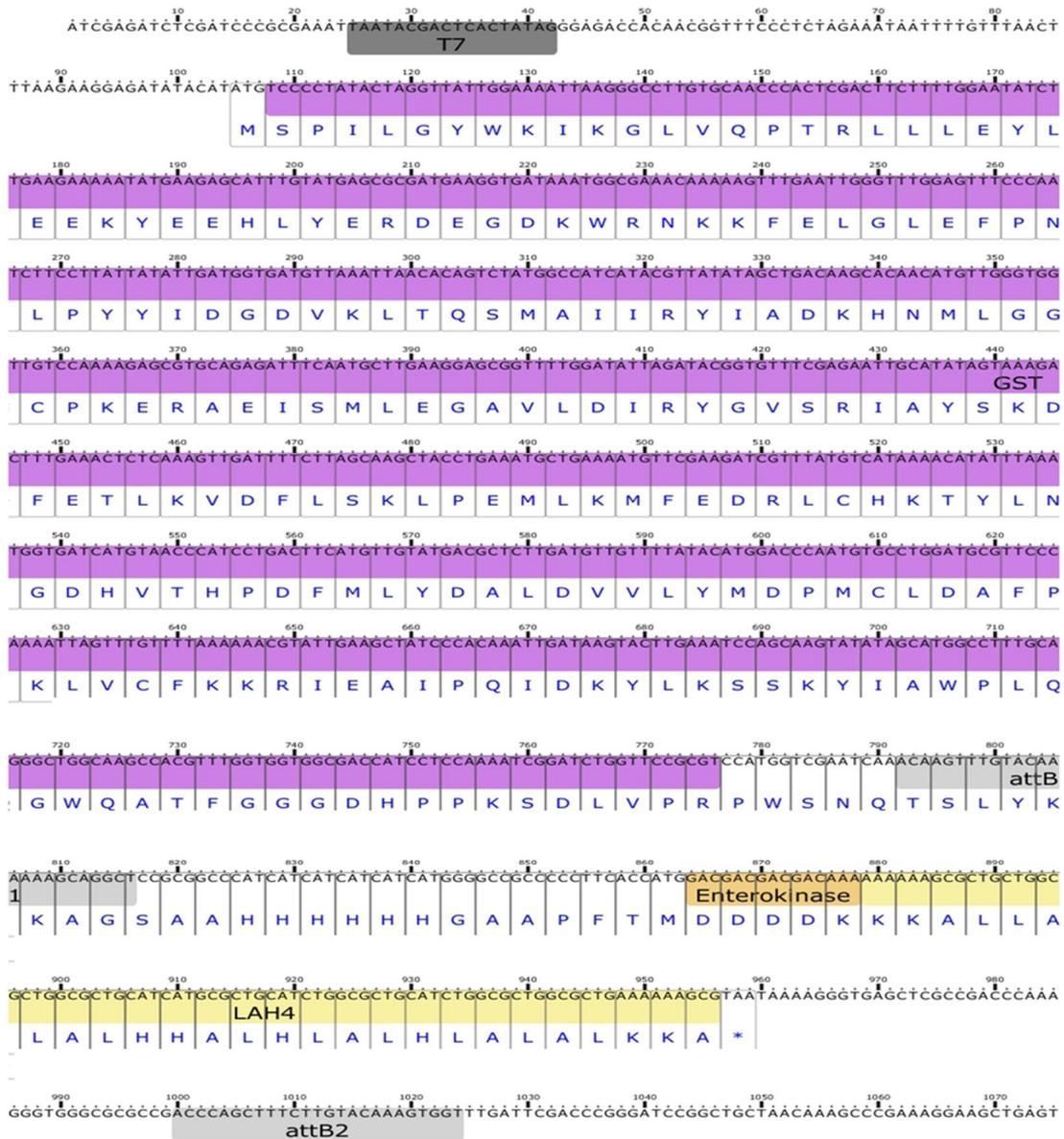


**pDEST15-HisX6-EK-LAH<sub>4</sub>**

**5532 bp**

**Figure 3.3 : Représentation schématique du vecteur pDEST15-HisX6-EK-LAH<sub>4</sub>**

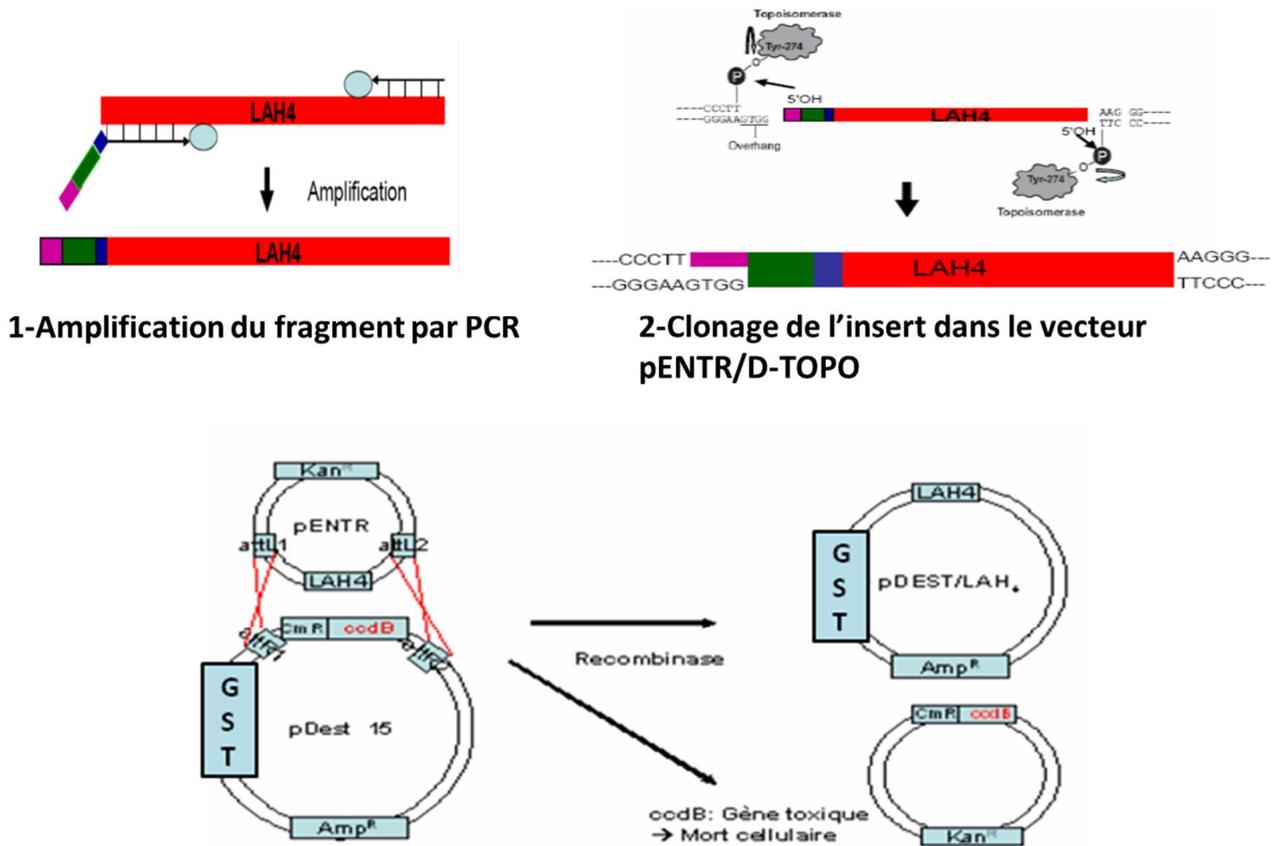
La figure 3.4 représente la séquence protéique de la protéine de fusion GST-HisX6-EK-LAH<sub>4</sub>



**Figure 3.4 : Séquence protéique de la protéine de fusion GST-HisX6-EK-LAH4**

### 3.3.2.2- Méthodes

#### - Technique de clonage Gateway :



#### 3- Réaction de recombinaison entre le vecteur d'entrée et le vecteur de destination.

1- La Vent Polymérase (cercle bleu) permet l'amplification par PCR du gène à insérer. Ce gène contient le site de reconnaissance de la topoisomérase (violet), un site de clivage (bleu) et le gène codant pour le peptide d'intérêt LAH<sub>4</sub>.

2- La construction du vecteur d'entrée est réalisée par une réaction de clonage catalysée par la Topoisomérase I du Vaccina virus. Elle permet un clonage directionnel entre le vecteur linéaire pENTR/D-TOPO et l'insert.

Les groupements 5' hydroxyles du gène à cloner, réalisent une attaque nucléophile sur les phosphates du vecteur pENTR liés à la topoisomérase et permettent donc un clonage unidirectionnel du gène.

3- Réaction de recombinaison entre pENTR, (construit en 2) qui contient les sites de recombinaison attL1 et attL2, et le vecteur de destination pDEST15 qui contient les sites attR1 et attR2. La réaction est réalisée par un mélange d'enzymes (LR Clonase Enzyme Mix : intégrase du bactériophage, des excisionases et des protéines IHF (Integration Host Factor). La présence du gène ccdB codant pour une protéine toxique permet d'exclure tous les vecteurs qui ne possèdent pas le gène d'intérêt.

Figure 3.5 : Les différentes étapes permettant de construire un vecteur d'expression par la technique Gateway.

### **3.3.2.2.1- Construction des vecteurs d'expressions exprimant la protéine de fusion GST-HisX6-DP-LAH<sub>4</sub> et GST-HisX6-EK-DP-LAH<sub>4</sub>**

#### **Production par PCR des fragments codant pour DP-LAH<sub>4</sub> et EK-DP-LAH<sub>4</sub> :**

Le fragment contenant la séquence codant pour DP-LAH<sub>4</sub> est construit par PCR en utilisant l'amorce 5' CACC ATG GAT CCG AAA AAA GCG CTG CTG GCG 3' qui contient le site de reconnaissance de la topoisomérase I (CACC), le site de clivage DP (GAT CCG) et l'amorce 5' TGG GTC GGC GAG CTC ACC CTT TTA TTA CGC TTT 3'. Le fragment contenant la séquence codant pour EK-DP-LAH<sub>4</sub> est construit par PCR en utilisant les amorces 5' CAC CAT GGA CGA CGA CGA CCC GAA AAA AGC GCT GCT G 3' et 5' TGG GTC GGC GAG CTC ACC CTT TTA TTA CGC TTT 3'. La réaction de PCR est effectuée dans un volume de 100 µL contenant 10 µL de tampon de PCR X 10, 4 nmol de dNTP X 10, 20 pmol de chacune des amorces, 65 fmol de matrice pDEST15-HisX6-EK-LAH<sub>4</sub> et 2,5 U de Vent Polymérase. La réaction de PCR se fait dans un thermocycleur et débute par une incubation de 5 min à 95°C, suivie de 30 cycles composés chacun d'une étape de dénaturation des deux brins d'ADN de la matrice (30 s, 94 °C), une étape d'hybridation des amorces (30 s, 50 °C) et une étape de polymérisation (30 s, 72 °C). Les produits sont visualisés sur gel d'agarose 2 % (m/v), colorée au bromure d'éthidium, par transillumination UV. Les produits de PCR sont purifiés par extraction sur gel d'agarose par kit Qiagen (selon le protocole du fabricant) (étape 1, figure 3. 5)

#### **Clonage des fragments de PCR dans le vecteur pENTR/D-TOPO :**

Les fragments de PCR purifiés, sont clonés de façon unidirectionnelle dans le vecteur pENTR/D-TOPO (étape 2, figure 3.5). En effet, 1 µL soit 20 ng de vecteur linéaire sont mélangés à 0,5 µL soit 1 ng de produit de PCR purifié et à 1 µL de solution saline (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl<sub>2</sub>), de l'eau stérile est ajoutée pour obtenir un volume final de 6 µL. Le mélange est incubé 15 min à température ambiante.

- **Transformation de bactéries compétentes chimiquement One shot TOP10 :**

La solution précédente a été ajoutée à 50  $\mu\text{L}$  de cellules bactériennes. Les cellules sont incubées 15 min dans la glace. Elles sont ensuite placées 30 s à 42 °C puis transférées immédiatement dans la glace. Ce choc thermique permet d'accentuer la déstabilisation de la bicouche lipidique et de stimuler la pénétration de l'ADN plasmidique dans les cellules. 250  $\mu\text{L}$  de milieu LB ont été ajoutés. Les cellules sont alors placées à 37°C sous agitation (250 rpm) pendant une heure. 30  $\mu\text{L}$  de cellules sont étalés sur boîte LB contenant 50  $\mu\text{g/ml}$  de kanamycine et incubés toute la nuit à 37°C.

- **Criblage des colonies :**

Cinq colonies sont testées pour la présence de l'insert, son orientation et sa séquence. Tout d'abord, une PCR (dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment) est réalisée directement sur les colonies isolées remises en suspension dans le milieu réactionnel, en présence des amorces adéquates. Le produit de PCR est analysé sur gel d'agarose 2 % et permet de mettre en évidence la présence de l'insert. Une préparation plasmidique est réalisée pour chaque souche donnant un résultat positif par PCR. Finalement, les vecteurs pENTR/D-TOPO contenant la séquence codant pour DP-LAH<sub>4</sub> ou EK-DP-LAH<sub>4</sub> ont été séquencés pour s'assurer de la bonne séquence (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Allemagne).

- **Réaction de Recombinaison :**

Une fois que les séquences des vecteurs précédemment construits ont été vérifiées, les vecteurs d'expression codant pour la GST-DP-LAH<sub>4</sub> ou GST-EK-DP-LAH<sub>4</sub> sont créés par une réaction de recombinaison entre le vecteur pENTR/D-TOPO modifié contenant la séquence (DP-LAH<sub>4</sub>) ou la séquence (EK-DP-LAH<sub>4</sub>) et le vecteur pDEST15 (étape 3, figure 3.5). Brièvement, 2  $\mu\text{L}$  de plasmide pENTR/D-TOPO modifiés (150 ng/ $\mu\text{L}$ ) sont mélangés à 2  $\mu\text{L}$  de vecteur pDEST15 (150 ng/ $\mu\text{L}$ ), 8  $\mu\text{L}$  de tampon TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA) et 4  $\mu\text{L}$  de LR Clonase enzyme Mix. La réaction est incubée 1 heure à 25°C puis 2  $\mu\text{L}$  de solution de protéinase K (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) sont ajoutés au mélange et l'ensemble est incubé 10 min à 37°C. 2  $\mu\text{L}$  de la réaction de recombinaison sont utilisés pour transformer les bactéries One shot TOP10. La transformation des cellules ainsi que le criblage des colonies sont faites

de la même manière que précédemment mais dans un milieu LB contenant 50 µg/mL d'ampicilline.

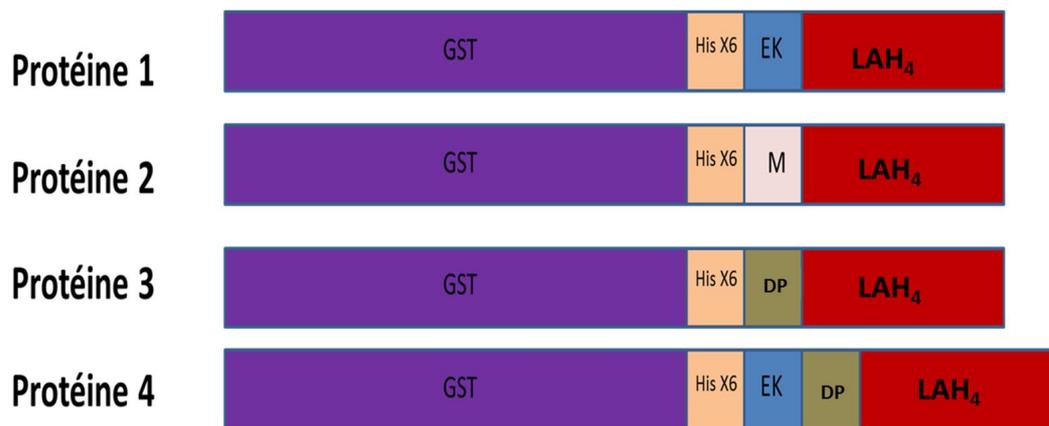
- **Introduction d'un Histag dans les vecteurs d'expression**

Un fragment codant six histidines (HisX6) et qui possède des extrémités cohésives avec le site de restriction *NotI* (présent sur les vecteurs pDEST15) a été construit par hybridation des deux brins d'ADN 5' GGC CCA TCA TCA TCA TCA TCA TGG 3' et 5' GGC CCC ATG ATG ATG ATG ATG ATG 3. Brièvement, une solution de 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 M Tris-HCl pH=7,3 contenant 20 µg de chacun des deux brins est chauffée à 100 °C puis laissée refroidir progressivement à température ambiante.

Afin d'introduire le site de purification HisX6, les vecteurs pDEST15-DP-LAH<sub>4</sub> et pDEST15-EK-DP-LAH<sub>4</sub> construits précédemment (pDEST15 modifiés) sont digérés par *NotI*. La réaction de digestion est réalisée dans un volume total de 20 µL contenant 2 µL de tampon de digestion X 10, 1 µg de vecteur pDEST15 modifié et 5 U d'enzyme de restriction *NotI* pendant 3 heures à 37 °C. Pour éviter la ligation du vecteur sur lui-même, après 2 heures de digestion, les extrémités 5' des vecteurs sont dephosphorylées par l'ajout de 1 µL CIP. Les produits de digestion sont purifiés par kit Qiagen. La ligation du fragment contenant la séquence HisX6 avec les vecteurs pDEST15 modifiés et digérés, se fait dans un volume de 10 µL. Différents rapports en masse molaire (MM) d'insert/vecteur de 25, 50, 75 et 100 ont été préparés. A ces différentes rapports 1 µL de tampon de ligation (300 mM Tris-HCl pH=7,8, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 10 mM ATP) et 1 U de T4 ADN ligase ont été ajoutés. Le mélange est laissé incubé à 20 °C pendant 4 heures.

Pour éliminer les vecteurs qui se seraient renfermés sur eux-mêmes sans avoir incorporé le Histag, une digestion de la réaction de ligation est effectuée avec *NotI*. En effet, les vecteurs qui se sont liés avec le fragment contenant l'Histag ne possèdent plus la séquence palindromique de coupure de *NotI* et par conséquent ne seront pas digérés. 10 µL de chaque produit de ligation sont mélangés à 2 µL de tampon de digestion, 0,2 µL de BSA, 37,3 µL d'eau stérile et 0,5 µL de *NotI*. Le mélange est incubé à 37°C pendant une heure. 5 µL du mélange de réaction sont utilisés pour transformer les bactéries One shot TOP10. La transformation des cellules ainsi que le criblage des colonies sont fait de la même manière que précédemment. Pour finir, les vecteurs ont été séquencés (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Allemagne).

**3.3.2.2.2- Test d'expression des protéines de fusion: GST-His<sub>X6</sub>-DP-LAH<sub>4</sub>, GST-His<sub>X6</sub>-EK-DP-LAH<sub>4</sub>, GST-His<sub>X6</sub>-EK-LAH<sub>4</sub> et GST-His<sub>X6</sub>-EK-Met-LAH<sub>4</sub>**



**Figure 3.6: Représentation des protéines de fusion qui diffèrent par leur site de clivage (protéine 1 : site de clivage enzymatique entérokinase (EK), protéine 2 : site de clivage chimique méthionine (M), protéine 3 : site de clivage chimique aspartate-proline (DP)) protéine 4 : correspond à la protéine 3 mais avec un site EK supplémentaire.**

150 ng de chacun des vecteurs pDEST15 modifiés, codant pour les différentes protéines de fusion (figure 3.6), sont mélangés à 50 µL de cellules compétentes BL21(DE3). Les cellules sont transformées comme précédemment. 20 µL et 80 µL de chaque transformation sont étalés sur boîte LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline.

Une préculture (LB supplémenté d'ampicilline à une concentration finale de 50 µg/mL), issue d'une seule colonie est incubée une nuit à 37°C, 250 rpm.

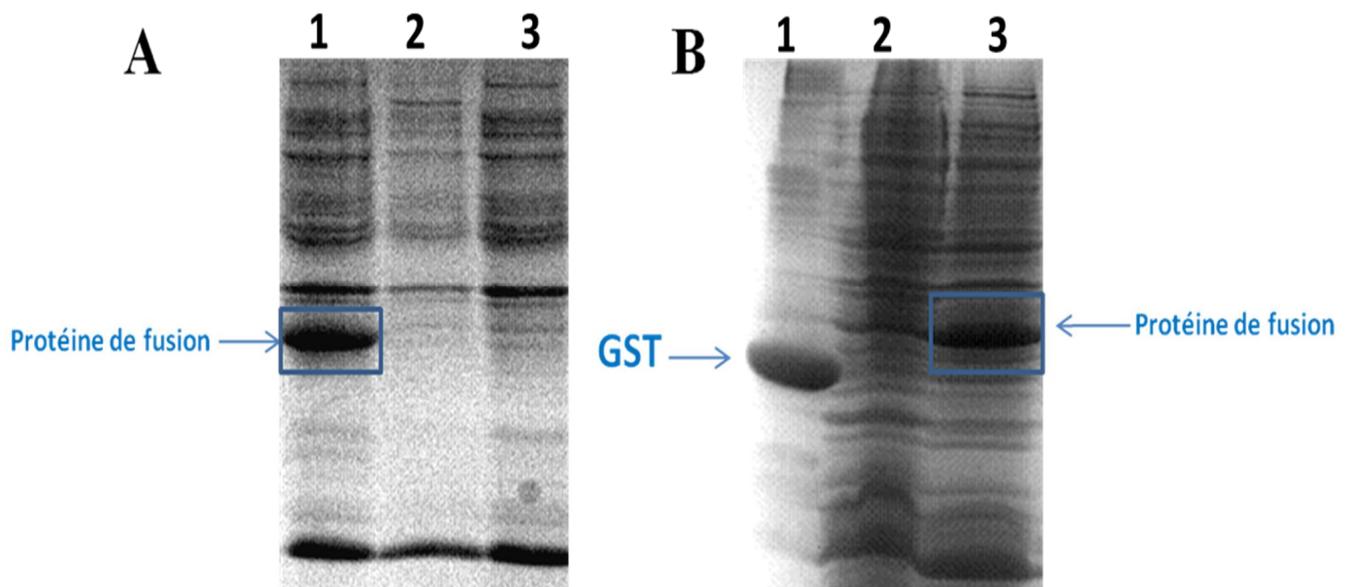
Chacune des précultures est ensuite diluée avec du milieu LB (1 : 100 (v/v)), l'ampicilline est ajoutée à une concentration finale de 50 µg/mL ainsi que 1 % de glucose (m/v) pour avoir un volume final de 10 mL. Les cultures sont incubées à 37 °C, sous agitation (250 rpm). Quand la DO à 600 nm a atteint la valeur de 0,6, l'expression de chacune des protéines de fusion est induite par ajout d'IPTG à une concentration finale de 1 mM. Un témoin négatif sans IPTG est réalisé de la même manière, pour chacune des cultures. Ensuite, celles-ci sont incubées à 37 °C, sous agitation pendant 3 heures. Les cellules sont centrifugées à 4 000 g pendant 20

minutes, 4°C. Les culots sont resuspendus dans 1 mL de tampon de lyse, puis 25 µL de DNase I (2 mg/mL), 50 µL de lysozyme (2 mg/mL) ont été ajoutés. Le tout est laissé à température ambiante sous agitation (10 rpm) pendant une heure pour permettre la lyse des cellules. 1/100 (v/v) des lysats totaux sont déposés sur SDS-PAGE 15 % [153].

### 3.3.3-Résultats et discussions

Tout d'abord, les vecteurs d'expression qui codent pour la protéine GST-HisX6-DP-LAH<sub>4</sub> et la protéine GST-HisX6-EK-DP-LAH<sub>4</sub> ont été construits par clonage des gènes DP-LAH<sub>4</sub> et EK-DP-LAH<sub>4</sub> construit par PCR, dans un vecteur d'entrée pENTR/D-TOPO. Les gènes sont ensuite introduits dans un vecteur d'expression pDEST15 qui contient la GST (24,5 kDa) comme partenaire de fusion en N-ter. La technique Gateway a permis un clonage directionnel des gènes. Les vecteurs d'expression sont sélectionnés par une double pression de sélection. Une sélection positive en présence d'ampicilline permet d'exclure les vecteurs qui ne se sont pas recombines. Une sélection négative, par la présence du gène *ccdB* codant pour une protéine toxique, permet d'exclure tous les vecteurs qui ne possèdent pas le gène d'intérêt (figure 3.6). Les vecteurs ont été séquencés pour vérifier la séquence et le bon cadre de lecture.

L'expression des trois protéines de fusion GST-HisX6-EK-LAH<sub>4</sub>, GST-HisX6-Met-LAH<sub>4</sub> et GST-HisX6-DP-LAH<sub>4</sub> différant uniquement par leur site de clivage, a été testée. La figure 3.7-A montre l'expression des trois protéines de fusion pour 100 µL de culture bactérienne. Le gel montre que la seule protéine de fusion qui s'exprime est la GST-HisX6-EK-LAH<sub>4</sub> car on observe une bande intense correspondant à une taille d'environ 27 kDa qui serait la taille de la protéine de fusion attendue. Le site entérokinase qui code pour la séquence DDDDK serait donc nécessaire à l'expression du peptide LAH<sub>4</sub>. Ce site contient des acides aminés chargés négativement qui inhiberaient la toxicité du peptide durant l'expression. Ainsi, le nouveau vecteur d'expression codant pour la GST-HisX6-EK-DP-LAH<sub>4</sub> a été conçu. La figure 3.7-B montre que cette fois ci en réincorporant le site DDDDK à la protéine de fusion qui contient le site de clivage chimique DP, on retrouve à nouveau l'expression de la protéine. En effet, on observe une bande intense correspondant à une protéine d'environ 27 kDa dans le cas où l'expression est induite en présence d'IPTG et non dans le cas où il n'y a pas d'induction de l'expression de la protéine.

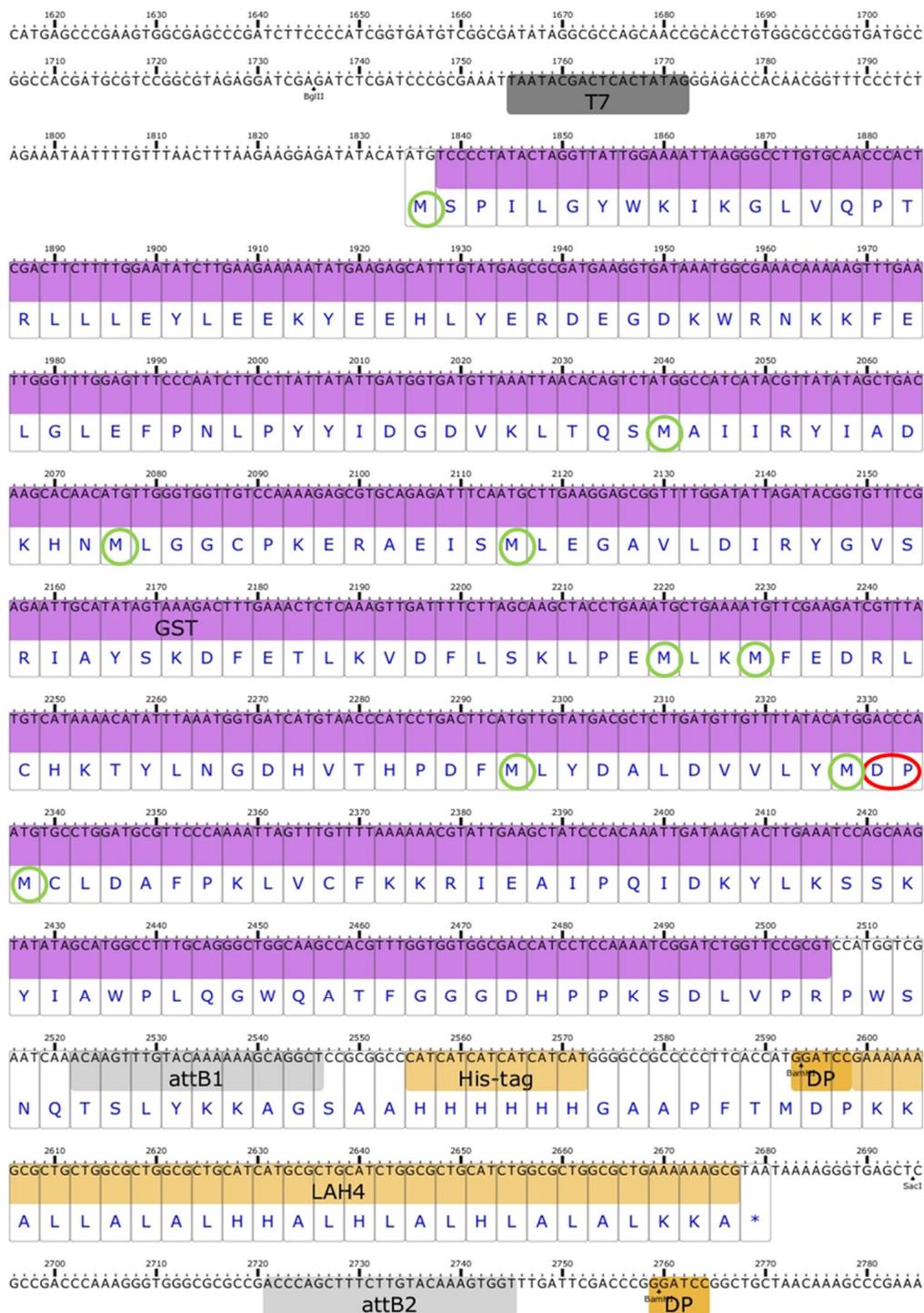


**Figure 3.7 : A- Gel SDS-PAGE (12 %) montrant l'expression ou non de la protéine de fusion GST-site de clivage-LAH<sub>4</sub> en fonction de l'incorporation de différents sites de clivage : 1 : entérokinase (EK), 2 : méthionine (Met) ou 3 : Aspartate-Proline (DP).**

**B- Gel SDS-PAGE (12 %) montrant l'expression de la protéine de fusion GST-HisX6-EK-DP-LAH<sub>4</sub> après induction à l'IPTG. 1 : la GST seule a été déposée sur le gel comme marqueur de poids moléculaire, 2 : sans IPTG, 3 : avec IPTG.**

Les résultats de ce travail montre que pour pouvoir produire le peptide LAH<sub>4</sub> il faut une protéine de fusion, un site de clivage chimique et une séquence anionique en amont de la séquence codant pour LAH<sub>4</sub>. D'autre part, Lee et al [147] ont montré qu'en plaçant une séquence de résidus chargés négativement en amont d'un peptide antimicrobien cationique, la toxicité se trouve réduite, vraisemblablement par la neutralisation des charges positives du peptide. Nos résultats sont en accord avec cette hypothèse et suggèrent que le site entérokinase (DDDDK) est une séquence efficace pour la neutralisation des quatre charges positives, correspondant aux chaînes latérales des quatre résidus lysines de LAH<sub>4</sub> à pH neutre. Le site de clivage DP a été choisi au lieu du site de clivage méthionine car il possède l'avantage d'utiliser de l'acide formique au lieu du bromure de cyanogène qui lui est toxique, mais aussi car il y a moins de séquences DP dans la protéine de fusion que de sites

méthionine. Ceci faciliterait la purification du peptide après clivage. En effet, la GST contient 1 site de clivage DP contre 9 méthionines (figure 3.8).



**Figure 3.8 : Séquence protéique de la protéine de fusion GST-HisX6-DP-LAH<sub>4</sub> montrant les résidus méthionine (entourés en vert) et la séquence DP (entourée en rouge) contenus dans la GST.**

Au même moment, dans notre laboratoire, le Dr Werten, a construit un vecteur d'expression pTIPX-4, qui permet d'utiliser le facteur de transcription humain TAF12, comme partenaire de fusion [155]. Ce partenaire de fusion possède l'avantage d'être de plus petite taille que la GST, 8 kDa contre 24,5 kDa, de s'exprimer de façon insoluble et de ne posséder aucun site DP (le seul site a été modifié par mutagenèse dirigée).

Le site entérokinase a été ajouté pour permettre l'expression de LAH<sub>4</sub>. En effet, l'expression de LAH<sub>4</sub> en fusion avec TAF12, sans le site DDDDK, a été également testée et a montré que l'expression est significativement améliorée en présence du site DDDDK.

Le tableau 3.3 résume les différents problèmes rencontrés et les solutions apportées.

<b>Vecteur d'expression</b>	<b>Expression de la protéine de fusion</b>	<b>Problèmes rencontrés</b>	<b>Solutions apportées</b>
<b>GST-EK-LAH<sub>4</sub></b>	OUI	La purification de la protéine de fusion est impossible à cause de l'agrégation.	Ajouter un Histag pour purifier la protéine dans des conditions dénaturantes.
<b>GST-HisX6-EK-LAH<sub>4</sub></b>	OUI	Clivage de la protéine de fusion inefficace en conditions dénaturantes	Changer le site de clivage par un site de clivage chimique.
<b>GST-HisX6-DP-LAH<sub>4</sub></b>	NON	Toxicité ?	La séquence anionique du site l'entérokinase semble nécessaire pour inhiber la toxicité du peptide antibactérien.
<b>GST-HisX6-EK-DP-LAH<sub>4</sub></b>	OUI	-un site DP supplémentaire est présent sur la GST. -La GST représente 80 % de la protéine de fusion.	Changer la GST par une plus petite protéine : TAF12 (8 kDa) et qui ne possède aucun site DP.

**Tableau 3.3 : Tableau résumant les problèmes rencontrés et les solutions apportées pour l'expression du peptide LAH<sub>4</sub>.**

### 3.4-Expression de LAH<sub>4</sub> avec TAF12 comme partenaire de fusion

#### 3.4.1-Matériel et Méthodes

**Plasmides** : Les caractéristiques du plasmide pTIPX-4 utilisé sont détaillées dans le tableau 3.4 ainsi que sur la figure 3.9 et 3.10.

Vecteur	Caractéristiques	Provenance
pTIPX-4	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Issu du vecteur pET-28b (Novagen) modifié en insérant le fragment BglIII- BlpI (voir figure 3.9)</li> <li>- Résistance à la Kanamycine</li> <li>- Fusion avec TAF12 HFD (dont le site DP est muté en RA) en N-ter</li> </ul>	laboratoire

Tableau 3.4 : Caractéristiques principales du vecteur pTIPX-4.

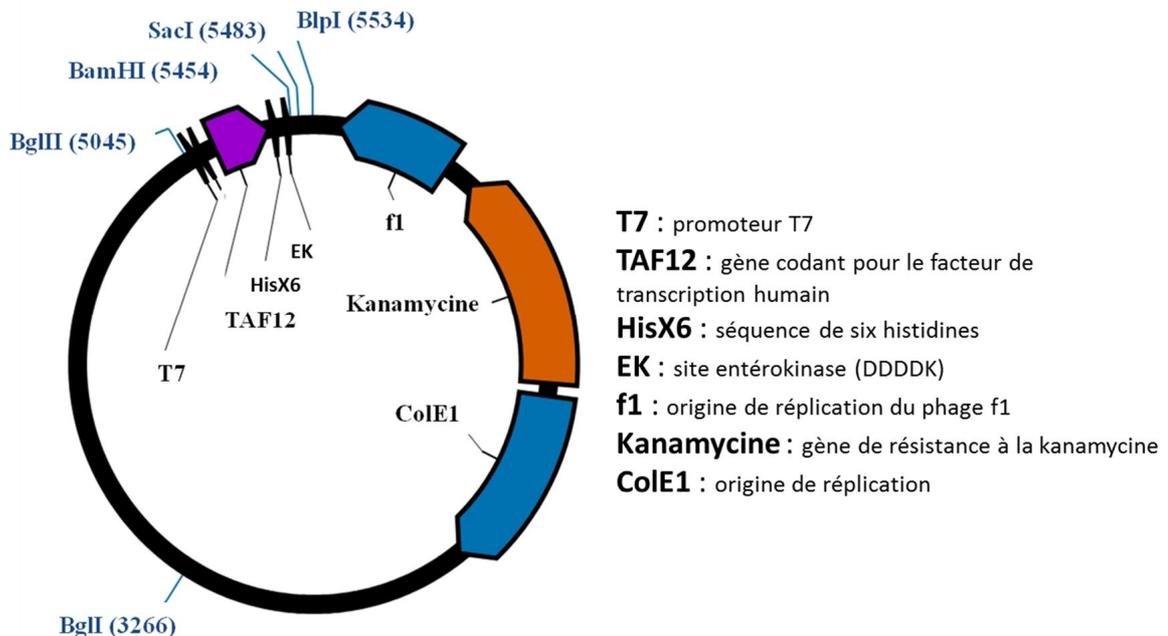
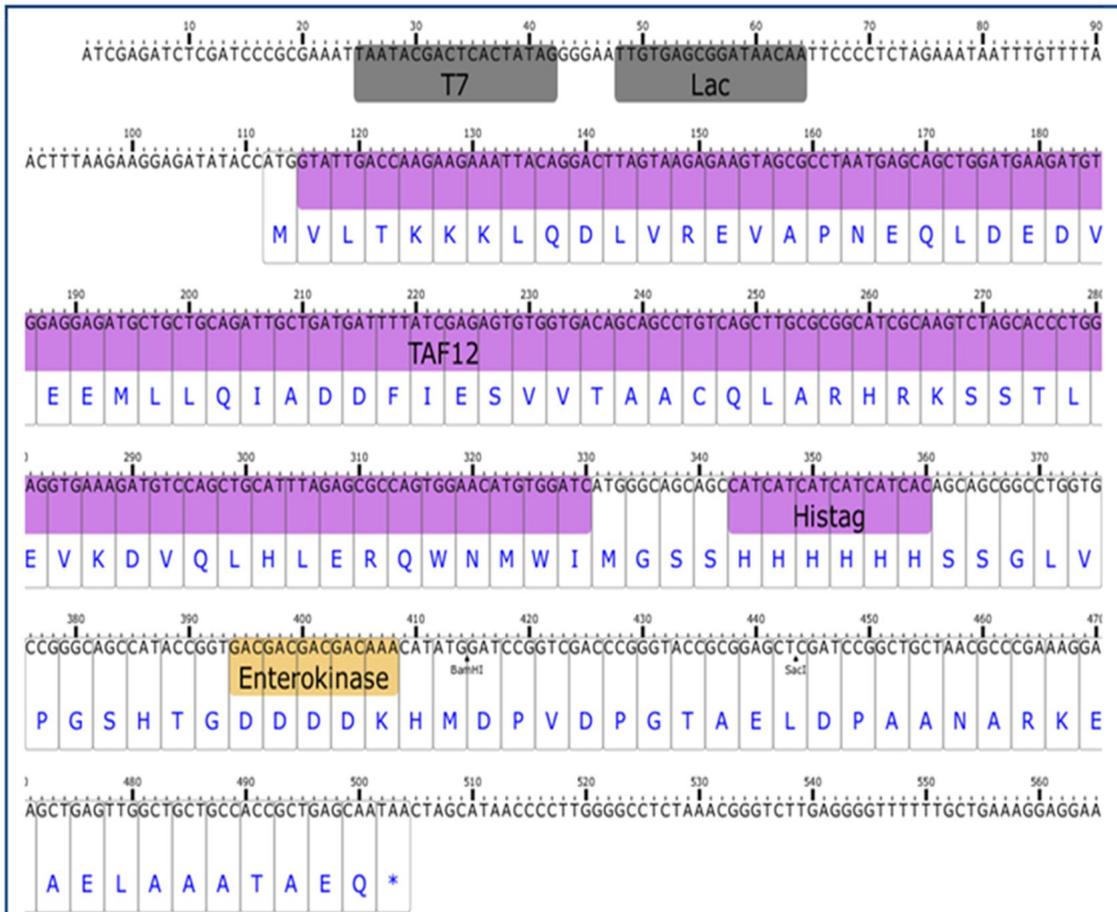


Figure 3.9 : Représentation schématique du vecteur pTIPX-4.



**Figure 3.10 : Séquence protéique de la partie codante en fusion avec TAF12.**

**Enzymes** : Les enzymes ainsi que les souches bactériennes ont été citées dans le paragraphe 3.3.2.1.

**3.4.1.1-Construction du vecteur d’expression codant la protéine de fusion :**  
**TAF12-HisX6-EK-DP-LAH<sub>4</sub>**

- **Amplification du gène par PCR :**

Pour pouvoir incorporer le gène codant LAH<sub>4</sub> dans le vecteur pTIPX-4, entre les sites *Bam*HI et *Sac*I, ce gène a été amplifié par PCR en utilisant deux amorces contenant chacune un des sites de restrictions : 5’CACCATGGATCCGAAAAAAGCGCTGCTGGCG 5’ et

5' CGGCAGGAGCTCTTACGCTTTTTTCAGGGCCAGAGC 3' (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Allemagne).

La réaction d'amplification a été réalisée dans un volume de 100 µL, contenant 70 fmol de matrice pDEST15-HisX6-EK-DP-LAH<sub>4</sub>, 20 pmol de chaque amorce, 4 mmol de dNTP X10, 10 µL de tampon de PCR X 10, ainsi que 2,5 U de Vent Polymérase. La réaction a lieu dans un thermocycleur. Elle est composée de 30 cycles contenant chacun une étape de dénaturation des deux brins d'ADN de la matrice (30 s à 94 °C), d'hybridation des amorces, (30 s à 60 °C) et de polymérisation (1 min à 72 °C).

Le résultat de PCR est visualisé sur gel d'agarose 2 % colorée au Bromure d'éthidium, par transillumination UV. Les produits de PCR sont purifiés par extraction sur gel d'agarose par kit Qiagen (selon le protocole du manufacteur).

- **Digestion et purification des fragments :**

Les fragments de PCR purifiés, ainsi que le vecteur pTIPX-4, ont été digérés successivement par *SacI* puis par *BamHI*. La réaction de digestion est réalisée dans un volume total de 20 µL, contenant 2 µL de tampon de digestion X 10, 1µg de vecteur pTIPX-4 ou le produit de PCR purifié, 10 U d'enzyme de restriction ( *SacI* ou *BamHI*), pendant 3 heures à 37 °C. Pour éviter la ligation du vecteur pTIPX-4 sur lui-même, les extrémités 5' du vecteur sont déphosphorylées après 2 heures de digestion, en présence de 1 µL CIP. Cette étape réduit considérablement l'éventuelle recircularisation du vecteur lors de l'étape de ligation. Les produits de digestion sont alors purifiés par kit Qiagen en utilisant l'extraction sur gel d'agarose.

- **Ligation :**

Le gène codant LAH<sub>4</sub> est inséré dans le vecteur pTIPX-4 entre les sites de restriction *BamHI* et *SacI* par une réaction de ligation. Celle-ci est effectuée dans un volume de 20 µL contenant le vecteur pTIPX-4 digéré et purifié, le produit de PCR digéré et purifié, 2 µL de tampon de ligation et 2 U de T4 DNA ligase. La réaction est incubée à température ambiante pendant une nuit. Les bactéries compétentes chimiquement (One shot TOP10) ont été transformées par le produit de ligation. Le vecteur pTIPX-4-LAH<sub>4</sub> a été séquencé pour s'assurer de la bonne séquence (Eurofins MWG Operon, Ebersberg).

### 3.4.1.2-Expression de la protéine de fusion TAF12-HisX6-EK-DP-LAH<sub>4</sub>

#### - Expression :

Les cellules bactériennes BL21 (DE3) ont été transformées par le vecteur pTIPX-4-LAH<sub>4</sub>. Une préculture issue d'une colonie est mise à pousser une nuit à 37 °C sous agitation à 200 rpm en présence de kanamycine (50 µg/mL) et de 1 % glucose (m/v). La préculture est ensuite diluée avec du milieu LB (1 : 100 (v/v)) contenant de la kanamycine à une concentration finale de 50 µg/mL ainsi que 1 % de glucose (m/v). La culture est incubée à 37 °C, sous agitation (200 rpm). Quand la DO à 600 nm a atteint la valeur de 0,6, l'expression de la protéine de fusion est induite par ajout d'IPTG à une concentration finale de 1 mM. Ensuite, la culture est incubée à 37 °C, sous agitation pendant 3 heures. Les cellules sont récupérées par centrifugation (10 min à 4 000 g, 4 ° C), et resuspendues dans 30 mL de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5 % Triton X-100) par litre de culture. Les cellules sont ensuite lysées par sonication (sonicateur Bandelin Sonopuls HD200 avec une sonotrode à ultrason, MS72/D) dans un bain de glace pendant 5 min avec des intervalles de pulse de 20 % et avec 25 % de puissance.

#### - Purification de la protéine de fusion par résine de Cobalt :

Les lysats de cellules sont centrifugés pendant 30 min à 4 °C, 10 000 g. Le culot contenant la fraction insoluble est resuspendu dans 30 mL de tampon de lavage (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA) et soniqué 1 min pour permettre la dissolution complète du culot. L'échantillon est centrifugé pendant 30 min à 4 °C, 10 000 g. Le culot est alors resuspendu avec 15 mL de tampon de solubilisation (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 8 M urée) et mis sous agitation sur moulin (10 rpm) à température ambiante pendant 2 heures. Une fois le culot bien solubilisé, la solution est mise à centrifuger à 10 000 g à température ambiante pendant 15 min. Le surnageant est récupéré et déposé sur une colonne chargée en Co<sup>2+</sup> (4 mL de résine) préalablement lavée avec 20 mL de tampon d'équilibration (50 mM tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 8 M urée). La colonne est alors lavée avec le tampon d'équilibration contenant 20 mM d'imidazole pour éliminer les protéines qui

n'ont pas ou peu d'affinité avec la résine. La protéine de fusion est alors éluée avec le même tampon mais contenant cette fois-ci 300 mM d'imidazole. Les fractions sont collectées et déposées sur gel SDS-PAGE 15 %. La protéine de fusion est ensuite précipitée avec 5 volumes d'acétone. La protéine précipitée est récupérée par centrifugation 10 000 g pendant 30 min, à 4 °C.

- **Clivage et Purification du peptide P-LAH<sub>4</sub> :**

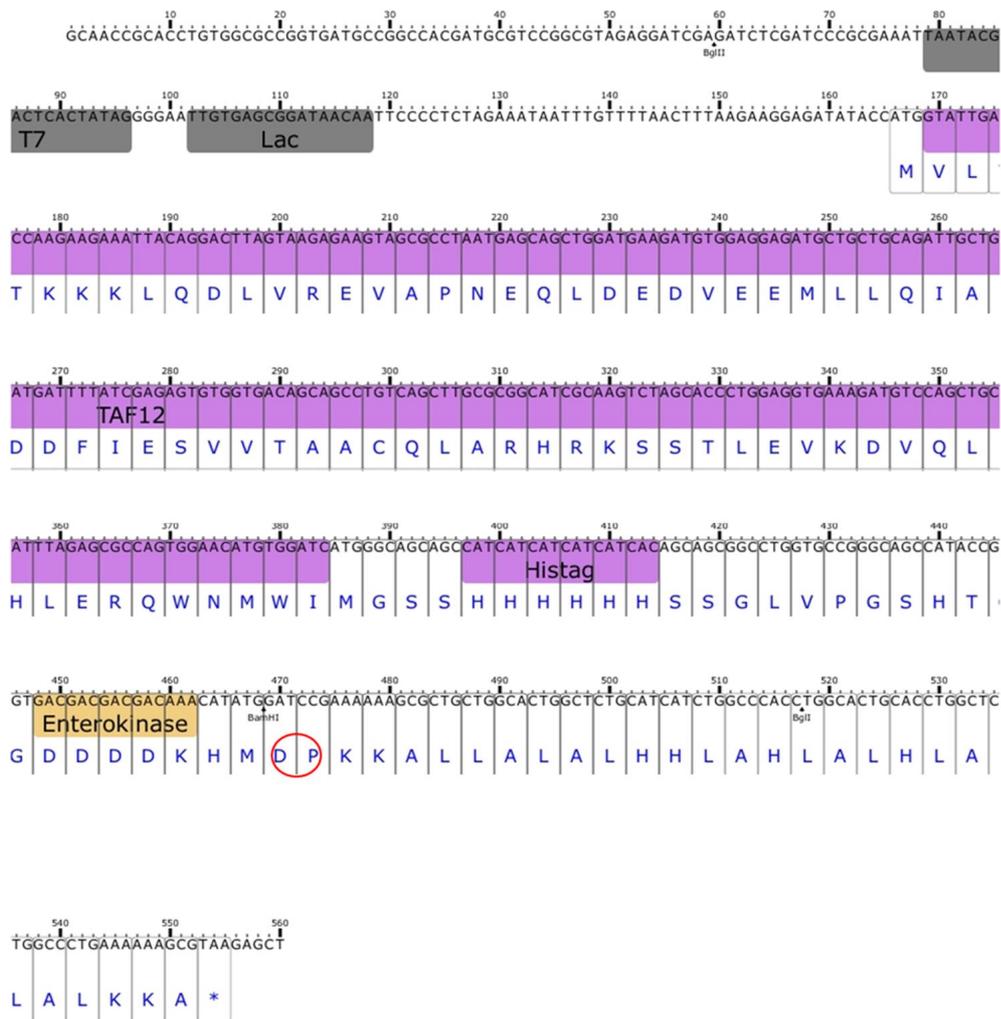
Le culot est alors resuspendu avec 5 mL d'acide formique 100 % pour 1 litre de culture puis de l'eau déionisée est ajoutée pour avoir une concentration finale d'acide formique de 50 % (v/v). La solution est incubée 24 h à 50 °C pour permettre le clivage de la protéine de fusion et la libération du peptide P-LAH<sub>4</sub> (avec addition d'une proline du côté N-ter du peptide LAH<sub>4</sub>).

Le solvant est ensuite évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi R-200) à 50 °C.

Le peptide est dissous dans de l'eau déionisée (5 mL par litre de culture), puis la solution est centrifugée 30 min à température ambiante, 16 000 g pour éliminer le matériel insoluble dans l'eau. Le peptide est purifié par HPLC (Bischoff) à deux pompes avec un débit de 7,5 mL/min sur une colonne Protonsil 300-5-C4 (150 X 20 mm) en utilisant un gradient de 10 à 80 % d'acétonitrile dans 0,1 % TFA. Celui-ci est alors collecté, le solvant évaporé. Finalement, le peptide est repris dans 4 % d'acide acétique et lyophilisé.

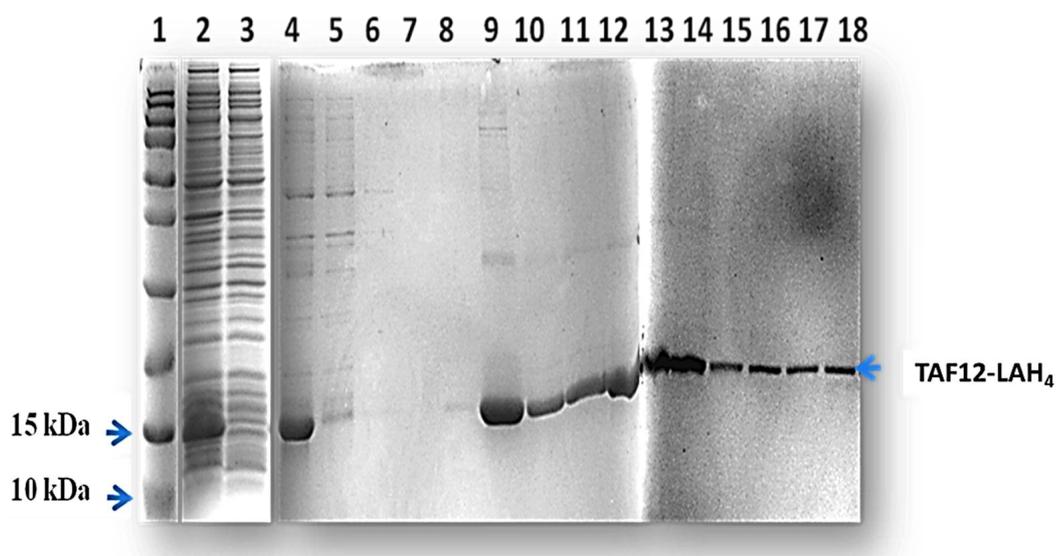
### **3.4.2-Résultats et discussions.**

La partie codante du vecteur exprimant le peptide LAH<sub>4</sub> avec le partenaire de fusion TAF12 en N-ter est représenté sur la figure 3.11. Le vecteur contient un Histag pour permettre la purification de la protéine de fusion par chromatographie d'affinité et un unique site de clivage par l'acide formique (site DP). La séquence DDDDK est présente pour éviter l'effet toxique du peptide envers la bactérie. Le vecteur a été séquencé pour vérifier le succès du clonage.



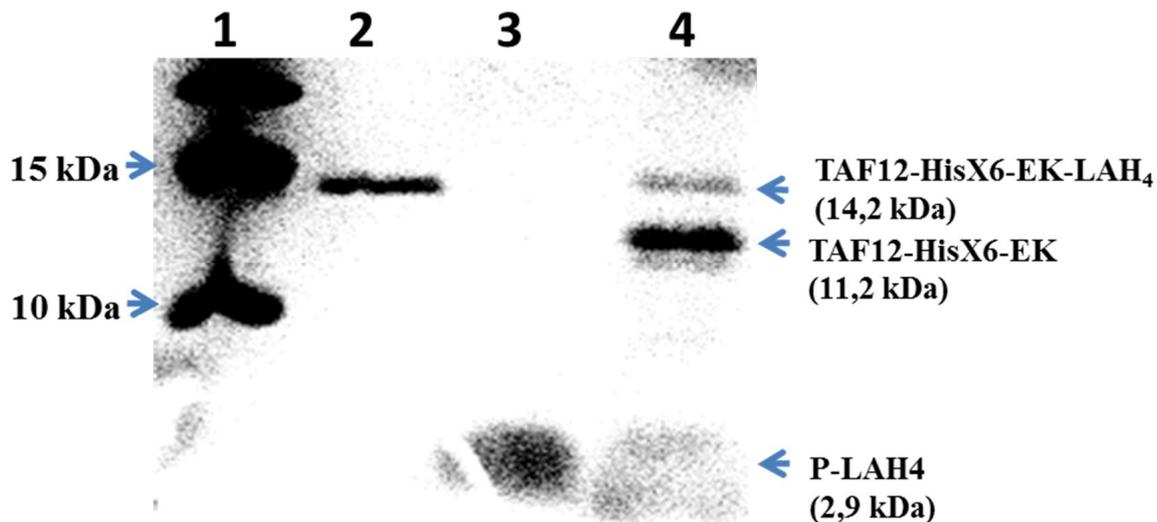
**Figure 3.11 : Représentation de la partie codant la protéine de fusion TAF12-EK-DP-LAH<sub>4</sub> avec son unique site de clivage DP.**

L'expression de la protéine de fusion est détectée par gel SDS-PAGE 15 %. La taille de la protéine TAF12-LAH<sub>4</sub> est de 14,2 kDa. La figure 3.12 montre l'expression et la purification de la protéine de fusion. L'apparition d'une bande protéique aux alentours de 15 kDa au niveau de la colonne 2 témoigne de l'expression de la protéine de fusion. De plus, la protéine se trouve dans la fraction insoluble (colonne 3 vs colonne 4). La fraction insoluble contenant la protéine de fusion a été resolubilisée dans 8 M urée et purifiée par résine de cobalt, la protéine est récupérée par élution avec 300 mM d'imidazole (colonnes 9 à 18). La pureté de la protéine est suffisante pour permettre le clivage par l'acide formique.



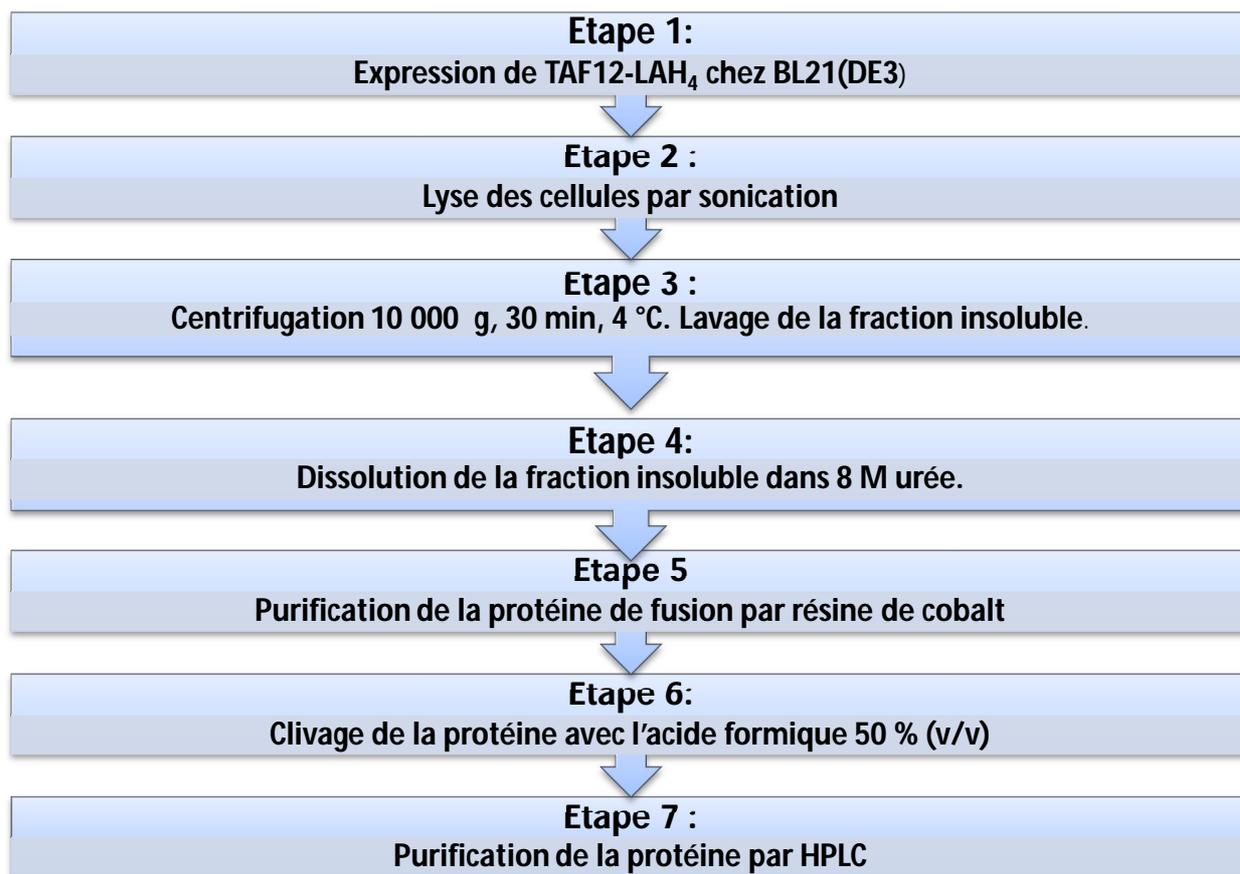
**Figure 3.12 : Expression et purification de la protéine de fusion TAF12-LAH<sub>4</sub> suivies par gel SDS-PAGE 15 %. Colonne 1 : marqueur de poids moléculaire; colonne 2 : cellules lysées ; colonne 3 : fraction soluble ; colonne 4 : fraction insoluble ; colonnes 5 à 8 : lavage de la colonne avec 20 mM d'imidazole; colonnes 9 à 18 : fractions protéiques éluées de la résine de cobalt avec 300 mM d'imidazole.**

La protéine a été clivée pendant 24 h à 50 °C. Le résultat du clivage est montré sur gel tricine SDS-PAGE (16 %) [154] (figure 3.13). Après clivage, le gel montre une diminution de l'intensité de la bande TAF12-HisX6-EK-LAH<sub>4</sub> (14,2 kDa) et l'apparition d'une bande à un peu moins de 15 kDa qui correspond à la protéine TAF12-HisX6-EK (11,2 kDa) (colonne 4). De plus, une bande correspondant à la taille du peptide P-LAH<sub>4</sub> (2,9 kDa) apparaît (colonnes 3 et 4). Le clivage n'est pas total après 24 h car on peut encore observer une bande de faible intensité correspondant à la protéine de fusion (colonne 4).



**Figure 3.13 : Gel Tricine SDS-PAGE (16 %). Clivage de la protéine de fusion TAF12-LAH<sub>4</sub>. Colonne 1 : marqueur de poids moléculaires ; colonne 2 : protéine de fusion TAF12-LAH<sub>4</sub> purifiée sur résine de Cobalt ; colonne 3 : 10 µg de peptide LAH<sub>4</sub> obtenu par synthèse peptidique ; colonne 4 : clivage à l'acide formique de la protéine de fusion purifiée sur résine de Cobalt.**

Après clivage, le solvant est évaporé. Le peptide est resuspendu dans l'eau et purifié par HPLC. En comparant le profil d'élution par HPLC du peptide P-LAH<sub>4</sub> produit par synthèse peptidique avec le profil d'élution de la protéine après clivage, nous avons facilement retrouvé le pic correspondant au peptide P-LAH<sub>4</sub>. Le peptide est élué à environ 13 min (800 s). Ce pic a été collecté et analysé par spectrométrie de masse. Le spectre de masse donne un poids moléculaire de 2875 Da pour ce pic, ce qui est en accord avec la masse attendue (masse attendue de 2877 Da). Tous ces résultats montrent qu'il est possible de produire le peptide P-LAH<sub>4</sub> par les différentes étapes décrites précédemment qui sont résumées sur la figure 3.14.



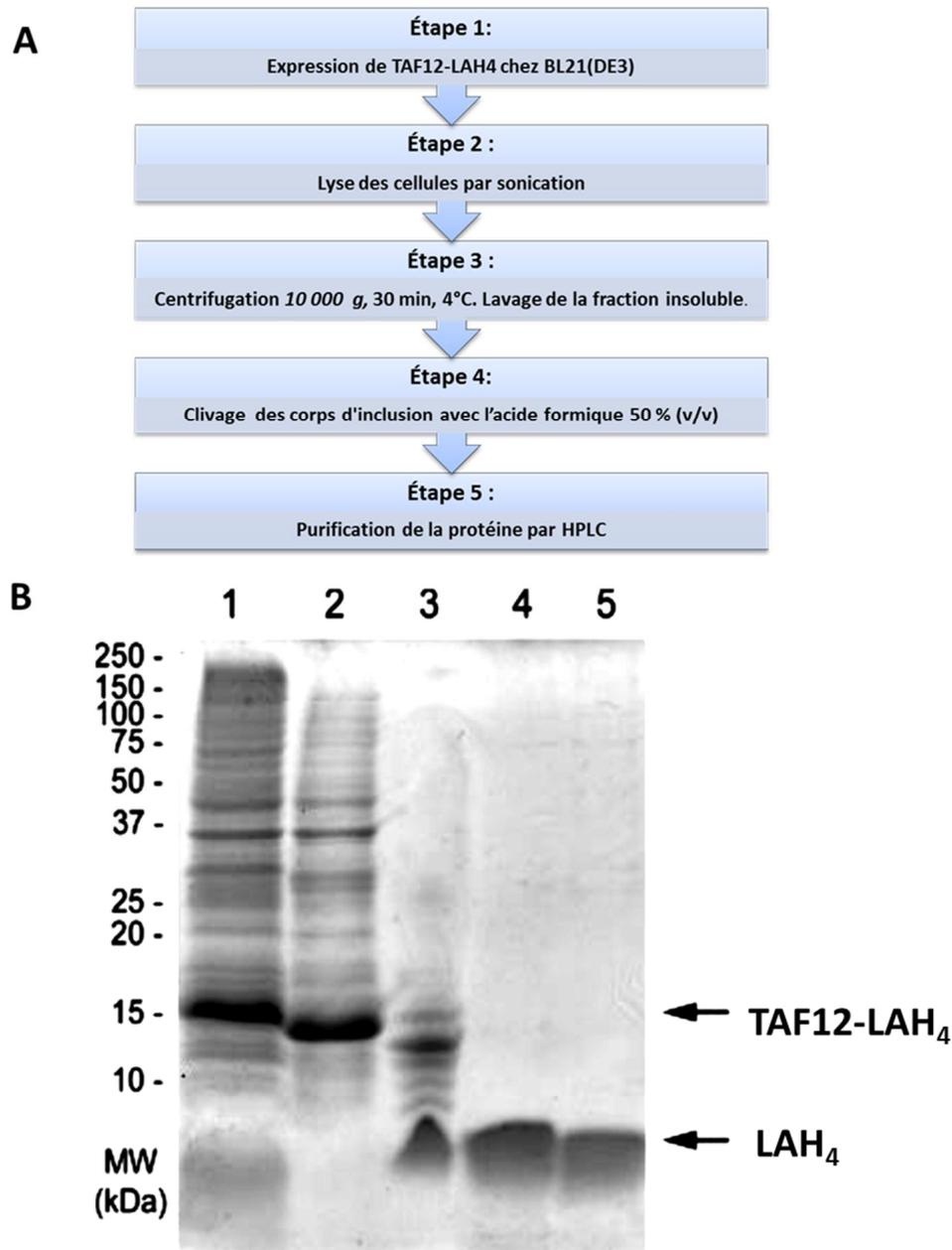
**Figure 3.14 :** Schéma montrant les étapes de production du peptide P-LAH<sub>4</sub> à partir de l'expression par les cellules BL21(DE3).

Après purification du peptide par HPLC et lyophilisation nous avons obtenu une masse de peptide P-LAH<sub>4</sub> de 4,5 mg/mL.

Avant de passer au marquage isotopique en <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C, nous avons essayé d'optimiser au mieux la quantité, le temps et le coût de la production du peptide P-LAH<sub>4</sub> en s'affranchissant de l'étape de purification de la protéine de fusion par chromatographie d'affinité.

Pour cela, nous avons testé le clivage direct sur les corps d'inclusion par l'acide formique. Ainsi, la fraction insoluble du lysat bactérien est lavée une fois dans le tampon de lavage et dissoute directement dans l'acide formique pur. De l'eau deionisée est ajoutée pour avoir une concentration finale d'acide formique de 50 % (v/v) comme précédemment. Les autres étapes restent les mêmes jusqu'à la purification du peptide par HPLC.

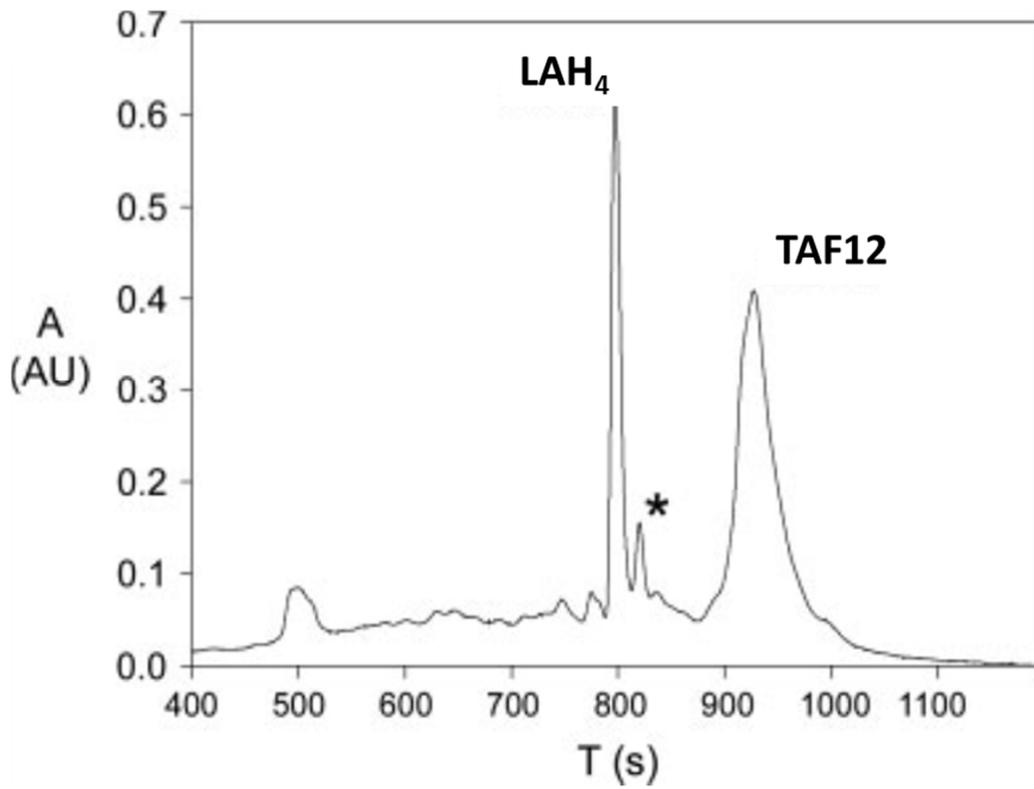
Les différentes étapes de la production du peptide P-LAH<sub>4</sub>, en clivant directement les corps d'inclusion, sont résumées sur la figure 3.15-A et analysées par gel tricine SDS-PAGE 16 % sur la figure 3.15-B.



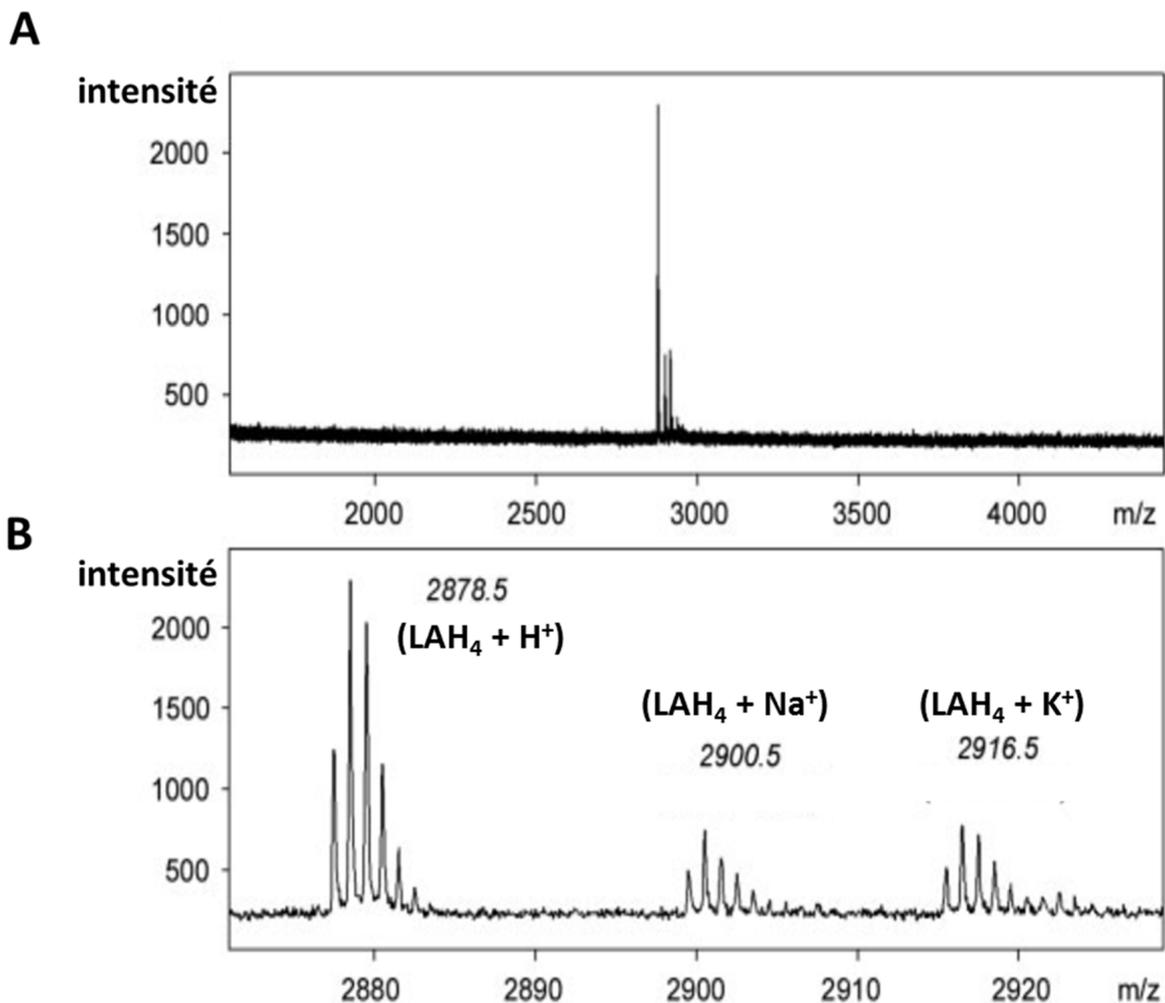
**Figure 3.15:** A- Résumé des étapes permettant la production du peptide P-LAH<sub>4</sub>. B- Gel Tricine SDS-PAGE 16 % montrant l'expression, le clivage de la protéine de fusion TAF12-LAH<sub>4</sub> ainsi que la purification du peptide P-LAH<sub>4</sub>. Colonne 1: Lysat de cellules bactériennes, colonne 2: fraction insoluble, colonne 3: clivage de la protéine de fusion, colonne 4: P-LAH<sub>4</sub> purifié par HPLC, colonne 5: LAH<sub>4</sub> synthétique comme contrôle (10 µg).

Le chromatogramme obtenu lors de la purification du peptide par HPLC (figure 3.16) montre l'absorbance de l'échantillon à 214 nm en utilisant un gradient d'acétonitrile de 10 à 80 % dans 0,1 % TFA. Le pic fin élué à environ 13 min est collecté et analysé par spectrométrie de masse. L'analyse SM (figure 3.17-A) confirme que ce pic correspond au peptide P-LAH<sub>4</sub> avec une masse de 2877,5 Da qui est donc en accord avec la masse théorique attendue. Le spectre de masse donne aussi deux autres masses de 2900,5 Da et 2916,5 Da (figure 3.17-B) qui correspondent à la fixation d'un ion sodium et potassium respectivement sur le peptide. Le pic qui suit le pic d'éluion du peptide P-LAH<sub>4</sub> (marqué par un astérisque sur la figure 3.16) a aussi été analysé par spectrométrie de masse. La masse obtenue correspond à + 28 Da par rapport à la masse de P-LAH<sub>4</sub>. Ce qui correspond au peptide formylé.

D'autre part, le clivage de la protéine a également été testé pendant 48 h. Les résultats par gel tricine ont montré que le clivage était total mais les quantités de peptide formylés (+ 28 kDa et 2X 28 kDa) (par spectrométrie de masse) étaient supérieures à celles obtenues lors du clivage pendant 24 h. D'où l'importance de ne pas continuer le clivage au-delà de 24 h. Le dernier pic d'éluion de la figure 3.16 correspond au partenaire de fusion hydrophobe TAF12 (pic analysé par gel SDS-PAGE 15 %) qui est élué plus tard que le petit peptide amphipathique sur gradient acétonitrile.



**Figure 3.16 : Chromatogramme HPLC montrant l'absorbance (unité arbitraire : AU) à 214 nm du matériel issu du clivage direct des corps d'inclusion par l'acide formique. Le pic marqué par un astérisque correspond au peptide P-LAH<sub>4</sub> formylé.**



**Figure 3.17 : A- Spectre de masse MALDI-TOF du peptide P-LAH<sub>4</sub> purifié par HPLC. B- Agrandissement du spectre. La masse moléculaire déterminée pour le peptide est de 2877,5 Da (masse attendue 2877 Da). Deux autres masses ont été déterminées 2900,5 Da et 2916,5 Da correspondant au peptide associé à un ion sodium ou à un ion potassium respectivement.**

Cette méthode de clivage direct des corps d'inclusion nous a permis d'obtenir 10 mg/L de culture, de peptide P-LAH<sub>4</sub> par pesée du produit après lyophilisation. En effet, cette méthode est plus avantageuse que la précédente car on obtient une quantité de peptide supérieure à celle obtenue précédemment (4,5 mg/mL). De plus cette méthode est plus rapide car elle ne nécessite pas d'étape de purification préalable de la protéine de fusion.

Il reste à montrer que malgré l'addition d'une proline en N-ter, le peptide conserve ses activités antibactériennes et son pouvoir de transférer l'ADN, afin de pouvoir faire des marquages en <sup>15</sup>N et/ou <sup>13</sup>C et continuer avec des études structurales par RMN.

## 3.5- P-LAH<sub>4</sub> : agent antibactérien et transfectant d'ADN

### 3.5.1-Matériel et méthodes

#### - Test Antibactérien :

Différentes concentrations (comprises entre 0 et 50 µg/mL) des trois peptides (LAH<sub>4</sub> synthétique noté LAH<sub>4</sub>, P-LAH<sub>4</sub> synthétique noté P-LAH<sub>4s</sub> ainsi que le peptide P-LAH<sub>4</sub> produit chez *E. coli* noté P-LAH<sub>4rec</sub>) ont été préparées dans 10 mM tampon citrate pH=5,5. Un clone de BL21 (DE3) est mis à pousser toute la nuit à 37 °C, 250 rpm dans du LB à pH=5,5. La culture est diluée jusqu'à obtenir une DO à 600 nm de 0,05 puis mise à pousser jusqu'à une DO de 0,5. La culture est ensuite rediluée à une DO de 0,05 et 800 µL de culture (1,6 \* 10<sup>7</sup> cellules) sont mélangés avec 200 µL de solution peptidiques à différentes concentrations. Pour le contrôle négatif : 800 µL de cellules sont mélangés avec 200 µl de 10 mM tampon citrate pH=5,5. Les cultures sont mises à pousser 4 heures à 37 °C, 250 rpm jusqu'à ce que la DO à 600 nm du contrôle a atteint 3. Les DO à 600 nm de toutes les solutions contenant les différents peptides sont mesurées.

#### - Capacité de lier l'ADN : Retard sur gel :

Afin de comparer la capacité de liaison de P-LAH<sub>4rec</sub> à l'ADN avec celle de LAH<sub>4</sub>, les deux peptides ont été mis en contact avec des quantités croissantes d'ADN à pH 7. Les différents rapports  $\frac{\text{masse de peptide}}{\text{masse d'ADN plasmidique}}$  ont été visualisés sur gel agarose 1 %. Cette expérience a été réalisée par le Dr Gilles Moulay (CRATG et UPCG, Evry).

#### - Test de transfection :

Finalement l'efficacité de transfection du peptide P-LAH<sub>4</sub> a été testée dans les cellules HepG2 par le Dr Gilles Moulay. Brièvement, différents rapports  $\frac{\text{masse de peptide}}{\text{masse d'ADN plasmidique}}$  ont été préparés en utilisant une quantité constante de 4 µg d'ADN plasmidique codant pour la luciférase de luciole. Les cellules HepG2 ont été transfectées par ces complexes et une solution de luciférine est ajoutée pour pouvoir mesurer la quantité de lumière émise. L'efficacité de transfection est déterminée en unité de lumière émise par la luciférase après 10 s par mg de protéine contenue dans les cellules.

### 3.5.2-Résultats et discussions.

#### Test Antibactérien :

Afin de tester et de comparer le pouvoir antibactérien du peptide P-LAH<sub>4</sub>rec avec les deux autres peptides P-LAH<sub>4</sub>s et LAH<sub>4</sub>, la croissance relative ( $\frac{DO \text{ avec peptide}}{DO \text{ sans peptide}} \times 100$ ) des cellules bactériennes BL21 (DE3) en fonction de la concentration en différents peptides (jusqu'à 50 µg/mL) a été mesurée. Les résultats de l'expérience sont montrés sur la figure 3.18. La croissance des cellules est considérablement réduite pour les trois peptides à partir de 12,5 µg/mL. Ce qui montre bien que le peptide P-LAH<sub>4</sub> produit chez la bactérie a un pouvoir antibactérien comparable à celui du peptide LAH<sub>4</sub> et ça malgré l'addition d'une proline en N-ter. De plus, pour le peptide LAH<sub>4</sub> synthétique les résultats sont en accord avec les valeurs publiées [41].

#### Croissance relative

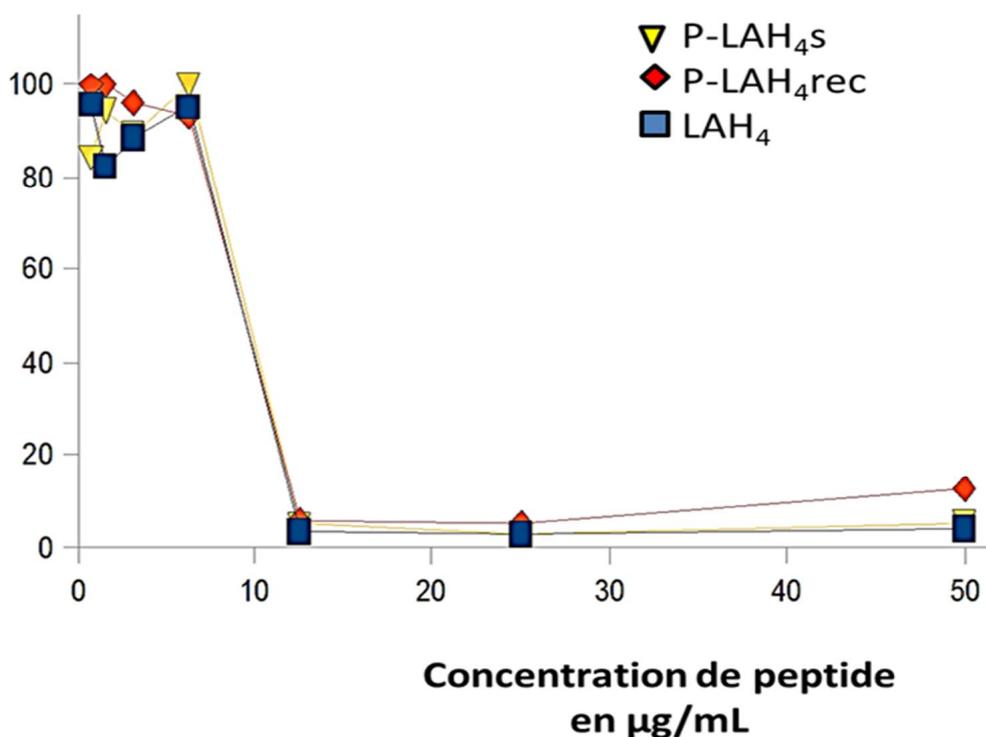
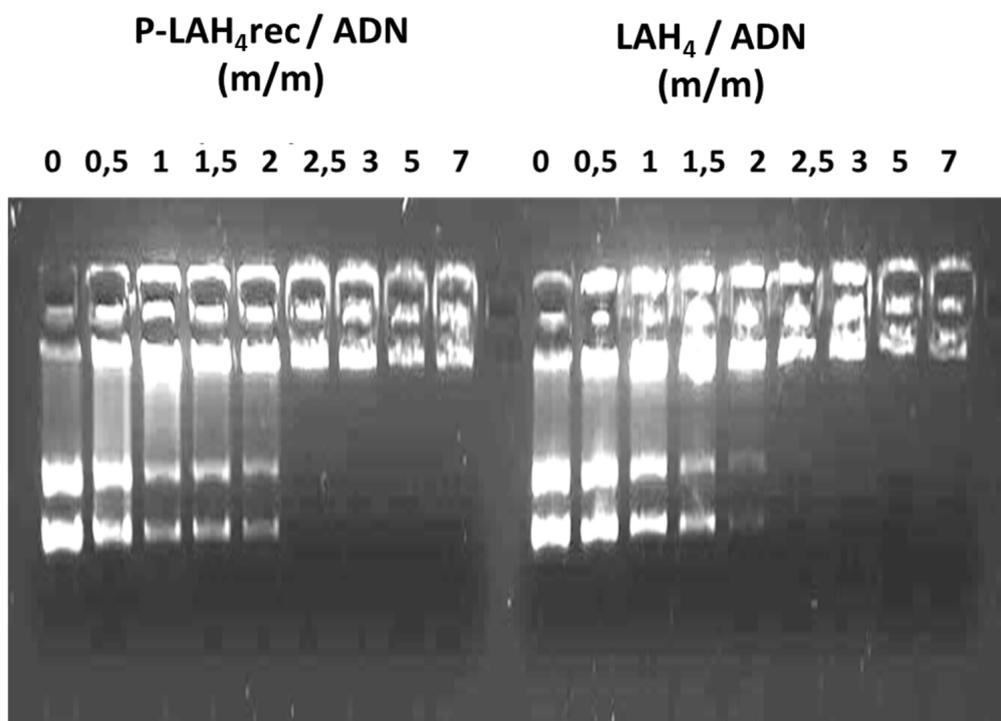


Figure 3.18 : Croissance relative des cellules BL21 (DE3) en fonction de la concentration des différents peptides à pH 5,5.

- **Capacité de lier l'ADN : Retard sur gel :**

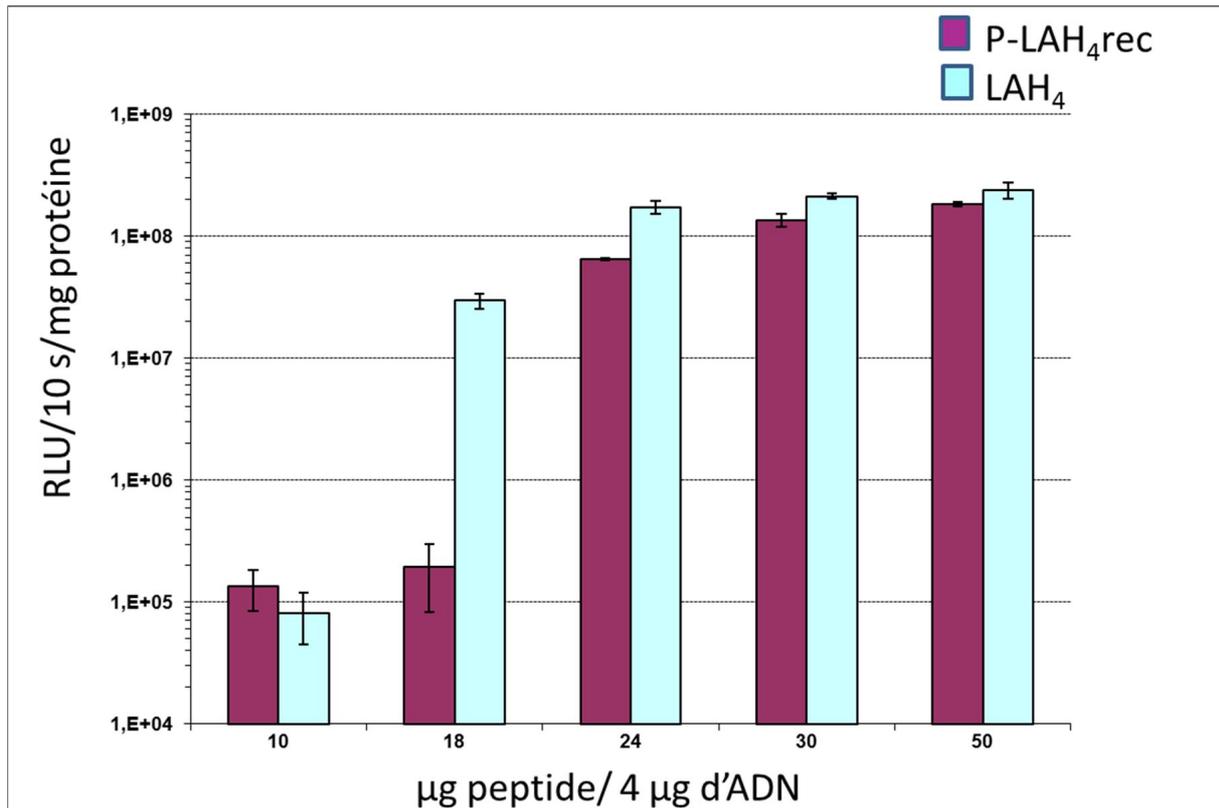
Les résultats sont montrés sur la figure 3.19. Le gel montre que les deux peptides retardent la migration de l'ADN pour des rapports de  $\frac{\text{masse de peptide}}{\text{masse d'ADN plasmidique}} = 2,5$  . Par conséquent le peptide P-LAH<sub>4</sub>rec possède les mêmes capacités de liaison à l'ADN que le peptide LAH<sub>4</sub>.



**Figure 3.19 : Gel agarose 1 % comparant l'efficacité de liaison des peptides (peptide LAH<sub>4</sub> produit par synthèse peptidique et le peptide P-LAH<sub>4</sub>rec produit chez *E. coli*) avec l'ADN plasmidique.**

- **Test de transfection :**

La figure 3.20 montre que le peptide P-LAH<sub>4</sub>rec est aussi capable de transférer l'ADN dans les cellules et que son efficacité est comparable à celle du peptide LAH<sub>4</sub>.



**Figure 3.20:** Comparaison de l'efficacité de transfection dans les cellules HepG2 entre le peptide LAH<sub>4</sub> produit par synthèse peptidique (bleu) et le peptide P-LAH<sub>4</sub>rec produit chez *E. coli* (violet).

### 3.6-Conclusions

Le but du travail décrit dans ce chapitre était d'établir un protocole de production d'un peptide antibactérien et transfectant d'ADN chez *E. coli* en vue de marquages isotopiques en <sup>15</sup>N et/ou <sup>13</sup>C afin de faire des études structurales par RMN.

Dans un premier temps nous avons essayé de produire le peptide de fusion avec la GST en N-ter en incorporant un site de clivage chimique (DP) au lieu du site de clivage enzymatique (DDDDK). Les tests d'expression des protéines de fusion contenant différents sites de clivage (DDDDK, M ou DP) nous ont permis de conclure que la séquence DDDDK était nécessaire à l'expression du peptide, et que par conséquent celle-ci est efficace pour inhiber la toxicité du peptide en neutralisant ses charges positives (K). Ainsi, seul le vecteur codant pour la GST-HisX6-EK-DP-LAH<sub>4</sub> montre une expression de la protéine de fusion sur

gel SDS-PAGE. La GST, avec une taille de 24,5 kDa, ne permettrait pas à elle seule d'inhiber la toxicité de LAH<sub>4</sub> pendant l'expression ni de protéger la protéine contre d'éventuelles protéases. De plus, la GST couvre 80 % de la protéine de fusion. Ainsi, pendant l'expression, la cellule bactérienne va utiliser la majorité de ses ressources pour produire la GST, au détriment du peptide. Partant de l'hypothèse que la séquence DDDDK permettrait d'inhiber la toxicité du peptide, et non la taille du partenaire de fusion, nous avons remplacé la GST par un partenaire de fusion hydrophobe (pour garder l'expression sous forme insoluble) et de plus petite taille (8 kDa). La protéine de fusion s'exprime alors de façon efficace. Nous avons pu obtenir le peptide avec une quantité de 4,5 mg/L de culture en purifiant la protéine de fusion sur résine de Co<sup>2+</sup> avant le clivage par l'acide formique. Afin d'optimiser au mieux le coût et le temps de production avant de passer au marquage <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C, nous avons essayé de cliver directement la fraction insoluble sans purification préalable de la protéine de fusion. Ainsi, nous avons obtenu une quantité de 10 mg/L de culture de peptide et donc deux fois supérieure au protocole précédent et à un moindre coût [156]. De plus, l'expression d'autres peptides antibactériens comme la thanatine, MGD-1, RK-1 et les chaînes 1 et 2 de l'hétéro dimère de la défensine par ce nouveau vecteur d'expression a été possible [156].

Cette méthode de production du peptide chez *E. coli* nous a permis d'obtenir le peptide mais avec l'addition d'une proline en N-ter et par conséquent nous avons obtenu le peptide P-LAH<sub>4</sub> et non LAH<sub>4</sub>. Il fallait donc vérifier que les pouvoirs antibactériens et transfectant d'ADN étaient présents. Les résultats ont montré que le peptide P-LAH<sub>4</sub>, comme LAH<sub>4</sub>, était un peptide antimicrobien et transfectant d'ADN de même efficacité.

Finalement, la production du peptide marqué est possible et les études structurales par RMN peuvent être envisagées.



## Chapitre 4 :

# Attribution RMN et structure secondaire du peptide P-LAH<sub>4</sub> en milieu micellaire.

### 4.1-Introduction.

Nous avons vu dans le chapitre précédent qu'il était possible de produire notre peptide dans un système bactérien et par conséquent de le marquer en <sup>15</sup>N et/ou en <sup>13</sup>C. Il est alors possible d'étudier les interactions du peptide avec les membranes par RMN, en commençant par exemple par déterminer sa structure dans un environnement membranaire.

Actuellement, environ 1500 peptides antibactériens sont référencés dans la banque de données des peptides antibactériens (<http://aps.unmc.edu/AP/statistic/statistic.php>) et seulement 206 de ces peptides ont leur structure tridimensionnelle connue. Les deux techniques utilisées pour la détermination de structure sont la cristallographie par rayon X et la spectroscopie RMN. Dans 95 % des cas la structure a été déterminée par RMN, contre 5 % par cristallographie à rayon X.

Lorsque l'on souhaite étudier les peptides dans un environnement membranaire, la RMN est la méthode la plus appropriée du fait de la difficulté de cristalliser les complexes de peptides-lipides. Cependant, à cause de la complexité des membranes bactériennes, les études structurales par RMN en solution sont réalisées dans des mélanges de solvants (TFE-eau) ou encore dans des membranes mimétiques comme les micelles. Le mélange TFE-eau induirait une conformation du peptide comparable à celle que l'on retrouve dans les membranes biologiques. Cependant, il est nécessaire, au préalable de confirmer l'équivalence de structure par dichroïsme circulaire en présence de vésicules [157-159]. Les micelles les plus utilisées pour la détermination de structure par RMN sont les micelles de sodium dodécylsulfate (SDS) ou encore des micelles de dodécylphosphocholine (DPC) [160, 161]. Par exemple, les structures de l'indolicidine [162], la magainine-2 ont été déterminées dans le SDS et dans le DPC [163, 164] et pour la buforine II dans le TFE [165].

Nous avons vu, dans le premier chapitre, que la structure du peptide LAH<sub>4</sub> a été résolue dans les micelles de DPC par RMN <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H bidimensionnelle à différents pH (4,1, 6,1 et 7,8). Cela a permis de comprendre les changements de conformation auxquels le peptide est soumis lorsqu'il s'insère dans les membranes [87].

Nous avons aussi vu dans ce chapitre que le peptide est capable de transférer l'ADN dans les cellules de mammifères par un phénomène d'endocytose [40, 45]. En effet, une fois le complexe endocyté, l'endosome s'acidifie pour atteindre un pH autour de 5, ce qui permettrait la libération de 50 % de peptides liés à l'ADN [92]. Le peptide se retrouverait ainsi libre dans l'endosome et serait capable de lyser la membrane pour libérer l'ADN vers le cytoplasme de la cellule. Cependant, l'étude de la structure du peptide à ce pH voisin de 5,5, n'a pas encore été résolue par RMN en solution.

Ainsi dans ce chapitre, on se propose d'élucider la structure du peptide à ce pH dans un environnement membranaire zwitterionique se rapprochant le plus de la membrane de l'endosome. En effet, connaître la structure du peptide marque un début vers la compréhension de son mécanisme d'action. Dans ce chapitre nous décrirons donc les méthodes qui nous ont permis d'obtenir la structure secondaire du peptide P-LAH<sub>4</sub> dans les micelles de DPC à pH= 5,4. Cette structure sera comparée à celles obtenues aux autres pH et mise en relation avec l'activité bactérienne et de transfection du peptide.

## **4.2-Matériel et Méthodes.**

### **4.2.1-Méthodes**

Le peptide P-LAH<sub>4</sub> possède 235 noyaux d'hydrogène, 137 noyaux de carbone et 39 noyaux d'azote. Pour déterminer la fréquence de résonance de chacun de ces noyaux, il est nécessaire d'avoir recours aux techniques RMN tridimensionnelles afin de limiter efficacement les problèmes de superposition. L'enregistrement de ces spectres est possible à partir du peptide doublement marqué en <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C. La méthode consiste déjà à attribuer les noyaux du squelette peptidique (N<sub>H</sub>, H<sub>N</sub>, C<sub>α</sub>, C<sub>β</sub>, H<sub>α</sub>, C<sub>O</sub>) puis les noyaux correspondants aux chaînes latérales. Ici, nous avons attribué les déplacements chimiques des noyaux suivants: N<sub>H</sub>, H<sub>N</sub>, C<sub>α</sub>, C<sub>β</sub> et H<sub>α</sub> pour 90 % des acides aminés du peptide. L'attribution des chaînes

latérales n'a pas pu être effectuée à cause du manque de temps RMN dû à la réorganisation des spectromètres liquides.

#### 4.2.1.1-Attribution des résonances du squelette peptidique

Pour arriver à l'attribution de ces noyaux, il est nécessaire de réaliser des couples d'expériences. Le principe repose sur la corrélation entre l'azote  $N_H$  et le proton amide d'un résidu  $i$  avec un troisième atome ( $^1H$  ou  $^{13}C$ ) appartenant soit au résidu  $i$  soit au résidu  $(i-1)$ . Ainsi, en combinant les informations entre les résidus on arrive à avoir l'enchaînement des atomes. Les spectres suivants ont été enregistrés:

- $^1H$ - $^{15}N$  HSQC qui permet d'attribuer les fréquences de résonance des noyaux  $N_H$  et  $H_N$ .
- HNCA et HN(CO)CA pour l'attribution des noyaux  $C_\alpha$ .
- HN(CO)CACB, HNCACB pour l'attribution des noyaux  $C_\beta$ .
- $^1H$ - $^{15}N$  HSQC-NOESY pour attribuer les noyaux  $^1H_\alpha$  et mesurer les effets Overhauser Nucléaire (NOE).

##### a) Spectres HN(CO) CA et HNCA : attribution du $C_\alpha$ et $C_{\alpha-1}$

##### Spectre HNCA :

La séquence HNCA [166] permet le transfert de l'aimantation du  $^1H_N(i)$  (du résidu  $i$ ) vers le  $^{15}N(i)$  puis aux  $^{13}C_\alpha(i)$  et au  $^{13}C_\alpha$  du résidu  $(i-1)$  via le couplage scalaire  $^{15}N$ - $^{13}C_\alpha$  (figure 4.1). Ainsi, sur le spectre on obtient deux taches en  $^{13}C_\alpha$  pour le déplacement chimique en  $^1H_N$  du résidu  $i$  (figure 4.2-A). Ceci s'explique par le fait que la valeur de la constante de couplage est du même ordre de grandeur. En effet,  $^1J_{N-C_\alpha} = 11$  Hz et  $^2J_{N-C_\alpha} = 7$  Hz (annexe 1). En général, la tache la plus intense correspond à la valeur de déplacement chimique du  $^{13}C_\alpha$  du résidu  $i$  car  $^1J_{N-C_\alpha} > ^2J_{N-C_\alpha}$ . La différence d'intensité des deux taches permet donc de distinguer le  $^{13}C_\alpha(i)$  du  $^{13}C_\alpha(i-1)$  mais il est cependant nécessaire tout de même de vérifier l'attribution grâce à une expérience complémentaire comme la HN(CO)CA.

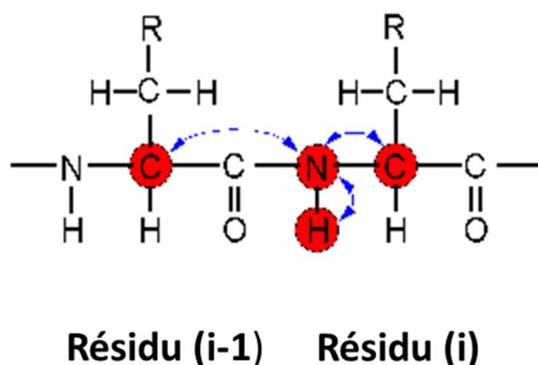


Figure 4.1 : Transferts d'aimantation impliqués dans l'expérience HNCA.

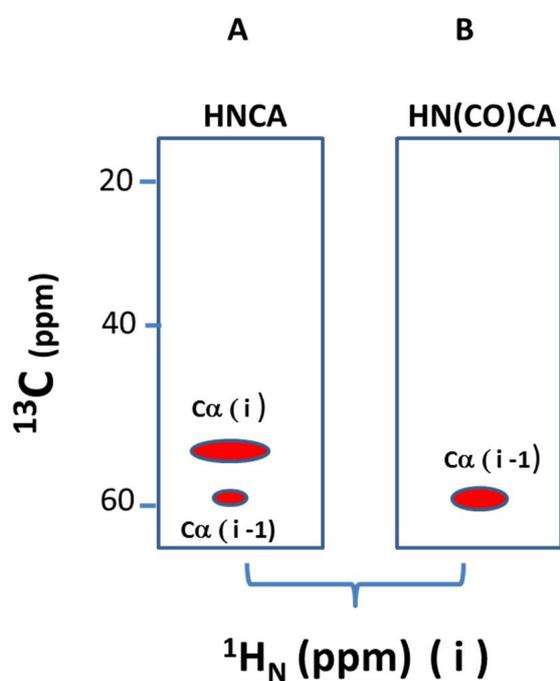
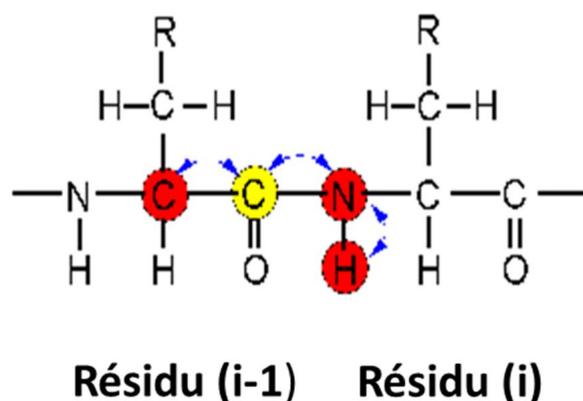


Figure 4.2 : A- L'expérience HNCA transfère l'aimantation du  $H_N(i)$  au  $N_H(i)$  vers le  $C\alpha(i)$  et  $C\alpha(i-1)$  : dans le plan correspondant au  $^1H_N$  d'un résidu  $i$ , on observe 2 corrélations dans la dimension carbone qui correspondent aux  $C\alpha$  du résidu  $i$  et du résidu précédent. B- Dans la même zone du spectre HN(CO)CA on observe qu'une seule corrélation qui correspond au  $C\alpha$  du résidu (i-1).

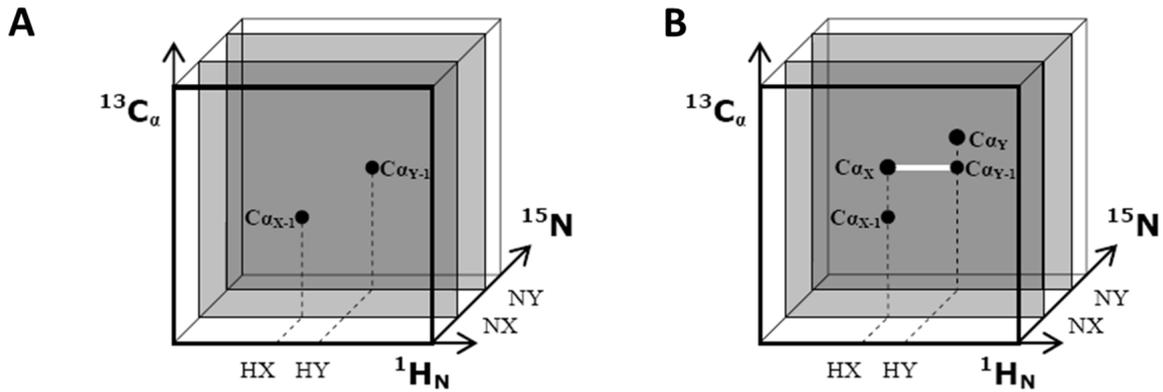
### Spectre HN(CO)CA :

L'expérience HN(CO)CA [167] permet le transfert de l'aimantation du  $^1\text{H}$  de l'amide du résidu  $i$  vers le  $^{15}\text{N}(i)$  au  $^{13}\text{C}\alpha$  du résidu  $(i-1)$  via le carbonyle (figure 4.3). On observe une seule tache en  $^{13}\text{C}\alpha$ , pour le déplacement chimique  $^1\text{H}_\text{N}$  du résidu  $i$ , qui correspond à la valeur de déplacement chimique du résidu  $(i-1)$  (figure 4.2-B) car le transfert d'aimantation ne peut se faire que dans un sens. En effet,  $^2\text{J}_{\text{N-CO}}$  est quasi nulle (1Hz).



**Figure 4.3 : Transferts d'aimantation impliqués dans l'expérience HN(CO)CA.**

Une représentation schématique de ces spectres en 3D est représentée sur la figure 4.4 et montre la connectivité séquentielle entre deux résidus X-Y.



**Figure 4.4:** A - Spectre 3D HN(CO)CA. B- Spectre 3D HNCA. L'analyse de ces spectres permet l'attribution des  $^{13}\text{C}_\alpha$  d'une protéine. L'exemple illustre un segment de 2 résidus consécutifs X-Y mettant en évidence la connectivité séquentielle.

***b) Spectres HN(CO)CACB et HNCACB : attributions des  $^{13}\text{C}_\beta$  [168]***

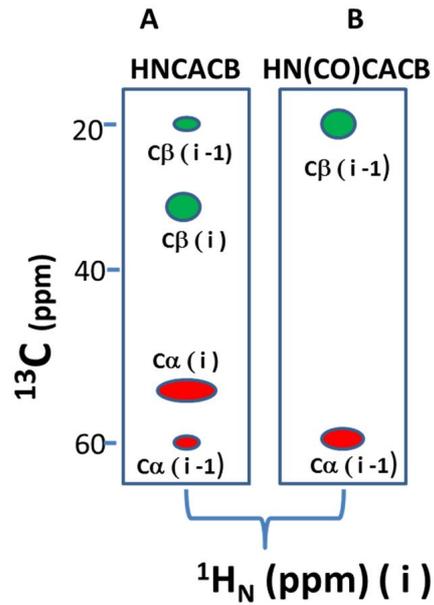
La connaissance des déplacements chimiques des noyaux  $^{13}\text{C}_\beta$  permet une première attribution des résidus car les déplacements chimiques en  $^{13}\text{C}_\alpha$  sont assez similaires d'un résidu à l'autre (annexe 2).

**Spectre HNCACB :**

Le transfert d'aimantation se fait de la même manière que pour la HNCA mais se poursuit du  $^{13}\text{C}_\alpha$  vers le  $^{13}\text{C}_\beta$  des résidus  $i$  et  $(i-1)$ . Dans le plan correspondant au  $^1\text{H}_N$  d'un résidu  $i$ , on observe 4 corrélations dans la dimension carbone qui correspondent aux  $\text{C}_\alpha$  et  $\text{C}_\beta$  du résidu  $i$  et du résidu précédent (figure 4.5-A).

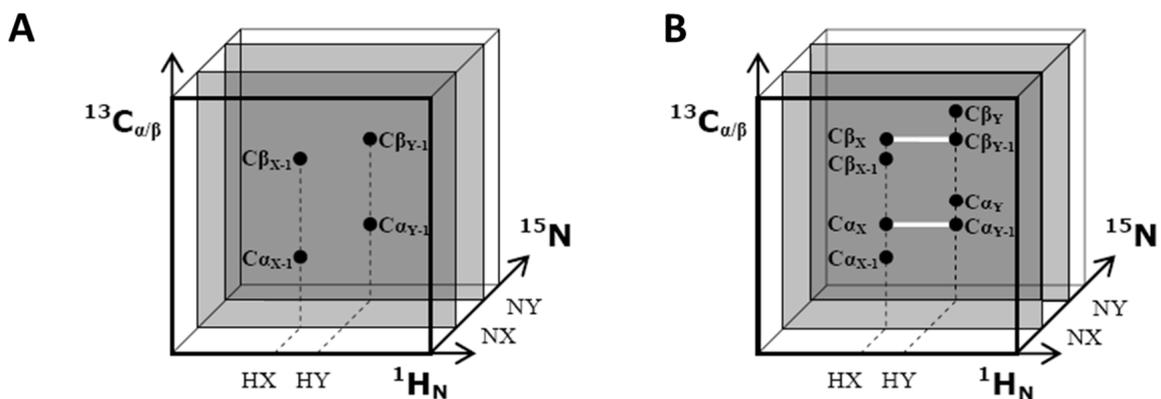
**Spectre HN(CO)CACB :**

Le transfert d'aimantation se poursuit vers le  $^{13}\text{C}_\beta$  du résidu  $(i-1)$  uniquement. Dans le plan correspondant au  $^1\text{H}_N$  d'un résidu  $i$ , on observe que 2 corrélations qui correspondent au  $\text{C}_\alpha$  et  $\text{C}_\beta$  du résidu  $(i-1)$  (figure 4.5-B).



**Figure 4.5:** A- L'expérience HNCACB transfère l'aimantation du  $H_N(i)$  au  $N_H(i)$  vers le  $C\alpha(i)$  et  $C\alpha(i-1)$  ainsi qu'au niveau des  $C\beta$  des résidus  $i$  et  $(i-1)$  : dans le plan correspondant au  $^1H_N$  d'un résidu  $i$ , on observe 4 corrélations dans la dimension carbone qui correspondent aux  $C\alpha$  et  $C\beta$  du résidu  $i$  et du résidu précédent. B- Dans la même zone du spectre HN(CO)CACB on observe que 2 corrélations qui correspondent au  $C\alpha$  et  $C\beta$  du résidu  $(i-1)$ .

Une représentation schématique de ces spectres en 3D est représentée sur la figure 4.6 et montre la connectivité séquentielle entre deux résidus X-Y.

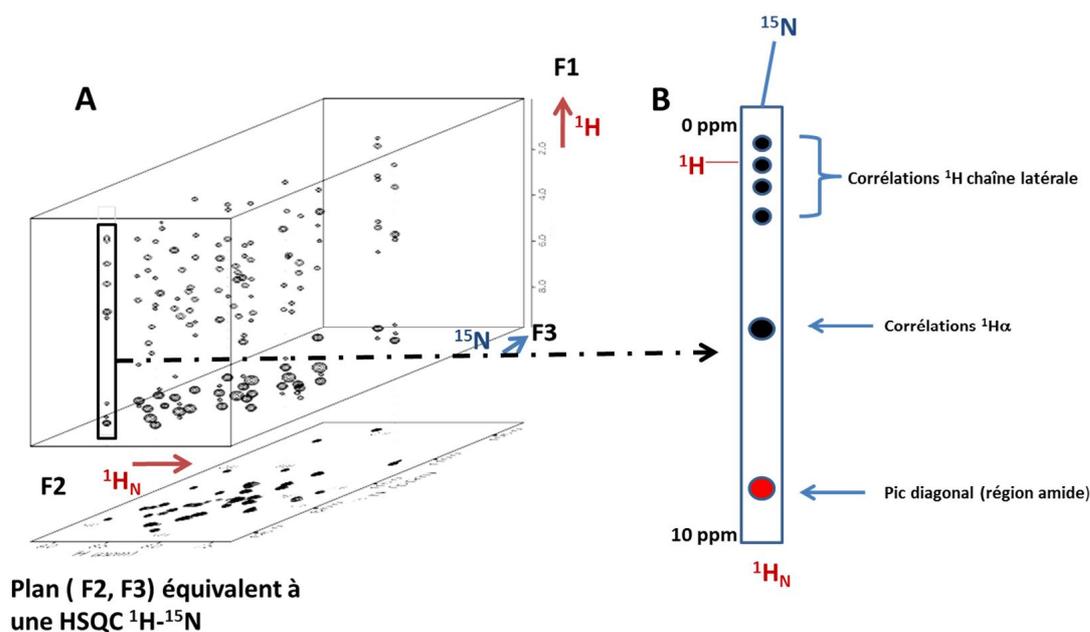


**Figure 4.6:** A – Spectre 3D HN(CO)CACB. B- Spectre 3D HNCACB. L'analyse de ces spectres permet l'attribution des  $^{13}C\beta$  d'une protéine. L'exemple illustre un segment de 2 résidus consécutifs X-Y mettant en évidence la connectivité séquentielle.

c) Spectre 3D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY-HSQC [169, 170]:

L'effet Overhauser nucléaire (NOE) repose sur le transfert d'aimantation entre deux noyaux qui sont proches dans l'espace (inférieur à 5 Å) par l'intermédiaire du couplage dipolaire. Pour ces noyaux, on mesure un signal de corrélation dont l'intensité est proportionnelle à  $1/r^6$  où  $r$  représente la distance entre les deux noyaux.

Dans un spectre de type 3D  $^1\text{H}_\text{N}$ - $^1\text{H}$  NOESY-HSQC (figure 4.7) d'une protéine, on mesure l'effet NOE entre le proton amide d'un résidu  $i$  et les autres noyaux d'hydrogène qui lui sont proches. L'enregistrement d'un tel spectre fournit une aide considérable lors de l'attribution séquentielle et donne des indications quant à la structure secondaire des protéines mais permet en plus de fournir des distances entre les noyaux et donc de remonter à la structure 3D de la molécule.



**Figure 4.7 : A- Spectre 3D  $^1\text{H}_\text{N}$ - $^1\text{H}$  NOESY-HSQC. La dimension 1 représente les protons, la dimension 2, les protons amides et la dimension 3 les noyaux d'azote-15. B- Chaque colonne (ou strip) correspondant à chaque tache de la HSQC (plan (F2,F3)), représente le spectre NOESY du proton amide d'un résidu du peptide.**

En première approximation, les volumes des taches de corrélation peuvent être convertis en contraintes de distances par la relation :

$$d_{ij} = k \cdot I_{ij}^{1/6}$$

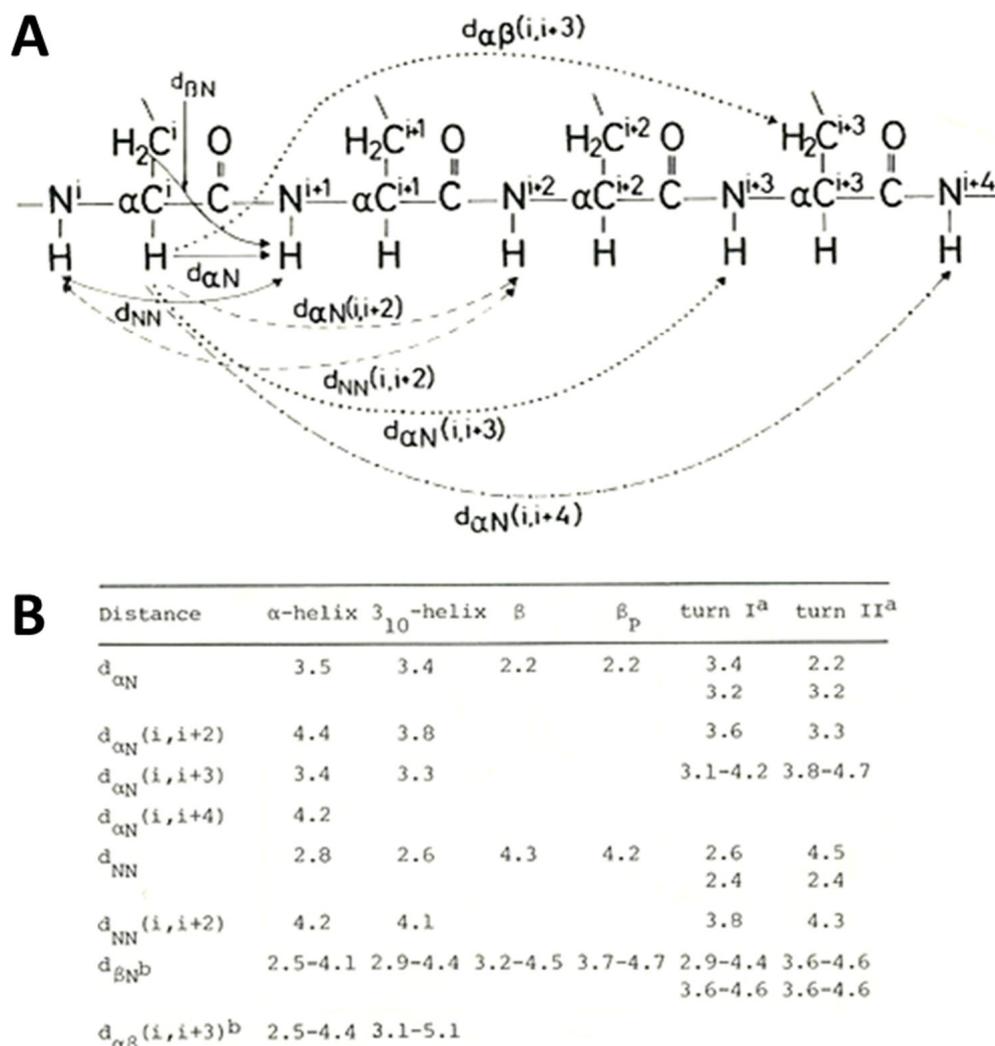
avec  $k$  le facteur de proportionnalité,  $d_{ij}$  la distance entre les noyaux  $i$  et  $j$  et  $I_{ij}$  l'intensité de la tache de corrélation pour les noyaux  $i$  et  $j$ .

Ces distances sont approximatives à cause de la dynamique interne des molécules. Ainsi, les distances issues de la valeur des volumes des taches de corrélation se situent dans une gamme de distances permises  $d_{\min} < d_{ij} < d_{\max}$ . De plus, une difficulté supplémentaire réside sur la présence de taches de corrélation ambiguës : une tache NOE peut être la somme de  $n$  résonances NOE. En effet, il peut être le résultat de contributions dipolaires entre plusieurs paires de protons dont les fréquences de résonances sont proches. Cependant, il existe des logiciels comme par exemple le logiciel ARIA (Ambiguous Restraints for Iterative Assignment) qui permet l'attribution semi-automatique des taches NOE et de traiter correctement les taches NOE ambiguës et enfin de les convertir en contraintes de distances [171]. Le fonctionnement de ce logiciel ne sera pas développé car l'attribution des taches NOE a été faite de façon manuelle.

#### **4.2.1.2-Détermination de la structure secondaire du peptide P-LAH<sub>4</sub> :**

##### ***a) Effets NOE dans les structures secondaires des protéines [172] :***

Dans les hélices  $\alpha$ , on observe généralement des effets NOE entre les protons amides de résidus voisins. Pour un  $N_H$  d'un résidu  $i$ , on mesurera un effet NOE avec le  $N_H$  du résidu  $i-1$  et du résidu  $i+1$ . Par contre pour les structures de type feuillet  $\beta$ , les effets NOE entre résidus voisins ont lieu entre le  $H\alpha$  et le  $N_H$ . Dans les structures en hélice  $\alpha$ , on a aussi des connectivités entre  $H\alpha$  et  $N_H$  des résidus  $i$  et  $i+3$ ,  $i+4$ . Les effets NOE observés dans les différentes structures secondaires sont montrés sur la figure 4.8



**Figure 4.8: A- Segment polypeptidique montrant les connectivités  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  au sein d'une protéine, B- Contacts NOE dans les protéines en fonction de leur structure secondaire [172].**

**b) Index de déplacement chimique (CSI) [173-176]:**

Contrairement à d'autres méthodes de spectroscopie optique comme le DC qui fournit une information globale quant à la structure secondaire de la protéine (% d'hélice  $\alpha$ , % feuillet  $\beta$ ...), la RMN permet non seulement de déterminer la structure secondaire de la protéine mais également de localiser précisément cette structure au sein de la chaîne peptidique.

Par exemple, la connaissance des valeurs de déplacements chimiques est importante car elle permet d'obtenir des informations structurales sur les protéines. En effet, des études ont montré qu'il existe une corrélation entre la valeur de déplacement chimique des  $^1\text{H}\alpha$  dans

une protéine et sa structure secondaire. En effet lorsqu'une protéine adopte une structure en hélice  $\alpha$  ses valeurs de déplacements chimiques en  $^1\text{H}\alpha$  sont inférieures à celles que l'on rencontre dans les protéines non structurées et supérieures si la protéine possède une structure en feuillet  $\beta$ . Il est possible de déterminer la structure secondaire d'une protéine en utilisant l'index de déplacement chimique (Chemical Shift Index, CSI) qui consiste à calculer l'écart entre le déplacement chimique du noyau observé ( $\delta_{\text{obs}}$ ) et le déplacement chimique du même noyau impliqué dans une structure aléatoire ( $\delta_{\text{RC}}$ ). Ensuite, pour chaque résidu on attribue un nombre -1, 0 ou +1.

En effet si :

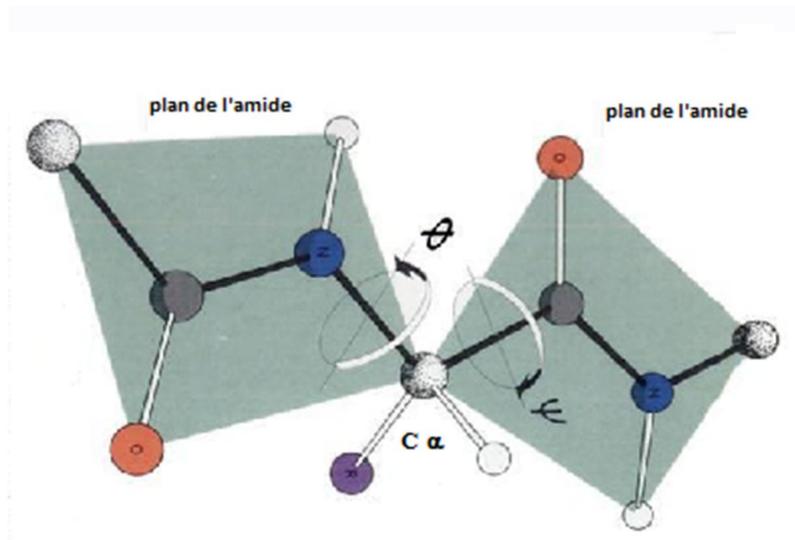
- $-0,1 < \delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{RC}} < +0,1$  alors on attribue un « 0 » au résidu.
- $\delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{RC}} < -0,1$  alors on attribue un « -1 » au résidu.
- $\delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{RC}} > 0,1$  alors on attribue un « +1 » au résidu.

Chacun de ces index indique donc la propension d'un acide aminé à être impliqué dans une hélice  $\alpha$  (-1), un feuillet  $\beta$  (+1) ou autre (0) Ainsi, une succession de quatre « -1 » non interrompue, indique la présence d'une hélice  $\alpha$  et une succession d'au moins trois « +1 » non interrompue indique la présence d'un feuillet  $\beta$ .

**c) Détermination des angles de torsion du squelette peptidique par le logiciel TALOS (Torsion Angle Likelihood Obtained from Shift and sequence similarity [177]:**

Une autre méthode empirique permet d'obtenir la structure secondaire d'une protéine à partir du logiciel TALOS. Ce logiciel permet de prédire les valeurs des angles dièdres  $\varphi$  et  $\psi$  (figure 4.9) à partir des valeurs de déplacements chimiques de cinq atomes d'un résidu :  $\text{H}_\text{N}$ , CO,  $\text{C}\alpha$ ,  $\text{C}\beta$  et  $\text{N}_\text{H}$ . Pour chaque résidu, TALOS prend en compte l'environnement de ses deux voisins. Ainsi, pour chaque tripeptide obtenu, il compare les valeurs de déplacements chimiques mesurées avec ceux de tripeptides contenus dans une banque de données. Cette banque de données contient des protéines dont la structure est connue avec une résolution de 2.2 Å. Pour chaque tripeptide de notre séquence, les dix tripeptides de la banque, pour lesquels il y a une bonne similarité de séquence ainsi qu'une bonne similarité de déplacements chimiques, sont conservés. Les valeurs des angles dièdres  $\varphi$  et  $\psi$  correspondants sont

indiquées sur le diagramme de Ramachandran. Celui-ci représente des surfaces qui englobent les angles  $\varphi$  et  $\psi$  que l'on retrouve dans les hélices  $\alpha$  droites ou gauches et les feuillets  $\beta$ .



**Figure 4.9 : Squelette peptidique montrant une unité peptidique ainsi que les angles dièdres  $\varphi$  et  $\psi$  [178].**

## 4.2.2-Matériel

### 4.2.2.1- Marquage uniforme du peptide P-LAH<sub>4</sub> en <sup>15</sup>N et en <sup>13</sup>C :

Le peptide uniformément marqué en <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C a été produit de la même manière que le peptide non marqué (chapitre 3) à la seule différence que le milieu LB a été remplacé par le milieu minimum M9 (annexe 3) qui contient 0,5 g <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl et 2 g de <sup>13</sup>C glucose par litre de culture comme seule source d'azote et de carbone. Tous les produits proviennent de Sigma-Aldrich (St-Louis, MO) sauf le <sup>13</sup>C glucose qui vient d'EURISO-TOP (Saint Aubin, France).

#### 4.2.2.2- Préparations des échantillons RMN

Deux échantillons RMN du peptide P- LAH<sub>4</sub> marqué uniformément en <sup>15</sup>N et <sup>13</sup>C ont été préparés. Le premier échantillon contient 500 µg de peptide P-LAH<sub>4</sub> dans 500 µL de tampon acétate pH=5,4. Le deuxième échantillon contient le peptide P-LAH<sub>4</sub> dans des micelles de DPC avec un rapport molaire n (LAH<sub>4</sub>) / n (DPC) = 1/100 à pH= 5,4 (ce rapport molaire correspond au rapport molaire utilisé par le Dr Georgescu dans la détermination de structure du peptide LAH<sub>4</sub> [87]). Pour cela, une solution de 34 mM de micelles de DPC (CMC = 1,1 mM) est obtenue en dissolvant 7 mg de DPC-d38 (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) dans 500 µL de 10 mM tampon acétate pH= 5,4. 500 µg de peptide LAH<sub>4</sub> marqué uniformément en <sup>15</sup>N et <sup>13</sup>C est additionné pour avoir une concentration finale en peptide de 0,34 mM. 10 % D<sub>2</sub>O (v/v) sont ajoutés aux échantillons RMN.

#### 4.2.2.3-Expériences RMN

Les spectres <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCs, ainsi que les spectres HN(CO)CA, HNCA, HN(CO)CACB, HNCACB et <sup>1</sup>H<sub>N</sub>-<sup>1</sup>H NOESY-HSQC ont été enregistrés par le Dr Andrew Atkinson (IGBMC, Illkirch), sur un spectromètre 600 MHz DRX Bruker équipé d'une cryosonde. Pour le spectre en deux dimensions <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC, la fenêtre spectrale en proton est de 4006,410 Hz. La fenêtre spectrale et le nombre d'incrément dans la dimension <sup>15</sup>N sont respectivement 1094,719 Hz et 200 incrément. Le nombre de scans est de 8. Pour les spectres en trois dimensions HNCA et HN(CO)CA, la fenêtre spectrale et le nombre d'incrément sont respectivement 7507,507 Hz et 2048 dans la dimension <sup>1</sup>H, 1094,725 Hz et 28 pour la dimension <sup>15</sup>N et 3621,858 Hz et 58 pour la dimension <sup>13</sup>C. Le nombre de scans est de 16. Les fenêtres spectrales et le nombre d'incrément pour les dimensions <sup>1</sup>H et <sup>15</sup>N et le même que précédemment pour les spectres HNCACB et HN(CO)CACB sauf pour la dimension <sup>13</sup>C où la fenêtre spectrale et le nombre d'incrément valent respectivement 8149,071 Hz et 96. Le délai de recyclage de tous les spectres précédent est de 1 s. L'enregistrement du spectre tridimensionnel <sup>1</sup>H<sub>N</sub>-<sup>1</sup>H NOESY HSQC s'est fait avec les fenêtres spectrales et les nombres d'incrément suivants: 7507,507 Hz/2048 dans la dimension <sup>1</sup>H, 1094,725 Hz/28 pour la dimension <sup>15</sup>N et 7507,507 Hz/180 pour la dimension <sup>1</sup>H, avec 8 scans et avec 1,2 s de délai de recyclage. Le temps de mélange est de 150 ms. La suppression de solvant a été faite avec la séquence Watergate 3-9-19 [179].

Les données ont été traitées avec les logiciels NMRpipe/NMRDraw [180]. Le logiciel CARA (The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial) [181] a été utilisé pour analyser tous les spectres 3D.

#### **4.2.2.4) Expériences de dichroïsme circulaire**

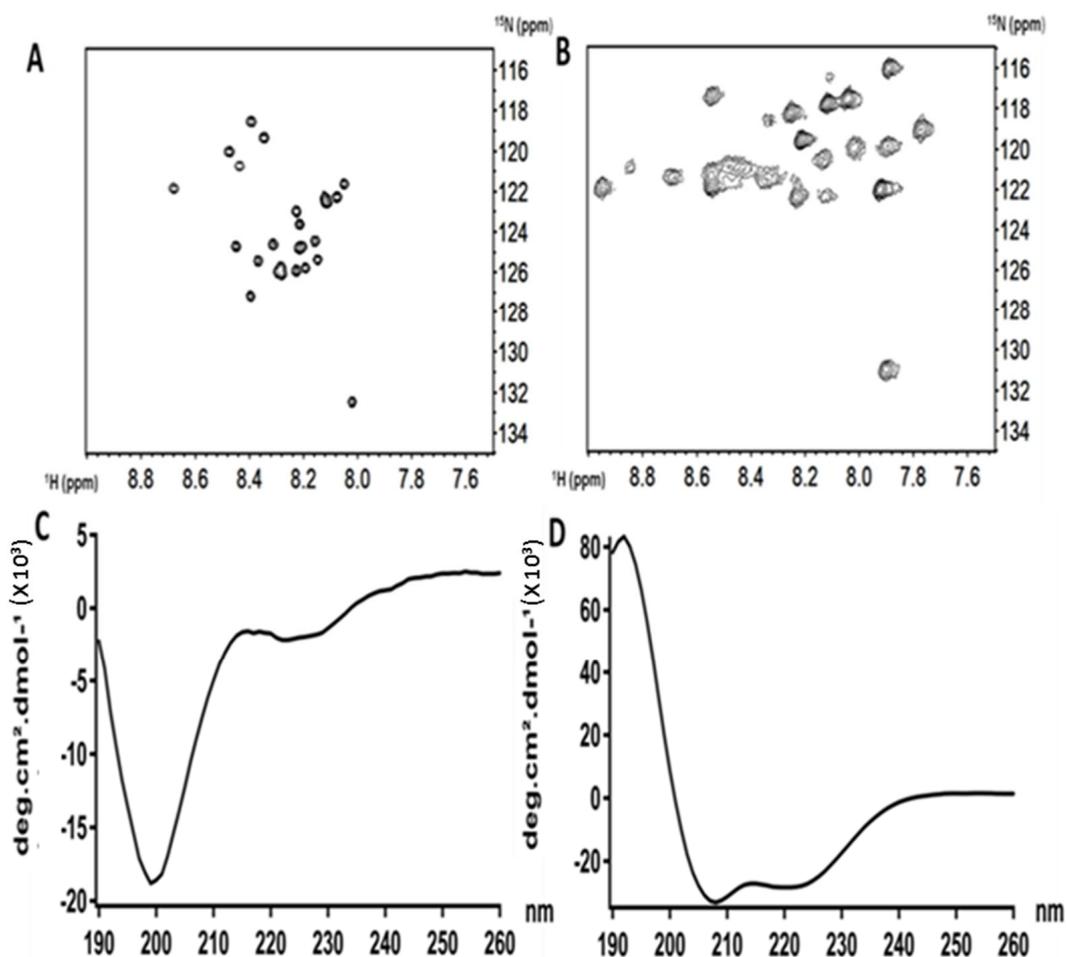
Les spectres de DC des solutions de complexes sont enregistrés à 317 K sur un appareil JASCO J-810 en utilisant une fenêtre spectrale de 190-260 nm.

### **4.3-Résultats et discussions**

#### **4.3.1-Attribution du squelette peptidique.**

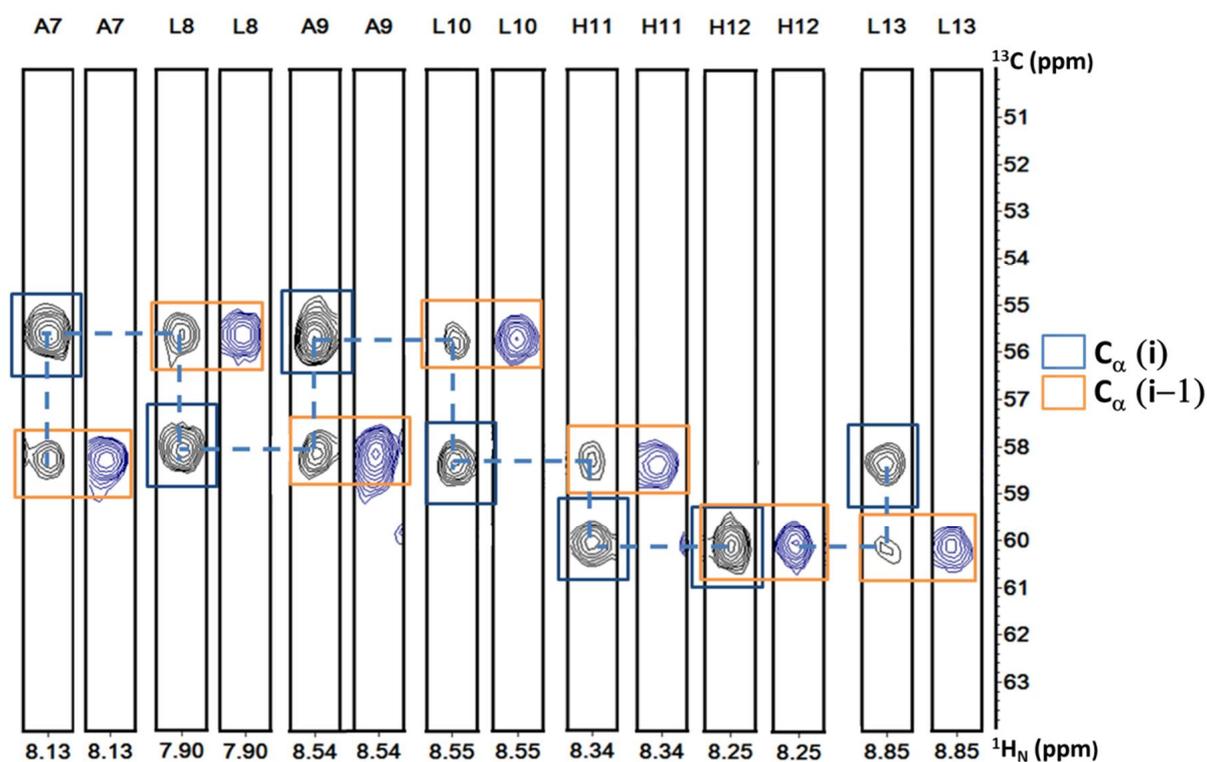
Les spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC montrent la corrélation entre les protons et les noyaux azote directement liés. Ainsi pour une protéine, on observe des taches de corrélation entre le proton amide et l'azote pour chaque acide aminé sauf pour le tout premier en N-ter. Théoriquement sur notre spectre nous devrions compter 26 taches.

Ce type de spectre permet de confirmer l'homogénéité de notre échantillon mais aussi de voir rapidement si notre peptide est présent de façon structurée. Un peptide bien structuré, est caractérisé par une bonne dispersion des résonances sur les deux dimensions. Ainsi, en comparant les spectres HSQCs sur la figure 4.10-A et B, on peut constater que le peptide n'est pas structuré dans 10 mM de tampon acétate, contrairement au peptide contenu dans 34 mM de micelles de DPC. Ces résultats ont été confirmés par dichroïsme circulaire (figure 4.10-C et D). En effet, le spectre dichroïque de l'échantillon contenant le peptide P-LAH<sub>4</sub> dans les micelles de DPC, est caractérisé par un maximum à 195 nm et deux minima à 208 nm et 222 nm. Ce spectre est caractéristique d'une structure en hélice  $\alpha$ . Ces résultats sont en accord avec les résultats publiés auparavant où il a été montré que le peptide LAH<sub>4</sub> se structure en hélices  $\alpha$  en présence de membranes [39, 41, 86, 87]. De plus, le spectre  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC du peptide P-LAH<sub>4</sub> dans les micelles de DPC à pH= 5,4 est stable au cours du temps. En effet, après avoir passé une dizaine de jours à 4 °C, le spectre n'a pas changé. Cet échantillon semble donc être prometteur pour l'étude structurale du peptide dans des membranes mimétiques. L'analyse du spectre montre 24 taches de corrélation contrairement aux 26 taches attendues.



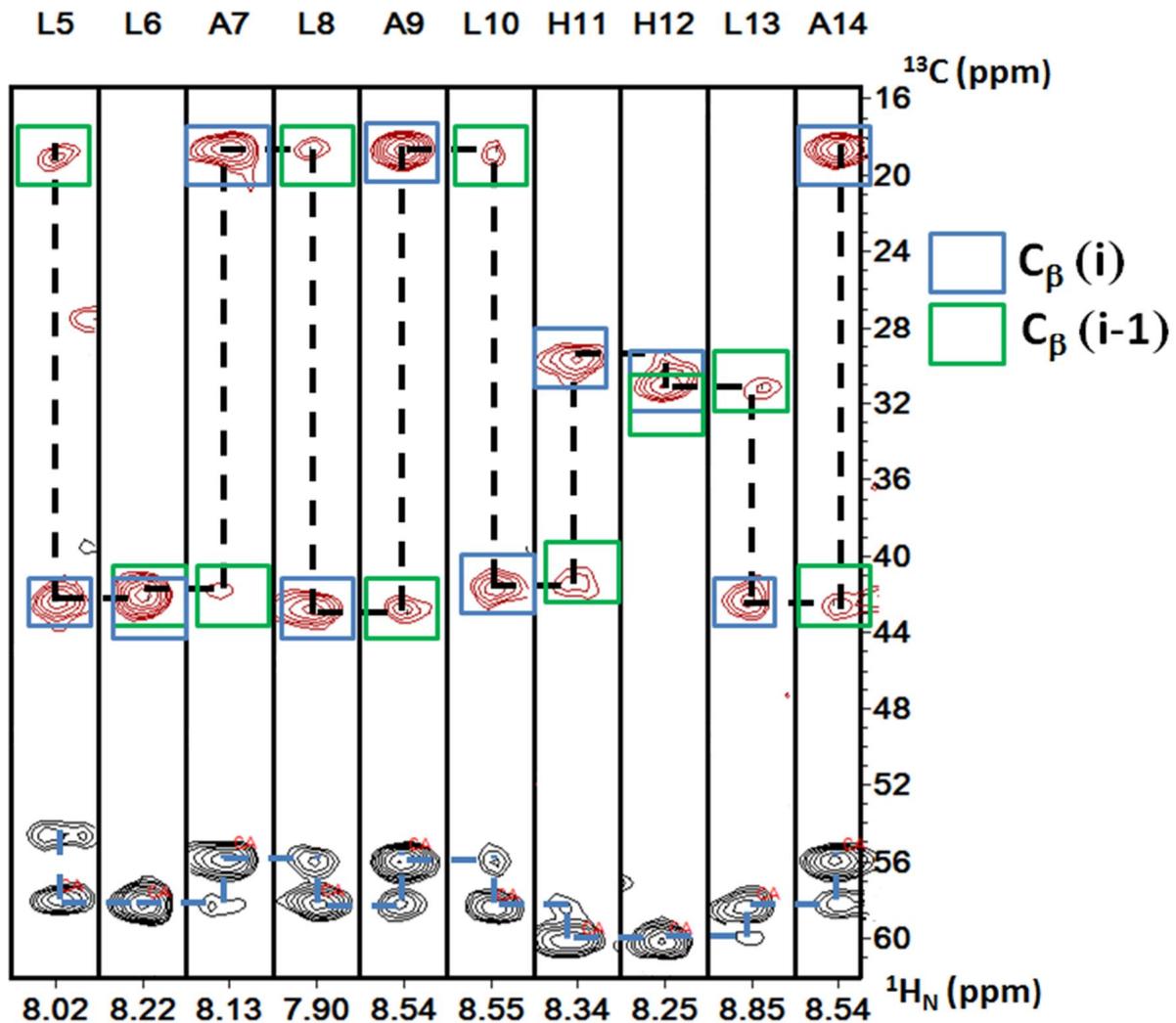
**Figure 4.10: A et C : Spectre  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC du peptide P-LAH<sub>4</sub> dans 10 mM de tampon acétate pH = 5,4 et spectre DC respectivement. B et D : Spectre  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC du peptide P-LAH<sub>4</sub> dans 34 mM de micelles de DPC à pH = 5,4 et spectre DC respectivement.**

La figure 4.11 montre un exemple de strips correspondant au déplacement chimique des protons amides des résidus A7 à L13 du spectre HN(CO)CA (bleu) et HNCA (noir). Pour chacune des valeurs de déplacements chimiques en  $^1\text{H}_\text{N}$ , les strips des spectres HN(CO)CA et HNCA sont mis côte à côte pour pouvoir différencier le déplacement chimique du C $\alpha$  du résidu  $i$  et du résidu  $(i+1)$  et ainsi de tenter une première attribution séquentielle des pics de  $\text{H}_\text{N}$  de la HSQC.



**Figure 4.11: Strips des spectres HN(CO)CA (bleu) et HNCA (noir) pour les résidus A7 à L13 mettant en évidence l'attribution des  $\text{C}_\alpha$  (encadré noir) et du  $\text{C}_\alpha(i-1)$  (encadré bleu) pour chaque résidu  $i$  et permettant ainsi un début d'attribution séquentielle (pointillés bleus).**

La comparaison des strips  $^1\text{H}_\text{N}$  des spectres HN(CO)CACB et HNCACB nous a permis de déterminer le déplacement chimique des noyaux  $\text{C}_\beta$  des résidus  $i$  et des résidus ( $i-1$ ) et en plus de discriminer les résidus leucine ( $\text{C}_\beta= 41,9$  ppm) et alanine ( $\text{C}_\beta= 19$  ppm) des résidus lysine ( $\text{C}_\beta= 32,3$  ppm) et histidine ( $\text{C}_\beta= 32$  ppm). La figure 4.12 montre l'attribution séquentielle à partir des déplacements chimiques des  $\text{C}_\alpha$  et  $\text{C}_\beta$  des résidu  $i$  et des résidu ( $i-1$ ) pour les acides aminés A7 à L13 du peptide P-LAH<sub>4</sub> à partir du spectre HNCACB.



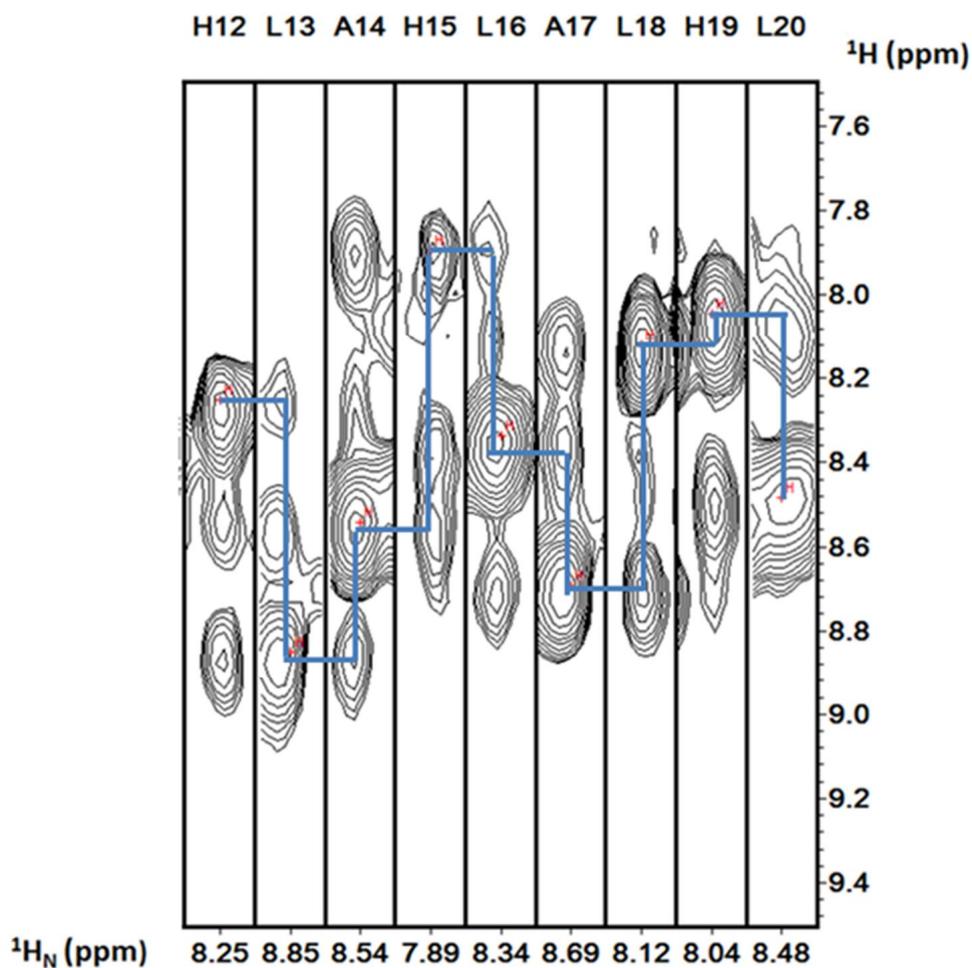
**Figure 4.12:** Strips du spectre HNCACB pour les résidus L5 à A14 mettant en évidence l’attribution des  $\text{C}_\beta$  et des  $\text{C}_\beta(i-1)$  (signaux rouges) pour chaque résidu et permettant ainsi l’attribution séquentielle (pointillés noirs). L’attribution séquentielle à partir des  $\text{C}_\alpha$  (signaux noirs) est montrée sur la partie basse du spectre (pointillés bleus).

Cependant, à cause de la redondance des acides aminés (les résidus A et L représente 67% des résidus du peptide), et donc de la présence de nombreuses taches avec des valeurs de déplacement chimique très proches, il est difficile d’attribuer toutes les taches de la  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC à partir des seuls spectres 3D HNCA, HN(CO)CA, HN(CO)CACB et HNCACB. Par conséquent l’attribution complète a nécessité l’enregistrement d’autres spectres.

L’analyse du spectre 3D  $^1\text{H}_\text{N}-^1\text{H}$  NOESY-HSQC nous a permis d’attribuer les taches de la  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC qui n’ont pas pu être attribués par les autres spectres 3D et de lever certaines ambiguïtés d’attribution précédents grâce aux contacts NOE existants entre les  $\text{N}_\text{H}-$

$N_H$  voisins ( $i, i+1$ ). La lysine 26 du peptide n'a pu être observée que sur la 3D  $^1H$ - $^1H$  NOESY-HSQC, par conséquent, seul les déplacements chimiques des noyaux  $^1H\alpha$ ,  $^{15}N_H$  et  $^1H_N$  ont pu être attribués pour ce résidu.

La figure 4.13 montre un exemple de strips du spectre 3D  $^1H_N$ - $^1H$  NOESY-HSQC entre les résidus 12 à 20. Cette figure montre les connectivités entre les résidus par les contacts NOE existants entre les  $N_H$ - $N_H$  voisins ( $i, i+1$ ).



**Figure 4.13: Strips des résidus 12 à 20 du spectre 3D  $^1H_N$ - $^1H$  NOESY-HSQC montrant le couplages  $N_H$ - $N_H$  entre les acides aminés voisins ( $i,i+1$ ).**

L'attribution des 24 taches de corrélations présentes sur la  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC est montrée sur la figure 4.14.

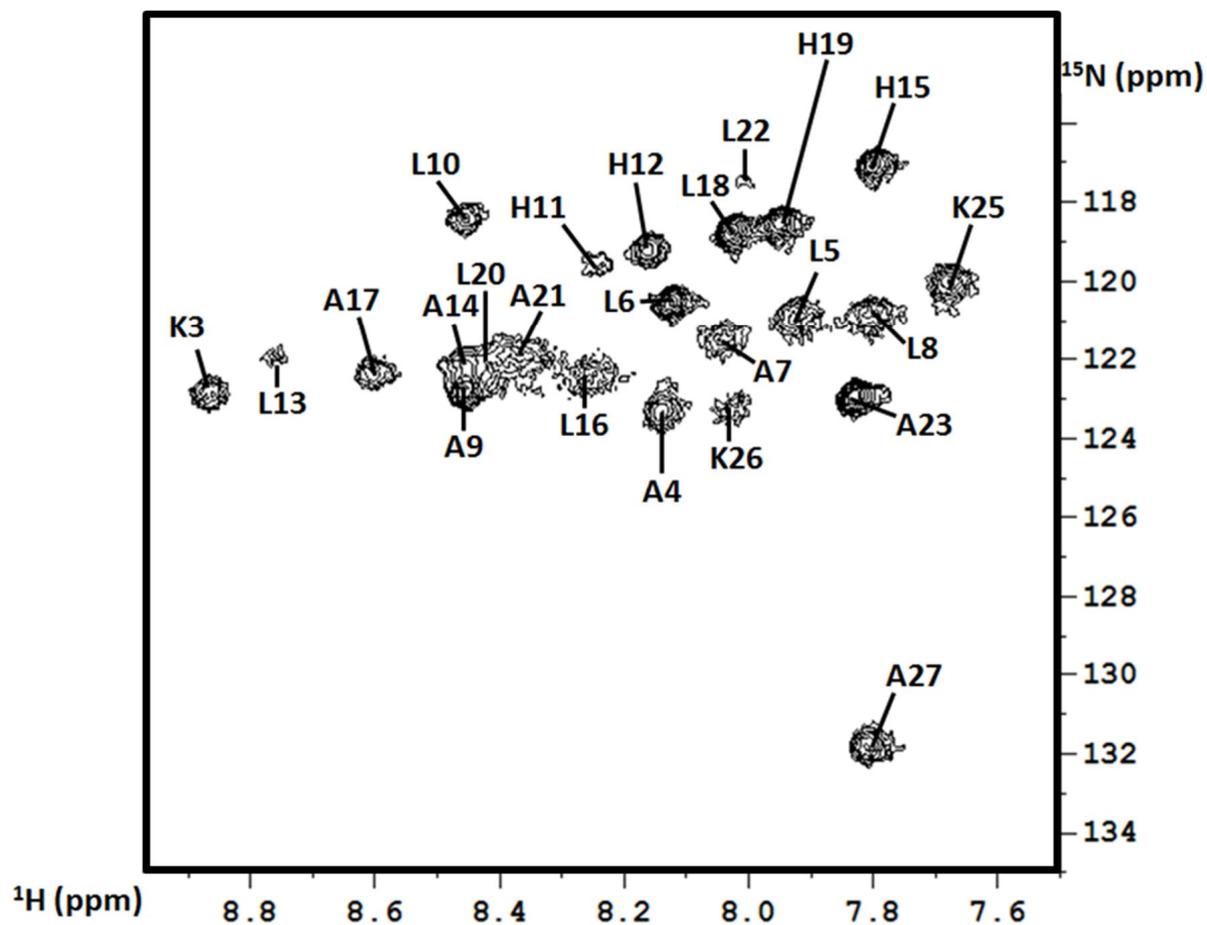


Figure 4.14: Spectre  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC du peptide P-LAH<sub>4</sub> dans les micelles de DPC à pH= 5,4 montrant l'attribution des noyaux  $^{15}\text{N}$  et  $^1\text{H}_\text{N}$  du squelette peptidique.

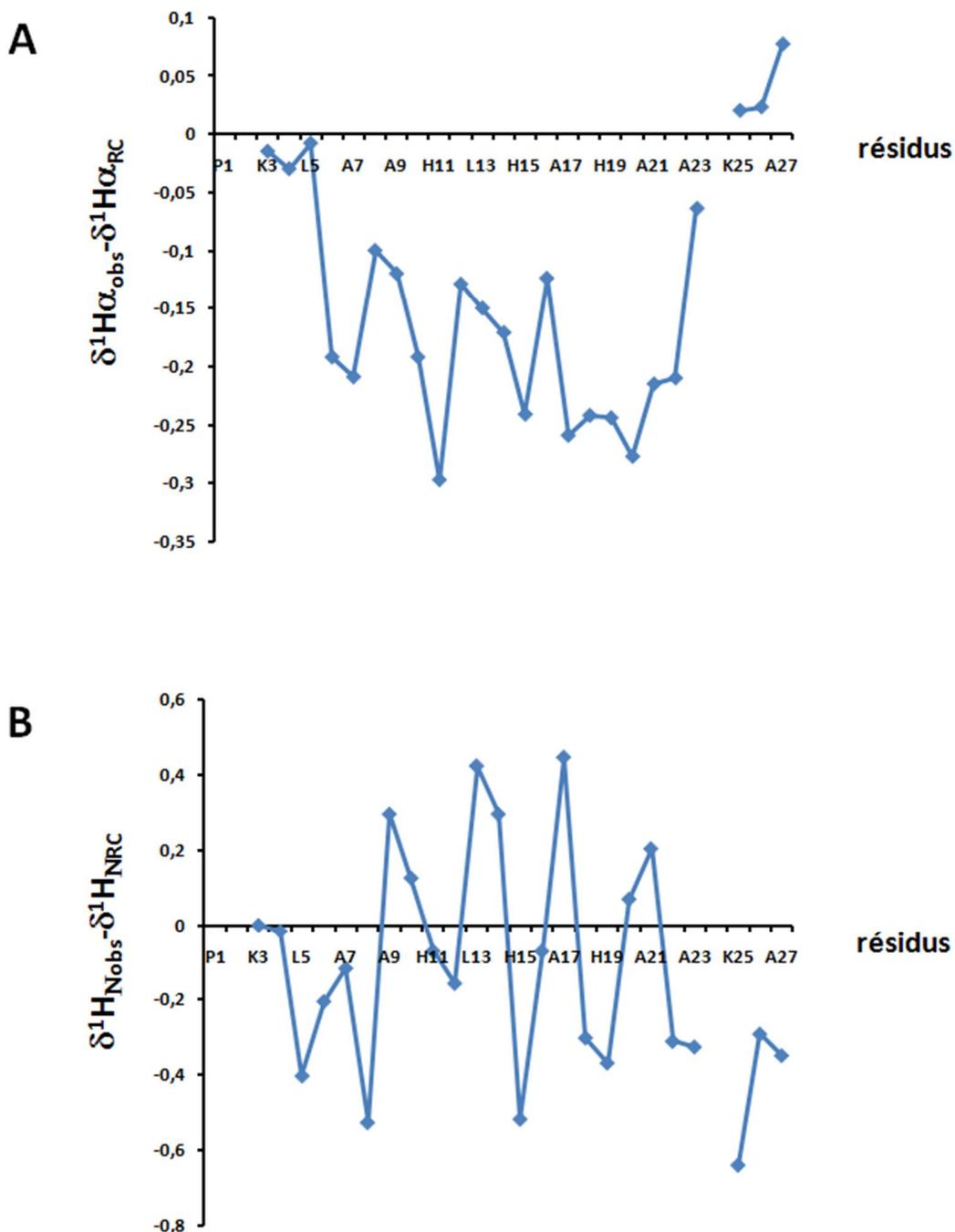
Hormis le résidu proline qui n'est pas observable sur ce type de spectre, nous n'avons pas pu attribuer la L24 et par conséquent déterminer les valeurs de déplacements chimiques de ses noyaux  $^{13}\text{C}\alpha$ ,  $^{13}\text{C}\beta$ ,  $^{15}\text{N}_\text{H}$ ,  $^1\text{H}_\text{N}$  et  $^1\text{H}\alpha$ . Ce problème est sûrement dû à la superposition des taches à cause de la séquence particulièrement redondante du peptide. De plus, le résidu K2 n'a pas été visualisé sur le spectre. Ce résidu appartient à l'extrémité N terminale du peptide et l'hypothèse la plus probable serait que ce résidu est situé dans une zone flexible donc avec une dynamique locale importante et par conséquent les corrélations correspondantes  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  sont faibles. Les valeurs de déplacements chimiques des noyaux  $\text{N}_\text{H}$ ,  $\text{H}_\text{N}$ ,  $\text{C}\alpha$ ,  $\text{C}\beta$ ,  $\text{H}\alpha$ , des résidus du peptide sont regroupés dans un tableau de l'annexe 4.

### **4.3.2-Identification de la structure secondaire et prédiction d'angles.**

La détermination de la structure secondaire du peptide a été prédite par différentes méthodes : les contacts NOE, le calcul du CSI ainsi que par le logiciel TALOS à partir des valeurs de déplacements chimiques obtenus précédemment.

#### **4.3.2.1-CSI**

Le graphique 4.15-A représente la différence entre la valeur de déplacement chimique  $^1\text{H}\alpha$  observée pour un résidu  $i$  du peptide et la valeur de déplacement chimique pour le même résidu lorsqu'il appartient à une structure aléatoire (CSI). Il faut cependant noter que le calcul du CSI n'a pas pu être fait pour les résidus P1, K2 et L24 faute d'attribution de ces trois acides aminés. Le graphe montre que le peptide P-LAH<sub>4</sub> possède une structure en hélice  $\alpha$  entre la leucine 6 et leucine 22 (avec des valeurs de CSI inférieures à -0,1) du peptide P-LAH<sub>4</sub> (ce qui correspond à la séquence L5-L21 du peptide LAH<sub>4</sub>). Les extrémités N-ter (P1 à L5) et C-ter (A23 à K27) du peptide ne semblent pas structurées (valeurs de CSI supérieures à 0,1).



**Figure 4.15:** A- Représentation graphique de l'écart (en ppm) entre le déplacement chimique  $^1\text{H}\alpha$  de chaque résidu du peptide P-LAH<sub>4</sub> et le  $^1\text{H}\alpha$  du même résidu dans une structure aléatoire. B- Représentation graphique de l'écart (en ppm) entre le déplacement chimique  $^1\text{H}_\text{N}$  de chaque résidu du peptide P-LAH<sub>4</sub> et le  $^1\text{H}_\text{N}$  du même résidu dans une structure aléatoire.

D'autres équipes ont cherché la relation qu'il y avait entre les valeurs de déplacements chimiques du proton amide ( $^1\text{H}_\text{N}$ ) et la structure secondaire des protéines [175, 176]. En général, les valeurs du déplacement chimique en  $^1\text{H}_\text{N}$  sont diminuées par rapport à celle des protéines non structurées, si la protéine adopte une structure en hélice  $\alpha$  et augmentées pour

les feuillets  $\beta$ . Lorsque l'on trace la  $\Delta\delta^1H_N$  en fonction de la position du résidu dans le peptide P-LAH<sub>4</sub> (figure 4.15-B), on n'observe pas de diminution des valeurs de déplacement chimique en  $H_N$  pour tous les résidus. En effet, on observe une périodicité de 3-4 résidus dans la valeur de  $\Delta\delta^1H_N$ . On pouvait déjà observer cette périodicité pour la  $\Delta\delta^1H_\alpha$  (figure 4.15-A). Cette périodicité dans la  $\Delta\delta^1H_N$  a aussi été observée avec d'autres peptides amphipathiques possédant une structure hélicale [182, 183]. La courbe  $\Delta\delta^1H_N$  en fonction de la position du résidu pour le peptide P-LAH<sub>4</sub>, montre quatre maximas positifs de CSI pour les résidus A9, A13, A17 et A21 et quatre minimas négatifs pour les résidus L8, H15, H19 et L22. Les valeurs positives de CSI correspondent aux résidus situés sur la face hydrophobe et les valeurs négatives de CSI aux résidus situés dans la face hydrophile du peptide P-LAH<sub>4</sub> (figure 4.16).

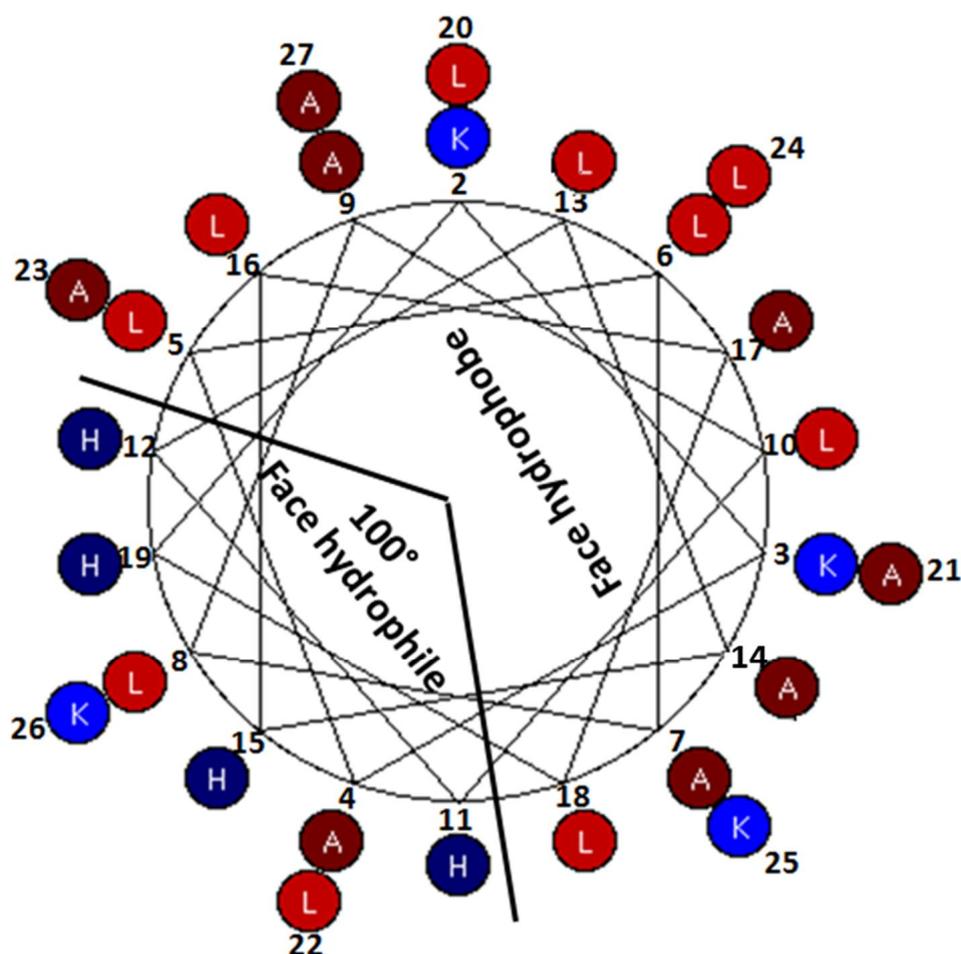


Figure 4.16 : Représentation en roue hélicoïdale d'Edmunson du peptide P-LAH<sub>4</sub>.

### 4.3.2.2- Contacts NOE

La présence de contacts NOE entre les résidus du peptide P-LAH<sub>4</sub> est visualisée à partir du spectre 3D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY-HSQC (figure 4.17).

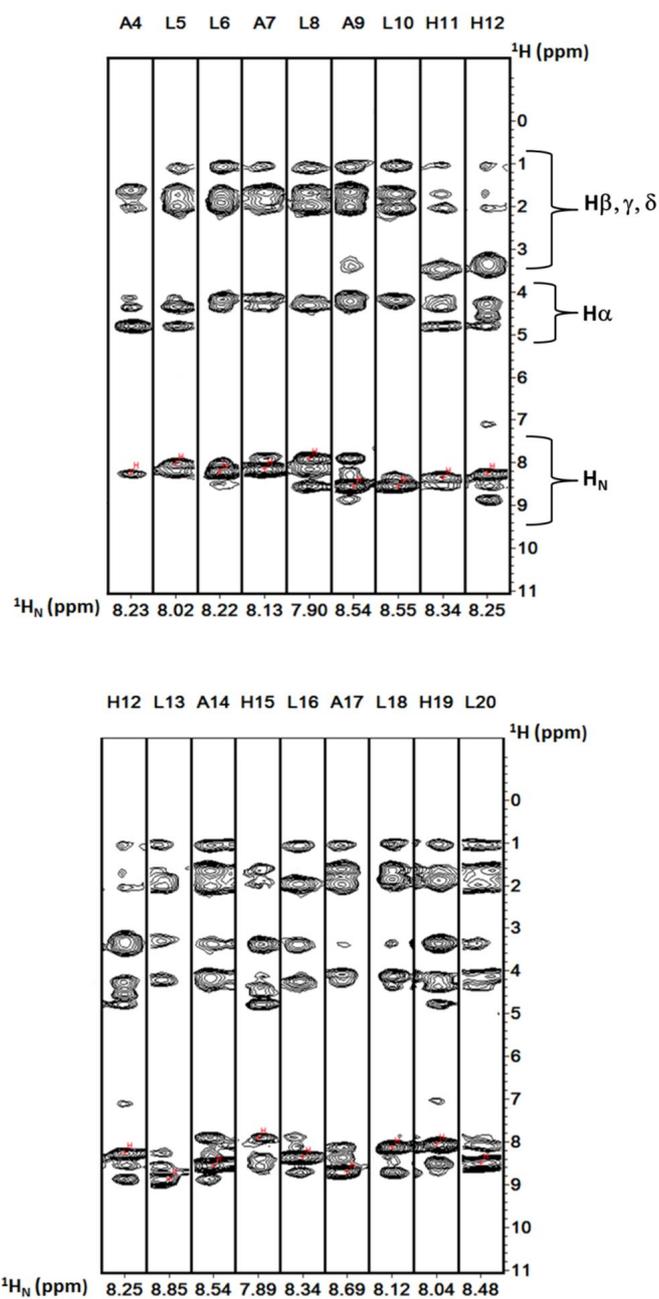
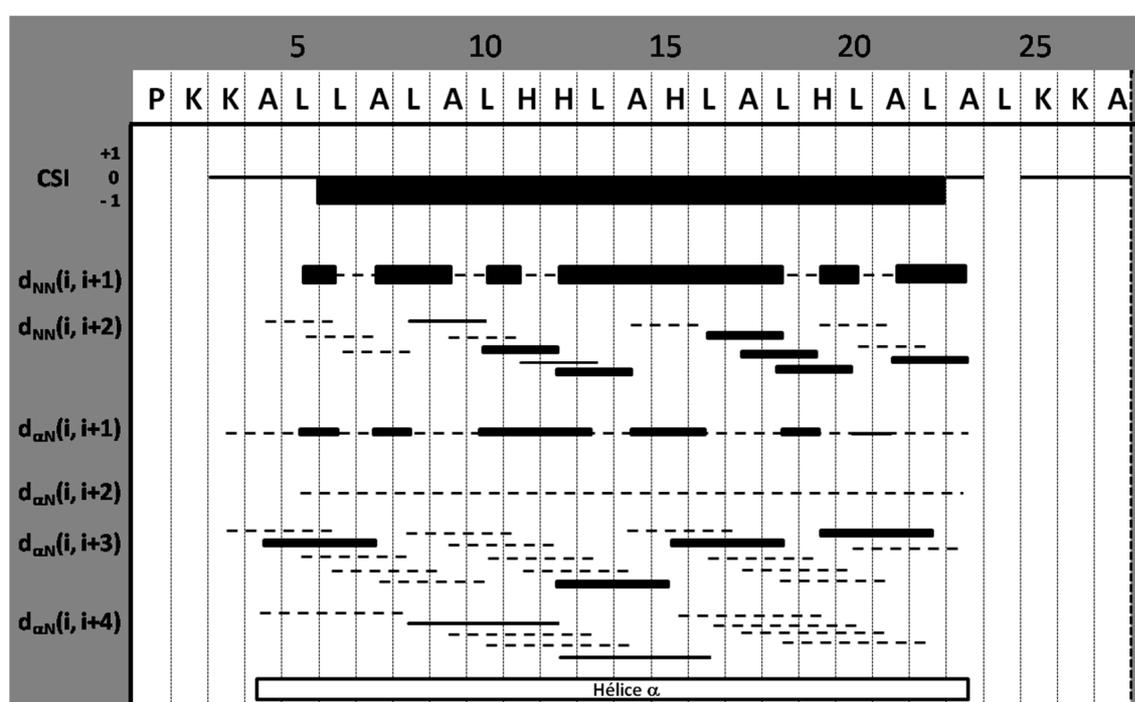


Figure 4.17 : Strips des résidus A4 à L20 du spectre 3D <sup>1</sup>H<sub>N</sub>-<sup>1</sup>H NOESY-HSQC.

L'attribution des taches NOE a été faite manuellement. A cause de la faible dispersion des déplacements chimiques des  $^1\text{H}\alpha$  au sein du peptide, les taches de corrélation avec ces noyaux sont très souvent ambigus du fait de la superposition des signaux. La figure 4.18 résume les contacts NOE présents sur le peptide en contact avec les micelles de DPC et à pH= 5,4. Ainsi, le graphe NOE de la figure 4.18 présente en trait plein les NOE non ambigus (dont l'épaisseur est fonction de l'intensité de la tache NOE) et en pointillés les NOE ambigus. L'intensité des taches de corrélation croisées non ambiguës est divisé en trois classes : forte, moyenne est faible correspondant respectivement à des intensités de taches > 15000, comprises entre 5000 et 15000 et inférieures à 5000 (annexe 5).

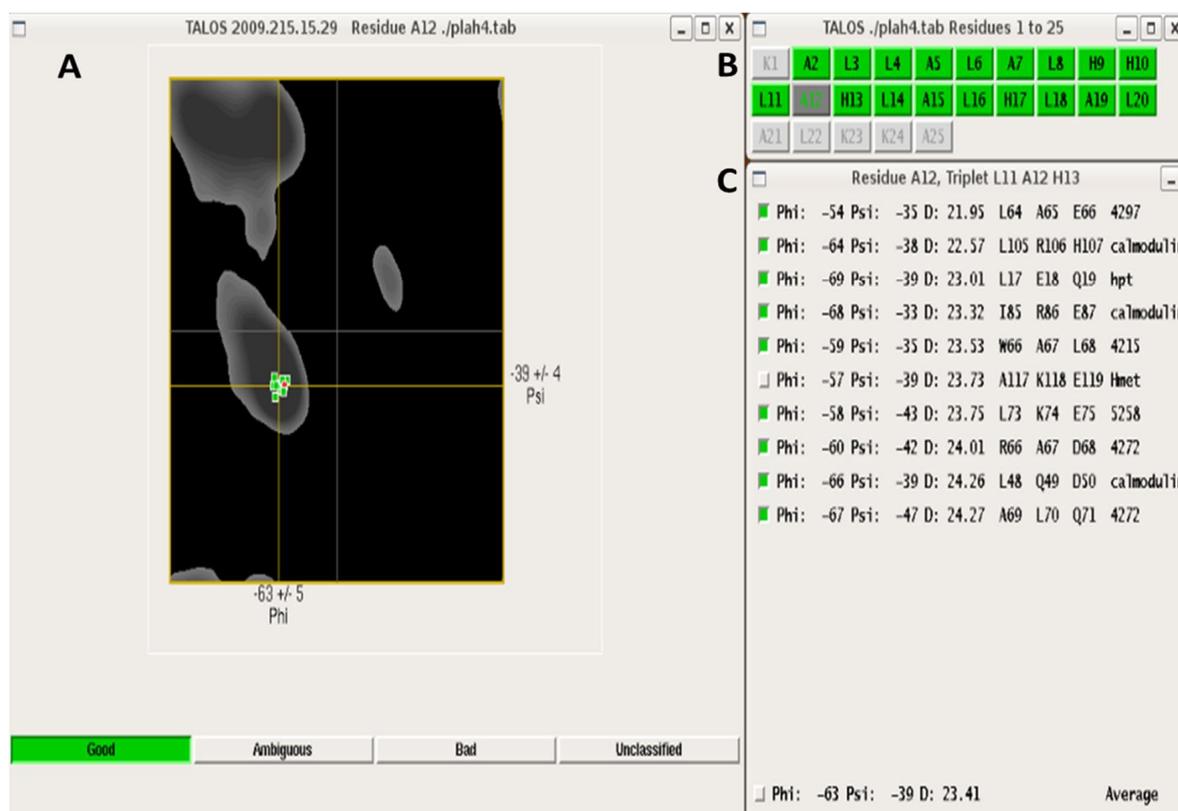


**Figure 4.18 : Graphique représentant les contacts NOE entre les résidus du peptide P-LAH<sub>4</sub>.**

L'analyse du graphe montre de forts contacts NOE entre les H<sub>N</sub> des résidus *i* et les H<sub>N</sub> des résidus (*i*+1) entre les résidus L5 et A23. D'autre part, on observe des contacts NOE de type  $^{15}\text{N}_\text{H}(i)$  et  $^1\text{H}\alpha$  (*i*+3 ou *i*+4) entre les résidus A4 et L22. Tous ces contacts NOE sont caractéristiques d'une hélice  $\alpha$ . Le peptide P-LAH<sub>4</sub> en contact avec les micelles de DPC à pH= 5,4 aurait une structure en hélice  $\alpha$  des résidus A4 au résidu A23.

### 4.3.2.3- TALOS

Le logiciel Talos permet de prédire les angles dièdres  $\phi$  et  $\psi$  du squelette peptidique. Ce logiciel utilise une banque de données contenant les déplacements chimiques de 78 protéines. L'analyse de la structure secondaire du peptide P-LAH<sub>4</sub> par TALOS a été réalisée en utilisant les déplacements chimiques N<sub>H</sub>, H<sub>N</sub>, C $\alpha$ , C $\beta$  et H $\alpha$  des résidus K3 à A27. La séquence peptidique utilisée pour calculer la structure secondaire par TALOS est la séquence de P-LAH<sub>4</sub> dépourvue de P1 et K2. Ainsi la lysine 3 du peptide correspond à la lysine 1 de la séquence utilisée par TALOS. La figure 4.19 montre un exemple de résultat obtenu par le logiciel pour le résidu A14 (A12 pour Talos).



**Figure 4.19 :** Résultat du logiciel TALOS pour l'alanine 14 (A12 pour TALOS) du peptide P-LAH<sub>4</sub>. A- Diagramme de Ramachandran illustrant les angles dièdres avec en carrés verts les dix tripeptides de la banque de données ayant une séquence similaire et des déplacements chimiques similaires avec celle du tripeptide L11-A12-H13. B- Les résidus notés en vert correspondent à des résidus où le logiciel suggère une structure secondaire (en hélice  $\alpha$ ) avec un niveau de confiance élevé. Les résidus en gris correspondent aux régions non classées. C- Les dix meilleures valeurs d'angles dièdres obtenues pour le résidu A14 du peptide et qui permet l'estimation des angles à  $-63 \pm 7^\circ$  et  $-39 \pm 8^\circ$ .

Le logiciel TALOS prédit une structure secondaire en hélice  $\alpha$  pour tous les résidus compris entre A4 et la L22. Par contre, le logiciel n'a pas pu prédire de structure pour les résidus A23, L24 et K 25 car comme nous l'avons vu précédemment le logiciel a besoin des valeurs de déplacement chimique des résidus  $i-1$  et  $i+1$  pour prédire les angles  $\varphi$  et  $\Psi$  d'un résidu  $i$ . Par contre, le logiciel ne prédit pas la lysine 26 comme appartenant à une structure en hélice  $\alpha$ . La partie C-ter ne semble pas structurée. La valeur moyenne des angles dièdres pour chaque résidu entre A4 et L22 prédits par TALOS est présentée dans l'annexe 6.

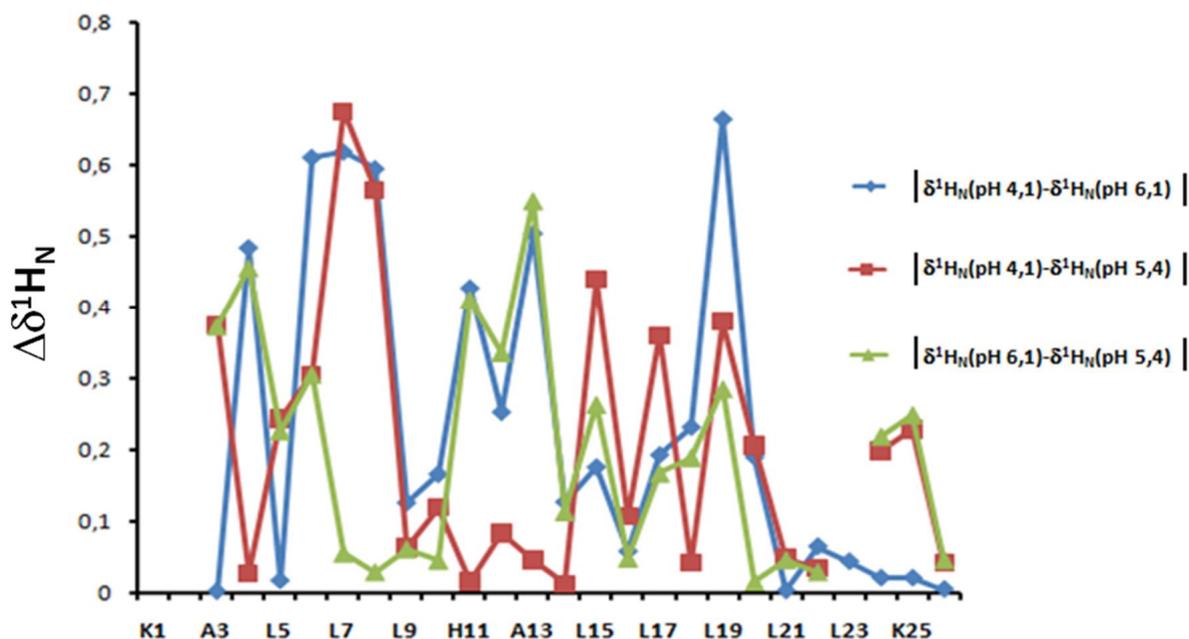
### **Conclusion :**

Les résultats obtenus par la méthode du CSI, par le logiciel Talos et les contacts NOE sont globalement compatibles entre eux. Quelques différences apparaissent cependant au niveau des limites de l'hélice  $\alpha$ . La technique du CSI indique que le peptide P-LAH<sub>4</sub> dans les micelles de DPC à pH= 5,4 est structuré en hélice  $\alpha$  des résidus L6 à L22. Quant à Talos il prédit une structure en hélice  $\alpha$  deux résidus avant c'est-à-dire à partir de l'alanine 4. Les contacts NOE caractéristiques d'une hélice  $\alpha$  se situent entre les résidus A4 et A23. Si l'on tient compte de l'ensemble des données obtenues, il semblerait donc que l'hélice  $\alpha$  est située entre les résidus A4 et A23.

### **Comparaison avec les structures obtenues à pH= 4,1 et pH= 6,1 :**

Le Dr Georgescu et ses collaborateurs [87] ont montré que la structure en hélice  $\alpha$  se déplaçait du côté C-ter vers le côté N-ter en augmentant le pH. En effet, à pH= 4,1 le peptide possède une structure en hélice  $\alpha$  entre les résidus 9-24, à pH 6,1 entre les résidus 3-9 et 14-24 et à pH= 7,8 entre les résidus 4-21.

Si l'on compare la variation de déplacement chimique du  $^1\text{H}_\text{N}$  (en valeur absolue), pour chaque résidu du peptide entre deux pH, on obtient les courbes de la figure 4.20. La courbe bleue montre la  $\Delta\delta$   $^1\text{H}_\text{N}$  entre le peptide dans une solution de DPC à pH= 4,1 et le peptide dans une solution de DPC à pH= 6,1. La courbe rouge représente la même variation mais entre pH= 4,1 et 5,4 et enfin la courbe verte la variation de  $\Delta\delta$   $^1\text{H}_\text{N}$  entre pH= 6,1 et 5,4.



**Figure 4.20 :** Courbes représentant la variation de la valeur de déplacement chimique des noyaux  $^1\text{H}_\text{N}$  pour chaque résidu du peptide entre pH= 4,1 et pH= 6,1 (courbe bleue), entre pH= 4,1 et pH= 5,4 (courbe rouge) et entre pH= 6,1 et pH= 5,4 (courbe verte).

La courbe bleue présente trois principales régions de variation du  $\delta^1\text{H}_\text{N}$ : entre les résidus A3-L9, H10-H14 et H18-A20. Si l'on compare ces zones de variations avec la différence de structure aux deux pH, on constate que la région entre A3-L9 correspond à une structuration en hélice  $\alpha$  du peptide LAH<sub>4</sub> à pH= 6,1 et qui est absente à pH= 4,1. L'autre région pour laquelle le  $\delta^1\text{H}_\text{N}$  varie correspond aux résidus compris entre H10 et H14. Ces résidus composent le coude du peptide à pH= 6,1. Ce coude est absent à pH= 4,1. Si l'on compare désormais la différence de  $\delta^1\text{H}_\text{N}$  pour le peptide à pH= 4,1 avec les valeurs que nous avons obtenues à pH= 5,4 (courbe rouge) ainsi que la différence entre les valeurs obtenus à pH= 6,1 et nos valeurs à pH= 5,4 (courbe verte), on constate qu'entre les résidus L5 et L9 la courbe rouge suit la courbe bleue entre les résidus L5 et L9 et donc qu'entre les résidus L5 et L9 le peptide se structurerait en hélice  $\alpha$  à pH= 5,4 comme à pH= 6,1. D'autre part, la courbe verte suit la courbe bleue entre les résidus H10 et H14 et donc à pH= 5,4 il n'y aurait pas de coude au niveau du peptide. Ainsi, ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus à partir du CSI, Talos et des effets NOE observés qui montrent qu'à pH= 5,4 le peptide est structuré en hélice  $\alpha$  entre les résidus A4 et A23.

## 4.4-Discussions

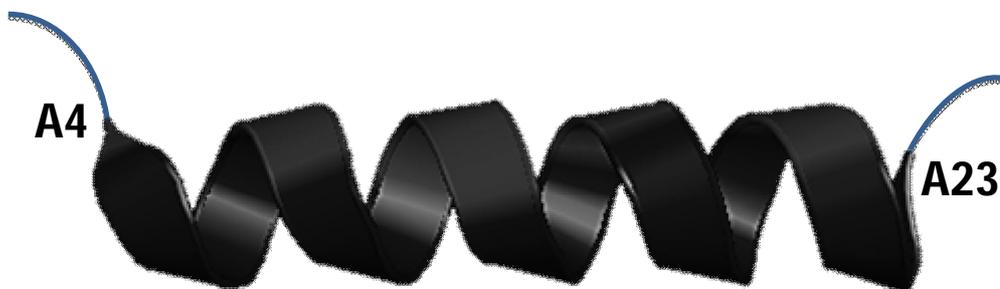
Nous avons vus dans le troisième chapitre que le peptide P-LAH<sub>4</sub> était un peptide antibactérien mais qu'il était aussi capable de véhiculer efficacement l'ADN à l'intérieur des cellules eucaryotes. Ces deux fonctions nécessitent l'interaction du peptide avec les membranes. Les études structurales du peptide P-LAH<sub>4</sub> par dichroïsme circulaire montrent que le peptide à pH= 5,4 se structure en hélice  $\alpha$  seulement dans un environnement membranaire. D'autre part, les informations structurales obtenues par RMN du liquide, nous ont permis de situer précisément sur le peptide, la structure en hélice  $\alpha$  lorsque celui-ci est en contact avec des micelles de DPC à pH= 5,4. Pour cela, nous avons déterminé les valeurs de déplacement chimique des noyaux N<sub>H</sub>, H<sub>N</sub>, C $\alpha$ , C $\beta$  et H $\alpha$  de tous les résidus du peptide sauf pour les résidus P1, K2 et L24. Ainsi, la combinaison des résultats obtenus par le CSI <sup>1</sup>H $\alpha$ , la prédiction des angles dièdres avec Talos ainsi que les contacts NOE non ambigus nous permettent de conclure que l'hélice  $\alpha$  se situe entre les résidus A4 à A23.

D'autre part, la comparaison des valeurs de  $\delta^1\text{H}_\text{N}$  du peptide dans les micelles de DPC à pH= 5,4 avec celles obtenues par le Dr Georgescu et ses collaborateurs [87] pour des pH de 4,1 et 6,1 montre d'une part, que les  $\Delta\delta^1\text{H}_\text{N}$  sont dues à des différences structurales au sein du peptide ( pH= 4,1 vs pH= 6,1) et d'autre part, qu'en comparant ces  $\delta^1\text{H}_\text{N}$  avec nos valeurs à pH= 5,4, il était possible de confirmer les régions hélicales du peptide. Le peptide LAH<sub>4</sub> à pH= 4,1 se structure en hélice  $\alpha$  des résidus 9 à 24 et à pH= 5,4 le peptide P-LAH<sub>4</sub> se structure en hélice  $\alpha$  des résidus 4 à 23. Tous ces résultats confirment que la structure en hélice se déplace bien du côté N-ter en augmentant le pH [87]. La différence obtenue concernant la localisation de l'hélice  $\alpha$  au sein du peptide entre pH= 4,1 et pH= 5,4 peut-être due au fait que les pK<sub>a</sub>s des histidines se situent autour de 5,5 et qu'à pH= 5,4 seulement la moitié des histidines sont protonées.

La structuration en hélice  $\alpha$  permet au peptide d'avoir une face hydrophile et une face hydrophobe. La face hydrophobe lui permettrait d'interagir avec la membrane et la face hydrophile avec le solvant. La formation d'une structure en hélice  $\alpha$  en présence de membranes a aussi été décrite pour d'autres peptides antibactériens comme les magainines [163, 184], la melittine [185] ou encore LL-37 [186]. De plus, de nombreuses études

effectuées sur les peptides antibactériens montre l'importance d'une structure amphipathique et une charge positive nette pour son activité cytolytique [187, 47]. En effet, le peptide LAH<sub>4</sub> montre une activité antibactérienne plus prononcée à pH= 5,5 qu'à pH= 7,5 [41, 86].

D'autre part, la connaissance de la structure secondaire à pH= 5,4 est importante pour la compréhension du mécanisme de transfection. En effet, il a été montré que l'acidification de l'endosome est une étape nécessaire à la transfection [40, 45]. Lors de cette acidification, le pH diminue autour de 5,5 et les histidines du peptide deviennent protonées et la moitié de peptides qui au départ était complexée à l'ADN se trouve désormais sous forme libre [92]. Le peptide libre est alors capable d'interagir avec la membrane de l'endosome pour la déstabiliser et permettre ainsi la libération de l'ADN. Nous avons ainsi montré qu'à ce stade le peptide P-LAH<sub>4</sub> se structurait en hélice  $\alpha$  des résidus A4 à A23 et que les parties terminales étaient non structurées. De plus, le fait que les pKas des chaînes latérales des histidines se situent autour de 5,5 signifie qu'à ce pH les résidus histidines sont à moitié sous forme cationique et l'autre moitié sous forme neutre, ce qui pourrait expliquer qu'il existe encore des différences de structures en diminuant le pH à 4,1 [87]. A pH=5,4, le peptide adopte une structure comparable à celles d'autres peptides antibactériens et pourrait donc déstabiliser la membrane de l'endosome selon un mécanisme similaire à celui observé pour ces peptides antibactériens. La figure 4.21 présente la structure secondaire du peptide à pH= 5,4.



**Figure 4.21 : Représentation de la structure secondaire de P-LAH<sub>4</sub> en contact avec les micelles de DPC à pH= 5,4. Le squelette peptidique a été réalisé avec Pymol, à partir des valeurs d'angles  $\phi$  et  $\psi$  prédites par Talos.**

Afin de compléter les résultats, en vue de la compréhension du mécanisme d'action, nous nous sommes intéressés dans le chapitre suivant, à l'étude de l'orientation du peptide dans les bicouches membranaires par RMN du solide et pour la première fois nous avons pu observer l'orientation du peptide sur toute sa longueur, grâce aux résultats obtenus dans le chapitre trois.



## Chapitre 5 :

# Etude de l'orientation et de la structure du peptide P-LAH<sub>4</sub> dans les bicouches de POPC par RMN du solide.

## 5.1-Introduction

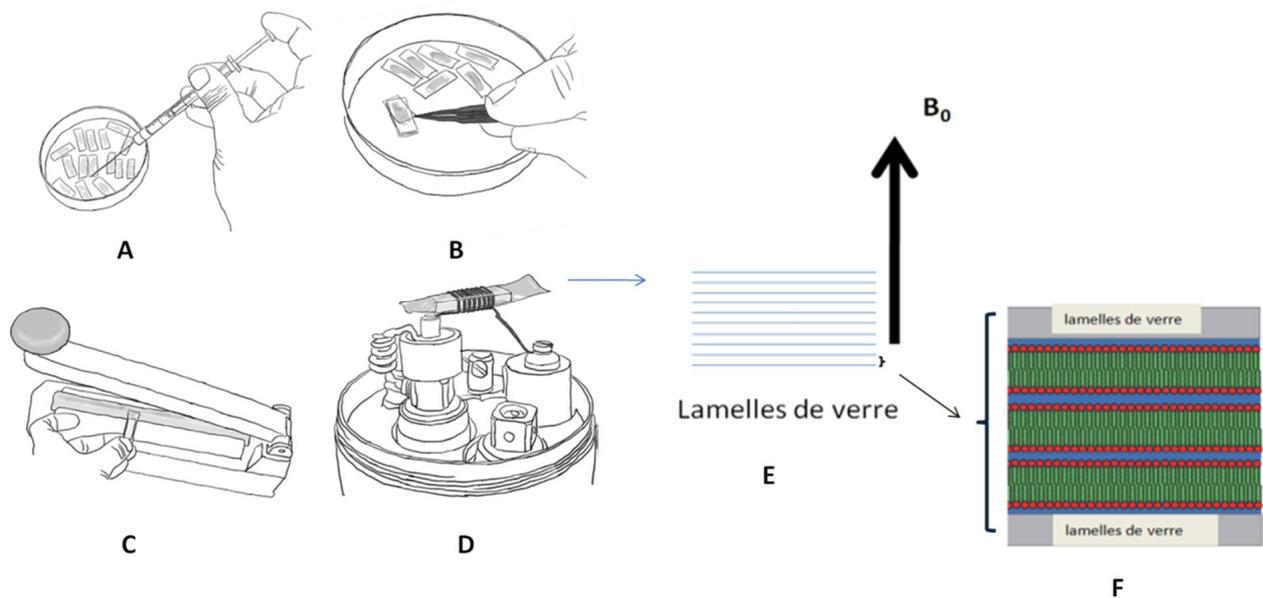
Afin de comprendre les mécanismes d'action antibactérien et transfectant d'ADN du peptide LAH<sub>4</sub>, il est nécessaire d'étudier le mode d'interaction du peptide avec les membranes. Dans ce chapitre, la RMN <sup>15</sup>N du solide, du peptide reconstitué dans des bicouches orientées [126, 127, 128], a été utilisée pour obtenir l'orientation de LAH<sub>4</sub> dans les membranes de POPC. En effet, jusqu'à présent LAH<sub>4</sub> a été produit par synthèse peptidique et sa topologie dans les membranes de POPC, a été déduite en marquant sélectivement l'alanine en position 13 [39] ou encore les alanines aux positions 6, 16 et 22 simultanément [188]. Afin, d'obtenir plus de précision sur la topologie du peptide, ce chapitre présente, les tous premiers résultats obtenus sur l'orientation du peptide marqué uniformément en <sup>15</sup>N dans les bicouches orientées de POPC à pH= 5,5 et 6,9. La RMN du solide a également été utilisée pour déterminer la structure du peptide grâce aux expériences 2D <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N PISEMA [130,189].

## 5.2-Matériel et Méthodes

### 5.2.1-Préparation des échantillons RMN orientés

100 mg de POPC (avanti polar lipids) sont mélangés avec 2 mL de dichlorométhane (Sigma-Aldrich). 5,4 mg de P-LAH<sub>4</sub> marqué uniformément en <sup>15</sup>N sont dissous dans 1,4 mL de tampon 10 mM Tris-HCl pH=7,3 ou 10 mM de tampon acétate pH= 5,5. Le pH de la solution peptidique est ammené à 6,9 ou 5,5 avec l'ajout de NaOH à 1 N. L'excès de solvant est évaporé sous rotavap (Buchi R-200) afin qu'il ne reste environ que 300 µL de solution peptidique. A cette solution sont ajoutés 2 mL de TFE (Sigma-Aldrich). L'ensemble est ajouté à la solution lipidique, le mélange est vortexé brièvement et soniqué dans un bain de sonication (Bandelin, RK514 BH) 30 s, à température ambiante. Le solvant est évaporé sous azote et le film lipidique est étalé sur 17 plaques de verre (4 X 22 mm), (Martienfeld,

Germany), (figure 5.1-A). Les plaques sont séchées à température ambiante une nuit, puis les traces de solvant organique sont éliminées sous vide et l'échantillon est mis à hydrater à 93% d'humidité relative. Les lamelles sont empilées les unes sur les autres (fig.5.1-B). L'échantillon est entouré d'un film de teflon puis emballé dans un film plastique soudé hermétiquement (figure 5.1-C) pour éviter les pertes d'eau dues au réchauffement de l'échantillon pendant l'expérience RMN. Celui-ci est ensuite placé à l'intérieur de la bobine (figure 5.1-D).



**Figure 5.1:** Les différentes étapes nécessaires lors de la préparation d'un échantillon RMN orienté (adapté de la référence [190]). A : Le mélange peptides/lipides est étalé sur lamelles de verre, le solvant est évaporé puis l'échantillon est hydraté. B : les lamelles sont empilées les unes sur les autres, C : l'échantillon est fermé hermétiquement, D : placé dans une bobine plate, E : Orientation des membranes dans le champ magnétique  $B_0$ , F : Orientation des membranes (> 3 bicouches) entre deux plaques de verre.

## 5.2.2-Acquisition des spectres RMN

### Spectres $^{31}\text{P}$ :

Les spectres  $^{31}\text{P}$  découplés  $^1\text{H}$  sont enregistrés à 161,953 MHz sur un spectromètre RMN Bruker Avance 400 MHz à l'aide d'une sonde à double résonance équipée d'une bobine plate. L'enregistrement se fait à température ambiante en utilisant une séquence d'impulsion écho de Hahn avec un pulse  $\pi/2$  de 3,5  $\mu\text{s}$ . La largeur spectrale est de 75 kHz. Le délai de l'écho et du recyclage sont respectivement de 40  $\mu\text{s}$  et 3 s. Un spectre  $^{31}\text{P}$  de référence de l'acide phosphorique 85 % est enregistré et le phosphore est calibré à 0 ppm. Avant transformation de Fourier une multiplication exponentielle correspondant à un LB de 150 Hz est appliquée.

### Spectres $^{15}\text{N}$ :

Les spectres  $^{15}\text{N}$  sont enregistrés à 40,54 MHz sur un spectromètre RMN Bruker Avance 400 MHz à l'aide d'une sonde à double résonance équipée d'une bobine plate [191]. L'enregistrement se fait à température ambiante en utilisant une séquence d'impulsion de polarisation croisée avec un fort découplage en  $^1\text{H}$ . La fenêtre spectrale, le temps d'acquisition, le temps de contact et le délai de recyclage valent 37,5 kHz, 6,8 ms, 1 ms et 3 s respectivement. Les spectres sont accumulés avec 40 k scans. Avant transformation de Fourier une multiplication exponentielle correspondant à un LB de 300 Hz est appliquée. Les spectres sont calibrés sur  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  à 41,5 ppm.

### Spectres PISEMA $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ :

Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre RMN Bruker Avance 500 équipé d'une bobine plate à double résonance. Un pulse de  $90^\circ$  de 6,12  $\mu\text{s}$  et de 1 ms de temps de contact ont été utilisés pour le CP avec un champ  $B_1$  de 41 kHz. Les protons sont spin-lockés à l'angle magique en appliquant un champ  $B_1$  de 50 kHz et un offset de +/- 28,9 kHz. Le temps d'acquisition et le délai de recyclage valent respectivement 10,3 ms et 2 s.

La fenêtre spectrale en F1 ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ) vaut 15 kHz pour le spectre de l'échantillon à pH= 5,5 et de 26,5 kHz pour le spectre de l'échantillon à pH=6,9. La fenêtre spectrale en F2 ( $^{15}\text{N}$ ) vaut 41 kHz pour les deux spectres. Les spectres sont calibrés sur  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  à 41,5 ppm.

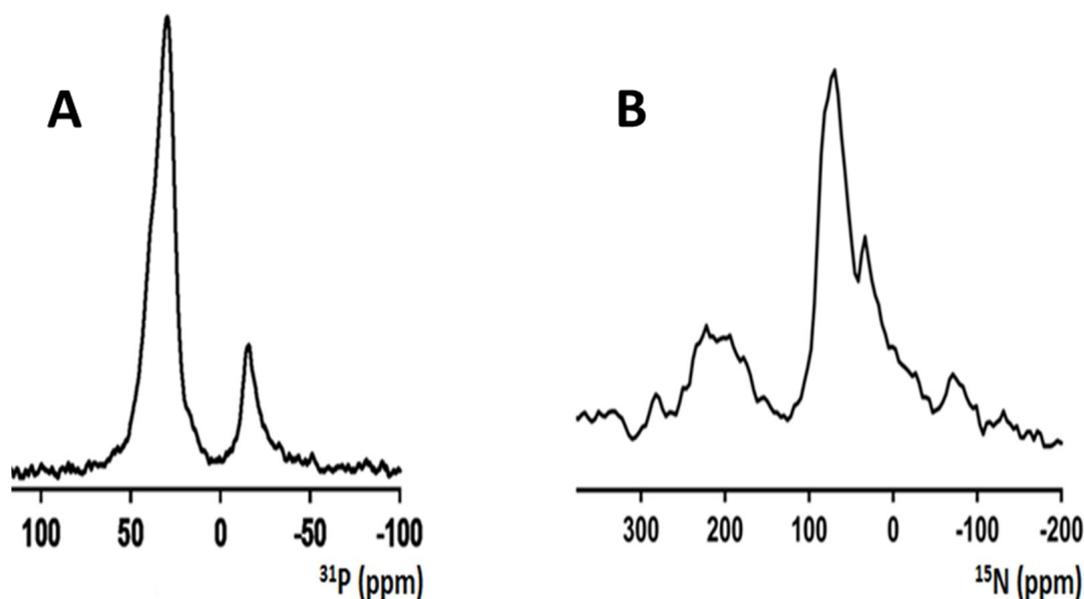
### Simulation du spectre PISEMA $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ :

Différents spectres PISEMA  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  ont été simulés en faisant varier l'angle d'inclinaison d'une hélice  $\alpha$  (18 résidus) par rapport à la normale à la membrane dans le but de se rapprocher au mieux du spectre expérimental obtenu. Les simulations ont été faites avec le logiciel SIMPSON/SIMMOL [136]. Le tenseur de déplacement chimique anisotrope du noyau  $^{15}\text{N}$  utilisé pour la simulation est :  $\sigma_{11}= 60$  ppm,  $\sigma_{22}= 80$  ppm et  $\sigma_{33}= 220$  ppm. Les spectres obtenus par simulation ont été visualisés avec dmfit [192].

## 5.3-Résultats et Discussions

Afin de déterminer l'orientation du peptide P-LAH<sub>4</sub> sur toute sa longueur, des échantillons de peptides marqués uniformément en  $^{15}\text{N}$ , dans les membranes orientées de POPC à pH= 5,5 et 6,9 ont été préparés.

### 5.3.1-Structure et topologie du peptide P-LAH<sub>4</sub> dans les bicouches orientées de POPC à pH= 5,5.



Figure

5.2 : A- Spectre  $^{31}\text{P}$  découplé  $^1\text{H}$  de bicouches orientées de 100 mg de POPC avec la normale des plaques de verre parallèle à  $B_0$  en présence de 5,4 mg de peptide P-LAH<sub>4</sub> à pH= 5,5. B - Spectre RMN  $^{15}\text{N}$  découplé  $^1\text{H}$  du même échantillon.

Lorsque le peptide P-LAH<sub>4</sub> est reconstitué dans des bicouches de POPC équilibrées à 93% d'humidité relative, le spectre RMN <sup>31</sup>P découplé <sup>1</sup>H (figure 5.2-A) indique que les membranes sont dans une phase liquide cristalline et qu'elles sont relativement bien alignées avec la normale à la bicouche parallèle au champ magnétique.

Le spectre <sup>15</sup>N découplé <sup>1</sup>H du peptide P-LAH<sub>4</sub> marqué uniformément en <sup>15</sup>N et reconstitué dans des bicouches orientées de POPC (figure 5.2-B), montre un pic fin autour de 35 ppm, un pic autour de 70 ppm et un autre compris entre 180 et 260 ppm. Ce spectre englobe les signaux correspondant à 26 noyaux <sup>15</sup>N des liaisons amides, les quatre noyaux <sup>15</sup>N des chaînes latérales des lysines ainsi que ceux appartenant aux quatre chaînes latérales des histidines.

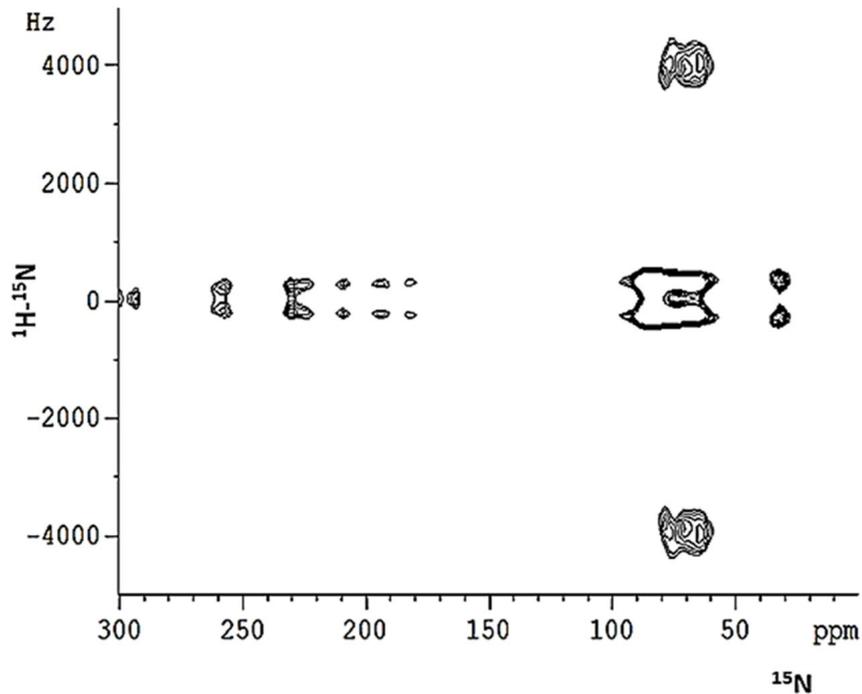
Le signal situé autour de 70 ppm provient des noyaux <sup>15</sup>N appartenant aux liaisons peptidique dont la liaison N-H est à peu près orientée parallèlement à la bicouche de POPC. Ces résultats sont en accord avec les données obtenues précédemment avec le peptide LAH<sub>4</sub>. En effet, les spectres <sup>15</sup>N à pH < 6 du peptide LAH<sub>4</sub> marqué en <sup>15</sup>N au niveau du résidu 13 ou sur les trois résidus 6,16 et 22 à la fois, montrent un signal RMN seulement dans la région située autour de 70 ppm [39, 188].

Le pic fin autour de 35 ppm correspond au signal provenant des noyaux <sup>15</sup>Nε des chaînes latérales des lysines. Ceci suggère que les chaînes latérales des résidus lysines présentes aux extrémités C-ter et N-ter du peptide sont mobiles dans les membranes de POPC. Il est important de noter que le transfert de polarisation est moins efficace lorsque les résidus sont mobiles mais le fait de pouvoir observer le déplacement chimique isotrope des chaînes latérales des lysines nous laisserait donc penser qu'on pourrait aussi observer la mobilité, si elle à lieu, des chaînes latérales des histidines. Le déplacement chimique isotrope des noyaux <sup>15</sup>N (<sup>15</sup>Nε2/<sup>15</sup>Nδ1) des chaînes latérales des histidines se situe autour de 170/178 ppm (forme cationique) et autour de 170/245 ppm (forme neutre)[193]. Sur le spectre on observe un pic large allant de 180 à 260 ppm. Il est possible que les signaux isotropes des chaînes latérales, si elles sont présentes, soient masquées par ce pic large. D'autre part, le signal isotrope des chaînes latérales des histidines peut également être absent du spectre, soit parce que l'efficacité de transfert de polarisation n'est pas assez efficace pour cette chaîne latérale (dans ces conditions de CP) soit parce que les signaux de ces noyaux <sup>15</sup>N sont élargis par l'anisotropie. Il se peut donc que le signal entre 180 ppm et 260 ppm sur le spectre corresponde à une distribution d'orientations des quatre chaînes latérales des histidines. En effet, le tenseur de

déplacement chimique anisotrope du noyau  $^{15}\text{N}^{\delta 1}$  du cycle imidazole a été mesuré dans His.HCl [194] et donne des valeurs de  $\sigma_{33} = 260$  ppm,  $\sigma_{22} = 203$  ppm et  $\sigma_{11} = 77$  ppm.

Pour le signal situé autour de 200 ppm, d'autres hypothèses sont envisageables. En effet, les données structurales obtenues par RMN en solution sur le peptide P-LAH<sub>4</sub> (chapitre 4) dans des micelles de DPC montre qu'à pH= 5,4 les extrémités du peptide ne sont pas structurées et que seuls les résidus compris entre A4 et A23 adoptent une conformation en hélice  $\alpha$ . Il nous appartient donc de nous interroger sur le signal qu'on devrait observer sur ce spectre concernant les extrémités N-ter et C-ter du peptide. Si ces extrémités étaient mobiles, on observerait un signal isotrope à 120 ppm correspondant au déplacement chimique isotrope des noyaux  $^{15}\text{N}$  amide du peptide. Ce signal est absent du spectre soit parce que le transfert de polarisation n'est pas efficace, soit parce que ces extrémités ne sont pas mobiles dans la bicouche de POPC. Par conséquent, on pourrait observer un signal correspondant à une poudre, pour ces extrémités. Ainsi, le signal visible sur le spectre autour de 200 ppm pourrait provenir des noyaux  $^{15}\text{N}$  amide des extrémités non structurées N-ter et C-ter du peptide. De plus, le fait que le signal autour de 200 ppm soit absent du spectre RMN  $^{15}\text{N}$  des échantillons marqué spécifiquement en position 13 [39] ou 6,16 et 22 [188] laisse suggérer que ce signal proviendrait soit des extrémités du peptide soit des chaînes latérales des histidines.

Dans le but d'obtenir plus d'informations sur la topologie du peptide dans les bicouches de POPC, un spectre 2D corrélant le déplacement chimique en  $^{15}\text{N}$  avec le couplage dipolaire  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  a été enregistré. Le spectre PISEMA du peptide P-LAH<sub>4</sub> dans les bicouches de POPC à pH= 5,5 est présenté sur la figure 5.3.



**Figure 5.3 : Spectre PISEMA 2D ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ) du peptide P-LAH<sub>4</sub> marqué uniformément en  $^{15}\text{N}$  dans des bicouches orientées de POPC dont la normale est parallèle à  $B_0$  à pH= 5,5.**

Le signal entre 60 et 80 ppm, possédant une constante de couplage dipolaire de 8 kHz, correspond au signal provenant des noyaux  $^{15}\text{N}$  amide du peptide qui sont orientés parallèlement à la bicouche de POPC. En effet, la simulation du spectre 2D PISEMA d'une hélice  $\alpha$  possédant des angles  $\varphi$  et  $\Psi$  de  $-60^\circ$  et  $-45^\circ$  respectivement, et dont l'hélice est orientée à  $90^\circ$  par rapport au champ magnétique  $B_0$  a été superposée au spectre expérimental. Le résultat est présenté sur la figure 5.4-A. Le spectre calculé est proche du spectre expérimental pour la région située entre 60 et 80 ppm avec une constante de couplage dipolaire de 8 kHz. Il semble donc que le peptide possède une structure en hélice  $\alpha$  avec une orientation parallèle à la membrane (figure 5.4-B).

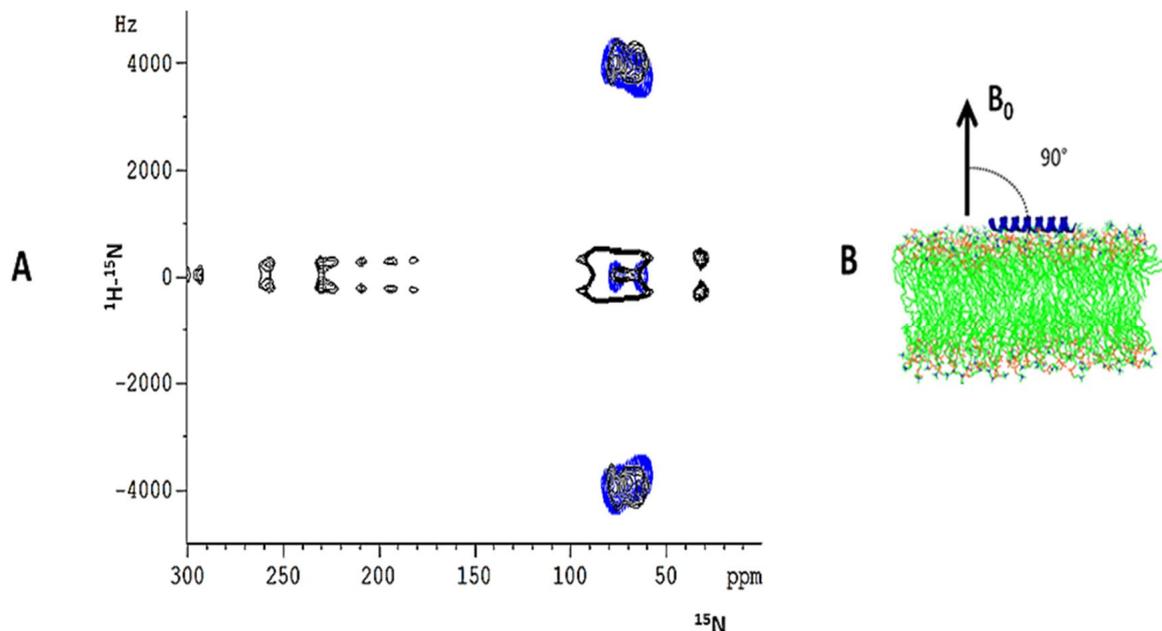


Figure 5.4 : A - Spectre PISEMA 2D ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ) expérimentale de la figure 5.3 superposé avec le spectre simulé d'une hélice  $\alpha$  idéale ( $\varphi = -60^\circ$ ,  $\Psi = -45^\circ$ ) orientée de  $90^\circ$  par rapport à  $B_0$ . B -Modèle montrant l'orientation du peptide par rapport à la bicouche de POPC.

### 5.3.2-Structure et topologie du peptide P-LAH<sub>4</sub> dans les bicouches orientées de POPC à pH= 6,9.

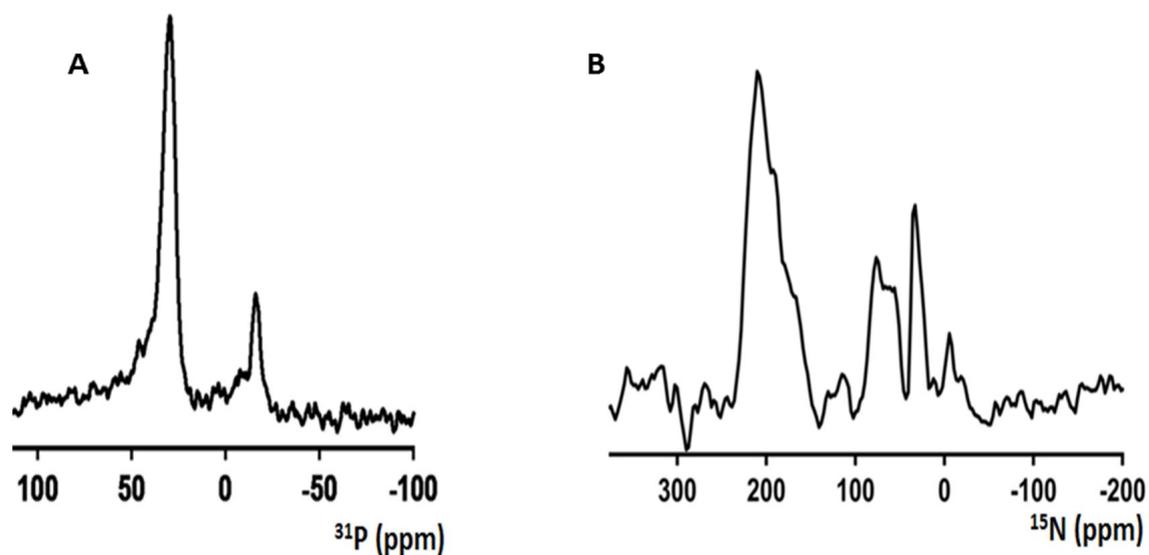


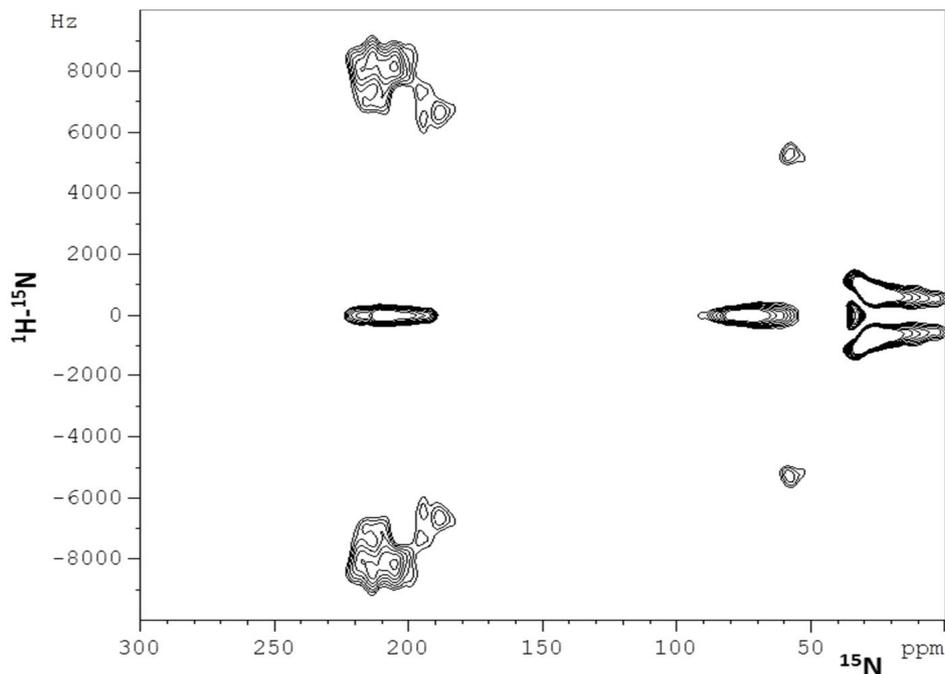
Figure 5.5 : A-Spectre  $^{31}\text{P}$  découplé  $^1\text{H}$  de bicouches orientées de 100 mg de POPC avec la normale des plaques de verre parallèle à  $B_0$  en présence de 5,4 mg de peptide P-LAH<sub>4</sub> à pH= 6,9. B-Spectre RMN  $^{15}\text{N}$  découplé  $^1\text{H}$  du même échantillon.

Le spectre  $^{31}\text{P}$  à pH= 5,5 est plus large (15 à 48 ppm et -13 à -26 ppm) que le spectre à pH= 6,9 (22 à 38 ppm et -13 à -19 ppm) (figure 5.5-A vs figure 5.2-A). Le peptide perturberait donc plus les membranes à pH acide qu'à pH neutre. Ces différences sur les spectres  $^{31}\text{P}$  sont dues aux différentes orientations qu'adopte le peptide aux deux pH (dans le plan et perpendiculaire à la membrane). Ces différentes orientations sont corrélées avec l'action antibactérienne du peptide P-LAH<sub>4</sub> qui est plus prononcée à pH acide qu'à pH neutre, ce qui confirme les résultats qui ont été obtenus pour le peptide LAH<sub>4</sub> [41, 86].

A pH= 6,9, le signal  $^{15}\text{N}$  du peptide P-LAH<sub>4</sub> est constitué d'un pic fin autour de 35 ppm, d'un signal autour de 200 ppm, et d'un autre autour de 60 ppm (figure 5.5-B). A pH= 6,9, les chaînes latérales des lysines sont également mobiles car on observe le pic isotrope des lysines autour de 35 ppm. Le signal situé autour de 200 ppm montre que les noyaux  $^{15}\text{N}$  amides des résidus du peptide sont orientés perpendiculairement par rapport à la membrane de POPC. Ces résultats sont aussi en accord avec les données obtenues sur le peptide LAH<sub>4</sub> marqué sur l'alanine 13 et reconstitué dans des membranes de POPC [39]. A ce pH, les résidus histidines se trouvent sous forme neutre et si leurs chaînes latérales étaient mobiles, on devrait alors observer les déplacements chimiques isotropes des noyaux  $^{15}\text{N}$  autour de 170 et 245 ppm. Ces signaux peuvent être présents mais masqués par le signal des noyaux  $^{15}\text{N}$  amides situés perpendiculairement à la membrane.

Pour le signal à 60 ppm plusieurs possibilités sont envisageables : le signal correspondrait à des résidus des extrémités N-ter et C-ter du peptide P-LAH<sub>4</sub> ou encore il est possible aussi que le peptide soit présent dans deux configurations différentes, certains peptides seraient orientés parallèlement et d'autres perpendiculairement à la membrane.

Dans le but d'obtenir plus d'information sur la topologie du peptide dans les bicouches de POPC, un spectre 2D PISEMA a été enregistré, il est présenté sur la figure 5.6.



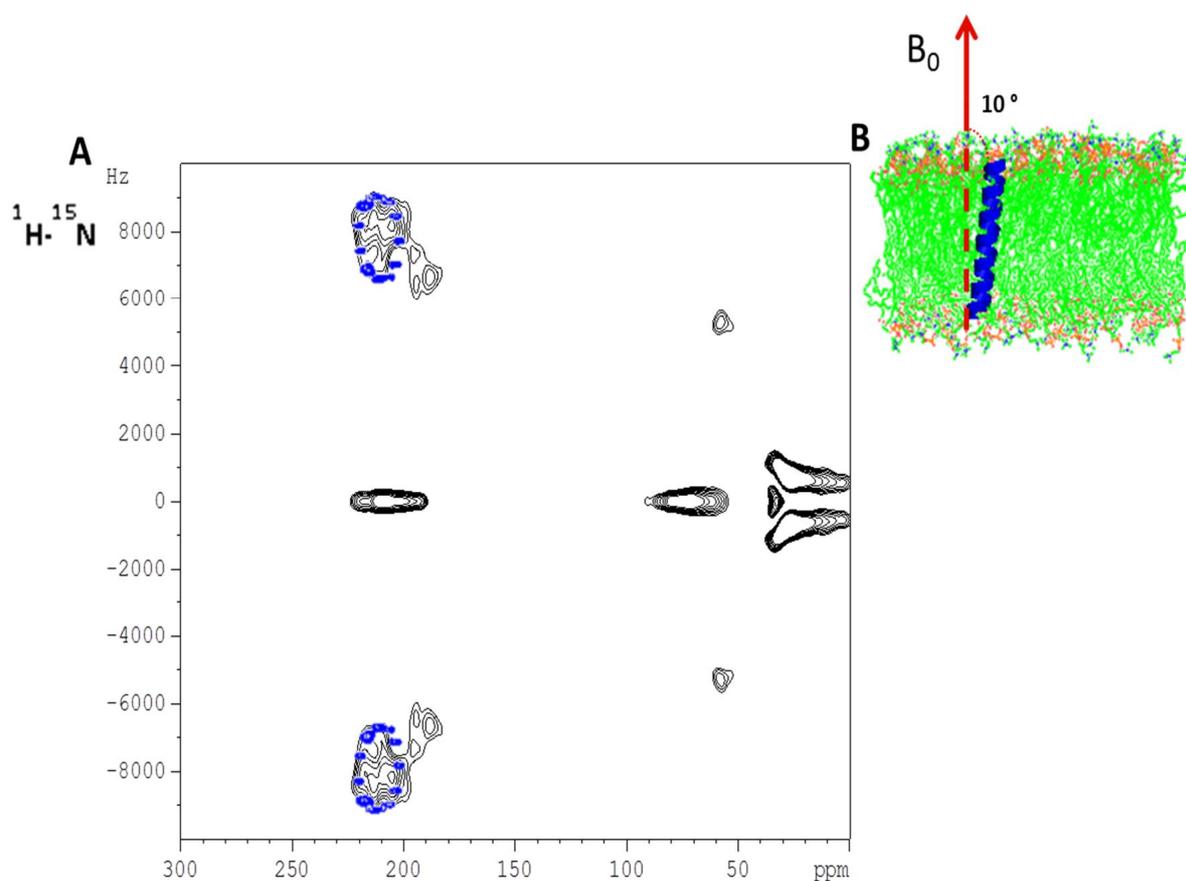
**Figure 5.6 : Spectre PISEMA 2D ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ) du peptide P-LAH<sub>4</sub> marqué uniformément en  $^{15}\text{N}$  dans des bicouches de POPC dont la normale est parallèle à  $B_0$  à pH= 6,9.**

Le spectre sur la figure 5.6 montre plusieurs signaux avec différentes valeurs de couplage dipolaire ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ). Ces valeurs sont regroupées dans le tableau 5.1.

Déplacement chimique (ppm)	Couplage dipolaire ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ) (Hz)
60	10000
180-200	12200-14000
200-225	13500-17000

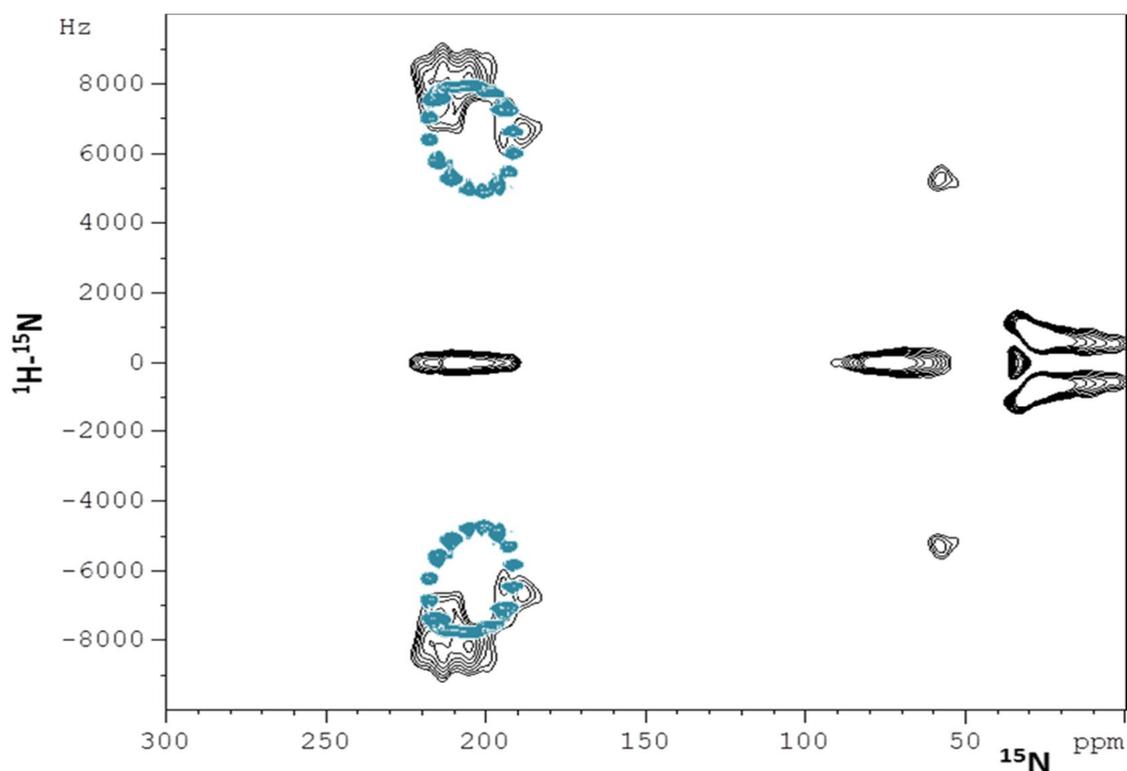
**Tableau 5.1 : Tableau regroupant les valeurs de déplacement chimique ainsi que les valeurs de couplage dipolaire  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  correspondantes qui ont été observées pour le peptide P-LAH<sub>4</sub> en contact avec des bicouches de POPC (dont la normale est parallèle à  $B_0$ ) à pH= 6.9.**

Les signaux entre 200 et 225 ppm, avec des constantes de couplage dipolaire comprises entre 13500 et 17000 Hz, correspondent aux signaux des noyaux  $^{15}\text{N}$  amides du peptide qui sont orientés parallèlement à la bicouche de POPC. En effet, la simulation du spectre 2D PISEMA d'une hélice  $\alpha$  possédant des angles  $\varphi$  et  $\Psi$  de  $-60^\circ$  et  $-45^\circ$  respectivement, et dont l'hélice est orientée de  $10^\circ$  par rapport au champ magnétique  $B_0$  a été superposé au spectre expérimental. Le résultat est présenté sur la figure 5.7-A. Le spectre calculé est proche du spectre expérimental pour la région située entre 200 et 225 ppm.



**Figure 5.7 :** A - Spectre PISEMA 2D ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ) expérimental de la figure 5.7 superposé avec le spectre simulé d'une hélice  $\alpha$  idéale ( $\varphi = -60^\circ$ ,  $\Psi = -45^\circ$ ) orientée de  $10^\circ$  par rapport à  $B_0$ . B- Modèle montrant l'orientation du peptide par rapport à la bicouche de POPC.

Pour essayer d'expliquer le signal autour de 180-200ppm/ 12-14 kHz, nous avons simulé un spectre PISEMA avec cette fois une hélice  $\alpha$  inclinée de  $14^\circ/B_0$  et possédant des valeurs d'angles ( $\varphi = -65^\circ$ ,  $\Psi = -45^\circ$ ). Nous avons superposé ce spectre au spectre expérimental, le résultat est montré sur la figure 5.8.



**Figure 5.8 : Spectre PISEMA 2D ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ) expérimental de la figure 5.7 superposé avec le spectre simulé d'une hélice  $\alpha$  idéale ( $\varphi = -65^\circ$ ,  $\Psi = -45^\circ$ ) orientée de  $14^\circ$  par rapport à  $B_0$ .**

Le résultat présenté sur la figure 5.8 montre qu'il manque des résonances (200-220 ppm/7-5 kHz) sur le spectre expérimental pour pouvoir justifier de la présence d'une autre hélice  $\alpha$  inclinée de  $14^\circ/B_0$ . De plus, selon la simulation, le signal à 180-200ppm/ 12-14 kHz sur le spectre expérimental ne semble pas appartenir à une hélice  $\alpha$  inclinée de  $10^\circ$ . Il est cependant important de noter que la simulation du spectre PISEMA a été faite en utilisant un unique tenseur anisotrope de déplacement chimique (CSA) valant :  $\sigma_{11} = 60$  ppm,  $\sigma_{22} = 80$  ppm et  $\sigma_{33} = 220$  ppm pour tous les résidus, et en supposant également que les valeurs d'angles  $\varphi$  et  $\Psi$  sont les mêmes tout au long de l'hélice. Ainsi, il est probable que ce signal provienne de certains résidus de l'hélice inclinée de  $10^\circ/B_0$  qui possèderaient des variations dans les

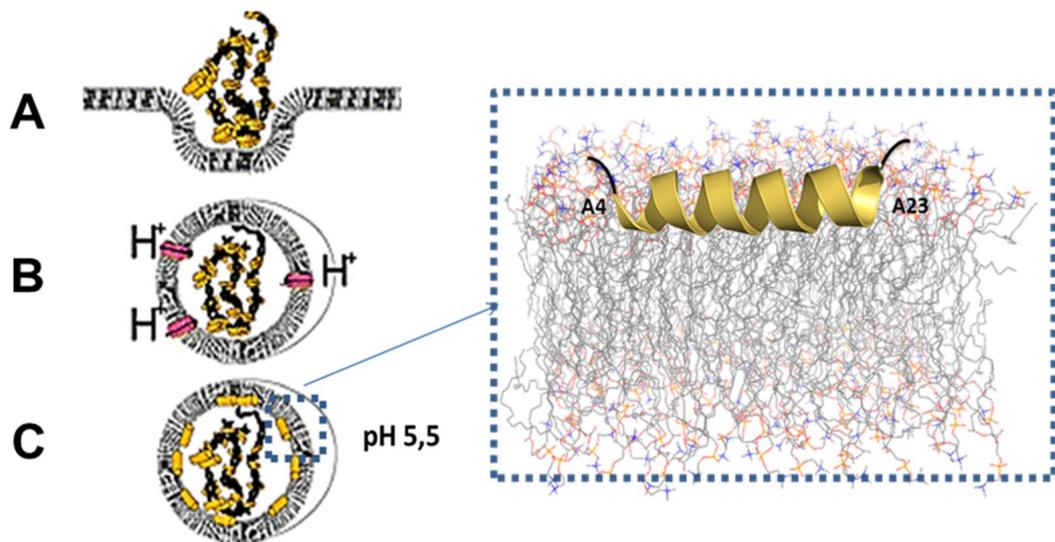
valeurs d'angle  $\varphi$  et  $\Psi$  [195] et/ ou des différences de valeurs de tenseur de déplacement chimique anisotrope [196]. En effet, une différence de +/- 5 ppm dans le CSA peut engendrer une erreur de 3 à 5 ° dans l'inclinaison de l'hélice.

Si l'on considère que la structure du peptide dans les bicouches de POPC à pH neutre est comparable à celle obtenue dans les micelles de DPC [87], alors il semblerait que le peptide ne soit pas structuré en hélice  $\alpha$  sur toute sa longueur. Et particulièrement à ces extrémités (résidus 1 à 4 et 22 à 26). Ainsi, le signal autour de 60 ppm pourrait correspondre aux extrémités non structurées du peptide. D'autre part, nous avons aussi soumis l'hypothèse que le signal autour de 60 ppm pourrait correspondre à certains peptides qui seraient orientés parallèlement à la membrane. Mais si l'on compare le signal obtenu pour les peptides orientés parallèlement (PISEMA figure 5.3) à ce signal, nous pouvons nous rendre compte que ces signaux ne sont pas identiques. En effet, les peptides orientés parallèlement à la bicouche de POPC montraient un signal autour de 60 ppm avec une constante de couplage de 8 kHz alors que le signal autour de 60 ppm à pH 6,9 montre une constante de couplage dipolaire de 10 kHz. Ces résultats semblent confirmer l'hypothèse que ce signal provient effectivement des résidus non structurés du peptide.

## 5.4-Discussions

Nous avons vu précédemment que les peptides antibactériens peuvent agir selon différents mécanismes [72]. Dans ce chapitre, nous avons déterminé, pour la première fois, la structure secondaire du peptide dans des bicouches orientées de POPC à partir des spectres 2D ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ) PISEMA. Les résultats montrent qu'à pH= 5,5 le peptide se structure en hélice  $\alpha$  dans les bicouches de POPC, et qu'il s'oriente parallèlement à la bicouche. Par contre à pH neutre, le peptide est orienté d'environ 10° par rapport à la normale à la bicouche de POPC. Une orientation de peptide parallèle à la membrane a également été retrouvée chez de nombreux peptides comme la magainine 2 [68,197], PGLa [198]) ou encore la cecropine A par exemple [199]. Ainsi ces peptides pourraient agir par des mécanismes similaires. Le mécanisme d'action proposé pour les peptides amphipathiques chargés positivement et qui s'orientent parallèlement à la membrane est de type « tapis » [90]. En effet, le peptide LAH<sub>4</sub> à pH= 5,5 se structure en hélice  $\alpha$  lui conférant ainsi une face hydrophobe interagissant avec la partie hydrophobe de la membrane et une face hydrophile chargée positivement interagissant avec les phosphores de la membrane et le solvant.

L'élargissement du spectre  $^{31}\text{P}$  à pH acide montre que le peptide possède une activité antibiotique plus prononcée à pH acide [41,86]. Ceci suggère que la configuration transmembranaire ne semble pas nécessaire à l'activité antibactérienne et que par contre l'orientation du peptide dans le plan à la bicouche est nécessaire à son activité lytique. Le fait que le peptide perturbe préférentiellement la membrane à pH acide a d'importantes implications dans le transfert des acides nucléiques car il a été montré que le transfert de gène par le peptide  $\text{LAH}_4$  implique l'acidification de l'endosome [45]. Ainsi, en regroupant les données structurales obtenues dans les deux chapitres précédents, nous proposons le modèle suivant pour l'interaction du peptide avec la membrane de l'endosome après acidification (figure 5.9). Les complexes pénètrent dans la cellule par un mécanisme d'endocytose (figure 5.9-A). A pH neutre, le peptide libre adopte une conformation en hélice  $\alpha$  et une orientation transmembranaire avec une inclinaison de  $10^\circ$  par rapport à la normale à la membrane de l'endosome. Durant l'acidification de l'endosome (figure 5.9-B), les chaînes latérales des résidus histidines se protonent et environ la moitié du nombre de peptides complexés à l'ADN se retrouve libérée dans l'endosome. Les peptides possèdent une conformation en hélice  $\alpha$  des résidus A4 à A23 et adoptent désormais une orientation parallèle à la membrane de l'endosome (figure 5.9-C).



**Figure 5.9 : Mécanisme d'endocytose du complexe ADN/ $\text{LAH}_4$  montrant la structure et la topologie du peptide lors de l'acidification de l'endosome. Adapté de [92].**

A pH 6,9 nous avons vu que le peptide est orienté de  $10^\circ$  par rapport à la normale à la membrane. L'épaisseur hydrophobe de la membrane de POPC en phase fluide vaut  $28,5 \text{ \AA}$  [200]. En supposant une distance de  $1,5 \text{ \AA}$  entre deux acides aminés hydrophobes, la longueur hydrophobe du peptide P-LAH<sub>4</sub> correspondrait à  $31,5 \text{ \AA}$ . Ainsi, pour que toute la longueur hydrophobe du peptide puisse être en contact avec la partie hydrophobe de la membrane, il faudrait que le peptide soit orienté de  $25^\circ$  et non de  $10^\circ$  par rapport à la normale à la bicouche. Lorsque le peptide possède une longueur hydrophobe plus longue que la longueur hydrophobe de la membrane, plusieurs autres mécanismes que celui d'incliner l'hélice par rapport à la membrane, peuvent avoir lieu pour éviter l'exposition des surfaces hydrophobes dans le milieu hydrophile. Le peptide peut, en effet, s'agréger ou modifier sa longueur hydrophobe en changeant sa structure aux extrémités. D'autre part la membrane peut également faire varier sa longueur hydrophobe en allongeant ses chaînes d'acides gras [201, 202]. Ainsi, il serait également intéressant d'étudier la topologie de LAH<sub>4</sub> en modifiant la longueur hydrophobe de la membrane afin d'observer si des changements d'orientation du peptide ont lieu.

Le marquage uniforme du peptide P-LAH<sub>4</sub> en  $^{15}\text{N}$  a permis l'étude de sa structure et de sa topologie par RMN du solide sur toute sa longueur. Les spectres  $^{15}\text{N}$  que nous avons obtenus montrent la présence de signal entre 60 et 260 ppm. D'autre part, le peptide contient des résidus dont les chaînes latérales possèdent un azote, comme les lysines et les histidines. La valeur du déplacement chimique isotrope des noyaux  $^{15}\text{N}$  des résidus lysines se trouve autour de 35 ppm et se distingue facilement des autres noyaux  $^{15}\text{N}$ . Cependant, le signal des noyaux  $^{15}\text{N}$  des chaînes latérales des histidines peut-être masqué par le déplacement chimique des noyaux  $^{15}\text{N}$  amides de la liaison peptidique. Ceci rend l'interprétation des spectres difficile d'autant plus qu'il existe très peu d'analyses des chaînes latérales par les expériences PISEMA. Le marquage sélectif de certains résidus du peptide permettrait donc de simplifier le spectre et de faciliter son interprétation. D'autre part, nous disposons désormais au laboratoire de peptide marqué en  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  sur chaque lysine séparément (voir chapitre 6), il serait donc intéressant de faire des échantillons de bicouches orientées avec ces peptides aux deux pH afin d'étudier la structure du peptide aux extrémités.

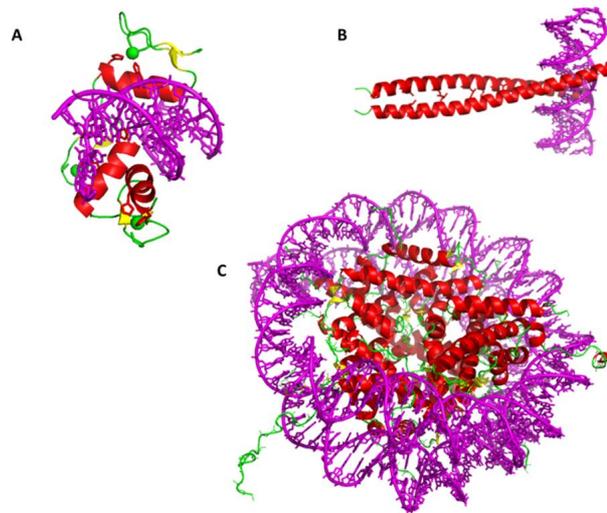


## Chapitre 6 :

# Etude des interactions entre le peptide LAH<sub>4</sub> et l'ADN par expériences REDOR.

### 6.1-Introduction

Les protéines qui forment des complexes avec l'ADN possèdent en général des motifs de type « hélice-tour-hélice », « doigt de zinc » ou « leucine zipper ». La figure 6.1 présente des exemples de structures tridimensionnelles de complexes protéines/ADN obtenues par cristallographie [203]. Actuellement il n'existe aucune structure tridimensionnelle connue d'un complexe peptide transfectant d'ADN/ADN dans la PDB à cause de la difficulté de cristalliser ces complexes. De plus, leur grande taille est un critère limitant pour obtenir des structures par RMN du liquide.



**Figure 6.1 : A- Structure du complexe Zif268-ADN obtenue par rayon X (PDB : 1A1F) possédant un motif en doigt de zinc (Cys2-His2). L'atome de zinc (sphère verte) est chélaté par deux résidus cystéine et par deux résidus histidine et l'ADN est représenté en violet. B- Structure cristallographique de l'homodimère Jun complexé à l'ADN (PDB : 2H7H) montrant un motif « leucine zipper ». Les chaînes latérales des résidus leucines sont montrées en rouge. C- Exemple de motifs « hélice-tour-hélice » au sein de la structure cristallographique d'un nucléosome avec les protéines histones H2A, H2B, H3 et H4 entourés d'ADN (PDB : 1AOI).**

Les interactions au sein de ces complexes sont généralement de nature non covalente. Les plus importantes sont de nature électrostatique et ont lieu entre les chaînes latérales des acides aminés chargés positivement (arginine, lysine, histidine) et les phosphates de l'ADN. D'autre part, les liaisons hydrogènes entre les phosphates, les bases ou sucres des acides nucléiques et les liaisons peptidiques ou les chaînes latérales des acides aminés hydrophiles peuvent également stabiliser le complexe. De plus, des interactions d'empilement entre les chaînes latérales des acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine, phénylalanine, histidine) et les bases des acides nucléiques peuvent avoir lieu. D'autres interactions de type hydrophobe (entre les bases des acides nucléiques et les chaînes latérales des acides aminés non polaires) ou de Van der Waals peuvent également participer à la stabilisation de ces complexes [204].

Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés aux interactions présentes à l'intérieur même du complexe ADN/LAH<sub>4</sub> et plus particulièrement aux résidus du peptide impliqués dans l'interaction avec les phosphates de l'ADN. Nous avons vu dans le premier chapitre que nous avons affaire à des complexes ADN/LAH<sub>4</sub> de grande taille pouvant même aller jusqu'à 1  $\mu\text{m}$  [93]. La RMN du solide reste donc un outil de choix pour étudier ces complexes car la taille ne représente pas de limite contrairement à la RMN du liquide.

Le Dr Prongidi-Fix et ses collaborateurs ont étudié la nature des interactions qui stabilisent les complexes par ITC [92]. Ils ont montré qu'à pH= 7, les complexes étaient stabilisés par des interactions électrostatiques et qu'à pH= 5, en plus des interactions électrostatiques, d'autres interactions de type hydrophobe étaient présentes. Afin d'obtenir plus de précision sur les interactions présentes au sein du complexe, nous avons identifié les résidus du peptide LAH<sub>4</sub> qui sont impliqués dans l'interaction avec l'ADN. Pour cela, nous avons tenté d'estimer les distances entre les noyaux <sup>15</sup>N du peptide et les noyaux <sup>31</sup>P de l'ADN par des expériences REDOR [133-135].

Depuis quelques années, les expériences REDOR prennent une place considérable dans l'étude des interactions entre diverses molécules comme peptide-peptide [205], peptide-membrane [206], enzyme-substrat [207], ou encore peptide-acides nucléiques [208-211]. Dans ce type d'expérience, la distance entre deux spins peut-être déterminée en mesurant la valeur de la constante de couplage dipolaire D car elle est inversement proportionnelle au cube de celle-ci. De plus, cette constante D est proportionnelle au rapport gyromagnétique de chacun de deux spins considérés. Ainsi, pour une même valeur de constante de couplage, plus

grand est le rapport gyromagnétique des noyaux, plus la distance pouvant être mesurée entre ces deux noyaux est grande. Le tableau 6.1 résume les valeurs de constante de couplage dipolaire D (en Hertz) et les distances (en Å) correspondantes pour différentes paires de spins. Les valeurs de couplage notées en rouge représentent les valeurs limites détectables.

distance (Å)	<sup>19</sup> F- <sup>13</sup> C	<sup>31</sup> P- <sup>15</sup> N	<sup>13</sup> C- <sup>15</sup> N	<sup>31</sup> P- <sup>13</sup> C
1	28375	4905	4905	12210
2	3547	613	613	1526
3	1051	182	182	452
4	443	77	77	191
5	227	39	39	98
6	131	23	23	57
7	83	14	14	36
8	55	10	10	24
9	39	7	7	17
10	28	5	5	12
11	21	4	4	9
12	16	3	3	7
13	13	2	2	6
14	10	2	2	4
15	8	1	1	4

**Tableau 6.1 : Tableau résumant les valeurs de constante de couplage dipolaire D (en Hertz) et les distances (en Å) correspondantes, pour différentes paires de spins. Les valeurs de couplage D notées en rouge représentent les valeurs limites détectables.**

Ainsi, les plus grandes distances pouvant être mesurées avec la technique REDOR sont les distances entre les noyaux <sup>19</sup>F-<sup>31</sup>P pouvant aller jusqu'à 13-14 Å. Un exemple concerne la mesure de la variation de la largeur du sillon mineur de l'ADN lorsque deux molécules de distamycine A y sont complexées. Pour pouvoir mesurer cette distance, l'ADN a été marqué par un groupement 2'-fluoro-2'-deoxyuridine et par un phosphorothioate. La distance mesurée entre les noyaux <sup>19</sup>F et <sup>31</sup>P de l'ADN libre est de 9,4 Å et passe à 13,6 Å lorsque celle-ci est complexée à deux molécules de distamycine A [208]. Cependant, l'inconvénient majeur réside essentiellement sur le fait que l'ajout de fluor sur les molécules peut modifier la structure ou les mécanismes d'interactions entre molécules.

Les expériences REDOR avec d'autres paires de spins comme  $^{13}\text{C}$ - $^{31}\text{P}$ ,  $^{15}\text{N}$ - $^{31}\text{P}$  permettent également d'obtenir des informations structurales importantes même si les distances mesurables sont plus faibles qu'avec le fluor. Par exemple, la mesure de distances  $^{15}\text{N}$ - $^{31}\text{P}$  au sein de l'ADN marqué uniformément en  $^{15}\text{N}$  ont permis de déterminer la conformation de l'ADN. En effet, Schaefer et ses collaborateurs ont montré que l'ADN encapsidé au sein du bactériophage T4, était sous une conformation B. En effet, différencier la forme A de la forme B de l'ADN est possible grâce à la différence de conformation du sucre au sein des deux formes ce qui aboutit à des valeurs différentes de distances  $^{31}\text{P}$ - $^{15}\text{N}$  au sein de l'ADN [211].

L'étude de l'interaction du peptide LAH<sub>4</sub> avec l'ADN a été réalisé dans un premier temps par des expériences REDOR  $^{13}\text{C}$ - $^{31}\text{P}$  en marquant sélectivement les résidus alanine 6 et alanine 13 en  $^{13}\text{C}\beta$  par synthèse peptidique. Aucun de ces deux résidus n'a montré une proximité avec les phosphates de l'ADN. Afin de ne pas continuer à marquer « aveuglément » le peptide par des isotopes en  $^{15}\text{N}$  ou en  $^{13}\text{C}$  par synthèse peptidique (ce qui devient rapidement cher), il était nécessaire de produire le peptide chez *E. coli* pour pouvoir le marquer uniformément en  $^{15}\text{N}$  et/ou  $^{13}\text{C}$  pour avoir une « vue globale » des résidus impliqués dans l'interaction avec l'ADN. Dès lors que nous avons disposé du peptide marqué uniformément, nous avons dans un premier temps testé les expériences REDOR sur ce peptide afin de cibler les résidus participant à l'interaction, puis dans une deuxième partie nous avons marqué spécifiquement, un à un, les résidus impliqués dans l'interaction afin d'obtenir la contribution de chacun d'eux dans l'interaction avec l'ADN.

## 6.2-Matériel et méthodes

### 6.2.1-Synthèse peptidique

Les solvants organiques proviennent de Sigma-Aldrich (St-Louis, MO) et ont une pureté supérieure à 99%.

Les peptides  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  **K** KALL ALALH HLAHL ALHLA LALKK A (noté LAH<sub>4</sub>-K1) et **K**  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  **K** ALL ALALH HLAHL ALHLA LALKK A (noté LAH<sub>4</sub>-K2) ont été conçus par synthèse peptidique en phase solide sur un synthétiseur automatique Millipore 9050. Dans un premier temps, le peptide dépourvu des deux lysines du côté N-ter, a été synthétisé (Fmoc – A)LL ALALH HLAHL ALHLA LALKK A sur une résine tentagel-R-RAM (RAPP Polymere

GmbH, Tubingen, Allemagne) en utilisant des cycles standards de synthèse avec un excès de quatre fois en acides aminés (A, L, K et H) protégés par un groupement Fmoc (Merck, Darmstadt, Allemagne). Une fois la synthèse terminée, la résine a été placée dans un verre frité et lavée avec de l'éthanol, de l'acide acétique et de l'éther. Avant d'incorporer les deux lysines restantes, 300 mg de résine ont été clivées afin de s'assurer de la bonne séquence. Le clivage a été réalisé dans une solution contenant 9,3 mL de TFA, 300 µL d'eau et 100 µL de triéthylsilane sous agitation pendant 4 heures. Le peptide a été ensuite récupéré dans une solution TFA/toluène (50/50) (v/v). Le solvant a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi R-200) à 45 °C. Le peptide a été solubilisé dans de l'acide acétique et précipité dans l'éther. Les tubes ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes. Le culot contenant le peptide a été finalement solubilisé dans de l'acide acétique 4 %, congelé dans de l'azote liquide et mis à lyophiliser. Le peptide non purifié a été analysé par spectrométrie de masse. Le spectre de masse MALDI-TOF a montré une masse de 2765,7 Da qui correspond à la masse du peptide LAH<sub>4</sub> dépourvu des deux lysines du côté N-ter avec un groupement protecteur Fmoc sur l'alanine du côté N-ter. La quantité de résine a été alors divisée en deux pour incorporer les deux acides aminés restant N-ter <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C **K** K-CONH<sub>2</sub> ou Nter-K<sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C **K** -CONH<sub>2</sub>. La lysine marquée uniformément en <sup>15</sup>N et <sup>13</sup>C provient de EURISO-TOP (Saint Aubin, France). Le reste de la synthèse, le clivage de la résine et la récupération du peptide non pur (LAH<sub>4</sub>-K1 et LAH<sub>4</sub>-K2 respectivement) ont été effectués comme précédemment.

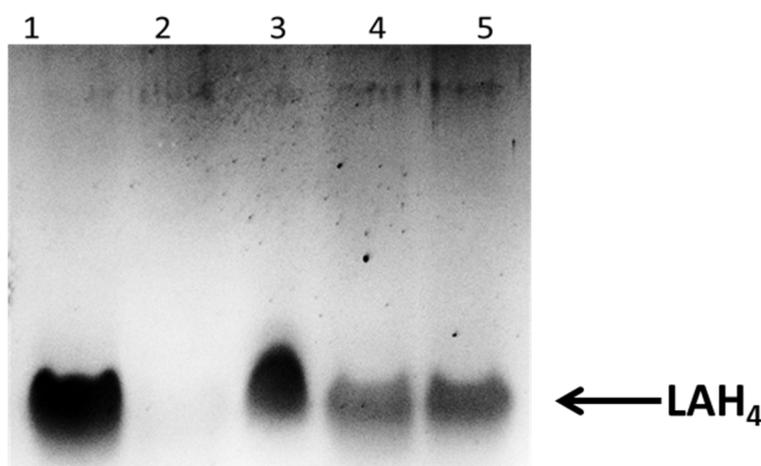
Les peptides Nter-KKALL ALALH HLAHL ALHLA LALK<sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C **K** A-CONH<sub>2</sub> et Nter-KKALL ALALH HLAHL ALHLA LAL<sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C **K** K A-CONH<sub>2</sub> (LAH<sub>4</sub>-K25 et LAH<sub>4</sub>-K24 respectivement) ont été également conçus par synthèse peptidique en phase solide sur un synthétiseur automatique Millipore 9050 sur résine tentagel-R-RAM. Les peptides Fmoc-K<sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C **KA** et Fmoc-<sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C **KK**A ont d'abord été synthétisés en utilisant des cycles standards de synthèse. Afin d'obtenir les peptides LAH<sub>4</sub>-K24 et LAH<sub>4</sub>-K25, le reste des acides aminés a été ajouté sur chaque résine. La résine a été traitée de la même manière que précédemment jusqu'à obtention du peptide non pur. Tous les peptides non purifiés ont été analysés par spectrométrie de masse avant purification.

Pour finir, les peptides LAH<sub>4</sub>-K1, LAH<sub>4</sub>-K2, LAH<sub>4</sub>-K24 et LAH<sub>4</sub>-K25 ont été purifiés par HPLC (Bischoff Protonsil 300-5-C4) en utilisant un gradient de 10 à 80 % d'acétonitrile dans 0,1 % TFA. Les peptides ont alors été collectés, le solvant évaporé. Chaque peptide a été ensuite repris dans 4 % d'acide acétique et lyophilisé.

## 6.2.2-Préparation des complexes P-LAH<sub>4</sub>/ADN de sperme de saumon pour la RMN du solide.

Les complexes d'ADN/LAH<sub>4</sub> sont généralement préparés en mélangeant une solution de peptide avec une solution d'ADN [92]. Le mélange est ensuite centrifugé et le culot est récupéré car il contient ces complexes. Pour être sûr que ce culot contient seulement des peptides complexés à l'ADN et non également des molécules de peptides libres qui auraient culoté à cause de la centrifugation, nous avons testé la présence de peptide dans le « culot » après centrifugation (10 000 g, 10 mn, 20 °C) d'une solution peptidique de LAH<sub>4</sub> (2 mg/mL) à pH= 5,5 (dans 10 mM de tampon acétate) et à pH= 7 (dans 10 mM de tampons Tris) sur gel Tricine SDS-PAGE 16 %.

En effet, si le culot contient également des peptides libres, les distances que l'on va mesurer entre les noyaux <sup>31</sup>P de l'ADN et les noyaux <sup>15</sup>N du peptide ne correspondront pas aux distances au sein même du complexe LAH<sub>4</sub>/ADN. Les résultats sont montrés sur la figure 6.2.



**Figure 6.2 : Gel Tricine SDS-PAGE 16 % : Colonne 1: surnageant de la solution peptidique (2 mg/mL) LAH<sub>4</sub> à pH= 5,5 après centrifugation. Colonne 2 : culot de la solution peptidique LAH<sub>4</sub> à pH= 5,5 après centrifugation. Colonne 3 : solution peptidique (2 mg/mL) LAH<sub>4</sub> à pH= 7. Colonne 4: surnageant de la solution peptidique (2 mg/mL) LAH<sub>4</sub> à pH= 7 après centrifugation. Colonne 5 : culot de la solution peptidique (2 mg/mL) LAH<sub>4</sub> à pH= 7 après centrifugation.**

Les résultats de la figure 6.2 montrent qu'après centrifugation de la solution peptidique pendant 10 min à 10 000 g, seule la solution peptidique à pH= 7 contient du peptide libre dans le culot. Après centrifugation à pH= 5,5 on ne retrouve pas de peptide libre

dans le « culot ». Nous avons ainsi préparé des échantillons de complexes ADN/LAH<sub>4</sub> en utilisant une solution peptidique de 2 mg/mL à pH= 5,5 car la préparation des échantillons par centrifugation est rapide et ne nécessite pas d'étapes supplémentaires pour séparer les complexes ADN/LAH<sub>4</sub> des peptides libres.

Ainsi, 14 mg de chacun des peptides (P-LAH<sub>4</sub> marqué uniformément en <sup>15</sup>N avec PM : 2915,3 Da et les quatre peptides LAH<sub>4</sub> marqués en <sup>15</sup>N/<sup>13</sup>C au niveau d'une lysine en position 1, 2, 24 ou 25 avec un PM : 2787,5 Da) ont été dissous dans 7 mL de 10 mM tampon acétate pH= 5,5. Cinq solutions d'ADN contenant chacune 20 mg d'ADN de sperme de saumon (Fluka, Buchs, Suisse) ont été dissoutes dans 2 mL de 10 mM de tampon acétate pH= 5,5. Chacune de ces solutions d'ADN a été ajoutée à chacune des solutions peptidiques, les mélanges ont été laissés à température ambiante toute la nuit pour que les complexes se forment. Chaque échantillon a alors été centrifugé pendant 10 min à 10 000 g à 20 °C. Le dosage par HPLC du surnageant de chaque solution, après centrifugation, a montré que tout le peptide se retrouve dans le culot. De même pour l'ADN, l'absorbance à 260 nm du surnageant de chaque solution a montré que tout l'ADN se retrouve dans le culot. Le culot de chaque échantillon contient donc  $4 \cdot 10^{19}$  atomes de Phosphore pour  $3 \cdot 10^{18}$  molécules de peptide soit 2 peptides pour 13 paires de bases. Les culots ont été congelés dans l'azote liquide puis mis à lyophiliser. Avant de passer l'échantillon au spectromètre RMN, chaque échantillon a été mis à hydrater à 93 % d'humidité.

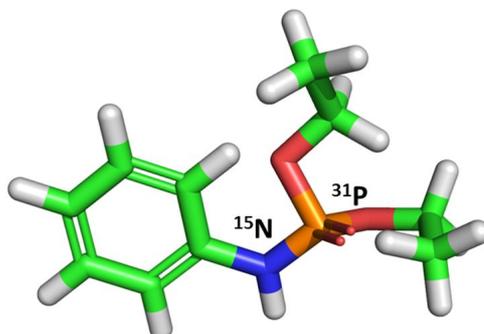
### **6.2.3-Expériences REDOR <sup>15</sup>N-<sup>31</sup>P.**

Toutes les expériences RMN ont été effectuées sur un spectromètre Bruker Avance 500, à l'aide d'une sonde triple BL3.2 DVT, opérant à une fréquence de 202,42 MHz pour le <sup>31</sup>P, 50,67 MHz pour le <sup>15</sup>N et 500,03 MHz pour le <sup>1</sup>H. L'échantillon a été mis dans un rotor de 3,2 mm en rotation, avec une vitesse de 22000 Hz. La vitesse de rotation a été contrôlée par l'unité pneumatique Bruker avec une stabilité de +/- 5 Hz.

#### ***Sur le composé modèle :***

Afin de s'assurer que les paramètres utilisés lors des expériences REDOR (vitesse de rotation, puissance de découplage...) permettent de mesurer des distances correctes entre les noyaux <sup>15</sup>N et <sup>31</sup>P, nous avons d'abord réalisé les expériences REDOR sur un composé modèle : le diéthyl-N-phényl-phosphoramidate dont la distance entre le noyau <sup>15</sup>N et <sup>31</sup>P est

de 1,702 Å [212]. La formule est représentée sur la figure 6.3. Ce composé est marqué en  $^{15}\text{N}$  et a été fourni par le Dr Hologne (UMR 5180 Sciences Analytiques, Villeurbanne, France).



**Figure 6.3 : Structure chimique du diéthyl-N-phényl-phosphoramidate.**

Pour l'enregistrement du spectre  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  CP-MAS, la fenêtre spectrale, le temps d'acquisition, le temps de contact, le délai de recyclage et le nombre de scans valent 16,66 kHz, 92,2 ms, 1 ms, 10 s et 16 respectivement. Le spectre a été calibré sur  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  à 41,5 ppm. Pour le spectre  $^{31}\text{P}$ - $^1\text{H}$  CP-MAS la fenêtre spectrale, le temps d'acquisition, le temps de contact, le délai de recyclage et le nombre de scans valent 100 kHz, 15,4 ms, 650  $\mu\text{s}$ , 10 s et 8 respectivement. Le spectre a été calibré sur  $\text{H}_3\text{PO}_4$  à 0 ppm. Avant transformation de Fourier une multiplication exponentielle correspondant à un LB de 150 Hz a été appliquée sur les spectres.

Pour les expériences REDOR le noyau non observé est noté entre { } en accord avec la nomenclature utilisée dans la littérature pour ce type d'expérience.

La séquence REDOR utilisée permet l'acquisition d'un point toutes les deux périodes de rotor pour chaque paire de spectres (l'écho-complet ( $S_0$ ) et l'écho-réduit (S)) avec 16 scans d'accumulation pour l'observation du noyau  $^{15}\text{N}$  (expérience REDOR de type  $^{15}\text{N}$ - $\{^{31}\text{P}\}$ ) et 8 scans pour l'observation du noyau  $^{31}\text{P}$  (expérience REDOR de type  $^{31}\text{P}$ - $\{^{15}\text{N}\}$ ). Les pulses de  $180^\circ$  sur le  $^{31}\text{P}$  ont une durée de 4,3  $\mu\text{s}$  (116 kHz) et de 9,52  $\mu\text{s}$  sur le  $^{15}\text{N}$  (53 kHz). Le découplage proton est de 78,12 kHz. L'expérience a été réalisée à 240 K.

#### ***Sur les complexes peptide/ADN :***

Pour l'enregistrement des spectres  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  CP-MAS des complexes peptide/ADN, la fenêtre spectrale, le temps d'acquisition, le temps de contact et le délai de recyclage valent 16,66

kHz, 15,4 ms, 1 ms et 800 ms respectivement. Les spectres ont été accumulés avec 2048 scans pour le peptide marqué uniformément et 10240 scans pour les peptides marqués sur une position. Les spectres ont été calibrés sur  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  à 41,5 ppm. Pour les spectres  $^{31}\text{P}$ - $^1\text{H}$  CP-MAS la fenêtre spectrale, le temps d'acquisition, le temps de contact et le délai de recyclage valent 100 kHz, 5,2 ms, 650  $\mu\text{s}$  et 800 ms respectivement. Les spectres ont été accumulés avec 1024 scans et calibrés sur  $\text{H}_3\text{PO}_4$  à 0 ppm. Avant transformation de Fourier une multiplication exponentielle correspondant à un LB de 150 Hz a été appliquée sur tous les spectres.

Pour les échantillons marqués uniformément en  $^{15}\text{N}$ , l'expérience REDOR  $^{15}\text{N}$ - $\{^{31}\text{P}\}$  a été réalisée pour 2, 60, 120, 230, 270, 300 et 350 périodes de rotor pour l'écho ( $S_0$ ) et l'écho-réduit (S) avec 2048 scans d'accumulations et l'expérience REDOR  $^{31}\text{P}$ - $\{^{15}\text{N}\}$  a été réalisée pour 2, 18, 32, 38, 64, 128, 192, 232 et 270 périodes de rotor pour l'écho ( $S_0$ ) et l'écho-réduit (S) avec 1024 scans d'accumulations. Le découplage proton est de 78,12 kHz.

Pour les échantillons marqués sur une seule lysine, l'expérience REDOR  $^{15}\text{N}$ - $\{^{31}\text{P}\}$  a été réalisée pour 2, 100, 200, 300, 400 et 600 périodes de rotor pour chaque paire de spectres : l'écho ( $S_0$ ) et l'écho-réduit (S) avec 10240 scans pour 2 et 100 périodes de rotor et 20480 scans pour 200, 300, 400, et 600 périodes de rotor. Les expériences REDOR  $^{31}\text{P}$ - $\{^{15}\text{N}\}$ , l'expérience a été faite pour 2, 100, 200, 300, 400, 500 et 600 périodes de rotor pour l'écho et l'écho-réduit avec 1024 scans d'accumulations. Les pulses de  $180^\circ$  sur le  $^{31}\text{P}$  ont une durée de 4  $\mu\text{s}$  (125 kHz) et de 9,26  $\mu\text{s}$  sur le  $^{15}\text{N}$  (54 kHz). Le découplage proton est de 78,12 kHz. Toutes les expériences ont été réalisées à 240 K.

#### ***Réalisation des courbes REDOR expérimentales :***

Les courbes de déphasage REDOR ont été obtenues en intégrant les signaux des spectres correspondant à l'écho-réduit et les signaux des spectres correspondant à l'écho-complet. Avant de mesurer les valeurs des intégrales correspondantes, les spectres S et  $S_0$  ont été traités de la même façon pour la phase et la ligne de base.

Pour le composé modèle, les courbes REDOR  $^{15}\text{N}$ - $\{^{31}\text{P}\}$  et  $^{31}\text{P}$ - $\{^{15}\text{N}\}$  ont été réalisées en calculant le rapport  $S/S_0$  correspondant au rapport des deux intégrales provenant du signal du spectre d'écho-complet (S) et du signal du spectre d'écho-réduit ( $S_0$ ), toutes les deux périodes de rotor.

Les courbes REDOR  $^{15}\text{N}$ - $\text{K}$ - $\{^{31}\text{P}\}$ , permettent de mettre en évidence la proximité des noyaux  $^{15}\text{N}$  de la chaîne latérale des lysines avec les phosphores de l'ADN. Cette courbe

REDOR a été obtenue de la façon suivante : le signal à 30 ppm du spectre correspondant à l'écho-réduit ainsi que le signal autour de 30 ppm du spectre correspondant à l'écho-complet ont été intégrés de façon manuelle avec le logiciel TOPSPIN. Le rapport des deux intégrales a été calculé en fonction du temps de l'évolution dipolaire.

Les courbes REDOR  $^{15}\text{NH-K-}\{^{31}\text{P}\}$ , permettent de mettre en évidence la proximité des noyaux  $^{15}\text{NH}$  des lysines avec les phosphores de l'ADN. La courbe a été obtenue de la même manière que précédemment mais en intégrant les signaux provenant des noyaux  $^{15}\text{NH}$  des liaisons amides autour de 120 ppm.

Les courbes de déphasages REDOR  $^{31}\text{P-}\{^{15}\text{N}\}$  expérimentales lorsque l'on observe les noyaux  $^{31}\text{P}$  ont été réalisées en intégrant la totalité du signal en  $^{31}\text{P}$  (y compris les bandes de rotation) des spectres d'écho-réduit et des spectres d'écho complet.

Les barres d'erreurs sur les valeurs de  $S/S_0$ , notées  $\epsilon_{S/S_0}$  ont été calculés à partir des valeurs du rapport signal/bruit (S/B) des spectres S et  $S_0$  de la façon suivantes :  $\epsilon_{S/S_0}=(S/S_0)(\epsilon_S^2 + \epsilon_{S_0}^2)^{1/2}$ , où  $\epsilon$  pour chaque spectre vaut  $1/(S/B)$  [213].

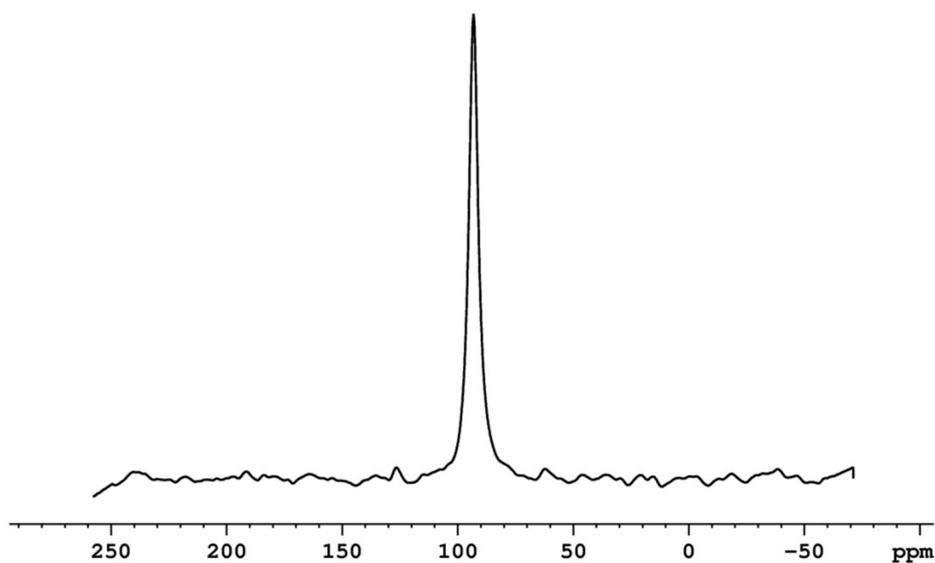
#### ***Réalisation des courbes de déphasage REDOR simulées :***

Les courbes de déphasage REDOR simulées sont réalisées à partir du logiciel SIMPSON/SIMMOL [136]. Le calcul des courbes a été réalisé pour une paire de spins isolés  $^{15}\text{N-}^{31}\text{P}$ , en imposant une fréquence de rotation à l'angle magique de 22000 Hz à partir du fichier cristallographique rep2000.

## **6.3-Résultats et discussions**

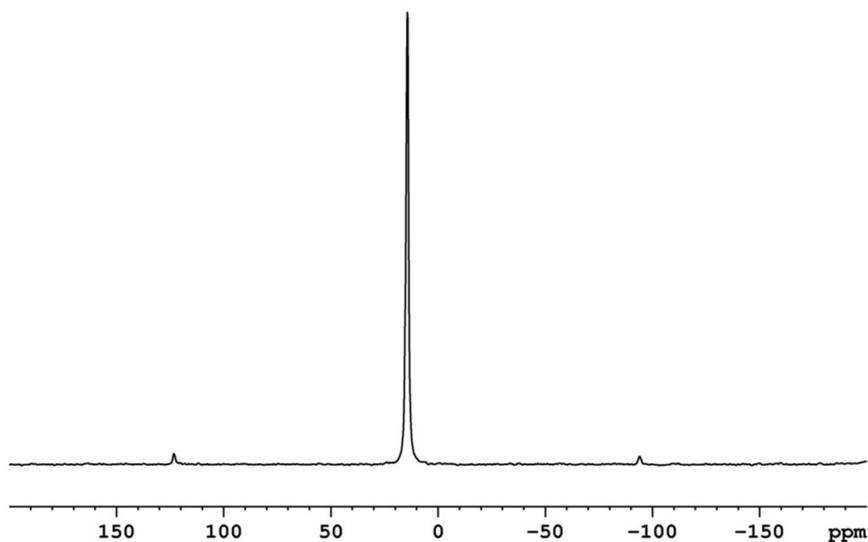
### **6.3.1-Mesure des distances $^{15}\text{N-}^{31}\text{P}$ par REDOR sur le diéthyl-N-phényl-phosphoramidate :**

La figure 6.4 montre le spectre  $^{15}\text{N}$  en rotation à l'angle magique (22000 Hz) du diéthyl-N-phényl-phosphoramidate. Le spectre RMN montre un signal autour de 90 ppm correspondant au déplacement chimique du noyau  $^{15}\text{N}$ .



**Figure 6.4 : Spectre  $^{15}\text{N}$  découplé  $^1\text{H}$  en rotation à l'angle magique (22000 Hz) du diéthyl-N-phényl-phosphoramidate marqué en  $^{15}\text{N}$ . Le spectre est le résultat de l'accumulation de 16 scans.**

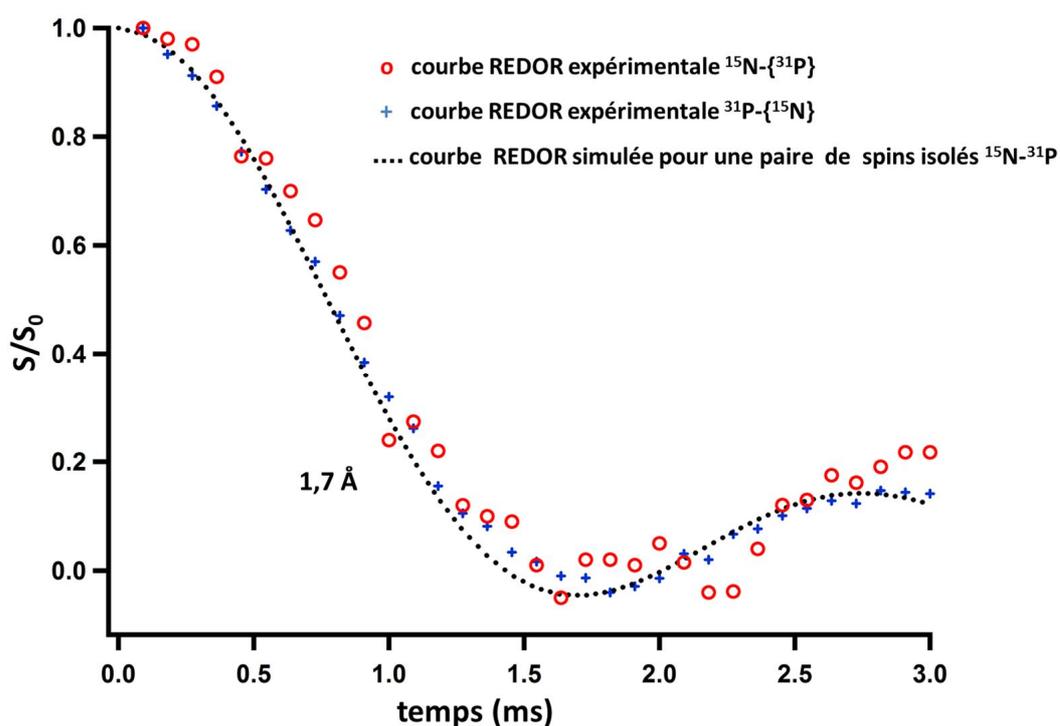
La figure 6.5 montre le spectre  $^{31}\text{P}$  du diéthyl-N-phényl-phosphoramidate avec un signal autour de 15 ppm et des bandes de rotation tous les 22 kHz.



**Figure 6.5 : Spectre  $^{31}\text{P}$  découplé  $^1\text{H}$  en rotation à l'angle magique (22000 Hz) du diéthyl-N-phényl-phosphoramidate. Le spectre est le résultat de l'accumulation de 8 scans.**

La figure 6.6 montre la courbe REDOR  $^{31}\text{P}\{-^{15}\text{N}\}$  (croix bleues) et la courbe REDOR  $^{15}\text{N}\{-^{31}\text{P}\}$  (ronds rouges) obtenues expérimentalement pour le diéthyl-N-phényl-phosphoramidate. Les deux courbes expérimentales se rapprochent le mieux de la courbe REDOR simulée correspondant à une paire de spins isolés  $^{15}\text{N}\text{-}^{31}\text{P}$  distants de 1,7 Å. Ces résultats sont en accord avec les longueurs de liaisons  $^{15}\text{N}\text{-}^{31}\text{P}$  correspondant à ce composé [209].

Ces résultats montrent que les distances mesurées entre les noyaux  $^{15}\text{N}$  et  $^{31}\text{P}$  par des expériences REDOR, en tournant l'échantillon à 22000 Hz avec un découplage proton de 78,12 kHz, sont correctes aussi bien quand on observe le noyau  $^{15}\text{N}$  que quand on observe le noyau  $^{31}\text{P}$ . En effet, réaliser des expériences REDOR à des hautes vitesses de rotation, comme ici à 22000 Hz est intéressant, car plus la vitesse de rotation est élevée plus on aura des points proches en temps sur la courbe REDOR et plus les distances mesurées seront précises. De plus, ceci est particulièrement intéressant pour la mesure de grandes valeurs de constante de couplage.



**Figure 6.6 : Courbes REDOR  $^{15}\text{N}\{-^{31}\text{P}\}$  et  $^{31}\text{P}\{-^{15}\text{N}\}$  expérimentales (ronds rouges et croix bleues respectivement) et simulés (pointillés) pour une paire de spins isolés  $^{15}\text{N}\text{-}^{31}\text{P}$  pour la molécule de diéthyl-N-phényl-phosphoramidate.**

Désormais il est possible d'appliquer ces expériences sur les complexes LAH<sub>4</sub>/ADN.

### 6.3.2-Etudes des interactions ADN/P-LAH<sub>4</sub> avec le peptide marqué uniformément en <sup>15</sup>N :

La figure 6.7 montre le spectre <sup>15</sup>N en rotation à l'angle magique du peptide P-LAH<sub>4</sub> complexé à de l'ADN de sperme de saumon à pH= 5,5. Sur ce spectre on distingue 3 pics: un pic autour de 120 ppm, un pic autour de 35 ppm et le troisième autour de 180 ppm. Le pic autour de 120 ppm correspond au signal provenant des noyaux azotes du groupement amide (NH) du peptide. Le pic à 35 ppm correspond au déplacement chimique isotrope des noyaux <sup>15</sup>Nε des chaînes latérales des quatre lysines du peptide. Le pic à 180 ppm correspond au déplacement chimique isotrope des noyaux <sup>15</sup>N des quatre chaînes latérales des histidines. Les pics étant bien distincts, on peut donc enregistrer des spectres REDOR afin de déterminer quels sont les résidus histidines et/ou lysines impliqués dans l'interaction avec l'ADN.

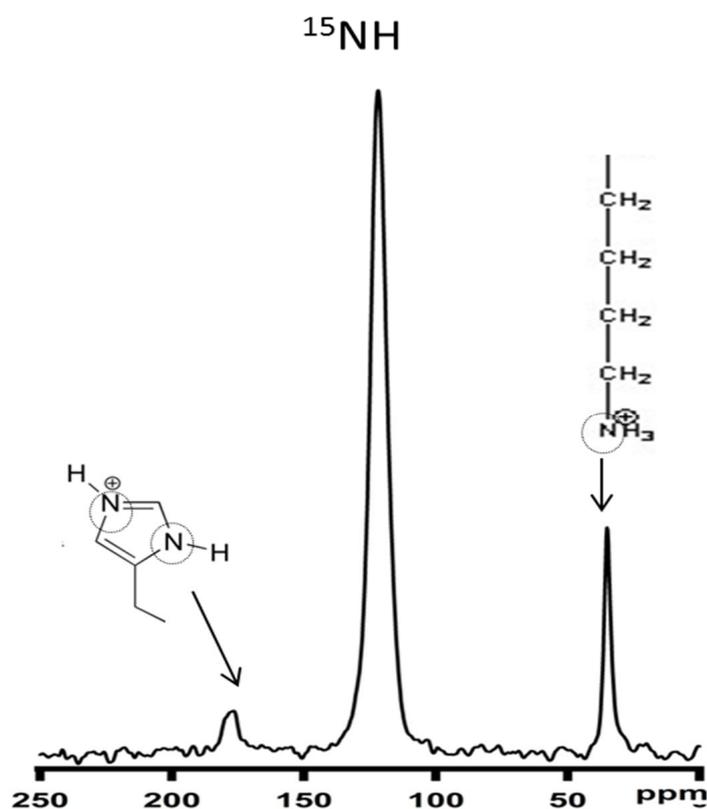
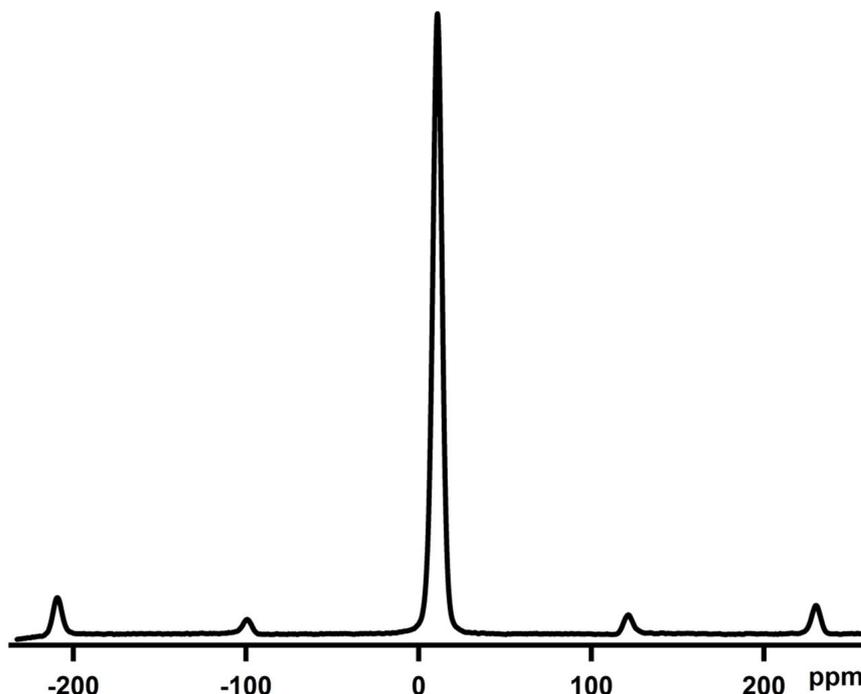


Figure 6.7 : Spectre <sup>15</sup>N découplé <sup>1</sup>H en rotation à l'angle magique (22000 Hz) du peptide P-LAH<sub>4</sub>, marqué uniformément en <sup>15</sup>N, complexé à l'ADN de sperme de saumon. Le spectre est le résultat de l'accumulation de 2048 scans.

La figure 6.8 montre quant à elle le spectre  $^{31}\text{P}$  en rotation à l'angle magique du complexe. Sur ce spectre on observe un pic autour de 0 ppm qui correspond aux noyaux  $^{31}\text{P}$  de l'ADN avec des bandes de rotation tous les 22 kHz.



**Figure 6.8 : Spectre  $^{31}\text{P}$  découplé  $^1\text{H}$  en rotation à l'angle magique (22000 Hz) de l'ADN de sperme de saumon complexé au peptide P-LAH<sub>4</sub>. Le spectre est le résultat de l'accumulation de 1024 scans.**

Afin de voir si les chaînes latérales des résidus lysines et/ou des résidus histidines sont impliquées dans la complexation du peptide P-LAH<sub>4</sub> avec l'ADN, nous avons entrepris des expériences REDOR de type  $^{15}\text{N}\{-^{31}\text{P}\}$  et  $^{31}\text{P}\{-^{15}\text{N}\}$ . L'expérience REDOR  $^{15}\text{N}\{-^{31}\text{P}\}$ , où l'on observe les noyaux  $^{15}\text{N}$ , permet de voir quels sont les noyaux  $^{15}\text{N}$  (de type amide,  $^{15}\text{N}\epsilon$  des lysines ou  $^{15}\text{N}\delta 1 / ^{15}\text{N}\epsilon 2$  des histidines) qui se trouvent à proximité des phosphates de l'ADN. La figure 6.9 montre les spectres  $^{15}\text{N}$  de l'écho-complet et de l'écho-réduit de l'expérience REDOR  $^{15}\text{N}\{-^{31}\text{P}\}$  après 11,62 ms de temps d'évolution de l'interaction dipolaire. Une diminution du signal (écho-réduit) est seulement observée pour le pic à 35 ppm ce qui signifie qu'un certain nombre de noyaux  $^{15}\text{N}\epsilon$ - lysine sont à proximités des phosphores de l'ADN. Les résultats indiquent aussi que les chaînes latérales des histidines à pH= 5,5 ne se trouvent pas à proximité des phosphates de l'ADN.

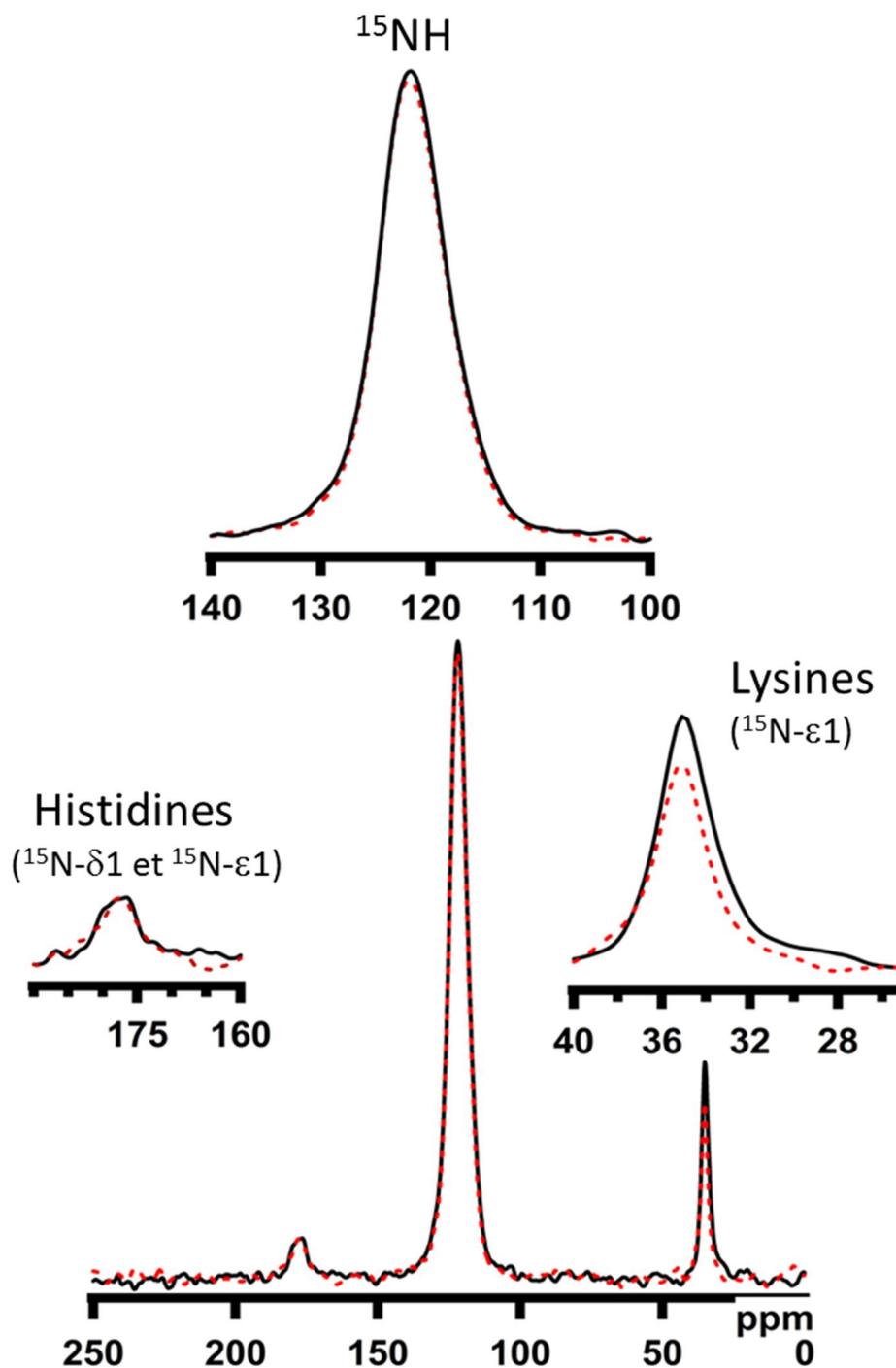
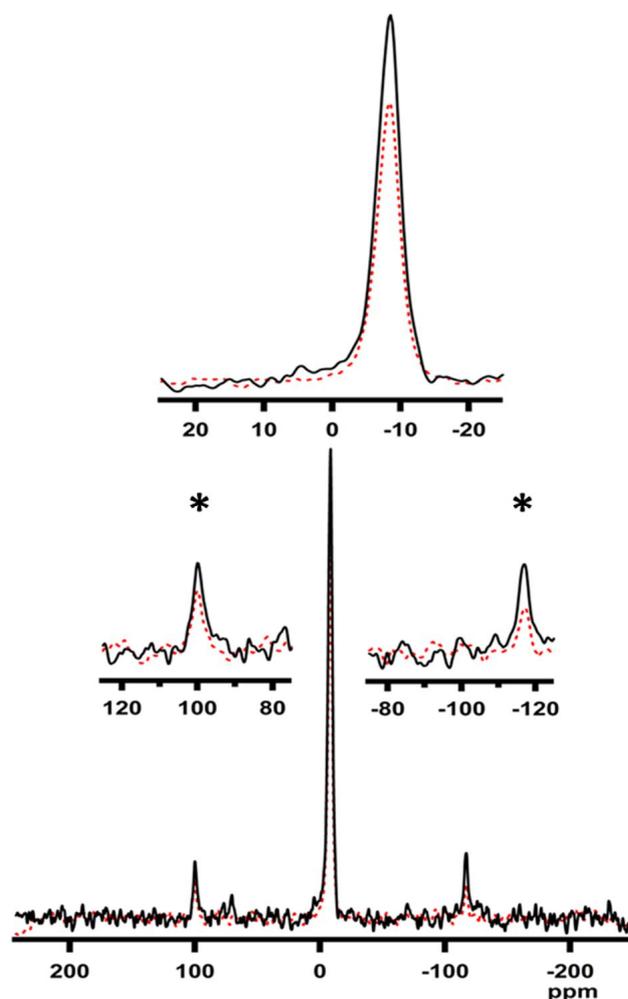


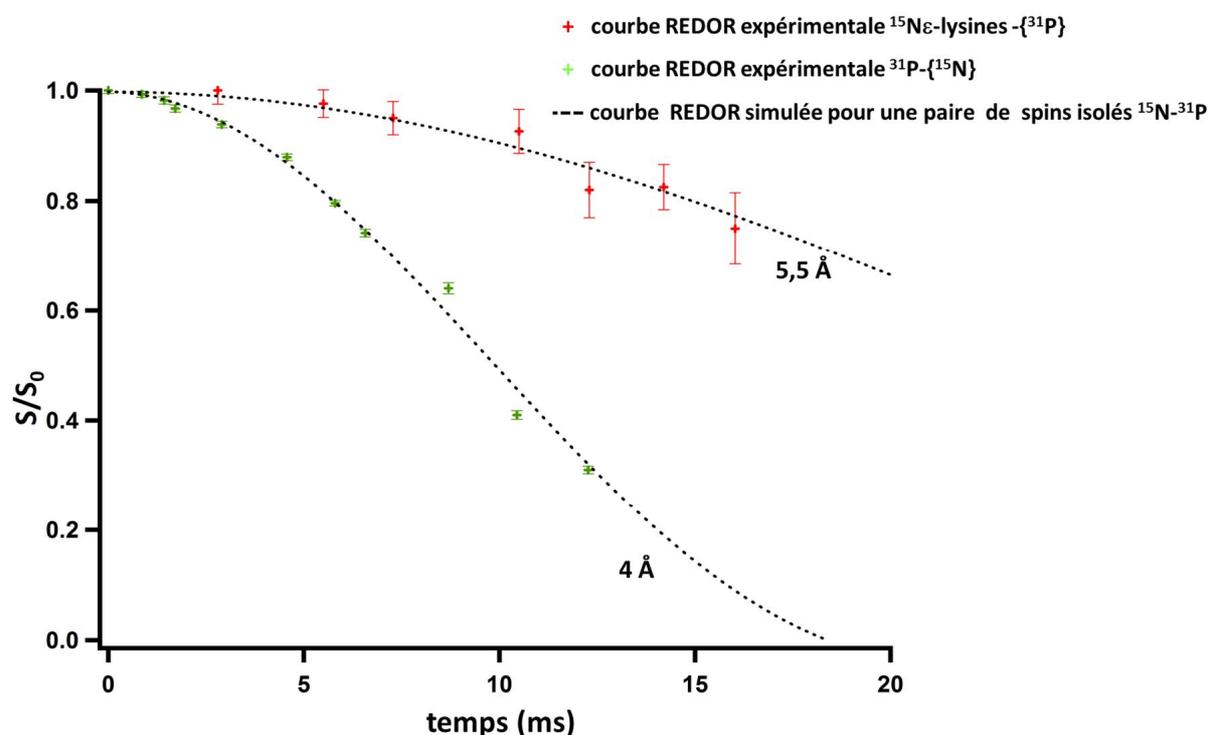
Figure 6.9 : Spectres REDOR  $^{15}\text{N}\{-^{31}\text{P}\}$  du peptide P-LAH<sub>4</sub>, marqué uniformément en  $^{15}\text{N}$ , complexé à l'ADN de sperme de saumon après 256 périodes de rotor (22000 Hz) soit 11,62 ms de temps d'évolution dipolaire. Le spectre correspondant à l'écho-complet est montré en noir et celui correspondant à l'écho réduit est représenté en pointillés rouges. Les spectres sont le résultat de l'accumulation de 2048 scans.

D'autre part, la proximité des noyaux  $^{15}\text{N}$  du peptide par rapport aux noyaux  $^{31}\text{P}$  de l'ADN est également visualisée par une expérience de type REDOR  $^{31}\text{P}\{-^{15}\text{N}\}$ , où cette fois on observe les noyaux  $^{31}\text{P}$ . La figure 6.10 montre les spectres  $^{31}\text{P}$  de l'écho-complet et de l'écho réduit de l'expérience REDOR  $^{31}\text{P}\{-^{15}\text{N}\}$  du peptide P-LAH<sub>4</sub>, marqué uniformément en  $^{15}\text{N}$ , complexé à l'ADN de sperme de saumon après 11,62 ms de temps d'évolution dipolaire. On observe une diminution du signal pour le pic situé à environ -10 ppm ainsi que pour les bandes de rotation à -120 ppm et 100 ppm.



**Figure 6.10 : Spectres REDOR  $^{31}\text{P}\{-^{15}\text{N}\}$ , enregistrés à 22000 Hz, du peptide P-LAH<sub>4</sub>, marqué uniformément en  $^{15}\text{N}$ , complexé à l'ADN de sperme de saumon. Le spectre correspondant à l'écho-complet est montré en noir et celui correspondant à l'écho réduit est représenté en pointillés rouge et correspond au signal obtenu après 11,62 ms d'évolution dipolaire (soit 256 périodes de rotor). Les spectres sont le résultat de l'accumulation de 1024 scans. Les astérisques représentent les bandes de rotation.**

La figure 6.11 montre les courbes REDOR obtenues expérimentalement. La courbe REDOR expérimentale  $^{15}\text{N}\epsilon\text{-lysines}\text{-}\{^{31}\text{P}\}$  est obtenue en intégrant uniquement le signal provenant des quatre chaînes latérales des lysines. La courbe REDOR expérimentale  $^{31}\text{P}\text{-}\{^{15}\text{N}\}$  provient de la diminution du signal provenant des résidus phosphore de l'ADN. Ces deux courbes se rapprochent le mieux des courbes REDOR théoriques correspondant à une paire de spins isolés  $^{15}\text{N}\text{-}^{31}\text{P}$  distants de 5,5 Å pour les chaînes latérales des lysines et de 4 Å pour les phosphores.



**Figure 6.11 : Courbes REDOR  $^{15}\text{N}\text{-}\{^{31}\text{P}\}$  et  $^{31}\text{P}\text{-}\{^{15}\text{N}\}$  expérimentales pour le peptide P-LAH<sub>4</sub> marqué uniformément en  $^{15}\text{N}$  et complexé à l'ADN de sperme de saumon, et simulés pour une paire de spins isolés  $^{15}\text{N}\text{-}^{31}\text{P}$ , en fonction du temps d'évolution dipolaire. La courbe REDOR expérimentale  $^{15}\text{N}\text{-}\{^{31}\text{P}\}$  représente uniquement la diminution du signal provenant des quatre chaînes latérales des lysines du peptide.**

Les résultats montrent que la distance moyenne entre les quatre chaînes latérales des lysines et les phosphores de l'ADN est de 5,5 Å. D'autre part, on observe des distances différentes en fonction du noyau observé. En effet, on mesure une distance plus courte lorsque l'on observe le noyau phosphore que lorsque l'on observe le noyau azote des chaînes latérales

des lysines. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que l'on se trouve dans un système multispins [133], où plusieurs noyaux  $^{15}\text{N}$  sont proches d'un noyau  $^{31}\text{P}$ . En effet, comme le peptide est marqué uniformément en  $^{15}\text{N}$ , un noyau  $^{31}\text{P}$  pourrait se trouver à proximité de plusieurs noyaux  $^{15}\text{N}$ . Il pourrait être voisins par exemple de noyaux  $^{15}\text{N}\epsilon$  des lysines K1, K2, K24 ou K25 ou encore proche à la fois de noyaux  $^{15}\text{NH}$  et de noyaux  $^{15}\text{N}\epsilon$  des résidus lysines.

Les expériences REDOR réalisées sur le peptide P-LAH<sub>4</sub> marqué uniformément en  $^{15}\text{N}$  nous ont permis de montrer que des noyaux  $^{15}\text{N}\epsilon$  de résidus lysines étaient proches des noyaux phosphores de l'ADN. Cependant on ne sait pas si ce sont tous les résidus lysines ou seulement certains qui sont proches des phosphores de l'ADN. Ainsi, nous avons marqué sélectivement les résidus lysines 1, 2, 24 et 25 en  $^{13}\text{C}$  et en  $^{15}\text{N}$  et préparé également les complexes LAH<sub>4</sub>-ADN à pH= 5,5 dans le but de déterminer quels sont les résidus lysines proches des phosphores de l'ADN.

### **6.3.3-Etudes des interactions ADN/LAH<sub>4</sub> avec le peptide marqué spécifiquement sur une lysine à la fois.**

La figure 6.12 montre les spectres  $^{15}\text{N}$  en rotation à l'angle magique des complexes ADN/LAH<sub>4</sub> lorsque le peptide est marqué en  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  sur la lysine 1 (A), sur la lysine 2 (B), sur la lysine 24 (C) ou encore sur la lysine 25 (D). Pour les spectres B, C et D on observe 2 pics. Un pic autour de 35 ppm correspondant au pic isotrope du  $^{15}\text{N}$  de la chaîne latérale de la lysine 2, 24 et 25. On observe aussi un pic autour de 120 ppm qui correspond au  $^{15}\text{N}$  de la liaison amide des résidus lysine 2, 24 et 25 respectivement. Par contre sur le spectre A on observe seulement un pic autour de 35 ppm. En effet, la lysine 1 étant le premier acide aminé de la séquence le  $^{15}\text{N}$  ne participe pas à la formation d'une liaison amide. L'extrémité N-ter est sous forme  $^{15}\text{NH}_3^+$ . Ce pic est plus large (+ 7 ppm) par rapport aux autres spectres B, C, D. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le signal autour de 35 ppm correspond au signal des noyaux  $^{15}\text{N}\epsilon$  de la lysine 1 mais également au signal des noyaux  $^{15}\text{N}$  provenant de l'extrémité N-ter du peptide LAH<sub>4</sub>.

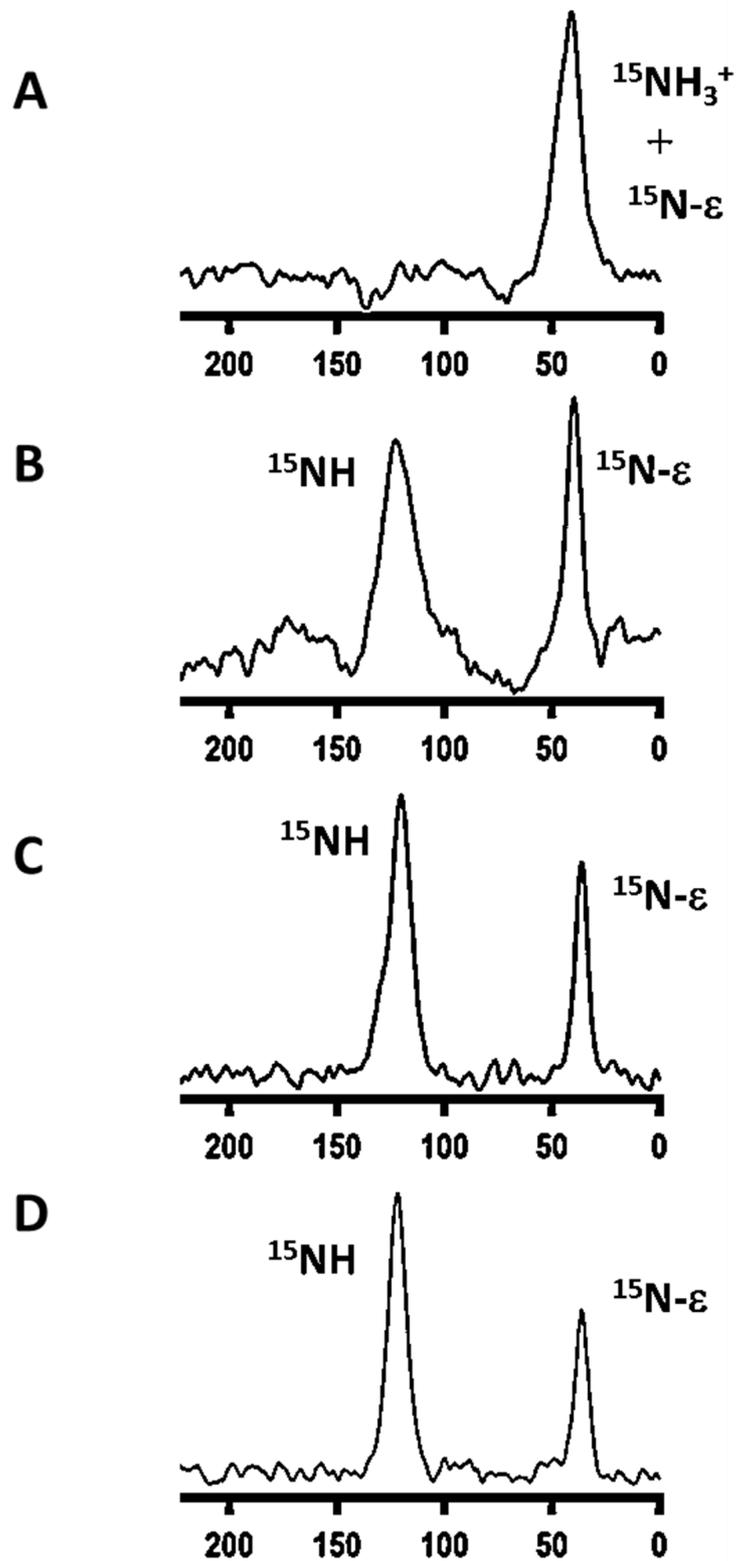
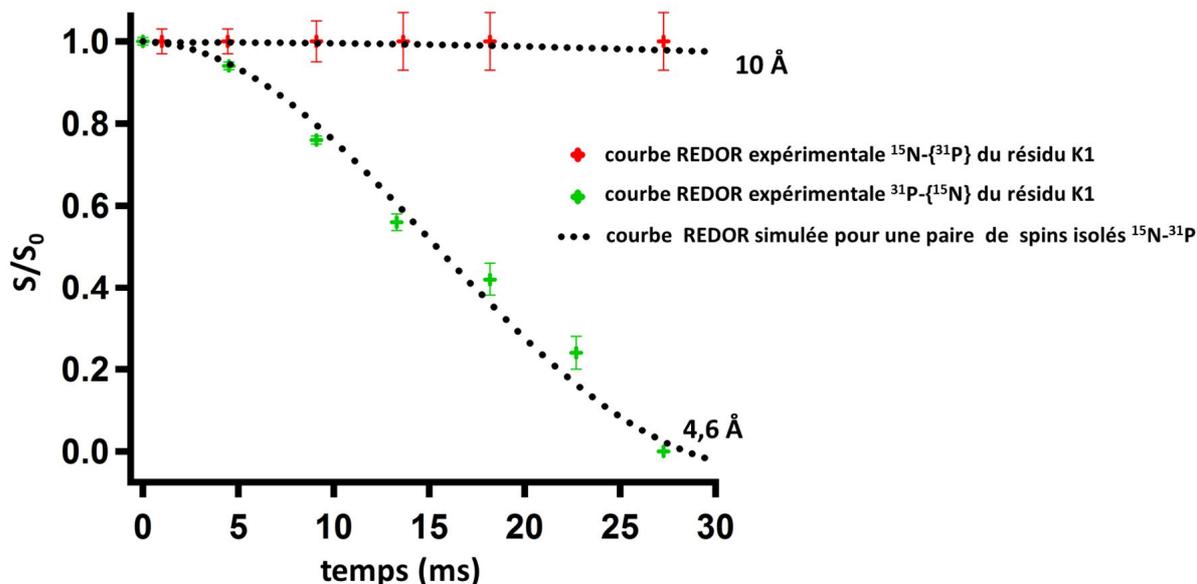


Figure 6.12 : Spectres  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  CP-MAS du peptide LAH<sub>4</sub>-K1 (A), LAH<sub>4</sub>-K2 (B), LAH<sub>4</sub>-K24 (C) et LAH<sub>4</sub>-K25 (D).

### 6.3.3.1-Contacts entre les noyaux $^{15}\text{N}$ -lysine et les noyaux $^{31}\text{P}$ de l'ADN pour les résidus K1 du peptide LAH<sub>4</sub> à pH= 5,5.

La figure 6.13 représente les courbes REDOR  $^{15}\text{N}\{-^{31}\text{P}\}$  (on observe le noyau  $^{15}\text{N}$ ) et  $^{31}\text{P}\{-^{15}\text{N}\}$  (on observe le noyau  $^{31}\text{P}$ ) obtenues lorsque seulement la lysine 1 du peptide est marquée en  $^{15}\text{N}$ .



**Figure 6.13: Courbes REDOR  $^{15}\text{N}\{-^{31}\text{P}\}$  et  $^{31}\text{P}\{-^{15}\text{N}\}$  du peptide LAH<sub>4</sub> marqué en  $^{15}\text{N}$  au niveau de la lysine 1 et complexé à l'ADN de sperme de saumon, en fonction du temps d'évolution dipolaire.**

La courbe REDOR  $^{15}\text{N}\{-^{31}\text{P}\}$ , en observant le noyau  $^{15}\text{N}$ , obtenue pour le peptide marqué en  $^{15}\text{N}$  au niveau de la lysine 1, ne montre pas de diminution du signal en  $^{15}\text{N}$  en fonction du temps d'évolution dipolaire ce qui laisserait penser que les noyaux  $^{15}\text{N}$  de cette lysine ne sont pas proches des phosphores de l'ADN. Cependant, lorsque l'on observe le noyau  $^{31}\text{P}$ , la courbe REDOR décroît jusqu'à 0 et se rapproche de la courbe REDOR simulée pour une paire de spins  $^{15}\text{N}\text{-}^{31}\text{P}$  distants de 4,6 Å. Cela signifie que 100 % des noyaux  $^{31}\text{P}$  (observés) sont proches des noyaux  $^{15}\text{N}$  de la lysine 1. Ces résultats semblent contradictoires car si un noyau  $^{31}\text{P}$  est proche d'un noyau  $^{15}\text{N}$  alors on devrait également observer la proximité des noyaux  $^{15}\text{N}$  par rapport aux noyaux  $^{31}\text{P}$  au niveau de la courbe REDOR  $^{15}\text{N}\{-^{31}\text{P}\}$ .

L'hypothèse la plus simple serait que l'on se trouve avec un excès de noyaux  $^{15}\text{N}$ , mais cette hypothèse n'est pas valide car dans nos conditions expérimentales nous avons  $6.10^{18}$  noyaux  $^{15}\text{N}$  (pour le peptide marqué au niveau de la lysine 1) pour  $4.10^{19}$  noyaux  $^{31}\text{P}$ .

Un point important à rappeler également est que le spectre  $^{15}\text{N}$  CP-MAS du peptide LAH<sub>4</sub> marqué au niveau de la lysine 1 de la figure 6.12, montre que les signaux RMN des noyaux  $^{15}\text{NH}_3^+$  de l'extrémité terminale du peptide et des noyaux  $^{15}\text{N}\epsilon$ , s'ils sont présents, ne sont pas distincts.

Une autre hypothèse qui pourrait expliquer ces résultats contradictoires serait que le signal en  $^{15}\text{N}$  sur le spectre RMN  $^{15}\text{N}$  du peptide LAH<sub>4</sub> marqué au niveau de la lysine 1 et complexé à l'ADN, corresponde uniquement au signal d'un seul type de noyaux  $^{15}\text{N}$  :  $^{15}\text{NH}_3^+$  (extrémité terminale) ou les noyaux  $^{15}\text{N}\epsilon$  (chaîne latérale). En effet, le délai de recyclage utilisé lors de l'enregistrement des spectres REDOR  $^{15}\text{N}\{-^{31}\text{P}\}$  est de 800 ms. Il est possible que ce temps de recyclage soit trop court pour pouvoir observer l'effet de certains noyaux  $^{15}\text{N}$ . Cependant, comme on observe les noyaux  $^{15}\text{N}\epsilon$  de la chaîne latérale de la lysine sur les autres échantillons alors on pourrait penser que ce sont les noyaux  $^{15}\text{N}\epsilon$  qui sont visibles sur le spectre RMN. Si le signal de noyaux  $^{15}\text{NH}_3^+$  est absent, sachant qu'on n'observe pas de déphasage en  $^{15}\text{N}$  sur la courbe REDOR, cela voudrait dire que les noyaux  $^{15}\text{NH}_3^+$  de l'extrémité N-terminale du peptide seraient proches des phosphores de l'ADN et non les noyaux  $^{15}\text{N}\epsilon$ .

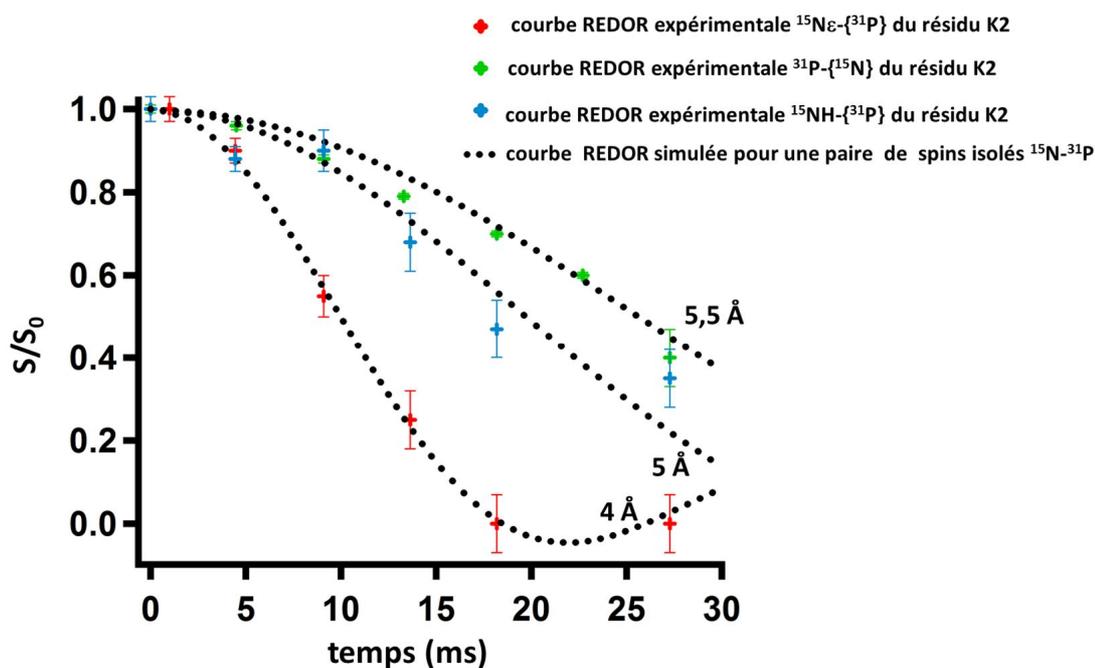
Cependant, si le signal RMN en  $^{15}\text{N}$  visible sur le spectre RMN CP-MAS provient des noyaux  $^{15}\text{NH}_3^+$  de l'extrémité terminale mais également des noyaux  $^{15}\text{N}\epsilon$  alors les résultats obtenus indiqueraient que les noyaux  $^{15}\text{N}$  de la lysine 1 ( $^{15}\text{NH}_3^+$  et  $^{15}\text{N}\epsilon$ ) ne sont pas proches des phosphores de l'ADN et qu'il y a un problème sur les résultats obtenus.

Pour conclure, ces résultats ne permettent pas de déterminer quels sont les noyaux  $^{15}\text{N}$  de la lysine 1 ( $^{15}\text{NH}_3^+$  ou  $^{15}\text{N}\epsilon$ , ou encore  $^{15}\text{NH}_3^+$  et  $^{15}\text{N}\epsilon$ ) qui se trouvent à proximité des phosphores de l'ADN.

Toutes ces hypothèses montrent l'importance de savoir à quel(s) noyau(x) correspond(ent) exactement le signal RMN du spectre  $^{15}\text{N}$  CP-MAS du peptide marqué au niveau de la lysine 1. Sachant que la lysine est également marquée uniformément en  $^{13}\text{C}$ , nous avons envisagé d'enregistrer des expériences 2D  $^{15}\text{N}\text{-}^{13}\text{C}$  qui permettrait de distinguer les noyaux  $^{15}\text{NH}_3^+$  des noyaux  $^{15}\text{N}\epsilon$ .

### 6.3.3.2-Contacts entre les noyaux $^{15}\text{N}$ -lysine et les noyaux $^{31}\text{P}$ de l'ADN pour les résidus K2 du peptide LAH<sub>4</sub> à pH= 5,5.

La figure 6.14 représente les courbes REDOR  $^{15}\text{N}$ - $\{^{31}\text{P}\}$  et  $^{31}\text{P}$ - $\{^{15}\text{N}\}$  obtenues lorsque seulement la lysine 2 du peptide est marquée en  $^{15}\text{N}$ .



**Figure 6.14: Courbes REDOR  $^{15}\text{N}$ - $\{^{31}\text{P}\}$  et  $^{31}\text{P}$ - $\{^{15}\text{N}\}$  du peptide LAH<sub>4</sub> marqué en  $^{15}\text{N}$  au niveau de la lysine 2 et complexé à l'ADN de sperme de saumon, en fonction du temps d'évolution dipolaire.**

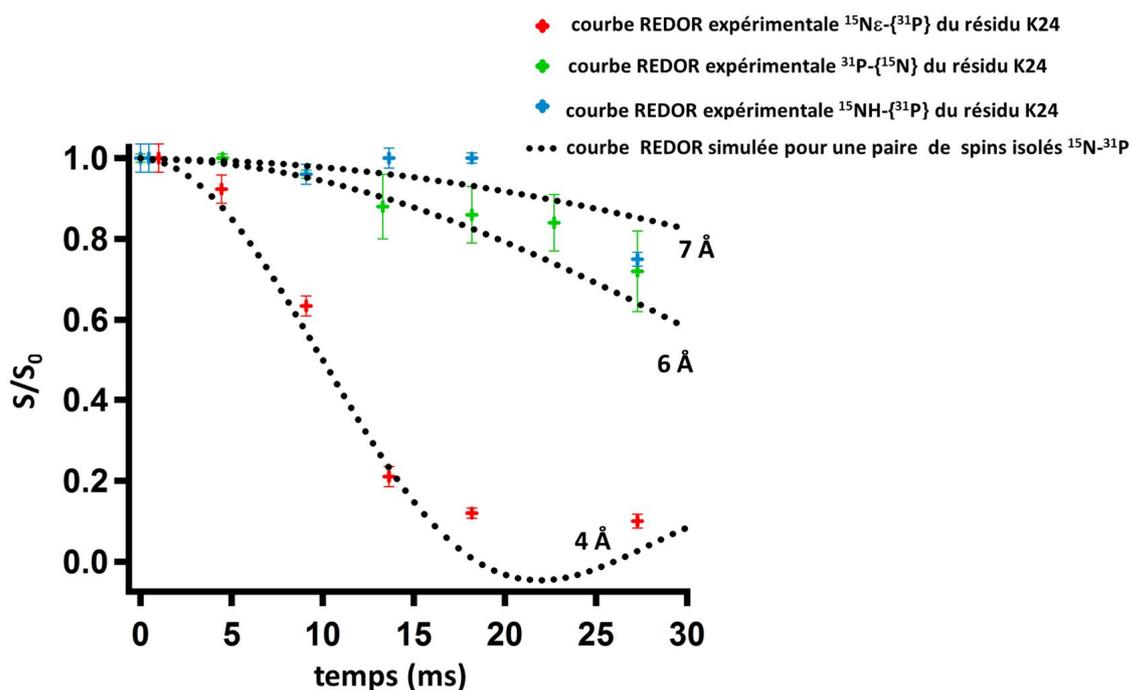
La figure 6.14 montre que le signal en  $^{15}\text{N}\epsilon$ -K2 diminue au cours du temps et atteint la valeur de 0 après 15 ms. Cette courbe de déphasage est très proche de la courbe de simulation REDOR pour une paire de spins isolés  $^{15}\text{N}$ - $^{31}\text{P}$  distants de 4 Å. Nous pouvons donc en conclure que les noyaux  $^{15}\text{N}\epsilon$ -K2 sont en contacts avec les noyaux  $^{31}\text{P}$  des phosphates de l'ADN. De plus, le fait que la courbe REDOR expérimentale descende jusqu'à 0 prouve que 100 % des noyaux  $^{15}\text{N}$  (observés) de la chaîne latérale des lysines en position 2 sont proches des phosphates de l'ADN et qu'ils agissent par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques.

Lorsque l'on observe cette fois ci les noyaux  $^{31}\text{P}$ , la courbe REDOR montre des distances entre les noyaux  $^{31}\text{P}$  et les noyaux  $^{15}\text{N}$  des lysines de 5,5 Å. Nous avons mesuré des distances plus courtes en observant les noyaux  $^{15}\text{N}\epsilon$  (4 Å) qu'en observant les noyaux  $^{31}\text{P}$ .

Ceci pourrait s'expliquer par le fait que tous les phosphores ne sont pas proches de noyaux  $^{15}\text{N}$  ou encore qu'en observant les noyaux  $^{31}\text{P}$ , on mesure les interactions dipolaires existantes non seulement entre les paires de spins  $^{31}\text{P}$ - $^{15}\text{N}$  mais également entre les paires de spins  $^{31}\text{P}$ - $^{15}\text{NH}$  de la liaison amide. En effet, la courbe REDOR  $^{15}\text{N}\{-^{31}\text{P}\}$  obtenue en observant uniquement les noyaux  $^{15}\text{NH}$  donne des distances entre les noyaux  $^{15}\text{NH}$  et  $^{31}\text{P}$  de l'ordre de 5 Å. De plus à 27 ms la courbe REDOR  $^{15}\text{N}\{-^{31}\text{P}\}$  pour les noyaux  $^{15}\text{NH}$  descend pour atteindre la valeur de 0,35 (+/- 0,07), ce qui signifie qu'au moins 65 % (+/- 7%) des noyaux  $^{15}\text{NH}$  de la lysine 2 sont proches des phosphores de l'ADN. De même la courbe REDOR  $^{31}\text{P}\{-^{15}\text{N}\}$  descend pour atteindre la valeur de 0,4 (+/- 0,07), ce qui signifie qu'au moins 60 % (+/- 7%) des phosphores sont proches de l'ADN. Les résultats obtenus ne permettent pas de savoir si 100 % des phosphores ou 100 % des noyaux  $^{15}\text{NH}$  sont proches car les courbes simulées (5 et 5,5 Å) pour lesquelles les courbes REDOR se rapprochent ne descendent pas encore à 0 après 27 ms d'évolution dipolaire. De plus, le paramètre limitant dans l'enregistrement des courbes REDOR est le temps de relaxation transversale  $T_2$  du noyau observé. En effet, plus le  $T_2$  est long plus on pourra obtenir des courbes REDOR plus loin en temps. Pour nos échantillons, il n'y a plus de signal en  $^{15}\text{N}$  pour les spectres d'écho complet après 30 ms d'évolution.

### **6.3.3.3-Contacts entre les noyaux $^{15}\text{N}$ -lysine et les noyaux $^{31}\text{P}$ de l'ADN pour les résidus K24 du peptide LAH<sub>4</sub> à pH= 5,5.**

La figure 6.15 représente les courbes REDOR  $^{15}\text{N}\{-^{31}\text{P}\}$  et  $^{31}\text{P}\{-^{15}\text{N}\}$  obtenues lorsque seulement la lysine 24 du peptide est marquée en  $^{15}\text{N}$ .



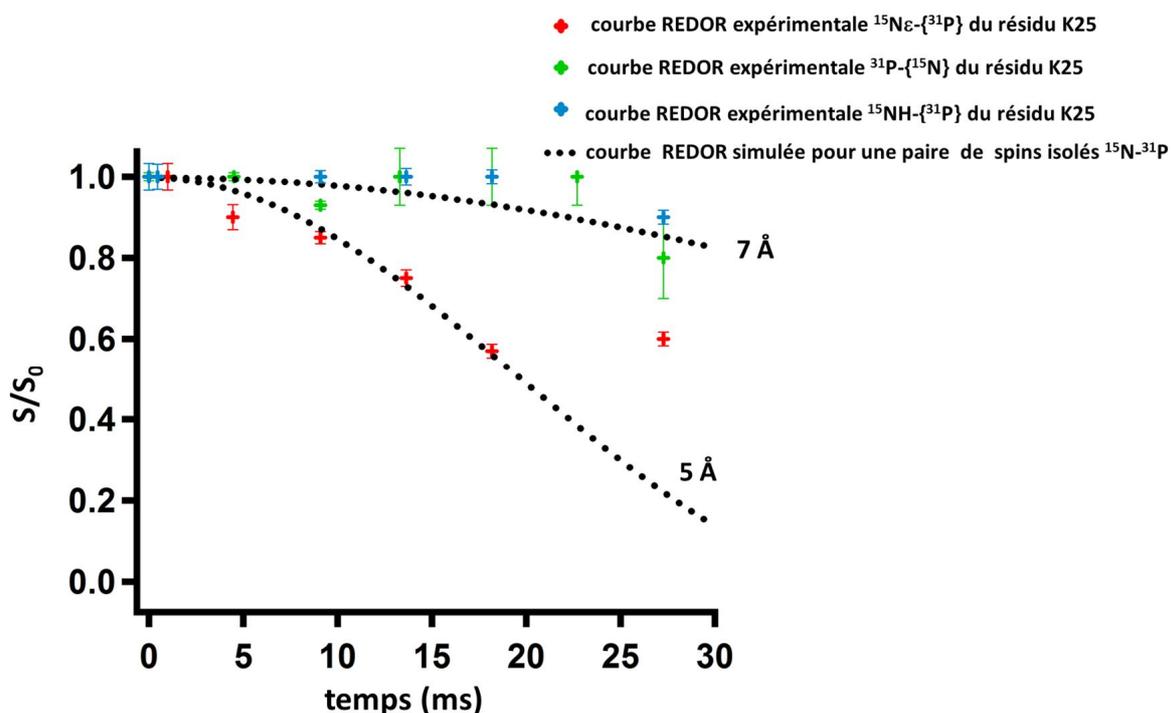
**Figure 6.15: Courbes REDOR  $^{15}\text{N}\text{-}\{^{31}\text{P}\}$  et  $^{31}\text{P}\text{-}\{^{15}\text{N}\}$  du peptide LAH4 marqué en  $^{15}\text{N}$  au niveau de la lysine 24 et complexé à l'ADN de sperme de saumon, en fonction du temps d'évolution dipolaire.**

Pour les noyaux  $^{15}\text{N}\varepsilon\text{-K24}$  les résultats sont similaires à ceux obtenus pour les noyaux  $^{15}\text{N}\varepsilon\text{-K2}$ . En effet, on obtient également une courbe de déphasage semblable et qui se rapproche de la courbe de simulation REDOR pour une paire de spins isolés  $^{15}\text{N}\text{-}^{31}\text{P}$  dont les noyaux sont distants de 4 Å. La courbe REDOR atteint un minimum de 0,1 (+/- 0,017) après 25 ms d'évolution dipolaire ce qui montre qu'au moins 90 % (+/- 1,7%) des noyaux  $^{15}\text{N}\varepsilon\text{-K24}$  sont proches des phosphores de l'ADN.

La courbe REDOR  $^{31}\text{P}\text{-}\{^{15}\text{N}\}$  se rapproche le mieux de la courbe REDOR simulée dont les noyaux  $^{31}\text{P}\text{-}^{15}\text{N}$  sont distants de 6 Å. Cette distance est supérieure à la distance observée entre le noyau  $^{15}\text{N}\varepsilon$  et  $^{31}\text{P}$  qui est de 4 Å. Comme précédemment cela s'expliquerait par le fait que les noyaux  $^{31}\text{P}$  sont proches des noyaux  $^{15}\text{N}\varepsilon$  mais également des noyaux  $^{15}\text{NH}$ . En effet, la courbe REDOR obtenue lorsque l'on observe le noyau  $^{15}\text{NH}$  montre que ces noyaux sont également proches des  $^{31}\text{P}$  avec des distances proches de 7 Å et donc supérieures à celles observées pour les noyaux  $^{15}\text{N}\varepsilon$ .

### 6.3.3.4-Contacts entre les noyaux $^{15}\text{N}$ -lysine et les noyaux $^{31}\text{P}$ de l'ADN pour les résidus K25 du peptide LAH<sub>4</sub> à pH= 5,5.

La figure 6.16 représente les courbes REDOR  $^{15}\text{N}$ - $\{^{31}\text{P}\}$  et  $^{31}\text{P}$ - $\{^{15}\text{N}\}$  obtenues lorsque seulement la lysine 25 du peptide est marquée en  $^{15}\text{N}$



**Figure 6.16: Courbes REDOR  $^{15}\text{N}$ - $\{^{31}\text{P}\}$  et  $^{31}\text{P}$ - $\{^{15}\text{N}\}$  du peptide LAH<sub>4</sub> marqué en  $^{15}\text{N}$  au niveau de la lysine 25 et complexé à l'ADN de sperme de saumon, en fonction du temps d'évolution dipolaire.**

Pour les noyaux  $^{15}\text{N}\epsilon$ -lysine 25, la courbe de déphasage REDOR suit la courbe de simulation REDOR de 5 Å pour une paire isolée jusqu'à environ 15 ms d'évolution dipolaire puis elle s'en éloigne. Le fait que la courbe REDOR expérimentale s'éloigne de la courbe simulée après 15 ms pour atteindre la valeur de 0,6, (+/- 0,017) nous permet de conclure cette fois ci que seulement 40 % (+/- 1,7%) des noyaux  $^{15}\text{N}\epsilon$  des lysines 25 sont en contact avec les phosphores de l'ADN. Pour le résidu K25, on observe une distance moyenne de 7 Å entre les noyaux  $^{31}\text{P}$  et les noyaux  $^{15}\text{N}$ . Les noyaux  $^{15}\text{NH}$  sont également à proximité des noyaux  $^{31}\text{P}$  avec une distance moyenne de 7 Å.

## 6.4) Discussions

### 6.4.1) Etudes des interactions ADN/P-LAH<sub>4</sub> avec le peptide marqué uniformément en <sup>15</sup>N.

Dans un premier temps, nous avons enregistré les expériences REDOR <sup>15</sup>N-<sup>31</sup>P et <sup>31</sup>P-<sup>15</sup>N sur le peptide marqué uniformément en <sup>15</sup>N pour cibler les résidus en interaction avec les phosphates de l'ADN. Ces expériences nous ont montrés qu'à pH= 5,5 dans des conditions expérimentales où nous avons 2 peptides pour 13 paires de bases, seules les chaînes latérales des lysines sont proches des phosphores de l'ADN. En effet, les chaînes latérales, chargées positivement, des histidines ne sont pas à proximité des phosphates de l'ADN, contrairement aux histones, où tous les résidus chargés positivement (arginine, lysine et histidine) sont impliqués dans la structuration de l'ADN sous forme de nucléosome [214]. D'autre part, Tsy-Yan Yu et Schaefer [208] ont étudiés les interactions qui étaient impliquées dans l'encapsidation de l'ADN du bactériophage T4 également par des expériences REDOR <sup>15</sup>N-<sup>31</sup>P}. Ils ont montrés que seules les chaînes latérales des lysines des protéines internes (IPs) étaient impliquées dans l'interaction avec les phosphates de l'ADN, et non les histidines ou les arginines qui sont également présents dans la protéine. Une question reste alors en suspens à savoir pourquoi les chaînes latérales des histidines ne participent pas activement aux interactions électrostatiques avec les phosphores de l'ADN comme les lysines?

Lorsque l'on observe les noyaux <sup>15</sup>Nε des quatre lysines lors des expériences REDOR, la distance moyenne obtenue entre les noyaux <sup>31</sup>P et les noyaux <sup>15</sup>N-ε lysine est de 5,5 Å. Par contre lorsque l'on observe les noyaux <sup>31</sup>P, on trouve une distance moyenne plus courte valant 4 Å. Ces données montrent qu'il y a plusieurs noyaux <sup>15</sup>N autour d'un noyau <sup>31</sup>P ou encore que les quatre lysines ne sont pas impliquées de façon égale dans l'interaction avec l'ADN. Les interactions électrostatiques sont importantes dans la condensation de l'ADN par le peptide LAH<sub>4</sub> et elles sont également présentes après acidification de l'endosome. Ces résultats sont en accords avec les résultats obtenus par ITC [92].

### 6.4.2) Etudes des interactions ADN/LAH<sub>4</sub> avec le peptide marqué spécifiquement sur une lysine à la fois.

Afin d'obtenir la contribution individuelle des quatre lysines séparément, nous avons marqué le peptide sélectivement, par synthèse peptidique, sur un résidu lysine à la fois. Le tableau 6.2 résume les distances obtenues entre les noyaux <sup>15</sup>N-<sup>31</sup>P pour chaque résidu K1, K2, K24 et K25 du peptide LAH<sub>4</sub> ainsi que pour le peptide P-LAH<sub>4</sub> marqué uniformément en <sup>15</sup>N, en fonction du noyau observé lors des expériences REDOR. Les valeurs données entre parenthèses indiquent le pourcentage de noyaux <sup>15</sup>N (observés) proches des noyaux <sup>31</sup>P de l'ADN (et inversement) qui ont pu être déterminé par REDOR.

Noyau observé	P-LAH <sub>4</sub>	Lysine 1	Lysine 2	Lysine 24	Lysine 25
<sup>15</sup> Nε (signal autour de 30 ppm)	5,5 Å		4 Å (100 %)	4 Å (90 %)	5 Å (40 %)
<sup>15</sup> NH (signal autour de 120 ppm)			5 Å	7 Å	7 Å
<sup>31</sup> P	4 Å	4,6 Å (100 %)	5,5 Å	6 Å	7 Å

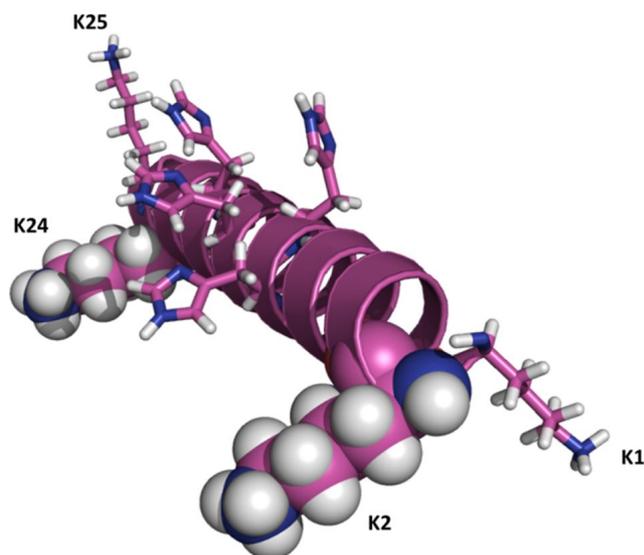
**Tableau 6.2 : Tableau résumant les distances obtenues entre les noyaux <sup>15</sup>N-<sup>31</sup>P pour chaque résidu K1, K2, K24 et K25 du peptide LAH<sub>4</sub> ainsi que pour le peptide P-LAH<sub>4</sub> marqué uniformément en <sup>15</sup>N, en fonction du noyau observé lors des expériences REDOR et le pourcentage des noyaux <sup>15</sup>N (observés) proches des noyaux <sup>31</sup>P (et inversement).**

Cependant, les échantillons ne sont pas composés de paires de spins isolés. Ainsi, les distances mesurées sont à prendre avec beaucoup de précaution car on se trouve dans un système multispins avec la possibilité d'avoir une distribution de distances <sup>15</sup>N-<sup>31</sup>P, ce qui rend les interprétations encore plus difficile. Cela nous a quand même permis de détecter la proximité de certains noyaux <sup>15</sup>N du peptide envers les phosphates de l'ADN.

Les résultats obtenus montrent que tous les noyaux <sup>31</sup>P observés sont proches de noyaux <sup>15</sup>N de la lysine 1. Nous avons cependant un problème en ce qui concerne les résultats de la courbe REDOR <sup>15</sup>N-<sup>31</sup>P} car on n'observe aucun déphasage contrairement à la courbe REDOR <sup>31</sup>P-<sup>15</sup>N}. Nos résultats ne nous permettent pas dire quels sont les noyaux <sup>15</sup>N de la

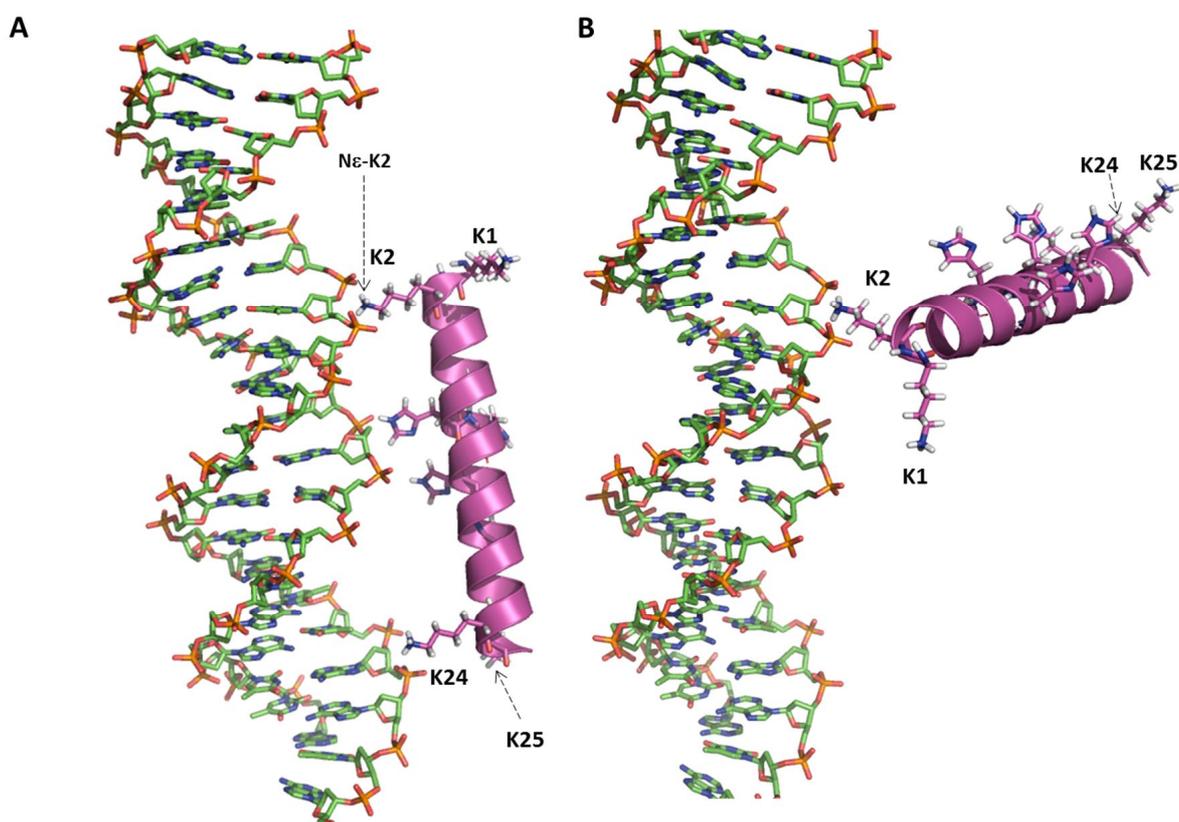
lysine qui sont proches des noyaux  $^{31}\text{P}$  de l'ADN. Pour cela, des expériences 2D  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$  sont nécessaires afin d'obtenir les déplacements chimiques des noyaux  $^{15}\text{N}\epsilon$  et  $^{15}\text{NH}_3^+$  du résidu lysine 1. De plus, nous avons choisi de marquer sélectivement un résidu lysine sur le peptide LAH<sub>4</sub> et non sur le peptide P-LAH<sub>4</sub>. Si nous avions continué le marquage sélectif sur le peptide P-LAH<sub>4</sub> nous n'aurions pas eu de problème concernant la première lysine car sur le peptide P-LAH<sub>4</sub>, cette lysine se serait trouvée en position 2 et on aurait pu observer sur le spectre  $^{15}\text{N}$  deux signaux différents correspondant aux noyaux  $^{15}\text{NH}$  et l'autre aux noyaux  $^{15}\text{N}\epsilon$ . De plus, le fait que 100 % des noyaux  $^{31}\text{P}$  sont proches de la lysine 1, sachant que l'on a 2 peptides /13 paires de bases (soit une lysine 1 pour 13 noyaux  $^{31}\text{P}$ ) laisse suggérer que l'ADN est sous forme compacte pour permettre la proximité de 13 noyaux  $^{31}\text{P}$  envers un résidu lysine 1.

D'autre part, les noyaux  $^{15}\text{N}\epsilon$  des lysines 2 et des lysines 24 sont plus nombreux à être impliqués dans la complexation de l'ADN que les noyaux  $^{15}\text{N}\epsilon$  des lysines 25 (100 % et 90 % contre 40 %). Ainsi, si l'on considère une hélice  $\alpha$  parfaite, ces deux résidus se trouvent du même côté du peptide (figure 6.17).



**Figure 6.17 : Structure en hélice  $\alpha$  du peptide LAH<sub>4</sub> mettant en évidence les chaînes latérales chargées positivement (lysines et histidines). Les chaînes latérales des lysines 2 et 24 sont représentés sous forme de sphère se trouvent du même côté de l'hélice. Elles participent de façon active à l'interaction avec l'ADN par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques.**

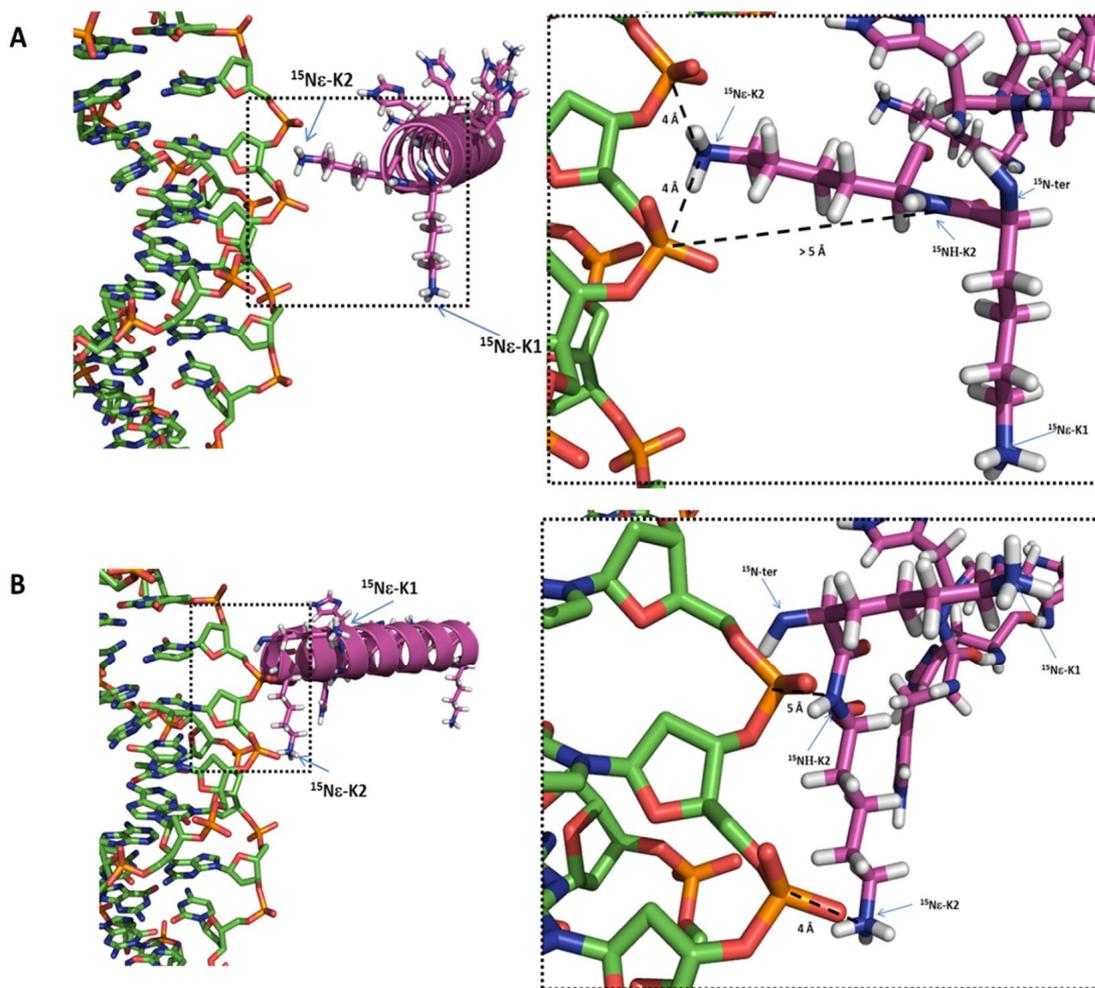
Les résultats des expériences REDOR nous informent que le peptide agit par ces deux extrémités via les chaînes latérales des lysines. Nous pouvons donc suggérer deux modèles d'interaction, dans le cas où le peptide aurait une conformation en hélice  $\alpha$  y compris à ses extrémités. Dans le premier modèle, les deux extrémités K2 et K24 du peptide interagissent sur un court segment d'ADN correspondant à la longueur du peptide (figure 6.18-A). Dans l'autre modèle (figure 6.18-B), une extrémité se lie à un brin d'ADN et l'autre extrémité peut se lier plus loin sur le même brin d'ADN permettant ainsi la compaction de l'ADN, ou encore celle-ci pourrait se lier à un autre brin d'ADN. Le premier modèle imposerait une proximité des chaînes latérales des histidines. Or nous n'avons pas observé de contact étroit entre les chaînes latérales des histidines et les phosphates de l'ADN. Ce modèle semble donc peu probable. Par contre, le deuxième modèle correspondrait mieux avec les résultats obtenus.



**Figure 6.18 : Deux modèles possibles pouvant expliquer l'interaction du peptide avec l'ADN via les chaînes latérales de ses résidus lysines localisées à ses extrémités.**

Nous avons également montré la proximité des noyaux  $^{15}\text{N}\epsilon\text{-K2}$  envers les noyaux  $^{31}\text{P}$  de l'ADN. De plus, il semble que les noyaux  $^{15}\text{NH}$  sont également proches des noyaux  $^{31}\text{P}$ . Cela peut être la conséquence de la proximité des noyaux  $^{31}\text{P}$  envers les noyaux  $^{15}\text{N}\epsilon$ . En effet, la distance maximale entre le noyau  $\text{N}\epsilon$  et le noyau  $\text{NH}$  au sein d'une lysine dans le nucléosome par exemple (PDB= 1AOI) est de 7,6 Å.

Les données obtenues nous permettent d'exclure le modèle A présenté sur la figure 6.19. En effet, sur ce modèle la chaîne latérale de la lysine 2 est positionnée de façon à ce que le noyau  $^{15}\text{NH}$  de la lysine 2 est éloigné du brin d'ADN. Or, nous avons vu précédemment que la distance entre les noyaux  $\text{N}\epsilon$  et  $\text{NH}$  au sein d'un résidu lysine est de 7,6 Å. Ainsi, le modèle A de la figure 6.19 donnerait des distances entre les noyaux  $^{31}\text{P}$  et  $^{15}\text{NH}$  supérieur à 5 Å. Sur l'autre modèle (figure 6.19-B) la chaîne latérale de la lysine 2 est positionnée le long du brin d'ADN permettant ainsi aux phosphores d'être en contact avec les noyaux  $^{15}\text{N}\epsilon\text{-K2}$  et  $^{15}\text{NH}\text{-K2}$  à la fois. De plus, dans ce modèle l'extrémité  $\text{NH}_3^+$  du peptide peut également se trouver à proximité des noyaux  $^{31}\text{P}$ , ce qui peut expliquer une distance de 4 Å quand on mesurait les contacts existants entre les paires de spins  $^{31}\text{P}\text{-}^{15}\text{N}\text{-K1}$  en observant le noyau phosphore.

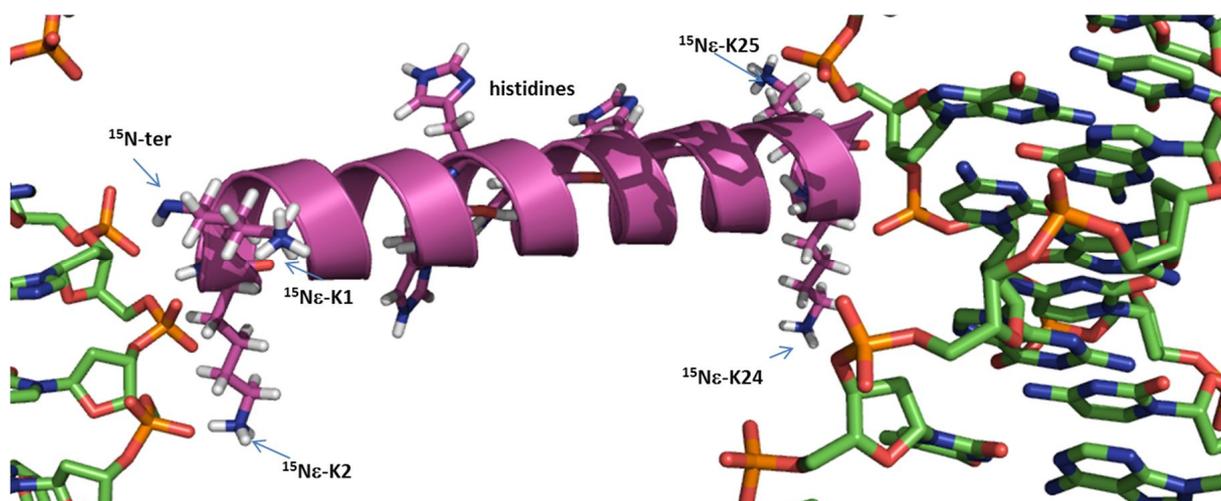


**Figure 6.19 :** Le modèle A nous montre que le positionnement de la chaîne latérale de la lysine 2 par rapport aux phosphores de l'ADN, ne permet pas de justifier les distances obtenues entre les noyaux  $^{15}\text{N}\epsilon\text{-K2-}^{31}\text{P}$  et les noyaux  $^{15}\text{NH-}^{31}\text{P}$ . Par contre, le modèle B montre que la position de la chaîne latérale de la lysine 2 par rapport aux phosphores de l'ADN permet d'expliquer les distances mesurées par les expériences REDOR.

Nous avons aussi montré que les résidus K24 et K2 avaient le même comportement vis-à-vis des interactions avec les phosphores de l'ADN et que ces deux résidus se trouvent du même côté du peptide LAH<sub>4</sub>. Donc on pourrait supposer que la lysine 24 se positionne de la même façon que ce que nous venons de décrire pour la lysine 2 mais avec une distance plus grande entre les paires de spins  $^{15}\text{NH-K24-}^{31}\text{P}$  (7 Å au lieu de 5 Å pour  $^{15}\text{NH-K2-}^{31}\text{P}$ ). D'autre part les résultats des expériences REDOR montrent également la proximité de certains résidus lysine 25 (40 %) par rapport aux phosphores de l'ADN. La proximité des noyaux  $^{31}\text{P}$  envers

40 % des noyaux  $^{15}\text{N}_\epsilon$  de la lysine 25 pourrait également être la conséquence de la proximité des noyaux  $^{15}\text{N}_\epsilon\text{-K24}$  envers les  $^{31}\text{P}$ .

Il est cependant important de noter que les renseignements obtenus par les expériences REDOR ne nous permettent pas de proposer un modèle unique d'interaction entre le peptide et l'ADN mais ils nous ont permis d'exclure le modèle de la figure 6.18-A où les résidus histidines seraient proches des phosphores de l'ADN. D'autre part, on ne sait pas si les extrémités du peptide sont structurées également en hélice  $\alpha$ . La figure 6.20 montre donc un des modèles d'interaction possible du peptide LAH<sub>4</sub> avec l'ADN à partir de l'ensemble des données obtenues par les expériences REDOR.



**Figure 6.20 : Modèle d'interaction du peptide LAH<sub>4</sub> avec les phosphores de l'ADN via les chaînes latérales des lysines à partir des distances mesurées par les expériences REDOR.**

## 6.5) Conclusions

Les peptides cationiques sont souvent utilisés pour neutraliser les charges négatives et condenser l'ADN en formant des tores ou encore des structures sous forme de bâtonnets [215]. Le peptide LAH<sub>4</sub> possède, en effet, quatre lysines chargées à pH= 7. Par contre, à pH= 5, avec la protonation des quatre chaînes latérales des histidines, la charge du peptide passe à +9. Ainsi, le peptide est capable d'interagir avec l'ADN aux deux pH, par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques. D'autre part, le peptide est capable de transporter l'ADN dans les cellules par un phénomène d'endocytose [40, 45]. Il a été montré également, que l'acidification de l'endosome est nécessaire au processus de transfection [40, 45]. Durant l'acidification, les chaînes latérales des résidus histidines se protonent. Comme le peptide possède désormais une plus forte charge positive, il faudrait donc moins de peptides pour neutraliser les charges négatives de l'ADN et par conséquent environ la moitié des peptides qui étaient complexés à l'ADN à pH neutre se retrouvent libres dans l'endosome [92].

Dans ce chapitre nous avons déterminé quels étaient les résidus qui étaient impliqués dans l'interaction avec l'ADN à pH= 5 par des expériences REDOR. Nous avons ainsi montré qu'à ce pH, malgré la protonation des résidus histidines, seuls les lysines sont proches des noyaux <sup>31</sup>P de l'ADN. Ces résidus histidines protonées, en position 10, 11, 14 et 18 du peptide, seraient donc principalement impliqués dans la déstabilisation de la membrane de l'endosome. La libération du complexe LAH<sub>4</sub>/ADN de l'endosome pourrait se faire par deux mécanismes possibles : les histidines pourraient donc agir comme des « éponges à protons » [16] à pH= 5, ce qui favoriserait la rupture de la membrane de l'endosome, ou le peptide à pH= 5 perturberait la membrane de l'endosome par un mécanisme de type « tapis ». Ces deux mécanismes pourraient également avoir lieu simultanément. A la suite de ces étapes, l'ADN se retrouve dans le cytoplasme. Les peptides encore complexés à l'ADN devront être libérés, probablement par des interactions non spécifiques avec les composants du cytoplasme. L'ADN diffuse alors jusqu'au noyau pour pouvoir transmettre son information génétique, par un mécanisme encore inconnu.

D'autre part, nous avons pu déterminer quels résidus du peptide étaient proches des noyaux <sup>31</sup>P de l'ADN. Cela, nous a permis d'obtenir un premier modèle d'interaction où le peptide agit sur l'ADN par l'intermédiaire de ses résidus lysines présents aux extrémités. Le fait que les histidines ne montrent pas de proximité envers les noyaux phosphores de l'ADN nous a permis d'exclure le modèle où le peptide se place le long d'un brin d'ADN et de

privilégier le modèle où le peptide agit par ces extrémités. De plus, il semble que les lysines 2, 24 et 25 possèdent un environnement en  $^{31}\text{P}$  assez similaire. D'autre part, le fait que plus de 90 % des noyaux  $^{15}\text{N}$  des résidus K2 et K24 se trouvent proches de noyaux  $^{31}\text{P}$  (contrairement aux résidus K25) laisse suggérer les lysines 2 et 24 soient les résidus « moteurs » pour l'interaction avec l'ADN. Il reste également à résoudre les questions en suspens sur la lysine 1.

## 6.6) Perspectives

Les données obtenues par les expériences REDOR fournissent les premières indications précises quant à l'interaction entre le peptide et l'ADN. De plus, les échantillons sont également marqués en  $^{13}\text{C}$  au niveau des résidus lysines. L'enregistrement des expériences REDOR  $^{13}\text{C}\{-^{31}\text{P}\}$  et  $^{31}\text{P}\{-^{13}\text{C}\}$  va nous permettre d'obtenir des renseignements quant à la proximité entre les noyaux  $^{13}\text{C}$  de chaque résidu lysine et les phosphores de l'ADN, ce qui nous permettra d'avoir une idée plus précise quant au positionnement des chaînes latérales lysines par rapport au phosphores. De plus, ces expériences vont nous permettre de vérifier les résultats obtenus dans ce chapitre et tout particulièrement à cause des problèmes d'interprétation rencontrés sur le peptide marqué au niveau de la lysine 1. De plus, la mesure des déplacements chimiques en  $^{13}\text{C}$  va nous permettre d'obtenir des indications quant à la structure du peptide sur ces extrémités. Il faudrait également réaliser les mêmes expériences sur les complexes LAH<sub>4</sub>/ADN à pH= 7 afin de comparer les interactions avec l'ADN aux deux pH pour pouvoir interpréter les résultats de transfection obtenus pour les mutants « LAH<sub>4</sub> » [40, 45, 93]. D'autre part, la détermination des pK<sub>a</sub>s des histidines lorsque le peptide est lié à l'ADN reste une étude intéressante à réaliser dans la compréhension des interactions qui ont lieu entre le peptide et l'ADN. Pour finir, des études structurales sur l'ADN cette fois-ci seraient intéressante en marquant par exemple l'ADN en  $^{15}\text{N}$  et en mesurant des distances  $^{15}\text{N}\text{-}^{31}\text{P}$  sur l'ADN libre et sur les complexes ADN/LAH<sub>4</sub>.

## Chapitre 7 : Conclusions Générales

LAH<sub>4</sub> est un peptide antibactérien de 26 acides aminés, qui de plus est capable de se lier à l'ADN, permettant ainsi son transfert dans les cellules eucaryotes [40, 45]. Pour profiter des avantages qu'offre la RMN, il était nécessaire de disposer du peptide marqué en <sup>15</sup>N et / ou <sup>13</sup>C pour étudier l'interaction du peptide avec les membranes et l'ADN.

Jusqu'à présent la production du peptide s'est faite via la synthèse peptidique en phase solide. Durant ma thèse, j'ai développé une méthode d'expression du peptide chez *E. coli* permettant la production de LAH<sub>4</sub>, malgré sa toxicité envers cet organisme, avec un marquage uniforme en <sup>13</sup>C et/ou en <sup>15</sup>N. Nous avons montré que la présence d'une séquence anionique (DDDDK) était nécessaire pour l'expression du peptide en fusion avec la GST. Partant de l'hypothèse que la séquence DDDDK permettrait d'inhiber la toxicité chez *E. coli*, et non la taille du partenaire de fusion, nous avons remplacé la GST (24,5 kDa) par un partenaire de fusion hydrophobe de plus petite taille : TAF12 (8 kDa). La protéine de fusion s'exprime sous la forme de corps d'inclusion qui n'étaient pas possible de solubiliser avec des concentrations en urée compatibles avec des méthodes de clivage enzymatiques. Nous avons donc choisi de cliver la protéine de fusion directement à partir des corps d'inclusion par méthode chimique avec l'acide formique malgré l'addition d'un proline du côté N-ter de LAH<sub>4</sub>. La production du peptide P-LAH<sub>4</sub> par cette méthode a abouti à l'obtention de 10 mg de peptide purifié par litre de culture. Nous avons également montré que ce nouveau peptide P-LAH<sub>4</sub> gardait les mêmes propriétés antibactériennes et de transfection d'ADN que LAH<sub>4</sub>. Nous avons donc pu entreprendre des études RMN sur ce nouveau peptide.

Les complexes LAH<sub>4</sub>/ADN entrent dans les cellules par endocytose. Lorsque le pH à l'intérieur de l'endosome diminue, des molécules de peptide se retrouvent libres dans l'endosome. Nous avons donc déterminé la structure du peptide à pH= 5,4 dans un environnement membranaire mimant l'endosome prêt à interagir avec la membrane pour permettre la libération de l'ADN dans le cytoplasme [40, 45]. En effet, à ce stade, le peptide se structure en hélice  $\alpha$  des résidus A4 à A23. Cette structure est comparable à celle d'autres peptide antibactériens, comme les magainines [163, 184], la melittine [185] ou encore LL-37 [186] et par conséquent, P-LAH<sub>4</sub> pourrait déstabiliser les membranes de l'endosome par un

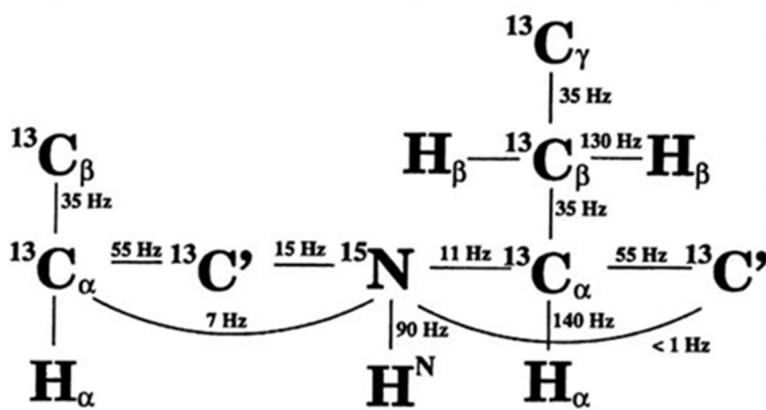
mécanisme similaire à celui observé pour ces peptides antimicrobiens. Nous avons, également montré qu'il existait encore des différences dans la localisation de l'hélice  $\alpha$  entre pH= 4,1 et pH= 5,4 et entre pH= 5,4 et pH= 6,1 qui seraient dues aux pKas des histidines qui se situent autour de 5,5.

D'autre part, des spectres CP  $^{15}\text{N}$  des échantillons orientés du peptide P-LAH<sub>4</sub> marqué uniformément en  $^{15}\text{N}$  dans des membranes de POPC à pH= 5,5 et 6,9 ont été enregistrés. Les résultats ont montré que P-LAH<sub>4</sub> s'oriente parallèlement à la membrane à pH= 5,5, alors qu'il se présente de manière transmembranaire avec une inclinaison de 10° par rapport à la normale de la bicouche phospholipidique à pH= 6,9. Les spectres  $^{31}\text{P}$  ont montré que le peptide perturbe plus les membranes à pH= 5,5 qu'à pH= 6,9, et que par conséquent, l'orientation parallèle aux membranes correspond à l'efficacité antibactérienne maximale. De plus, les spectres 2D  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  PISEMA montrent que le peptide P-LAH<sub>4</sub> se structure également en hélice  $\alpha$  aux deux pH dans les membranes de POPC.

Les études structurales au sein du complexe ADN/LAH<sub>4</sub> par des expériences REDOR nous ont permis de montrer que seuls les résidus lysine du peptide étaient proches des noyaux  $^{31}\text{P}$  de l'ADN à pH= 5 malgré la présence des résidus histidines chargés positivement. Cela suggère un modèle d'interaction dans lequel le peptide agirait avec l'ADN par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques via ses extrémités. Dans ce modèle le peptide expose seulement une de ses extrémités sur un brin d'ADN en laissant l'autre extrémité libre d'interagir avec un autre brin, ou plus loin sur le même brin. Le rôle clé des résidus histidines serait la déstabilisation des membranes de l'endosome par un mécanisme d' « éponge à protons » [16] et/ou de type « tapis » [90]. Le peptide conserverait donc après acidification de l'endosome un rôle protecteur de l'ADN envers les nucléases. Le marquage sélectif en  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  sur chacune des quatre lysines séparément révèle que les lysines 2, 24 et 25 ont un environnement assez similaire en  $^{31}\text{P}$ . De plus, 90 % des noyaux  $^{15}\text{N}$  des lysines 2 et 24 se trouvent proches des noyaux  $^{31}\text{P}$ , contrairement à la lysine 25 (40 %). Ceci suggère que les lysines 2 et 24 sont les résidus « moteurs » dans l'interaction avec l'ADN. Les chaînes latérales des lysines K2 et K24 s'orienteraient parallèlement au brin d'ADN.

## Annexes

Annexe 1 : Valeurs caractéristiques des constantes de couplages  $^1J$  et  $^2J$  dans une protéine.



Annexe 2 : Valeurs de déplacements chimiques des acides aminés A, L, H et K pour une structure aléatoire de peptide

Noyau/Résidus	alanine	leucine	histidine	lysine
$H_N$	8,25	8,42	8,41	8,41
$H_\alpha$	4,35	4,38	4,63	4,36
$H_\beta$	1,39	1,65, 1,65	3,26, 3,20	1,85, 1,76
Autres H		$\gamma H$ : 1,64 $\delta CH_3$ : 0,94, 0,90	2H : 8,12 4H : 7,14	$\gamma CH_2$ : 1,45, 1,45 $\delta CH_2$ : 1,70, 1,70 $\epsilon CH_2$ : 3,02, 3,02 $\epsilon NH_3^+$ : 7,52
$C_\alpha$	52,50	55,70	55,80	56,70
$C_\beta$	19,00	41,90	32,00	32,30
CO	177,10	177,10	175,10	176,50

**Annexe 3 :**

**A-Composition du milieu utilisé pour produire le peptide P-LAH<sub>4</sub> marqué uniformément en <sup>15</sup>N et <sup>13</sup>C pour un litre de culture :**

<b>Solutions stocks</b>	<b>Volume utilisé (mL)</b>
<b>5 X M9</b>	200
<b>50 g/L <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl</b>	10
<b>20 % <sup>13</sup>C glucose</b>	10
<b>1M MgSO<sub>4</sub></b>	2
<b>1M CaCl<sub>2</sub></b>	0,1
<b>1g/L FeSO<sub>4</sub></b>	0,1
<b>10 g/L thiamine</b>	1
<b>10 g/L biotine</b>	1
<b>10 mg/mL kanamycine</b>	5
<b>préculture</b>	10
<b>eau</b>	Qsp 1000

**B- Composition du milieu 5 X M9 :**

<b>Sels</b>	<b>Masse (g)</b>
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O</b>	<b>42,5</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>15</b>
<b>NaCl</b>	<b>2,5</b>

**Annexe 4 : Tableau regroupant les valeurs de déplacements chimiques des noyaux  $N_H$ ,  $H_N$ ,  $C\alpha$ ,  $C\beta$ ,  $H\alpha$ , des résidus du peptide. Seul les résidus P1, K2 et L24 non pas pu être attribués ainsi que les déplacements chimiques des noyaux  $C\alpha$  et  $C\beta$  de la lysine 26.**

	$C\alpha$	$C\beta$	$N_H$	$H_N$	$H\alpha$	$H\beta$
<b>K3</b>	59,577	32,674	121,938	8,954	4,345	
<b>A4</b>	54,581	18,826	122,422	8,234	4,380	
<b>L5</b>	57,783	42,299	119,958	8,018	4,330	
<b>L6</b>	58,223	42,313	119,560	8,216	4,188	
<b>A7</b>	55,513	18,750	120,518	8,134	4,141	
<b>L8</b>	58,054	42,696	119,818	7,894	4,250	
<b>A9</b>	55,682	18,750	121,827	8,546	4,230	
<b>L10</b>	58,290	41,472	117,357	8,546	4,188	
<b>H11</b>	59,984	29,766	118,551	8,340	4,333	3,460
<b>H12</b>	60,120	31,067	118,197	8,254	4,501	3,336
<b>L13</b>	58,358	42,313	120,938	8,844	4,230	
<b>A14</b>	55,931	18,597	121,042	8,546	4,179	
<b>H15</b>	59,611	29,919	115,984	7,893	4,389	3,404
<b>L16</b>	58,256	42,160	121,469	8,350	4,256	
<b>A17</b>	55,931	18,597	121,416	8,697	4,091	
<b>L18</b>	58,181	41,854	117,711	8,119	4,138	
<b>H19</b>	59,916	29,996	117,490	8,042	4,386	3,371
<b>L20</b>	58,019	42,084	120,902	8,490	4,153	
<b>A21</b>	55,522	18,755	120,903	8,454	4,135	
<b>L22</b>	57,409	41,931	116,458	8,110	4,179	
<b>A23</b>	54,294	18,903	122,026	7,925	4,286	
<b>L24</b>						
<b>K25</b>	56,801	33,056	119,030	7,771	4,380	
<b>K26</b>			119,05	8,119	4,383	
<b>A27</b>	53,989	20,662	130,947	7,902	4,227	

**Annexe 5 : Tableau résumant les contacts NOE présents sur le spectre 3D  $^1\text{H}_\text{N}$ - $^1\text{H}$  NOESY-HSQC attribués manuellement ainsi que leur intensité (volume).**

Résidus (i, i+1)	$d_{\text{NN}}$ (i, i+1)
L5/L6	35314
A7/L8	23846
L8/A9	33450
L10/H11	19498
H12/L13	20407
L13/A14	15052
A14/H15	30042
H15/L16	23396
L16/A17	15226
A17/L18	22013
H19/L20	33768
A21/L22	15903
L22/A23	16634

Résidus (i, i+2)	$d_{\text{NN}}$ (i, i+2)
L8/L10	2925
L10/H12	12775
H11/L13	2752
H12/A14	9147
L16/L18	9442
A17/H19	8579
L18/L20	5520
A21/A23	6066

Résidus (i, i+1)	$d_{\alpha\text{N}}$ (i, i+1)
L5/L6	9795
A7/L8	13066
L10/H11	8954
H11/H12	7543
H12/L13	7123
A14/H15	6042
L16/A17	12930
L18/H19	13793
L20/A21	3003

Résidus (i, i+3)	$d_{\alpha\text{N}}$ (i, i+3)
A4/A7	7613
H12/H15	14124
L15/H18	6042
H19/L22	11618

Résidus (i, i+4)	$d_{\alpha\text{N}}$ (i, i+4)
L8/H12	3795
H12/L16	3456

**Annexe 6 : Valeurs des angles dièdres moyens prédits par le logiciel TALOS pour le peptide P-LAH<sub>4</sub>.**

Résidu	A4	L5	L6	A7	L8	A9	L10	H11	H12	L13
Phi	-63,420	-63,680	-62,340	-65,180	-63,990	-63,240	-66,170	-64,630	-62,340	-60,780
Psi	-41,650	-39,950	-39,560	-38,490	-44,120	-38,290	-41,500	-45,460	-45,180	-42,310

A14	H15	L16	A17	L18	H19	L20	A21	L22
-63,000	-63,570	-64,030	-62,240	-64,090	-60,980	-62,230	-62,600	-66,870
-38,910	-41,440	-41,460	-38,480	-44,800	-44,860	-43,030	-36,810	-31,380



## *Références*

- [1] Miller A.D. Retroviral vectors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*; 158: 1-24, 1992.
- [2] Miller A.D, Miller D.G, Garcia J.V, Lynch C.M. Use of retroviral vectors for gene transfer and expression. *Methods Enzymol.*; 217: 581-599, 1993.
- [3] Fisher K.J, Choi H, Burda J, Chen S.J, Wilson J. M. Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. *Virology*; 217: 11-22, 1996.
- [4] Lai C.M, Lai Y.K, Rakoczy P.E. Adenovirus and adeno-associated virus vectors. *DNA Cell Biol.*; 21:895-913, 2002.
- [5] Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M et al.,LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1.*Science*; 302:415-419, 2003.
- [6] <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>
- [7] Felgner P.L et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*; 84: 7413-7417, 1987.
- [8] Mintzer M.A, Simanek E.E. Nonviral Vectors for Gene Delivery. *Chem. Rev.*; 109:259-302, 2009.
- [9] Farhood H, Serbina N, Huang L. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim. Biophys. Acta*; 1235: 289-295, 1995.
- [10] Mislick K. A, Baldeschwieler J. D. Evidence for the role of proteoglycans in cation mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*; 93:12349-12354, 1996.
- [11] Radler J.O, Koltover I, Salditt T, Safinya C.R. Structure of DNA–cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science*; 275:810-814, 1997.
- [12] Koltover I, Salditt T, Radler J.O, Safinya C.R. An inverted hexagonal phase of cationic liposome–DNA complexes related to DNA release and delivery.*Science*; 281:78-81, 1998.
- [13] Safinya, C. R. Structures of lipid-DNA complexes: supramolecular assembly and gene delivery. *Curr. Opin. Struct. Biol.*; 11:440-448, 2001.
- [14] Gao X, Huang L. Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther.* ; 2:710-722, 1995.
- [15] Xu Y, Szoka Jr F.C. Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry*; 35: 5616-5623, 1996.
- [16] Medina-Kauwe L.K, Xie J, Hamm-Alvarez.S, Intracellular trafficking of non viral vectors. *Gene Ther.*; 12:1734-1751, 2005.

- [17] Boussif O et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A; 92:7297-7301, 1995.
- [18] Eliyahu H, Barenholz Y and Domb A.J. Polymers for DNA Delivery. Molecules; 10:34-64, 2005.
- [19] Ogris M, Brunner S, Schuller S, Kircheis R, Wagner E. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. Gene Ther.; 6:595-605, 1999.
- [20] Fischer D, Bieber T, Li Y, Elsasser H. P, Kissel T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. Pharm. Res.; 16:1273-1279, 1999.
- [21] Kichler A, Leborgne C, Coeytaux E. Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. The Journal of Gene Medicine; 3:135-144, 2001.
- [22] Bielinska A, Kukowska-Latallo J.F, Johnson J, Tomalia D.A, Baker Jr J.R. Regulation of *in vitro* gene expression using antisense oligonucleotides or antisense expression plasmids transfected using starburst PAMAM dendrimers. Nucleic Acids Res.; 24:2176-2182, 1996.
- [23] Dennig J, Duncan E. Gene transfer into eukaryotic cells using activated polyamidoamine dendrimers. J. Biotechnol.; 90:339-347, 2002.
- [24] Kukowska-Latallo J.F, Bielinska A.U, Johnson J, Spindler R, Tomalia D.A, Baker Jr J.R. Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A; 93:4897-4902, 1996.
- [25] Tang M.X, Redemann C.T, Szoka Jr F.C. *In vitro* gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. Bioconjugate Chem.; 7:703-714, 1996.
- [26] Midoux P, Monsigny M. Efficient Gene Transfer by Histidylated Polylysine/pDNA Complexes. Bioconjugate Chem.; 10:406-411, 1999.
- [27] Wagner E, Plank C, Zatloukal K, Cotten M, Birnstiel M. L. Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 89: 7934-7938, 1992.
- [28] Plank C, Oberhauser B, Mechtler K, Koch C, Wagner E. The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems. J. Biol. Chem.; 269:12918-12924, 1994.
- [29] Midoux P, Mendes C, Legrand A, Raimond J, Mayer R, Monsigny M and Roche A.C, Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L -lysine into hepatoma cells. Nucleic Acids Res.; 21: 871-878, 1993.

- [30] Kichler A, Mechtler K, Behr J.P and Wagner E. Influence of membrane-active peptides on lipospermine/DNA complex mediated gene transfer. *Bioconjugate Chem.*; 8:213-221, 1997.
- [31] Wagner E. Application of membrane-active peptides for non viral gene delivery. *Adv Drug Deliv. Rev.*; 38:279-289, 1999.
- [32] Ogris M, Carlisle RC, Bettinger T, Seymour LW. Melittin enables efficient vesicular escape and enhanced nuclear access of nonviral gene delivery vectors. *J. Biol. Chem.*; 276:47550-47555, 2001.
- [33] Allende D, Simon S.A, McIntosh T.J. Melittin-induced bilayer leakage depends on lipid material properties: evidence for toroidal pores. *Biophys. J.*; 13: 13, 2004.
- [34] Gottschalk S, Sparrow J.T, Hauer J, Mims M.P, Leland F.E, Woo S.L and Smith L.C. A novel DNA-peptide complex for efficient gene transfer and expression in mammalian cells. *Gene Ther.*; 3:448-457, 1996.
- [35] Li W, Nicol F, Szoka Jr F.C. GALA: a designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*; 56:967-985, 2004.
- [36] Wyman T.B, Nicol F, Zelphati O, Scaria P.V, Plank C, Szoka Jr F.C. Design, synthesis, and characterization of a cationic peptide that binds to nucleic acids and permeabilizes bilayers. *Biochemistry*; 36:3008-3017, 1997.
- [37] Niidome T, Takaji K, Urakawa M, Ohmori N, Wada A, Hirayama T, Aoyagi H. Chain length of cationic alpha-helical peptide sufficient for gene delivery into cells. *Bioconjugate Chem.*; 10: 773-780, 1999.
- [38] Kichler A, Pages JC, Leborgne C, Druillennec S, Lenoir Coulaud D, Delain E, Le Cam E, Roques BP, Danos O. Efficient DNA transfection mediated by the C-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 viral protein R. *J. Virol.*; 74: 5424-5431, 2000.
- [39] Bechinger B. Towards membrane protein design: pH dependent topology of histidine containing polypeptides. *J. Mol. Biol.*; 263: 768-775, 1996.
- [40] Kichler A, Leborgne C, März J, Danos O, Bechinger B. Histidine-rich amphipathic peptide antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad Sci USA.*; 100:1564-15681, 2003.
- [41] Vogt T.C.B, Bechinger B. The interactions of histidine-containing amphipathic helical peptide antibiotics with lipid bilayers: the effects of charges and pH. *J. Biol. Chem.*; 274: 29115-29121, 1999.
- [42] Mason A.J, Bechinger B, Kichler A. Rational design of vector and antibiotic peptides using solid-state NMR. *Mini Rev. Med. Chem.*; 7: 491-497, 2007.
- [43] Mason A.J, Moussaoui W, Abdelrhman T, Boukhari A, Bertani P, Marquette A, Shooshtarizaheh P, Moulay G, Boehm N, Guerold B, Sawers R.J.H, Kichler A, Metz-Boutigue M.H, Candolfi E, Prevost G, Bechinger B. Structural determinants of antimicrobial

and antiplasmodial activity and selectivity in histidine rich amphipathic cationic peptides. *J. Biol. Chem.*; 284: 119-133, 2009.

[44] Mason A.J, Gasnier C, Kichler A, Prevost G, Aunis D, Metz-Boutigue M.H, Bechinger B. Enhanced membrane disruption and antibiotic action against pathogenic bacteria by designed histidine rich peptides at acidic pH. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 50:3305-3311, 2006.

[45] Kichler A, Mason A.J, Bechinger B. Cationic amphipathic histidine rich peptides for gene delivery. *Biochim. Biophys. Acta*; 1576:301-307, 2006.

[46] Riordan JR, Rommens J.M, Kerem B-S, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zelenski J, Lok S, Plavsic N, Chou J.L, Drumm M.L, Iannuzzi MC, Collins FS and Tsui L.C. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. *Science*; 245:1066-1073, 1989.

[47] M. Zasloff. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*; 415:389-395, 2002.

[48] Boman H.G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.*; 13:61-92, 1995.

[49] Hancock R.E.W. Host defense peptides, *Drugs* 57: 469–473, 1999.

[50] Baker M.A, Maloy W.L, Zasloff M and Jacob L.S. Anticancer efficacy of magainin 2 and analogue peptides. *Cancer Res.*; 53:3052–3057, 1993.

[51] Schröder-Borm H, Bakalova R and Andrä J. The NK-lysin derived peptide NK-2 preferentially kills cancer cells with increased surface levels of negatively charged phosphatidylserine. *FEBS Lett.*; 579:6128-6134, 2005.

[52] Wachinger M, Kleinschmidt A, Winder D, Von Pechmann N, Ludvigsen A, Neumann M, Holle R, Salmons B, Erfle V and Brack-Werner R. Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. *J. Gen. Virol.*; 79:731-740, 1998.

[53] Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 84:5449-5453, 1987.

[54] Mor A, Nguyen V.H, Delfour A, Migliore-Samour D, Nicolas P. Isolation, amino acid sequence and synthesis of dermaseptin, 3 novel antimicrobial peptide of amphitian skin, *Biochemistry*; 30: 8824-8830, 1991.

[55] Zanetti M, Gennaro R, Skerlavaj B, Tomasinsig L, and Circo R. Cathelicidin peptides as candidates for a novel class of antimicrobials. *Curr. Pharm. Des.*8:779-793, 2002.

[56] Habermann E, Jentsch J. Sequenzanalyse des Melittins aus den tryptischen und peptischen Spaltstücken. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.*; 348:37–50, 1967.

- [57] Oren Z. and Shai Y. A class of highly potent antimicrobial peptides derived from paradaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachinus marmoratus*. *Eur. J. Biochem.*; 237:303-310, 1986.
- [58] Johansson J, Gudmundsson G. H, Rottenberg M. E, Berndt K. D, Agerberth B. Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J. Biol. Chem.*; 273:3718-3724, 1998.
- [59] Lehrer R.I, Lichtenstein A.K, Ganz T. Defensins-antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu. Rev. Immuno.*; 111:105-128, 1993.
- [60] Hancock R.E, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.*; 8:402-410, 2000.
- [61] Zasloff M. Antibiotic peptides as mediators of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*; 4:3-7, 1992.
- [62] Lehrer R.I, Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defense. *Curr. Opin. Immunol.*; 11:23-27, 1999.
- [63] Yeaman R and Yount N.Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.*; 55:27-55, 2003.
- [64] Lehrer R.I, Barton A, Daher K.A, Harwig S.S, Gnz T, Selsted M.E. Interaction of human defensins with *Escherichia coli* Mechanism of bactericidal activity. *J. Clin. Invest.*; 84:553-561, 1989.
- [65] Bechinger B. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta.*; 1462:157-183, 1999.
- [66] Matsuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta*; 1462:1-10, 1999.
- [67] Wieprecht T, Apostolov O, Beyermann M, Seelig J. Membrane binding and pore formation of the antibacterial peptide PGLa : thermodynamic and mechanistic aspects. *Biochemistry*; 39:442-452, 2000.
- [68] Bechinger B, Zasloff M, and Opella S.J. Structure and interactions of magainin antibiotic peptides in lipid bilayers: a solid-state nuclear magnetic resonance investigation. *Biophys J.*; 62:12-14, 1992.
- [69] Gazit E, Miller I.R, Biggin P.C, Sansom M.S.P, Shai Y. Structure and orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 within phospholipid membranes. *J. Mol. Biol.*; 258:860-870, 1996.
- [70] Oren Z, Hong J, Shai Y. A comparative study on the structure and function of a cytolytic alpha-helical peptide and its antimicrobial beta-sheet diastereomer. *Eur. J. Biochem.*; 259:360-369, 1999.

- [71] Monaco V, Formaggio F, Crisma M, et al. Orientation and immersion depth of a helical lipopeptaibol in membranes using TOAC as an ESR probe. *Biopolymers*; 50:239–253, 1999.
- [72] Bechinger B. Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. *J Membr Biol.*; 156:197-211, 1997.
- [73] Sansom M.S. Alamethicin and related peptaibols-model ion channels. *Eur. Biophys. J.*; 22:105-124, 1993.
- [74] Salnikov ES, De Zotti M, Formaggio F, Li X, Toniolo C, O'Neil J.D, Raap J, Dzuba S.A, Bechinger B. Alamethicin topology in phospholipid membranes by oriented solid-state NMR and EPR spectroscopies: a comparison. *J. Phys. Chem. B.*; 113:3034-3042, 2009.
- [75] Bechinger B, Skladnev D.A, Ogrel A, Li X, Rogozhkina E.V, Ovchinnikova T.V, O'Neil J.D, Raap J. <sup>15</sup>N and <sup>31</sup>P solid-state NMR investigations on the orientation of zervamicin II and alamethicin in phosphatidylcholine membranes. *Biochemistry*; 40:9428-9437, 2000.
- [76] Dempsey C.E, Butler G.S. Helical structure and orientation of melittin in dispersed phospholipid membranes from amide exchange analysis in situ. *Biochemistry*; 31:11973-11977, 1992.
- [77] Shai Y, Bach D, Yanovsky A. Channel formation properties of synthetic pardaxin and analogues. *J. Biol. Chem.*; 265:20202-20209, 1990.
- [78] Matsuzaki K, Murase O, Fujii N and Miyajima K. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry*; 35:11361–11368, 1996.
- [79] Yang L, Harroun T.A, Weiss T.M, Ding L and Huang H.W. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys.*; 81:1475–1485, 2001.
- [80] Henzler-Wildman K.A, Martinez G.V, Brown M.F and Ramamoorthy A. Perturbation of the Hydrophobic Core of Lipid Bilayers by the Human Antimicrobial Peptide LL-37. *Biochemistry*; 43:8459–8469, 2004.
- [81] Toke O, Cegelski L, Schaefer J. Peptide antibiotics in action: Investigation of polypeptide chains in insoluble environments by rotational-echo double resonance. *Biochim Biophys Acta.*; 1758:1314–1329, 2006.
- [82] Bechinger B, Lohner K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta.*; 1758:1529-1539, 2006.
- [83] Bechinger B. Insights into the mechanisms of action of host defence peptides from biophysical and structural investigations. (soumis)
- [84] Park C.B, Kim H.S and Kim S.C. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 244:253–257, 1998.

- [85] Otvos Jr L, Insug O, Rogers M.E, Consolvo P.J, Condie B.A, Lovas S, Bulet P and Blaszczyk-Thurin M. Interaction between Heat Shock Proteins and Antimicrobial Peptides. *Biochemistry*; 39:14150–14159, 2000.
- [86] Marquette A, Mason A.J, Bechinger B. Aggregation and membrane permeabilizing properties of designed histidine-containing cationic linear peptide antibiotics. *J. Pept. Sci.*; 14:488-495, 2008.
- [87] Georgescu J, Munhoz V.H, Bechinger B. NMR structures of the histidine-rich peptide LAH<sub>4</sub> in micellar environments: membrane insertion, pH-dependent mode of antimicrobial action and DNA transfection. *Biophys. J.*; 99:2507-2515, 2010.
- [88] Bechinger B, Ruyschaert J.M and Goormaghtigh E. Membrane Helix Orientation from Linear Dichroism of Infrared Attenuated Total Reflection Spectra. *Biophys. J.*; 76:552-563, 1999.
- [89] <http://pymol.org/>  
<http://www.lrz.de/~heller/membrane/membrane.html>
- [90] Mason A.J, Martinez A, Glaubitz C, Danos O, Kichler A, Bechinger B. The antibiotic and DNA-transfecting peptide LAH<sub>4</sub> selectively associates with, and disorders, anionic lipids in mixed membranes. *FASEB J.*; 20:320-332, 2006.
- [91] Langlet-Bertin B, Leborgne C, Scherman D, Bechinger B, Mason A.J, Kichler A. Design and evaluation of histidine-rich amphipathic peptides for siRNA delivery. *Pharm. Res.*; 27:1426-1436, 2010.
- [92] Prongidi-Fix L, Sugewara M, Bertani P, Raya J, Leborgne C, Kichler A, Bechinger B. Self-promoted uptake of peptide/ DNA transfection complexes. *Biochemistry*; 46:11253-11262, 2007.
- [93] Kichler A, Leborgne C, Danos O, Bechinger B. Characterization of the gene transfer process mediated by histidine-rich peptides. *J. Mol. Med.*; 85:191-201, 2007.
- [94] Das A. Overproduction of proteins in *Escherichia coli*: vectors, hosts, and strategies. *Methods Enzymol.*; 182:93–112, 1990.
- [95] Richardson J.P. Transcription Termination. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*; 15:81-93, 1993.
- [96] Makrides S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*; 60:512-538, 1996.
- [97] Hauffmann F, Rinas U. Stress Induced by Recombinant Protein Production in *Escherichia coli*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*; 89:73-92, 2004.
- [98] Hannig G, Makrides S.C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.*; 16:54-60, 1998.

- [99] Caulcott C.A, Rhodes M. Temperature-induced synthesis of recombinant proteins. *Trends Biotechnol.*; 4:142-146, 1986.
- [100] Studier F.W, Rosenberg A.H, Dunn J.J, Bubendorff J.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.*; 185:60–89, 1990.
- [101] Sørensen H.P, Mortensen K.K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*; 115:113-128, 2005.
- [102] Saier M.H. Differential codon usage: a safeguard against inappropriate expression of specialized genes? *FEBS Lett.*; 362:1-4, 1995.
- [103] Kurland C, Gallant J. Errors of heterologous protein expression. *Curr. Opin. Biotechnol.*; 7:489-493, 1996.
- [104] Dieci G, Bottarelli L, Ballabeni A, and Ottonello S. tRNA-assisted overproduction of eukaryotic ribosomal proteins, *Protein Expr. Purif.*; 18 :346-354, 2000.
- [105] Rauhut R, Klug G. mRNA degradation in bacteria. *FEMS. Microbiol. Rev.*; 23:353-370, 1999.
- [106] Cao G.J, Pogliano J, Sarkar N. Identification of the coding region for a second poly(A) polymerase in *Escherichia coli*. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.*; 93:11580-11585, 1996.
- [107] Lopez P.J, Marchand I, Joyce S.A, Dreyfus M. The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing *in vivo*. *Mol. Microbiol.*; 33:188-199, 1996.
- [108] Goldberg A.L, and Goff S. A. The selective degradation of abnormal proteins in bacteria. p. 287–314, 1986 In W. Reznikoff and L. Gold (ed.), *Maximizing gene expression*. Butterworths, Boston.
- [109] Gottesman S, and Maurizi M.R. Regulation by proteolysis: energy dependent proteases and their targets. *Microbiol. Rev.*; 56:592-621, 1992.
- [110] Murby M, Uhle´n M, and Stahl S. Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in *Escherichia coli*. *Protein Expression Purif.*; 7:129-136, 1996.
- [111] Gottesman S. Genetics of proteolysis in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.*; 23:163-198, 1989.
- [112] Grodberg J, and Dunn J. ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.*; 170:1245-1253, 1988.
- [113] Koken M. H. M, Odijk H. H. M, Van Duin M, Fornerod M, and Hoeijmakers J.H.J. Augmentation of protein production by a combination of the T7 RNA polymerase system and ubiquitin fusion: overproduction of the human DNA repair protein, ERCC1, as a ubiquitin fusion protein in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 195:643-653, 1993.

- [114] Murby M, Cedergren L, Nilsson J, Nygren P.A, Hammarberg B, Nilsson B, Enfors S.O, and Uhle'n M. Stabilization of recombinant proteins from proteolytic degradation in *Escherichia coli* using a dual affinity fusion strategy. *Biotechnol. Appl. Biochem.*; 14:336-346, 1991.
- [115] Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and James D Watson. *Molecular Biology of the Cell*, 3rd edition.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cell&part=A2635>
- [116] Fahnert B, Lilie H, Neubauer P. Inclusion bodies: formation and utilisation. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*; 89:93-142, 2004.
- [117] Kemsley J. Protein aggregates Probed. *Sciences and Technology*. 86:31, 2008.
- [118] Lilie H, Schwarz E, Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli* *Current Opinion in Biotechnology*; 9: 497-501, 1998.
- [119] Kuliopulos A, Walsh C.T. Production, purification and cleavage of tandem repeats of recombinant peptides. *J. Am. Chem. Soc.*; 116:4599-4607, 1994.
- [120] Majerle A, Kidric J, Jerala R. Production of stable isotope enriched antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: an application to the production of a <sup>15</sup>N-enriched fragment of lactoferrin. *J. Biomol. NMR*; 18:145-151, 2000.
- [121] Szoka P.R, Schreiber A.B, Chan H, Murthy J. A general method for retrieving the components of a genetically engineered fusion protein. *DNA*; 5:11-20, 1986.
- [122] Antorini M, Breme U, Caccia P, Grassi C, Lebrun S, Orsini G, Taylor G, Valsasina B, Marengo E, Todeschini R et al. Hydroxylamine-induced cleavage of the asparaginyl-glycine motif in the production of recombinant proteins : the case of insulin like growth factor I. *Prot. Expr. Purif*; 11:135-147, 2000.
- [123] Richard J. Jenny, Kenneth G. Mann and Roger L. Lundblad. A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. *Protein Expression and Purification*; 31:1-11, 2003.
- [124] Rodriguez P.L, Carrascal L. Improved factor Xa cleavage of fusion proteins containing maltose binding protein. *Biotechniques*; 18: 238-243, 1995.
- [125] LaVallie E.R, McCoy J.M. Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*; 6:501-506, 1995.
- [126] Bechinger B, Gierasch L.M, Montal M, Zasloff M, Opella S.J. Orientations of helical peptides in membrane bilayers by solid state NMR spectroscopy. *Solid State Nucl. Magn. Reson.*; 7:185-191, 1996.
- [127] Bechinger B, Sizun C. Aligement and Structural Analysis of Membrane Polypeptides by <sup>15</sup>N and <sup>31</sup>P Solid-State NMR Spectroscopy. *Concept in Magnetic Resonance*; 18: 130-145, 2003.

- [128] Aisenbrey C, Bertani P, Bechinger B. Solid-state NMR investigations of membrane-associated antimicrobial peptides. *Methods Mol. Biol.*; 618:209-233, 2010.
- [129] Seelig J, and Seelig A. Lipid conformation in model membranes and biological membranes. *Q. Rev. Biophys.*; 13:19-61, 1980.
- [130] Marassi F.M. NMR of Peptides and Proteins in Oriented Membranes. *Concepts Magn. Reson.*; 14:212-224, 2002.
- [131] Hafner S, and Spiess H. W. Advanced solid state NMR spectroscopy of strongly dipolar coupled spins under fast magic angle spinning, *Concept. Magnetic Res.*, 10: 99-128, 1998.
- [132] Laws D.D, Bitter H-M.L and Jerschow A. Solid-state NMR Spectroscopic Methods in Chemistry. *Angew. Chem. Int.*; 41:3096-312, 2002.
- [133] Goetz J.M and Schaefer. REDOR Dephasing by Multiple Spins in the presence of molecular Motion. *Journal of Magnetic Resonance*; 127:147-154, 1997.
- [134] Gullion T. Rotational-Echo, Double-Resonance NMR. *Concepts Magn. Reson.*, 10:277-289, 1998.
- [135] Gullion T and Schaefer J. Rotational-echo double-resonance NMR. *J. Magn. Reson.*, 81:196-200, 1989.
- [136] Bak M, Schultz R, Vosegaard T, and Nielsen N.C. Specification and Visualization of Anisotropic Interaction Tensors in Polypeptides and Numerical Simulations in Biological Solid-State NMR. *J. Magn. Reson.*; 154:28-45, 2002.
- [137] Wei Q, Kim Y.S, Seo J.H, Jang W.S, Lee I.H, Cha H.J. Facilitation of expression and purification of an antimicrobial peptide by fusion with baculoviral polyhedrin in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*; 71:5038-5043, 2005.
- [138] Hwang S.W, Lee J.H, Park H.B, Pyo S.H, So J.E, Lee H.S, Hong S.S, Kim J.H. A simple method for the purification of an antimicrobial peptide in recombinant *Escherichia coli*. *Mol. Biotechnol.*; 18:193-198, 2001.
- [139] Zhang L, Falla T, Wu M, Fidai S, Burian J, Kay W, Hancock R.E. Determinants of recombinant production of antimicrobial cationic peptides and creation of peptide variants in bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 247:674-680, 1998.
- [140] Moon J.Y, Henzler-Wildman K.A, Ramamoorthy A. Expression and purification of a recombinant LL-37 from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.*; 1758:1351-1358, 2006.
- [141] Li Y, Li X, Wang G. Cloning, expression, isotope labeling, and purification of human antimicrobial peptide LL-37 in *Escherichia coli* for NMR studies. *Protein Expr. Purif.*; 47:498-505, 2006.

- [142] Moon W.J, Hwang D.K, Park E.J, Kim Y.M, Chae Y.K. Recombinant expression, isotope labeling, refolding, and purification of an antimicrobial peptide, piscidin. *Protein Expr. Purif.* ; 51:141-146, 2007.
- [143] Pazgier M, Lubkowski J. Expression and purification of recombinant human alpha-defensins in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*; 49:1-8, 2006.
- [144] Majerle A, Kidric J, Jerala R. Production of stable isotope enriched antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: an application to the production of a <sup>15</sup>N-enriched fragment of lactoferrin. *J. Biomol. NMR*; 18:145-151, 2000.
- [145] Li Y. Carrier proteins for fusion expression of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*; 54:1-9, 2009.
- [146] Lee J.H, Kim J.H, Hwang S.W, Lee W.J, Yoon H.K, Lee H.S, Hong S.S. High-level expression of antimicrobial peptide mediated by a fusion partner reinforcing formation of inclusion bodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 277:575-580, 2000.
- [147] Lee J.H, Minn I, Park C.B, Kim S.C. Acidic peptide-mediated expression of the antimicrobial peptide buforin II as tandem repeats in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* ; 12:53-60, 1998.
- [148] Huang L, Wang J, Zhong Z, Peng L, Chen H, Xu Z, Cen P. Production of bioactive human beta-defensin-3 in *Escherichia coli* by soluble fusion expression. *Biotechnol. Lett.*; 28:627-632, 2006.
- [149] Zhou Q.F, Luo X.G, Ye L, Xi T. High-level production of a novel antimicrobial peptide perinerin in *Escherichia coli* by fusion expression. *Curr. Microbiol.*; 54:366-370, 2007.
- [150] Morin K.M, Arcidiacono S, Beckwitt R, Mello C.M. Recombinant expression of indolicidin concatamers in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; 70:698-704, 2006.
- [151] Haught C, Davis G.D, Subramanian R, Jackson K.W, Harrison R.G. Recombinant production and purification of novel antisense antimicrobial peptide in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.*; 57:55-61, 1998.
- [152] Wei Q, Kim Y.S, Seo J.H, Jang W.S, Lee I.H, Cha H.J. Facilitation of expression and purification of an antimicrobial peptide by fusion with baculoviral polyhedrin in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*; 71:5038-43, 2005.
- [153] Sambrook J, Fritsch E.F, and Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2<sup>nd</sup> edition, 1989.
- [154] Schagger, H. and Von Jagow G. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*; 166:368-379, 1987.

[155] Gangloff Y.G, Werten S, Romier C, Carré L, Poch O, Moras D, Davidson I. The human TFIID components TAF(II)135 and TAF(II)20 and the yeast SAGA components ADA1 and TAF(II)68 heterodimerize to form Histone-like Pairs. *Mol. Cell. Biol.*; 20:340-351, 2000.

[156] Vidovic V, Prongidi-Fix L, Bechinger B, Werten S. Production and isotope labeling of antimicrobial peptides in *Escherichia coli* by means of a novel fusion partner that enables high-yield insoluble expression and fast purification. *J. Pept. Sci.*; 15:278-284, 2009.

[157] Pan Y.L, Cheng J.T.J, Hale J, Pan J.H, Hancock R.E.W and Straus S.K. Characterization of the structure and membrane interaction of the antimicrobial peptides aurein 2.2 and 2.3 from Australian southern bell frogs, *Biophys. J.*; 92: 2854-2864, 2007.

[158] Park S, Park S.H, Ahn H.C, Kim S, Kim S.S, Lee B.J. Structural study of novel antimicrobial peptides, nigrocins, isolated from *Rana nigromaculata*, *FEBS Lett.*; 507:95-100, 2001.

[159] Sonnichsen F.D, Van Eyk J.E, Hodges R.S and Sykes B.D. Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an NMR and CD study using a synthetic actin peptide. *Biochemistry*; 31:8790-8798, 1992.

[160] Haney E.F, Lau F, and Vogel H.J. Solution structures and model membrane interactions of lactoferrampin, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta*; 1768: 2355-2364, 2007.

[161] Schibli D.J, Nguyen L.T, Kernaghan S.D, Rekdal O and Vogel H.J. Structure-function analysis of tritrypticin analogs: potential relationships between antimicrobial activities, model membrane interactions, and their micelle-bound NMR structures. *Biophys. J.*; 91:4413-4426, 2006.

[162] Rozek A, Friedrich C.L, and Robert E. W. Hancock. Structure of the Bovine Antimicrobial Peptide Indolicidin Bound to Dodecylphosphocholine and Sodium Dodecyl Sulfate Micelles. *Biochemistry*; 39 : 15765-15774, 2000.

[163] Marion D, Zasloff M and Bax A. A two-dimensional NMR-study of the antimicrobial peptide magainin-2, *FEBS Lett.*; 227:21-26, 1988.

[164] Gesell J, Zasloff M and Opella S.J. Two-dimensional H-1 NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an alpha-helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution. *J. Biomol. NMR*; 9:127-135, 1997.

[165] Yi G.S, Park C.B, Kim S.C and Cheong C. Solution structure of an antimicrobial peptide buforin II, *FEBS Lett.*; 398:87-90, 1996.

[166] Kay L. E, Ikura M, Tschudin R and Bax A. Three-dimensional triple-resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins. *J. Magn. Reson.*; 89:496-514, 1990.

[167] Yamazaki T, Lee W, Arrowsmith C.H, Muhandiram D.R and Kay L.E. A Suite of Triple Resonance NMR Experiments for the Backbone Assignment of <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C, <sup>2</sup>H Labeled Proteins with High Sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.*; 116: 11655-11666, 1994.

- [168] Wittekind M and Mueller L. HNCACB, a High-Sensitivity 3D NMR Experiment to Correlate Amide-Proton and Nitrogen Resonances with the Alpha- and Beta-Carbon Resonances in Proteins. *J. Magn. Reson.*, 101: 201-205, 1993.
- [169] Marion D, Driscoll P.C, Kay L.E, Wingfield P.T, Bax A, Gronenborn A.M and Clore G.M. Overcoming the overlap problem in the assignment of proton NMR spectra of larger proteins by use of three-dimensional heteronuclear proton-nitrogen-15 Hartmann-Hahn-multiple quantum coherence and nuclear Overhauser-multiple quantum coherence spectroscopy: application to interleukin 1.β. *Biochemistry*; 28:6150-6156, 1989.
- [170] Marion D, Kay L.E, Sparks S.W, Torchia D.A and Bax A. Three-dimensional heteronuclear NMR of nitrogen-15 labeled proteins. *J. Am. Chem. Soc.*; 111:1515-1517, 1989.
- [171] Linge J.P, O'Donoghue S.I and Nilges M. Assigning Ambiguous NOEs with ARIA. *Methods in Enzymology*; 339:71-90, 2001.
- [172] Wuthrich K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. John Wiley & Sons, New York, 1986.
- [173] Wishart D.S and Sykes B.D. Chemical shifts as a tool for structure determination, *Methods Enzymol.*; 239: 363-392, 1994.
- [174] Wishart D.S, Sykes B. D. and Richards F. M. Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *J. Mol. Biol.*; 222: 311-333, 1991.
- [175] Wishart D.S and Nip A.M. Protein chemical shift analysis: a practical guide. *Biochem. Cell Biol.*; 76: 153-163, 1998.
- [176] Williamson M.P. Secondary-structure dependent chemical shifts in proteins. *Biopolymers*; 29: 1423-1431, 1990.
- [177] Cornilescu G, Delaglio F, Bax A. Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *Journal of Biomolecular NMR*; 13:289-302, 1999.
- [178] Voet D and G.Voet J. *Biochemistry*, 3 ème edition, 2004.
- [179] Sklenar V, Piotto M, Leppik R, Saudek V. Gradient-tailored water suppression for 1H-15N HSQC experiments optimized to retain full sensitivity. *J. Magn. Reson.*; 102:241-245, 1993.
- [180] Delaglio F, Grzesiek S, Vuister G.W, Zhu G, Pfeifer J, Bax A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR*; 6:277-293, 1995.
- [181] *The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial* by Rochus Keller, first edition 2004.
- [182] Zhou N.E, Zhu B.Y, Sykes B.D and Hodges R.S. Relationship between amide proton chemical shifts and hydrogen bonding in amphipathic α-helical peptides. *J. Am. Chem. Soc.*; 114:4320-4326, 1992.

- [183] Kuntz I.D, Kosen P.A, and Craig E.C. Amide chemical shifts in many helices in peptides and proteins are periodic, *J. Am. Chem. Soc.*; 113:1406-1408, 1991.
- [184] Matsuzaki K, Murase O, Tokuda H, Funakoshi S, Fujii N, Miyajima K. Orientational and aggregational states of magainin 2 in phospholipid bilayers. *Biochemistry* 33:3342-3349, 1994.
- [185] Bello J, Bello HR, Granados E. Conformation and aggregation of melittin: dependence on pH and concentration. *Biochemistry*; 21:461-465, 1982.
- [186] Porcelli F, Verardi R, Shi L, Henzler-Wildman K.A, Ramamoorthy A, Veglia G. NMR structure of the cathelicidin-derived human antimicrobial peptide LL-37 in dodecylphosphocholine micelles. *Biochemistry*; 47:5565-5572, 2008.
- [187] Zelezetsky I, Tossi A. Alpha-helical antimicrobial peptides, using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. *Biochim. Biophys. Acta*; 1758:1436-1449, 2006.
- [188] Aisenbrey C, Bechinger B. Investigations of polypeptide rotational diffusion in aligned membranes by  $^2\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$  solid-state NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*; 126:16676–16683, 2004.
- [189] Kim.S, Cross T.A. 2D solid state NMR spectral simulation of  $^3_{10}$ ,  $\alpha$ , and  $\pi$ -helices. *Journal of Magnetic Resonance* ; 168 :187-193, 2004.\$
- [190] Aisenbrey C, Bertani P, Bechinger B. Solid-state NMR investigations of membrane-associated antimicrobial peptides. *Methods Mol. Biol.*; 618:209-233, 2010.
- [191] Bechinger B, and Opella S.J. 1991. Flat-coil probe for NMR spectroscopy of oriented membrane samples. *J. Magn. Reson.*; 95:585–588, 1991.
- [192] Massiot D, Fayon F, Capron M, King I, Le Calvé S, Alonso B, Durand J-O, Bujoli B, Gan Z, Hoatson G. Modelling one- and two-dimensional Solid State NMR spectra. *Magnetic Resonance in Chemistry*; 40:70-76, 2002.
- [193] Munowitz M, Bachovchin W.W, Herzfeld J, Dobson C.M, Griffin R.G. Acid-base and tautomeric equilibria in the solid state: nitrogen-15 NMR spectroscopy of histidine and imidazole *J. Am. Chem. Soc.*; 104:1192–1196, 1982.
- [194] Harbison G, Herzfeld J, and Griffin R.G. Nitrogen-15 chemical shift tensors in L-histidine hydrochloride monohydrate. *J. Am. Chem. Soc.*; 103:4752-4754, 1981.
- [195] Nevzorov A.A and Opella S.J. Structural fitting of PISEMA spectra of aligned proteins. *Journal of Magnetic Resonance*; 160: 33-39, 2003.
- [196] Salnikov E, Bertani P, Raap J, Bechinger B. Analysis of the amide ( $^{15}\text{N}$ ) chemical shift tensor of the C( $\alpha$ ) tetrasubstituted constituent of membrane-active peptides, the  $\alpha$ -aminoisobutyric acid residue, compared to those of di- and tri-substituted proteinogenic amino acid residues. *Journal of Biomolecular NMR*; 45:373-387, 2009.

[197] Bechinger B, Kim Y, Chirlian L.E, Gesell J, Neumann J.M, Montal M, Tomich J, Zasloff M and Opella S.J. Orientations of amphipathic helical peptides in membrane bilayers determined by solid-state NMR spectroscopy. *Journal of BioMolecular NMR*; 1:167-173, 1991.

[198] Bechinger B, Zasloff M and Opella S.J. Structure and Dynamics of the Antibiotic Peptide PGLa in Membranes by Solution and Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Biophysical Journal*; 74:981-987, 1998.

[199] Silvestro L, Paul Axelsen H. Infrared spectroscopy of supported lipid monolayer, bilayer, and multibilayer membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*; 96: 69-80, 1998.

[200] Nagle J.F and Nagle S-T. Structure of lipid bilayers. *Biochim. et Biophys. Acta* ; 1469:159-195, 2000.

[201] Killian J.A. Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Bioch. Biophys. Acta* ; 1376 :401-415, 1998.

[202] Harzer U, Bechinger B. Alignment of Lysine-Anchored Membrane Peptides under Conditions of Hydrophobic Mismatch: A CD, <sup>15</sup>N and <sup>31</sup>P Solid-State NMR Spectroscopy Investigation. *Biochemistry*; 39:13106-13114, 2000.

[203] Luscombe N.M, Austin S.E, Berman H.M, Thornton J.M. An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome Biol.*; 1:1-37, 2000.

[204] Chary K.V.R. and Govil G. NMR in Biological Systems. *Focus in Biological Systems*; Volume 6, 351-375, 2008.

[205] Toke O, O'Connor R.D, Weldeghiorghis T.K, Maloy W.L, Glaser R.W, Ulrich A.S, Schaefer J. Structure of (KIAGKIA)<sub>3</sub> aggregates in phospholipid bilayers by solid-state NMR. *Biophys. J.*; 87:675-687, 2004.

[206] Toke O, Maloy W.L, Kim S.J, Blazyk J, Schaefer J. Secondary structure and lipid contact of a peptide antibiotic in phospholipid bilayers by REDOR. *Biophys. J.*; 87:662-674, 2004.

[207] Yu T.Y, O'Connor R.D, Sivertsen A.C, Chiauzzi C, Poliks B, Fischer M, Bacher A, Haase I, Cushman M, Schaefer J. (<sup>15</sup>N){(<sup>31</sup>P)} REDOR NMR studies of the binding of phosphonate reaction intermediate analogues to *Saccharomyces cerevisiae* lumazine synthase. *Biochemistry* ; 47:13942-13951, 2008.

[208] Olsen G.L, Louie E.A, Drobny G.P, Sigurdsson S.T. Determination of DNA minor groove width in distamycin-DNA complexes by solid-state NMR. *Nucleic Acids Res.*; 31:5084-5089, 2003.

[209] Olsen G.L, Edwards T.E, Deka P, Varani G, Sigurdsson S.T, Drobny G.P. Monitoring tat peptide binding to TAR RNA by solid-state  $^{31}\text{P}$ - $^{19}\text{F}$  REDOR NMR. *Nucleic Acids Res.*; 33:3447-3454, 2005.

[210] Louie E.A, Chirakul P, Raghunathan V, Sigurdsson S.T, Drobny G.P. Using solid-state  $^{31}\text{P}\{^{19}\text{F}\}$  REDOR NMR to measure distances between a trifluoromethyl group and a phosphodiester in nucleic acids. *J. Magn. Reson.*; 178:11-24, 2006.

[211] Yu T.Y, Schaefer J. REDOR NMR characterization of DNA packaging in bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.*; 382:1031-1042, 2008.

[212] Hologne M. Communication privée, UMR 5180 Sciences Analytiques, Villeurbanne, France.

[213] Mani R, Tang M, Wu X, Buffy J.J, Waring A.J, Sherman M.A, Hong M. Membrane-bound dimer structure of a beta-hairpin antimicrobial peptide from rotational-echo double-resonance solid-state NMR. *Biochemistry* ; 45:8341-8349, 2006.

[214] Widom J. Structure, dynamics, and function of chromatin *in vitro*. *Ann. Rev. Biophys. Biomol.Struct.*; 27 :285-327, 1998.

[215] Bloomfield V-A. DNA Condensation. *Curr. Opin. in Stru. Biology*; 6:334-341, 1996.

## *Communications*

**Verica Vidovic:** Expression of antibacterial peptide LAH<sub>4</sub> for NMR studies, EMBL Protein Expression Workshop, Heidelberg (2006)

**Verica Vidovic** and Marc Prudhon, Sebastiaan Werten, Philippe Bertani and Burkhard Bechinger, Production and solid-state NMR studies of antimicrobial peptides LAH<sub>4</sub> and NK2 in lipid bilayers, Japan Society for the Promotion of Science (2007)

**Verica Vidovic** et Marc Prudhon, Sebastiaan Werten, Philippe Bertani et Burkhard Bechinger, Production et études structurales par RMN du vecteur peptidique antibactérien : LAH<sub>4</sub>, Colloque des Jeunes Chercheurs, Vaincre La Mucoviscidose (2008)

## *Publications*

**Vidovic V**, Prongidi-Fix L, Bechinger B, and Werten S. Production and isotope labelling of antimicrobial peptides in Escherichia coli by means of a novel fusion partner that enables high-yield insoluble expression and fast purification, J Pept. Sci.; 15: 278-284, 2009.

Salnikov E, Aisenbrey C, **Vidovic V**, Bechinger B. Solid-state NMR approaches to measure topological equilibria and dynamics of membranes polypeptide. Biochim Biophys Acta.; 1798:258-265, 2010.

# Production and isotope labeling of antimicrobial peptides in *Escherichia coli* by means of a novel fusion partner that enables high-yield insoluble expression and fast purification

Verica Vidovic, Lydia Prongidi-Fix, Burkhard Bechinger and Sebastiaan Werten\*

A method is presented that allows efficient production of antimicrobial peptides in bacteria by means of fusion to the histone fold domain of the human transcription factor TAF12. This small fusion partner drives high-level expression of peptides and leads to their accumulation in an entirely insoluble form, thereby eliminating toxicity to the host. Using the antimicrobial peptide LAH4 as an example, we demonstrate that neither affinity purification of the TAF12 fusion protein nor initial solubilization of inclusion bodies in denaturing buffers is required. Instead, crude insoluble material from bacteria is directly dissolved in formic acid for immediate release of the peptide through chemical cleavage at a unique Asp-Pro site. This is followed by purification to homogeneity in a single chromatographic step. Because of the elevated expression levels of the histone fold domain and its small size (8 kDa), this straightforward purification scheme produces yields in excess of 10 mg active peptide per liter of culture. We demonstrate that TAF12 fusion allows expression of a wide range of antimicrobial peptides as well as efficient isotope labeling for NMR studies. Copyright © 2009 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords:** antimicrobial peptide; bacterial expression; NMR; high-throughput

## Introduction

*Escherichia coli* (*E. coli*) is arguably the most convenient microorganism available to date for the large-scale production of recombinant polypeptides *in vivo* [1]. The bacterium is also ideally suited for uniform labeling strategies to enable structural and biophysical studies, as it can be grown in well-defined synthetic media containing appropriately labeled nutrients. Polypeptides labeled with  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ , or seleno-methionine can be produced very cost-effectively in this manner and as a result have become standard tools in NMR and x-ray crystallography [2].

Unfortunately, expression of foreign genes in *E. coli* often fails due to vector instability, resulting from toxicity of the molecule of interest towards the host. This problem is particularly common in the case of antimicrobial peptides, natural defense molecules involved in the innate immune system of metazoans, which kill bacteria by permeating and disrupting their membranes [3]. Investigation of the structural properties and dynamics of such peptides by heteronuclear NMR is of considerable biomedical interest, as the emergence of resistance traits in pathological bacteria calls for rational design of new antibiotics [4]. Although native antimicrobial peptides can be produced synthetically, uniform isotope labeling by chemical means would in most cases be prohibitively expensive. Consequently, many laboratories have sought to establish methods for the production of antimicrobial peptides in *E. coli*, in spite of their inherent toxicity towards bacteria [5].

The lethal effects of antimicrobial peptides on *E. coli* can often be circumvented by expressing the molecule of interest as part of a

fusion protein. Although this approach allows expression of some peptides in a soluble form (e.g. in conjunction with glutathione S-transferase (GST) [6,7] or thioredoxin [8–11]), most successful cases involve fusion proteins that accumulate entirely in inclusion bodies [12–19]. This suggests that protein aggregation provides a powerful means of neutralizing toxicity of antimicrobial peptides towards the host.

Antimicrobial peptides may spontaneously form inactive aggregates if fused to soluble partners such as ubiquitin [12] or if multimerized [13,14]. Nevertheless, it would be advantageous to develop a robust, generally applicable method that allows targeting of any toxic peptide of interest to inclusion bodies. To this end, several laboratories have identified highly insoluble proteins that can be used as fusion partners, such as ketosteroid isomerase [15], baculoviral polyhedrin [16,17], RepA [18], and an artificial polypeptide encoded by portions of the *E. coli* Trp operon [19]. Although expression levels of the corresponding fusion proteins tend to be satisfactory, all the aforementioned partners have the disadvantage that they are relatively large (typically 20 kDa or more). This diminishes the efficiency of the expression system, as the peptide

\* Correspondence to: Sebastiaan Werten, Institut de Chimie Université Louis Pasteur CNRS UMR 7177 4 rue Blaise Pascal 67070 Strasbourg France. E-mail: s.werten@chimie.u-strasbg.fr

Institut de Chimie, Université Louis Pasteur, CNRS UMR 7177, 4 rue Blaise Pascal, 67070 Strasbourg, France

of interest is usually as small as 2–3 kDa and thus comprises only a modest percentage of the material that is expressed.

An additional problem is the fact that obtaining pure peptide from an insoluble fusion protein preparation is not as straightforward as it would be in the case of a soluble fusion protein. The main reason for this is that the denaturing conditions required for initial purification of the fusion preclude the use of proteases to release the peptide. Instead, most protocols published to date make use of chemical cleavage either by cyanogen bromide (following a methionine residue) or by formic acid (which cleaves the sequence Asp-Pro). Although the latter method leaves a proline at the *N*-terminus of the peptide of interest, it is more specific (chances of an Asp-Pro site occurring within a peptide of interest are smaller than that of an internal methionine residue) and has the additional advantage that formic acid is less toxic than cyanogen bromide. Moreover, the acid is readily eliminated, for instance by evaporation. Nevertheless, peptide isolation remains a costly and time-consuming procedure that typically involves purification of the denatured fusion protein by metal affinity chromatography, exchange of the solvent by dialysis, chemical cleavage, and final chromatographic purification of the peptide itself. The use of large fusion partners further complicates matters, as in this case multiple internal chemical cleavage sites are likely to be present. This means numerous contaminating fragments are generated, some of which may be difficult to separate chromatographically from the peptide of interest.

Here, we describe a fast and highly efficient alternative for the expression and purification of antimicrobial peptides, which is based on fusion to the histone fold domain (HFD) of the human transcription factor TAF12. This protein domain is considerably smaller than traditional fusion partners (8kDa) yet highly expressed in an entirely insoluble form in the absence of its natural dimerization partner [20–22]. The HFD is therefore ideally suited as a fusion partner for insoluble expression, and we show that it is

capable of neutralizing the toxicity of a wide range of antimicrobial peptides. Only one internal Asp-Pro site is present in the HFD itself, which we have mutated to simplify peptide purification. Using the antimicrobial peptide LAH4 as an example, we demonstrate that affinity purification of the TAF12 fusion protein and even initial solubilization in buffers containing 8 M urea or 6 M guanidinium chloride before cleavage can be avoided. Instead, crude inclusion body preparations are directly dissolved in formic acid to set up cleavage reactions, whereupon a single HPLC purification step suffices to purify the peptide of interest to homogeneity. We show that this remarkably simple procedure readily produces large quantities of fully active LAH4 and demonstrate its usefulness for rapid production of the milligram amounts of uniformly <sup>15</sup>N-labeled material required to perform NMR studies.

## Materials and Methods

### Construction of Expression Vectors

The naturally occurring Asp-Pro site in the gene encoding the human TAF12 HFD [20] was changed to Asp-Ala by PCR-mediated mutagenesis [23]. Expression vectors pTIPX-1 and pTIPX-2 were constructed by insertion of this mutated gene plus oligonucleotides corresponding to a novel polylinker and an enterokinase site (pTIPX-2 only) into pET-15b (Novagen), using standard cloning techniques [24]. The vectors pTIPX-3 and pTIPX-4 were subsequently generated by transfer of the BglII–Bpu1102I fragment from, respectively, pTIPX-1 and pTIPX-2 to pET-28b (Novagen). All expression vectors (Figure 1 and Table 1) were verified by DNA sequencing.

Synthetic DNA encoding several antimicrobial peptides (Table 2) was purchased from Geneart AG, Regensburg. Individual genes were amplified by PCR and cloned in between the BamHI and Sac I or SacII sites of the expression vectors. All constructs were verified by DNA sequencing.



**Figure 1.** Schematic representation of the TAF-fusion expression vectors used in this study. Translation as well as cleavage sites in the expressed fusion protein have been indicated. All restriction sites shown are unique. NdeI and BamHI (or Sall) sites can be used for cloning of the sequence of interest directly downstream of an Asp-Pro sequence (for formic acid cleavage), or a Met codon (for CnBr cleavage), respectively. The boxed sequence containing the enterokinase site is only present in pTIPX-2 and pTIPX-4.

**Table 1.** Properties of the pTIPX expression vectors used in this study. The pTIPX vectors differ from the original pET vectors in the region between the BglII and Bpu1102I restriction sites, as shown in Figure 1

Expression vector	Selection marker	Enterokinase site	Derived from
pTIPX-1	Ampicillin	No	pET-15b
pTIPX-2	Ampicillin	Yes	pET-15b
pTIPX-3	Kanamycin	No	pET-28b
pTIPX-4	Kanamycin	Yes	pET-28b

### Expression of TAF12 Fusion Proteins

Overnight precultures from single colonies of transformed BL21 (DE3) were diluted 1 : 100 in Luria Bertani (LB) medium containing the appropriate antibiotic (100 µg/l ampicillin or 20 µg/l kanamycin) and 1% glucose (weight/volume) where indicated, incubated in a shaker for 2–3 h at 37 °C, and induced by addition of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) to a final concentration of 1 mM at an optical density (600 nm) of 0.4–0.6. After an additional 3-h incubation, cells were collected by centrifugation (10 min at 4000 × g, 4 °C), resuspended in 30 ml of lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100) per liter of culture and stored at –80 °C until further use. Uniformly <sup>15</sup>N-labeled material was produced identically, but instead of LB medium M9 minimal medium [24] was used that contained 0.5 g/l <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl as the sole nitrogen source.

### Peptide Purification

Bacteria were thawed and lysed by sonication on ice for 5 min (Bandelin Sonopuls HD200 with SH213G booster horn and MS72/D tip, 20% pulse intervals at 25% power), followed by centrifugation of the lysate for 30 min at 4 °C, 10 000 × g. The insoluble fraction was resuspended in wash buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA), followed by sonication for 1 min and centrifugation as before. The resulting pellet was then dissolved in 5–10 ml of 100% formic acid per liter of culture. This solution was mixed with de-ionized water so as to arrive at a final formic acid concentration of 50% (volume/volume) and incubated for 24 h at 50 °C. Upon evaporation of all solvent under vacuum using a Rotavapor R-200 (Büchi) at 50 °C, the cleaved peptide was dissolved in de-ionized water (5 ml per liter of culture), followed by centrifugation (30 min at room temperature, 16 000 × g) to remove water-insoluble bacterial debris. The peptide was then purified to homogeneity by HPLC (Prontosil 300-5-C4) using a 10–80% acetonitrile gradient in 0.1% TFA. The purified peptide was dried (Rotavapor) and dissolved in 4% acetic acid and lyophilized to remove remaining TFA.

### Analysis of Protein Samples

Protein samples were analyzed by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 15% gels [24]. Peptide samples (Figure 4(a)) were analyzed by means of tricine SDS-PAGE [32]. All gels were stained using Coomassie Brilliant Blue. LAH4 yield was assessed directly by determining the mass of the purified and lyophilized peptide using a microbalance. The LAH4 fusion protein expression level lower limit was calculated on the basis of the final peptide yield, assuming no losses. Expression levels of all other fusion proteins were estimated by comparison with the LAH4 fusion protein using Coomassie-stained gels (Figure 3).

Antimicrobial activity of LAH4 was measured using *E. coli*, BL21 (DE3), essentially as described by Vogt and Bechinger [33].

### NMR Spectroscopy

For the <sup>1</sup>H<sup>15</sup>N-HSQC spectrum shown in Figure 5, 1.8 mg of uniformly <sup>15</sup>N-labeled LAH4 was dissolved to a final concentration of 1 mM in a 1 : 1 mixture of deuterated TFE and H<sub>2</sub>O. Measurements were performed at 298 K on a Bruker Avance 500 MHz spectrometer equipped with a broadband inverse (BBI) probe, employing a 3.9–19 watergate sequence [34] with 8 scans and 512 increments, and referenced with respect to water (<sup>1</sup>H) and liquid NH<sub>3</sub> (<sup>15</sup>N). Data were processed using the program NMRnotebook (NMRtec, Illkirch Graffenstaden, France).

## Results

### Design of Expression Vectors

Four related vectors were constructed for the expression of target genes fused to the insoluble HFD of TAF12. An overview of these pTIPX (TAF12-mediated Insoluble Peptide eXpression) vectors is given in Figure 1 and Table 1. In addition to the HFD, all vectors encode a histidine tag for optional binding to metal affinity resin, and have multiple cloning sites for seamless insertion of the gene of interest directly downstream of an Asp-Pro site for formic acid cleavage, or following a Met codon for CnBr cleavage. The naturally occurring Asp-Pro site within the TAF12 HFD itself was changed to Ala-Pro by PCR-mediated mutagenesis. This facilitates purification following formic acid cleavage, because only two fragments are generated, that is, the peptide of interest and the remainder of the fusion protein. Plasmids are maintained via either an ampicillin (pTIPX-1, pTIPX-2) or a kanamycin (pTIPX-3, pTIPX-4) selection marker.

### Expression of Antimicrobial Peptides

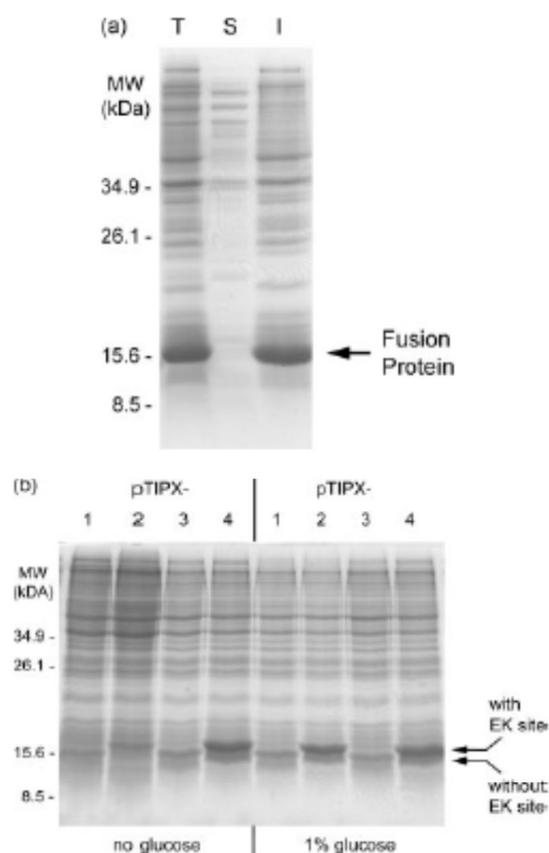
We tested the pTIPX vectors using LAH4, an artificial antimicrobial peptide developed in our laboratory [25]. This molecule is also an efficient transfection agent for eukaryotic cells and a potential gene therapy vector [35]. Because of its pronounced antibacterial activity, earlier attempts to express LAH4 as part of soluble fusion proteins had failed (our unpublished data). On the contrary, fusion of LAH4 to TAF12 using the expression vector pTIPX-4 results in a highly expressed, entirely insoluble protein (Figure 2(a)).

Expression results for all four pTIPX vectors are shown in Figure 2(b). In the presence of 1% glucose (right panel) for catabolite repression during the growth phase [36], each of the vectors produces significant amount of the insoluble fusion protein. However, optimal results are obtained with pTIPX-2 and pTIPX-4. This suggests that the enterokinase site in these vectors abolishes slight residual toxicity, originating either from trace amounts of soluble fusion protein or from soluble degradation products. Indeed, work by Lee *et al.* [13] indicated that a sequence of negatively charged residues directly preceding a cationic antimicrobial peptide can significantly reduce its toxicity, presumably by neutralizing the overall positive charge of the molecule. Our results are consistent with this hypothesis, and suggest that the highly negatively charged enterokinase site (DDDDK) is an efficient inhibitory sequence.

In the presence of 1% glucose (Figure 2(b), right panel), selection by ampicillin and kanamycin appears equally effective (compare

**Table 2.** Antimicrobial peptides expressed in this study by means of pTIPX-4

Peptide [Reference]	Origin	Structure	Sequence
LAH4 [25]	Designed	$\alpha$ -Helix	KKALLALALHHLAHLAHLALALKKA
Thanatin [26,27]	Insect	$\beta$ -Sheet	GSKKPVIHICNRRTGKQCRM
MGD-1 [28]	Mussel	Mixed $\alpha/\beta$	GFGCPNNYQCHRHCKSIPGRCCGGYCGGWHRLRCTCYRCG
RK-1 [29]	Rabbit	Mixed $\alpha/\beta$	MPCSCKKYCDPWEVIDGSCGLFNISKYICCREK
Distinctin 1 [30,31]	Frog	4-Helix bundle	ENREVPVPGFTALIKTLRCKII
Distinctin 2 [30,31]	Frog	4-Helix bundle	NLVSGLIEARKYLEQLHRKLNCKV



**Figure 2.** Expression of the antimicrobial peptide LAH4. Samples analyzed correspond to 100  $\mu$ l of bacterial culture. (a) Insoluble expression of LAH4 using pTIPX-4: total lysate (T), soluble fraction (S), insoluble fraction (I). (b) Effect of expression vector used and catabolite repression by glucose. Only insoluble fractions are shown here.

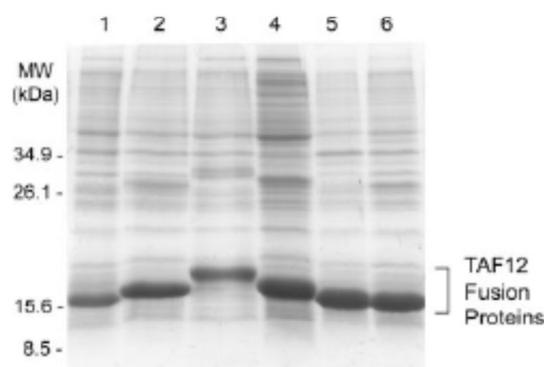
pTIPX-2 and pTIPX-4), indicating that under these conditions there is sufficient repression of peptide expression and toxicity to allow unhindered propagation of each plasmid. Without glucose-mediated repression, however, higher levels of leaky expression are to be expected, which in the case of ampicillin selection (pTIPX-2) and in the absence of other precautionary measures (such as regularly refreshing the culture medium) might lead to reduced plasmid stability [36]. Indeed, without glucose addition (Figure 2(b), left panel), we observe higher expression levels for pTIPX-4 than for pTIPX-2. Even though catabolite repression—at

least in the case of LAH4—provides a simple means of restoring pTIPX-2 expression levels, we conclude that to assure maximally robust production of highly toxic cationic antimicrobial peptides, pTIPX-4 is preferable. We, therefore, decided to use this vector, which combines TAF-fusion, an enterokinase site, and kanamycin selection, for all subsequent experiments. We also continued to use media supplemented with 1% glucose for enhanced repression.

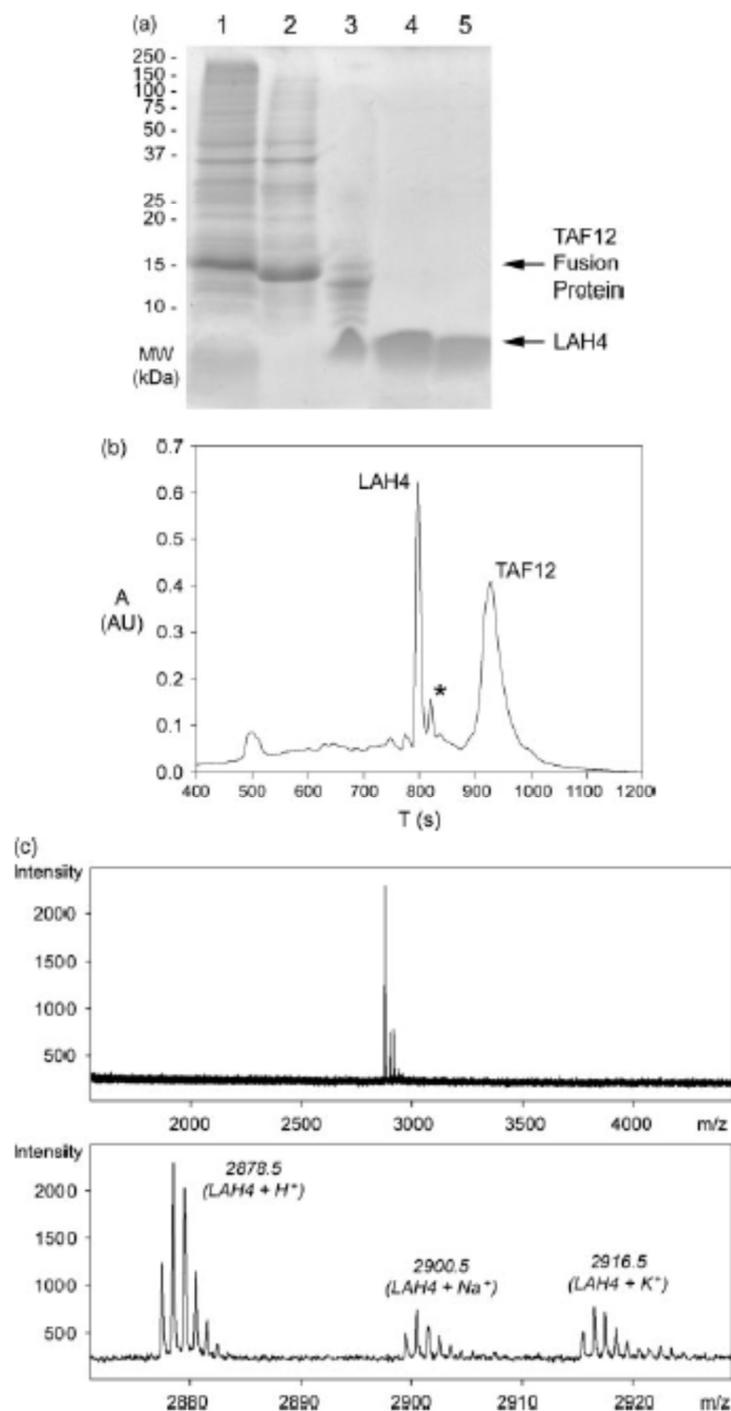
In order to investigate if pTIPX-4 is also an efficient vector for the production of antimicrobial peptides other than LAH4, we attempted expression of a series of representative molecules (listed in Table 2). These peptides, originating from a variety of organisms and belonging to several different structural and functional classes [3], were all found to be highly expressed (Figure 3). Fusion protein production levels (lanes 2–6) are equal to or even exceeding those observed for LAH4 (lane 1). Assuming comparable purification efficiencies (*vide infra*), this means that a yield of 10–20 mg of the peptides can be obtained per liter of culture. Growth of transformed bacteria is in all cases uninhibited, that is, doubling times measured are identical to those for nontransformed bacteria. These results indicate that pTIPX-4 efficiently neutralizes toxicity of a wide range of antimicrobial peptides and enables their high-level expression.

### Peptide Purification

Because TAF12 fusion proteins accumulate to relatively high-purity levels in inclusion bodies and only two products (the peptide of interest and the fusion partner) are generated by formic acid cleavage, we attempted to simplify the traditional



**Figure 3.** Expression of a variety of antimicrobial peptides using pTIPX-4: LAH4 (lane 1), thanatin (lane 2), MGD-1 (lane 3), RK-1 (lane 4) and the individual chains 1 and 2 of the distinctin heterodimer (lanes 5 and 6, respectively). Only insoluble fractions are shown, corresponding to 130  $\mu$ l of bacterial culture. Further details concerning the peptides are given in Table 2.



**Figure 4.** Purification of LAH4. (a) Results of individual purification steps: total cell lysate (lane 1), crude insoluble material (lane 2), and formic acid cleavage products (lane 3), each corresponding to 100  $\mu$ l of bacterial culture. Lane 4 shows 10  $\mu$ g of HPLC-purified end product; lane 5 shows 10  $\mu$ g of synthetic LAH4 for comparison. (b) HPLC profile of material from the LAH4 cleavage reaction. The peak assigned \* presumably corresponds to a formic acid adduct of LAH4 (see main text). (c) MS (MALDI) analysis of purified LAH4. Intensities are expressed in arbitrary units. The lower panel shows a detailed view of the peaks in the upper panel. Three masses can be identified, which correspond to LAH4 alone or associated to a sodium or potassium ion originating from the MALDI sample preparation procedure.

purification scheme for insoluble fusion proteins. Thus, we found that initial purification of the fusion protein (e.g. by metal affinity chromatography under denaturing conditions) and even solubilization in buffers containing 8 M urea or 6 M guanidinium chloride can be avoided. Instead, the insoluble fraction of the bacterial lysate is washed once with buffer and dissolved directly in pure formic acid. This solution is then diluted with water to set up a cleavage reaction in 50% formic acid, which releases the peptide from the fusion partner [37]. Following incubation for 24 h at 50 °C, the solvent is evaporated under vacuum. The cleaved peptide is then dissolved in water and purified to complete homogeneity by HPLC. The effectiveness of this extremely simple procedure is illustrated for LAH4 in Figure 4(a) and (b). Additional experimental details are given in the Materials and Methods section.

Analysis by MS confirmed that the sharp peak in the HPLC elution profile shown in Figure 4(b) indeed corresponds to LAH4 (Figure 4(c), an observed mass of 2877.5 Da, in good agreement with the expected value of 2877 Da). Notably, small amphipatic peptides such as LAH4 are readily separated from the hydrophobic fusion partner, which elutes very late in the acetonitrile gradient. The minor peak directly following LAH4 was also analyzed using mass spectrometry (not shown), and found to correspond to a molecule with a molecular mass of 2905.5 Da, that is, exceeding that of the main product by 28 Da. We observed that this peak increased when the formic acid incubation time was augmented from 24 to 48 h (data not shown). Taken together, these observations suggest that the additional peak corresponds to a formic acid adduct of LAH4, formed during the cleavage reaction. This underlines the importance of avoiding incubation times in excess of 24 h. However, even such minor side products are easily removed by HPLC and the peptide obtained is homogeneous as evidenced by SDS-PAGE (Figure 4(a)) as well as mass spectrometry (Figure 4(c)). The final yield obtained is 10 mg LAH4 per liter of culture.

The antimicrobial activity of the purified peptide, which differs from standard LAH4 in that it contains an *N*-terminal proline residue remaining from the formic acid cleavage site, was subsequently investigated. We found that the bacterially expressed peptide inhibits *E. coli* growth as efficiently as does chemically synthesized LAH4, the latter either with or without additional *N*-terminal proline. Measured LD50 concentrations are around 10 µg/l for all three of the peptides (bacterially expressed peptide, chemically synthesized peptide, and chemically synthesized peptide with an *N*-terminal proline residue), in good agreement with

values reported earlier for synthetic LAH4 [33]. The additional *N*-terminal proline residue therefore does not interfere with the antimicrobial activity of LAH4.

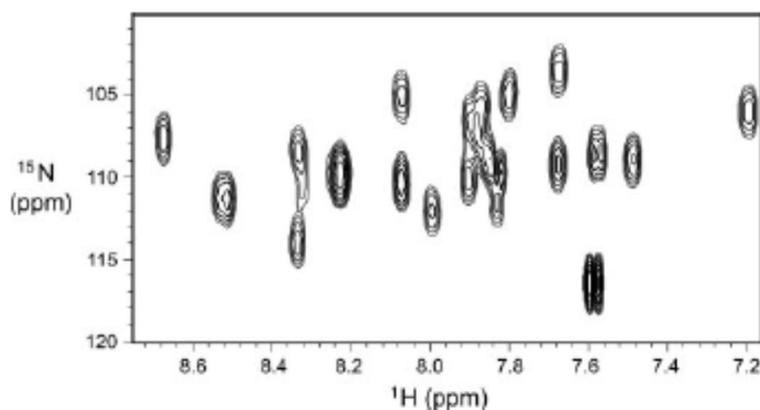
Using M9 minimal medium containing  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  as the only nitrogen source, and the fast purification scheme outlined above, we succeeded in rapidly producing milligram amounts of isotope-labeled LAH4 for use in NMR studies. Figure 5 shows the resulting  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC spectrum of the peptide in 50% TFE, indicative of a homogeneous sample and efficient uniform  $^{15}\text{N}$ -labeling.

## Discussion

Here, we have described a procedure that allows rapid expression and purification of peptides that are normally toxic to *E. coli*, and demonstrated its effectiveness for the production of the antimicrobial peptide LAH4 in native as well as uniformly  $^{15}\text{N}$ -labeled form. Compared with earlier methods that use insoluble fusion partners to neutralize peptide toxicity towards the host, our approach has a number of significant advantages. In the first place, the fusion partner we use, TAF12, is not only expressed in an entirely insoluble form and at very high levels (typically more than 40 mg per liter of culture), but in addition is smaller than the fusion partners typically used for this purpose. This increases efficiency, as the peptide of interest constitutes a larger percentage of the protein that is produced. Moreover, we demonstrated that TAF12 fusion allows high-level expression of a series of entirely unrelated antimicrobial peptides, suggesting that the fusion is quite generally applicable.

Importantly, the high expression levels and the absence of internal Asp-Pro sites in the fusion partner enabled us to bypass a number of commonly used purification steps and directly treat the insoluble fraction of *E. coli* with formic acid, followed by single-step HPLC purification of the peptide of interest. This simplification of the traditional purification scheme leads to a considerable gain in time and eliminates losses in the course of intermediate chromatography steps. In addition, purification costs are significantly reduced because no affinity resin is required and only relatively inexpensive chemicals are used.

We established our method primarily with the aim of facilitating high-throughput expression and purification of active, uniformly labeled antimicrobial peptides for structural and biophysical studies, in particular by NMR. However, the procedure is extremely straightforward, fast and inexpensive and could be developed



**Figure 5.** Heteronuclear single quantum coherence (HSQC) spectrum of bacterially expressed and uniformly  $^{15}\text{N}$ -labeled LAH4 in 50% TFE.

into an interesting alternative for large-scale chemical synthesis of native peptides as well. Moreover, the method clearly has advantages (in particular in terms of cost-effectiveness and speed) over soluble expression techniques and may therefore be of interest for the *in vivo* production of nontoxic peptides and possibly proteins that are amenable to post-purification renaturation.

#### Acknowledgements

We thank Noëlle Potiers for mass spectrometry analysis of peptides and Roland Graff for assistance with NMR spectroscopy. S.W. was supported by fellowships from *Vaincre La Mucoviscidose (VLM)* and the *Agence Nationale de la recherche (ANR)*. The *Institut de Science et d'Ingénierie Supramoléculaires (ISIS)* is acknowledged for hosting the laboratory.

#### References

- Sørensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 2005; **115**: 113–128.
- Yokoyama S. Protein expression systems for structural genomics and proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2003; **7**: 39–43.
- Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; **19**: 491–511.
- Yacoby I, Benhar I. Targeted anti bacterial therapy. *Infect. Disord. Drug Targets* 2007; **7**: 221–229.
- Ingham AB, Moore RJ. Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2007; **47**: 1–9.
- Moon JY, Henzler-Wildman KA, Ramamoorthy A. Expression and purification of a recombinant LL-37 from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 2006; **1758**: 1351–1358.
- Capparelli R, Ventimiglia I, Palumbo D, Nicodemo D, Salvatore P, Amoroso MG, Iannaccone M. Expression of recombinant puroindolines for the treatment of staphylococcal skin infections (*Acne Vulgaris*). *J. Biotechnol.* 2007; **128**: 606–614.
- Huang L, Wang J, Zhong Z, Peng L, Chen H, Xu Z, Cen P. Production of bioactive human Beta-defensin-3 in *Escherichia coli* by soluble fusion expression. *Biotechnol. Lett.* 2006; **28**: 627–632.
- Xu Z, Peng L, Zhong Z, Fang X, Cen P. High-level expression of a soluble functional antimicrobial peptide, human Beta-defensin 2, in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 2006; **22**: 382–386.
- Xu Z, Zhong Z, Huang L, Peng L, Wang F, Cen P. High-level production of bioactive human Beta-defensin-4 in *Escherichia coli* by soluble fusion expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006; **72**: 471–479.
- Xu X, Jin F, Yu X, Ji S, Wang J, Cheng H, Wang C, Zhang W. Expression and purification of a recombinant antibacterial peptide, cecropin, from *Escherichia coli*. *Protein Exp. Purif.* 2007; **53**: 293–301.
- Moon WJ, Hwang DK, Park EJ, Kim YM, Chae YK. Recombinant expression, isotope labeling, refolding, and purification of an antimicrobial peptide, piscidin. *Protein Exp. Purif.* 2007; **51**: 141–146.
- Lee JH, Minn I, Park CB, Kim SC. Acidic Peptide-mediated expression of the antimicrobial peptide buforin II as tandem repeats in *Escherichia coli*. *Protein Exp. Purif.* 1998; **12**: 53–60.
- Tian ZG, Teng D, Yang YL, Luo J, Feng XJ, Fan Y, Zhang F, Wang JH. Multimerization and fusion expression of bovine lactoferrin derivative LfcbN15-W4.10 in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007; **75**: 117–124.
- Majerle A, Kidric J, Jerala R. Production of stable isotope enriched antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: An application to the production of a 15N-enriched fragment of lactoferrin. *J. Biomol. NMR* 2000; **18**: 145–151.
- Wei Q, Kim YS, Seo JH, Jang WS, Lee IH, Cha HJ. Facilitation of expression and purification of an antimicrobial peptide by fusion with baculoviral polyhedrin in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; **71**: 5038–5043.
- Li L, Kim YS, Hwang DS, Seo JH, Jung HJ, Du J, Cha HJ. High and compact formation of baculoviral polyhedrin-induced inclusion body by Co-expression of baculoviral FP25 in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 2007; **96**: 1183–1190.
- Zhang L, Falla T, Wu M, Fidal S, Burlan J, Kay W, Hancock REW. Determinants of recombinant production of antimicrobial cationic peptides and creation of peptide variants in bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; **247**: 674–680.
- Pazgler M, Lubkowski J. Expression and purification of recombinant human  $\alpha$ -defensins in *Escherichia coli*. *Protein Exp. Purif.* 2006; **49**: 1–8.
- Werten S, Mitschler A, Romier C, Gangloff Y-G, Thuault S, Davidson I, Moras D. Crystal structure of a subcomplex of human TFIIID formed by TBP-associated factors hTAF4 (hTAFII135) and hTAF12 (hTAFII20). *J. Biol. Chem.* 2002; **277**: 45502–45509.
- Fribourg S, Romier C, Werten S, Gangloff YG, Poterszman A, Moras D. Dissecting the interaction network of multiprotein complexes by pairwise coexpression of polypeptides in *E. coli*. *J. Mol. Biol.* 2001; **306**: 363–373.
- Gangloff YG, Werten S, Romier C, Carré L, Poch O, Moras D, Davidson I. The human TFIIID components TAF(II)135 and TAF(II)20 and the yeast SAGA components ADA1 and TAF(II)68 heterodimerize to form Histone-like Pairs. *Mol. Cell. Biol.* 2000; **20**: 340–351.
- Higuchi R. *PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications*. Academic Press: San Diego, CA, 1990; 177–183, Chapter 22.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Bechinger B. Towards membrane protein design: pH-sensitive topology of Histidine-containing polypeptides. *J. Mol. Biol.* 1996; **263**: 768–775.
- Fehlbaum P, Bulet P, Chernysh S, Briand JP, Roussel JP, Letellier L, Hetru C, Hoffmann JA. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996; **93**: 1221–1225.
- Mandard N, Sodano P, Labbe H, Bonmatin JM, Bulet P, Hetru C, Ptak M, Vovelle F. Solution structure of thanatin, a potent bactericidal and fungicidal insect peptide, determined from proton Two-dimensional nuclear magnetic resonance data. *Eur. J. Biochem.* 1998; **256**: 404–410.
- Yang YS, Mitta G, Chavanieu A, Calas B, Sanchez JF, Roch P, Amelias A. Solution structure and activity of the synthetic Four-disulfide bond mediterranean mussel defensin (MGD-1). *Biochemistry* 2000; **39**: 14436–14447.
- McManus AM, Dawson NF, Wade JD, Carrington LE, Winzor DJ, Craik DJ. Three-dimensional structure of RK-1: a novel Alpha-defensin peptide. *Biochemistry* 2000; **39**: 15757–15764.
- Batista CV, Scaloni A, Rigden DJ, Silva LR, Rodrigues Romero A, Dukor R, Sebben A, Talamo F, Bloch C. A novel heterodimeric antimicrobial peptide from the Tree-frog phyllomedusa distincta. *FEBS Lett.* 2001; **494**: 85–89.
- Raimondo D, Andreotti G, Saint N, Amodeo P, Renzone G, Sanseverino M, Zocchi I, Molle G, Motta A, Scaloni A. A Folding-dependent mechanism of antimicrobial peptide resistance to degradation unveiled by solution structure of distinctin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005; **102**: 6309–6314.
- Schägger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 1987; **166**: 368–379.
- Vogt TCB, Bechinger B. The interactions of Histidine-containing amphipathic helical peptide antibiotics with lipid bilayers. The effects of charges and pH. *J. Biol. Chem.* 1999; **274**: 29115–29121.
- Sklenár V, Plotto M, Leppik R, Saudek V. Gradient-tailored water suppression for 1H-15N HSQC experiments optimized to retain full sensitivity. *J. Magn. Reson., Ser. A* 1993; **102**: 241–245.
- Kichler A, Mason AJ, Bechinger B. Cationic amphipathic Histidine-rich peptides for gene delivery. *Biochim. Biophys. Acta* 2006; **1758**: 301–307.
- Zhang Y, Taiming L, Liu J. Low temperature and glucose enhanced T7 RNA Polymerase-based plasmid stability for increasing expression of Glucagon-like peptide-2 in *Escherichia coli*. *Protein Exp. Purif.* 2003; **29**: 132–139.
- Li Y, Li X, Wang G. Cloning, expression, isotope labeling, and purification of human antimicrobial peptide LL-37 in *Escherichia coli* for NMR studies. *Protein Exp. Purif.* 2006; **47**: 498–505.



## Review

## Solid-state NMR approaches to measure topological equilibria and dynamics of membrane polypeptides

Evgeniy Salnikov, Christopher Aisenbrey, Verica Vidovic, Burkhard Bechinger\*

Université de Strasbourg / CNRS, UMR7177, Institut de chimie, 4, rue Blaise Pascal, 67070 Strasbourg, France

## ARTICLE INFO

**Article history:**  
 Received 14 April 2009  
 Received in revised form 12 June 2009  
 Accepted 29 June 2009  
 Available online 9 July 2009

**Keywords:**  
 Alamethicin  
 Peptaibols  
 Antimicrobial peptide  
 Transmembrane  
 Alpha-helix  
 Topology  
 Hydrophobic mismatch  
 Tilt and rotational pitch angle  
 Azimuthal angle  
 Rotational diffusion  
 Lateral diffusion  
 Helix axis  
 Wobbling motion  
 Libration

## ABSTRACT

Biological membranes are characterized by a high degree of dynamics. In order to understand the function of membrane proteins and even more of membrane-associated peptides, these motional aspects have to be taken into consideration. Solid-state NMR spectroscopy is a method of choice when characterizing topological equilibria, molecular motions, lateral and rotational diffusion as well as dynamic oligomerization equilibria within fluid phase lipid bilayers. Here we show and review examples where the  $^{15}\text{N}$  chemical shift anisotropy, dipolar interactions and the deuterium quadrupolar splittings have been used to analyze motions of peptides such as peptaibols, antimicrobial sequences, Vpu, phospholamban or other channel domains. In particular, simulations of  $^{15}\text{N}$  and  $^2\text{H}$ -solid-state NMR spectra are shown of helical domains in uniaxially oriented membranes when rotation around the membrane normal or the helix long axis occurs.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Contents

1. NMR as a tool to study topological equilibria and molecular dynamics . . . . .	259
2. Methods to measure lateral diffusion in membranes . . . . .	261
3. Rotational diffusion and aggregation in membranes. . . . .	261
Acknowledgements . . . . .	264
References . . . . .	264

The structures of several membrane proteins have been determined at high resolution [1,2] and these often are an important step to our detailed understanding of their functioning. Having available the structures of different conformational states, thereby tracing the structural changes in a stroboscopic manner, can be particularly helpful to gain insights into the molecular functioning. Examples are the many

intermediates of the bacteriorhodopsin photocycle [3], or a number of structures of the skeletal muscle sarco-plasmic reticulum Ca-ATPase [4,5], as well as the homologous *Arabidopsis thaliana* auto-inhibited  $\text{H}^+$ -ATPase2 [6]. However, despite their high resolution, these structures are static, have in most cases been recorded at cryotemperatures and do not show the lipid bilayer. In contrast, the widely accepted fluid mosaic model suggests an inherently dynamic nature of the membrane with the proteins and lipids diffusing laterally and rotationally [7]. Therefore, additional information about the dynamic nature of the membranes and the proteins is key to fully understand the movements associated with their action. This is even more the case for membrane-associated peptides that are thoroughly immersed in the lipid environment and where interactions between peptides and lipids dominate [8].

Abbreviations: BR, bacteriorhodopsin; CD, circular dichroism; CP, cross polarization; CSA, chemical shift anisotropy; DMPC, 1,3-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; MAS, magic angle spinning; NMR, nuclear magnetic resonance; POPC, 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; POPE, 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine; POPG, 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol  
 \* Corresponding author. Tel.: +33 3 90 24 51 50; fax: +33 3 90 24 51 51.  
 E-mail address: bechinger@chimie.u-strasbg.fr (B. Bechinger).

The dynamic nature of peptide-peptide interactions in a membrane has early on become apparent when the voltage-dependent channel formation by alamethicin has been investigated by single channel electrophysiological recordings. Alamethicin is a 20-amino acid hydrophobic peptide of fungal origin that is rich in Aib ( $\alpha$ -aminoisobutyric acid) and which exhibits antimicrobial activities (reviewed in [9–12]). This peptide is considered a paradigm for channel formation in biological membranes and has therefore been extensively studied by a variety of biophysical methods in the past. When added to lipid bilayers, well-defined patterns of successive increases in conductance levels are observed, each of a duration of a few milliseconds [13–15]. These step-wise changes resemble those seen in the presence of large voltage- or ligand-gated channel proteins (reviewed in [9–12]). The open alamethicin pore has been described by ‘transmembrane helical bundles’ or ‘barrel staves’ [10] which are composed of at least three [16] or four subunits [17]. As many as 20 different conductance states have been described [18] and it is believed that these correspond to differently sized bundles of transmembrane alamethicin helices [10]. Contrary to some of the previous models, recent molecular modeling calculations of the alamethicin channels suggest a less regular arrangement with a high degree of conformational variation of each subunit [19], an observation that is in agreement with recent experimental solid-state NMR data [20]. Conformational and/or topological heterogeneity has also been observed for phospholamban or sarcoplipin [21,22]. Furthermore, a combination of solid-state NMR spectroscopy and molecular modeling has recently revealed interesting structural details on the GABA-TM2 domain [23].

Whereas alamethicin remains associated with the bilayer surface at low peptide-to-lipid ratios, pores of self-associated transmembrane helical bundles are formed above a threshold concentration [24]. A reorientation of the helix dipole and thereby an increase in the transmembrane population have also been suggested to form the basis of voltage gating [10,11]. In this context, the study of the in-plane to transmembrane equilibrium is of interest as it allows one to understand this regulatory event in a more quantitative manner [8].

NMR spectroscopy works in environments that preserve the character of solutions and/or of liquid crystalline membranes. It is therefore a method of choice to study molecular dynamics at high resolution, and the measurement of relaxation times and NOEs for spectral density mapping is a well-established method in solution NMR spectroscopy [25,26]. Due to inherent difficulties to obtain high-resolution NMR spectra in soft solids such as liquid crystalline membranes, these methods are less well established for biomolecules in such environments although first measurements of dynamics have been obtained from MAS NMR spectra of proteins in the solid state [27]. It is interesting to note that the solid-state NMR line widths observed for membrane samples and thereby the spectral resolution are inherently linked to the local dynamics of the protein [28–30].

### 1. NMR as a tool to study topological equilibria and molecular dynamics

Fig. 1 shows an example of the topological and conformational heterogeneity of a membrane-associated peptide. To monitor alamethicin alignment as a function of lipid composition, the peptide was reconstituted into uniaxially oriented membranes and the samples were investigated by proton-decoupled  $^{15}\text{N}$  solid-state NMR spectroscopy. The  $^{15}\text{N}$  chemical shift of  $^{15}\text{N}$  labeled peptide bonds provides a direct indicator of the membrane alignment of helical polypeptides when these are reconstituted into bilayers that are typically oriented with the normal parallel to the magnetic field direction [31]. Whereas the chemical shift values of transmembrane peptides occur in the 200 ppm range, those of in-plane oriented helices resonate at frequencies <100 ppm [20,23,31–33]. Fig. 1A shows the  $^{15}\text{N}$  chemical shift spectrum of alamethicin uniformly

labeled with  $^{15}\text{N}$  in oriented POPC, a simple mimetic of the zwitterionic membranes of eukaryotes, and Fig. 1B after reconstitution in POPE/POPG membranes, a model for bacterial membranes. Whereas the chemical shift values (between 195 and 230 ppm with a maximum at 208 ppm) indicate a transmembrane alignment of the peptide in POPC, an orientation parallel to the surface is adopted in POPE/POPG (chemical shifts between 68 and 125 ppm with a maximum at 95 ppm).

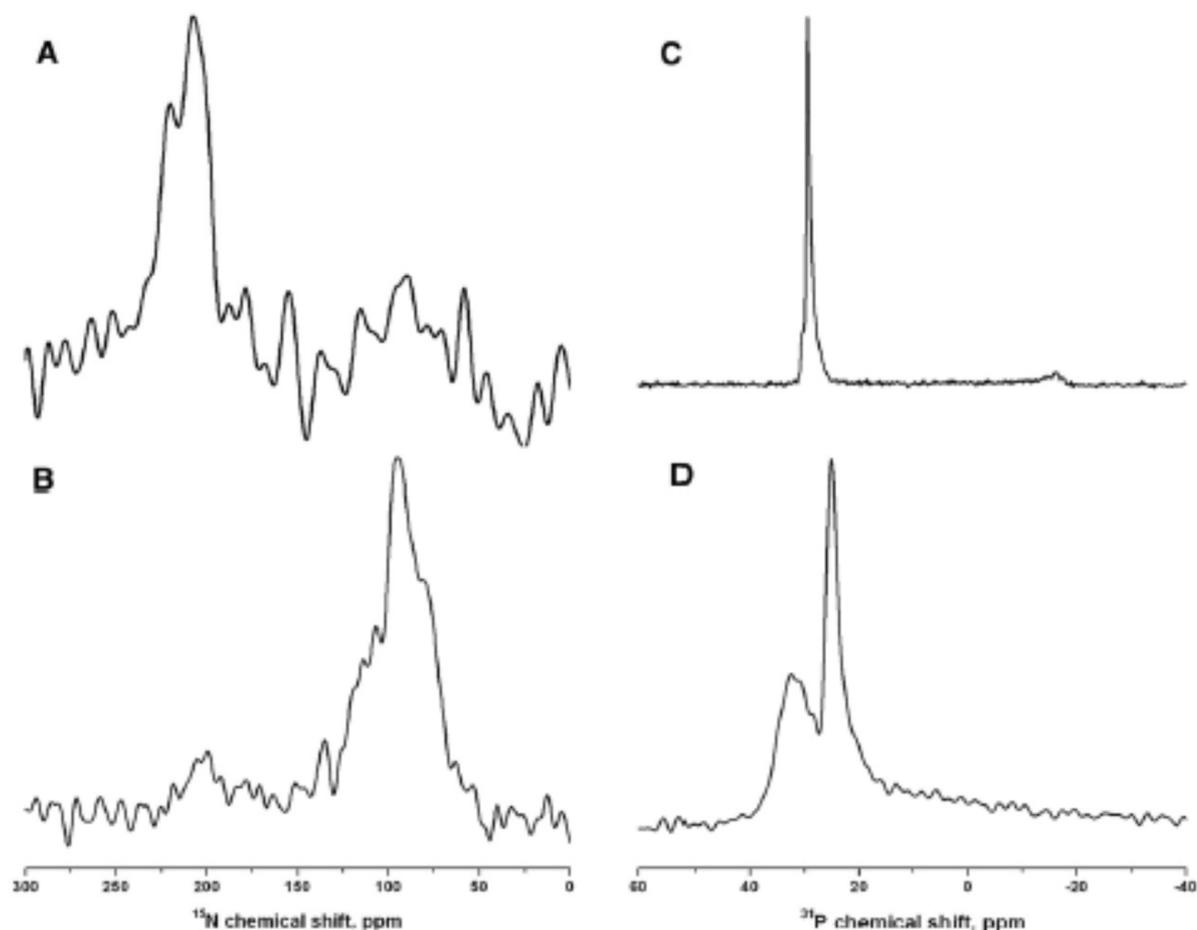
Fig. 1C and D show proton-decoupled  $^{31}\text{P}$  solid-state NMR spectra of the same samples from which the  $^{15}\text{N}$  solid-state NMR spectra were recorded (Fig. 1A, B). The  $^{31}\text{P}$  chemical shift value is dependent on the alignment of the lipid head group relative to the magnetic field direction ( $B_0$ ), the latter being collinear with the glass plate normal ( $n$ ). For pure phosphatidylcholine membranes in their fluid state at the sample orientations represented in Fig. 1 ( $B_0 \parallel n$ ), values around 30 ppm are characteristic of lipids that align with their long axis parallel to  $B_0$  and resonances at  $-15$  ppm are indicative of perpendicular alignments. The narrow  $^{31}\text{P}$  NMR resonance in Fig. 1C therefore shows that the phospholipid membranes are well aligned with only a small contribution reaching into the  $-15$  ppm region. The latter probably corresponds to the maximum intensity typically observed for a powder pattern line shape (i.e. a random alignment of non-oriented sample) [34].

The mixed POPE/POPG membrane exhibits two main intensities (Fig. 1D) corresponding to the differences in the  $^{31}\text{P}$  chemical shift anisotropy of its two phospholipid components. Also in this case, a predominant alignment of the phospholipids parallel to  $B_0$  is observed albeit the distribution is less homogeneous and the membranes exhibit higher mosaic spread. This observation agrees with previous data where amphipathic peptides that intercalate into the membrane interface in an in-plane fashion caused considerable membrane disordering [35–40].

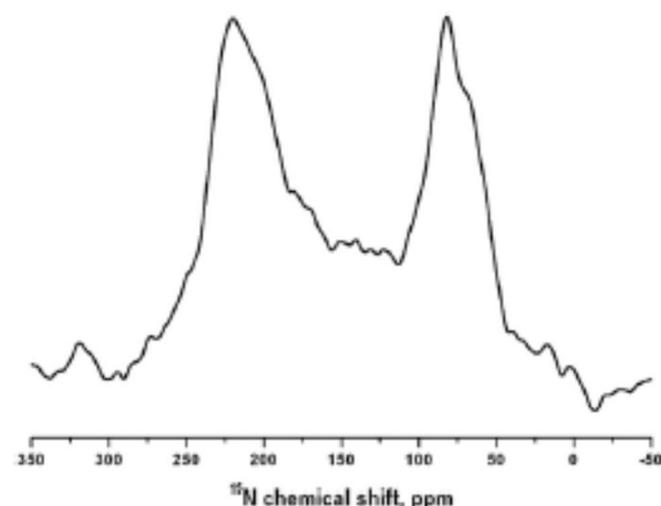
The example shown in Fig. 1 illustrates that the peptide-lipid interactions are governed by sensitive equilibria although the acquisition time of many hours, even for a one-dimensional solid-state NMR spectrum, hampers the measurements of kinetic parameters characterizing these topological transitions. Previously, the membrane interactions of alamethicin were investigated in a variety of different environments by CD- [41,42] and solid-state NMR spectroscopies on oriented samples [43–45]. Using these techniques, transitions between the surface-associated state and transmembrane alignments of alamethicin and other members of the peptaibol family were characterized as a function of lipid composition, peptide-to-lipid ratio [24,41,42] and membrane hydrophobic thickness [20,45]. Lipid-dependent topologies, including barrel-stave pores, have also been observed paradoxically using solid-state NMR spectroscopy [35,46].

Topological equilibria have also been observed by solid-state NMR spectroscopy for a variety of other peptides and proteins including colicins [47,48], diphtheria toxin [49,50] and the C-terminal anchoring domain of the anti-apoptotic protein Bcl-x<sub>L</sub> [51]. Furthermore, histidine-containing antimicrobial and transfection peptides have been designed in such a manner to change membrane orientation [52,53] and DNA association as a function of pH [54], an effect that has also been used to quantify the Gibbs free energies associated with the transfer of amino acid residues from the membrane interface to the hydrophobic interior [55,56].

Even though the equilibrium thermodynamics can be established and the differences in energies between topomers calculated [55,56], the question remains how fast the transfer between the in-plane and the transmembrane configuration occurs. This is a challenging task for systems where data acquisition is hampered by low sensitivity, but the investigation of histidine-containing amphipathic peptides has provided some indications [52,56,57]. Interestingly, at intermediate pH, the in-plane and transmembrane peptides exhibit well-separated  $^{15}\text{N}$  resonances (Fig. 2) indicating that the exchange between the two alignments is slow on the  $10^{-4}$  s time scale [52,56] although the orientational equilibrium is reversible within a few minutes of incubation [53].



**Fig. 1.** Proton-decoupled oriented  $^{15}\text{N}$  (A, B) or  $^{31}\text{P}$  solid-state NMR spectra (C, D) of alamethicin in POPC membrane at a concentration of 1 mol% (A, C), or in POPE/POPG 3/1 bilayers at a concentration of 2 mol% (B, D). In the case of POPE/POPG membrane (B, D), pH 7.5 was set by addition of 1 mM Tris buffer solution and a temperature was maintained at 37 °C. For the sample of alamethicin in POPC, the temperature was maintained at 21 °C. The sample normal was aligned parallel to the external magnetic field. The effect of alamethicin on the order parameter of these membranes was published earlier [100].



**Fig. 2.** Proton-decoupled  $^{15}\text{N}$  solid-state NMR spectrum of LAH4 reconstituted in a membrane of POPC at a concentration of 1 mol% oriented with the normal parallel to the magnetic field direction. LAH4 is an amphipathic helical peptide, where the polar face consists of four histidines, with potent antimicrobial and DNA transfection characteristics [52,80]. The peptide changes from a transmembrane to an in-plane alignment in a pH-dependent manner [52] and the spectrum shows the situation at pH 6. The peptide was prepared labeled uniformly with  $^{15}\text{N}$  according to [101]. A comparison of the effects of different peptide topologies on lipid order parameters is shown in [100].

The dynamics of membrane-associated polypeptides has also been explored by solid-state NMR investigations of the  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  and  $^1\text{H}$ -X dipolar couplings which are in the range of a few tens of kHz. At a given distance such as in covalent bonds, the reduction of the dipolar coupling is an indicator of motions faster than the spin interaction and has been explored to compare the dynamics of crystalline and membrane-bound colicin Ia [58]. Furthermore, by using this approach, it was shown that the biological activities of three tachyplesin antimicrobial peptides, when associated with lipid bilayers, correlated with the motional amplitudes observed within the peptide backbone, a finding that was interpreted with the different degree of aggregation of the  $\beta$ -sheet structures [59]. Interestingly, the dipolar interactions between nuclei have been exploited in various other ways, for example, by using different cross-polarization conditions on oriented samples to screen for the dynamical features of protein domains [60,61]. Furthermore, the orientation-dependent dipolar interactions are used to introduce a second dimension into static oriented solid-state NMR spectra [62,63], and by combining orientational information from dipolar interactions, chemical shift anisotropy and solution NMR data, highly refined structural models of membrane polypeptides can be obtained [39,64–66].

When bacteriorhodopsin (bR), labeled uniformly with  $^{15}\text{N}$  has been investigated by static oriented CP solid-state NMR spectroscopy, the temperature dependence of the  $^{15}\text{N}$   $T_2$  relaxation times is indicative of slow motions on the millisecond time scale [30]. On the other hand, the line broadening observed in  $^{13}\text{C}$  CP-MAS spectra at

low temperatures indicates that the helices of bR in the purple membrane exhibit motions at frequencies of around 100 Hz [29,67]. The motional amplitudes and/or frequencies are increased after reconstitution of bR into DMPC membranes [30]. Motions of bR in the tens of microsecond correlation time regime have been found coupled to the phospholipids dynamics and these correlate with the activity of the proton pump [68]. In static oriented purple membrane samples, the slow motions result in considerable line broadening when the sample exhibits even a small degree of mosaic spread or conformational heterogeneity [30,69]. In this context, it should be noted that dark adapted bR is characterized by two distinct retinal conformers (e.g. [70,71]) which may contribute to the conformational heterogeneity of the protein backbone.

## 2. Methods to measure lateral diffusion in membranes

Another important aspect of membrane-polypeptide dynamics is the rotational and lateral diffusion in membranes. Commonly, optical techniques such as fluorescence recovery after photobleaching (FRAP, [72]) or fluorescence correlation spectroscopy (FCS) [73,74] are used to follow the diffusion along the membrane surface but these techniques require the labeling with bulky optical probes, which by themselves may have an effect on the diffusion and aggregation of the molecules. Therefore, non-invasive NMR methods have been developed for solutions and for membranes which make use of magnetic field gradients. As the strength of the magnetic field determines the speed of precession of the nuclear spin, magnetization phase differences develop during the duration of the magnetic field gradient. These can be used to encode the localization of the nuclei along the direction of the gradient. By applying a gradient of similar strength but with an opposite sign, the effect of the first gradient is cancelled provided that the spins have not changed their localization during the echo delays. Therefore, in pulse field gradient (pfg) NMR, the loss of signal after the second gradient pulse is a measure of diffusion [75]. As semi-solid samples such as membranes are characterized by considerable line broadening, the application of the technique is less obvious. However, by uniaxially orienting the membranes between glass plates and at alignments of the sample normal along the magic angle, rotational diffusion helps in obtaining well-resolved resonances [76,77].

Lateral diffusion experiments are widely applied to characterize the phase behavior of lipid bilayers of different compositions in particular in the presence of sterols [73,77]. Investigations of the formation of domains within lipid membranes (e.g. [78–80]), an effect known as lipid phase separation since the early days of lipidology, have become popular again after it has been speculated that ‘rafts’ may be important in biology. Although there are numerous indications for the biological significance of lipid phase separation within cellular membranes [81], the physical concept of microdomains is difficult to prove *in vivo* [82,83].

## 3. Rotational diffusion and aggregation in membranes

Whereas the rotational diffusion around the membrane normal of lipids and sterols (e.g. cholesterol) is characterized by correlation times in the ps–ns range and is of special interest for a microscopic description of the lipid phase behavior [84], the rotational motion of membrane peptides and proteins occurs in the  $\mu$ s–ms range. The latter time frame is accessible by solid-state NMR methods as it corresponds to chemical shift anisotropies (CSA) and deuterium quadrupolar interactions (in the range of 10–100 kHz). Optical techniques like polarized fluorescence photobleaching recovery (pFR) can extend the measurement window into the ms range [85].

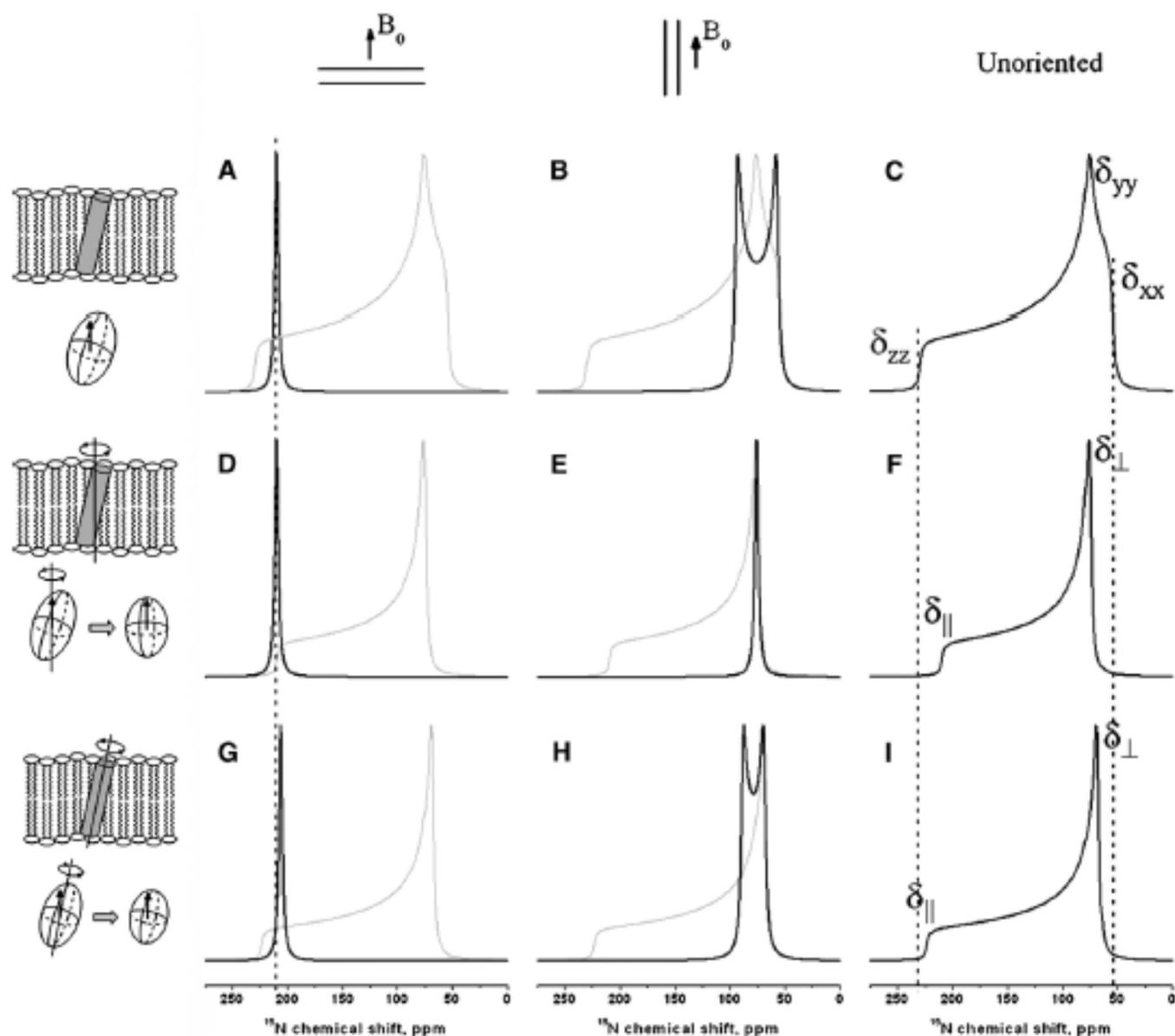
The coefficients describing rotational diffusion augment quickly with the size of the particle ( $D_{rot} \propto 1/R^2$ ) [86], therefore, the measurements are highly sensitive to the formation of multimers where aggregation results in reduced rotational correlation times. A number of channel-

forming peptides have been shown to stably insert into the bilayers at transmembrane alignments (e.g. [20,87,88]). In these cases, channel opening is associated with conformational and topological changes and/or oligomer formation. Although from the oriented solid-state NMR spectra the structure and alignment of these channel peptides [20,87,88] have been calculated, the question often remains if the spectra represent the mono- or oligomeric forms of the channel [89]. We have therefore developed an approach where the  $^2\text{H}$  solid-state NMR spectra of peptides labeled with methyl-deuterated alanines allow one to obtain information about the membrane rotational diffusion and thereby indirectly about the aggregation state in the membrane [90]. In contrast to many other techniques, such as e.g. fluorescence transfer energy measurements, the aggregation state can be tested by investigating the same samples that are also used for the structural analysis by merely tilting the oriented membranes by  $90^\circ$ . In this configuration, rotational diffusion around the membrane normal changes the molecular alignment relative to the magnetic field direction ( $B_0$ ) [90]. As a consequence, the resulting NMR spectrum is a superposition of individual spectra each corresponding to a particular molecular alignment relative to  $B_0$  and a spherical powder pattern line shape is observed when rotational averaging is slow (Figs. 3B and 4B). However, in cases where rotational diffusion is fast, averaging of this powder pattern is observed (Figs. 3E and 4E) and this difference can be used to describe the rotational diffusion in a semiquantitative manner. Whereas the rotational diffusion of membrane peptides is ‘frozen’ in the gel-phase [90], it is sufficiently fast for averaging also below the phase transition temperature in the case of lipids and sterols [84].

Following this concept, it has been demonstrated that the  $^2\text{H}$  quadrupolar line shape of the deuterated alanine methyl group is sensitive to differences in aggregation between transmembrane monomers and small oligomers (Fig. 4B, E) [90]. The technique shows, for example, that in a typical solid-state NMR sample the Influenza M2 transmembrane channel peptide occurs as a mixture between configurations exhibiting slow and fast rotational diffusion rates [89].

Notably, fast rotational diffusion also modifies the spectral appearance of non-oriented samples (e.g. Figs. 3C, E, I and 4C, E, I) and the resulting powder pattern line shapes can be used to obtain topological information about the peptides within lipid bilayers [31,91,92]. Furthermore, the dynamics in membranes has pronounced effects on the nuclear dipolar couplings and therefore the cross polarization efficiency and this has been used to qualitatively account for motions in membranes [59,93]. As the averaging of dipolar interactions depends on the alignment of the rotation axis relative to the magnetic field direction, cross-polarization efficiency drops when the dipolar couplings approach zero near the magic angle and results in distorted powder pattern line shapes [58,92,94]. Related effects also account for the difficulties of recording CP spectra of 20–30 mer in-plane aligned peptides reconstituted in oriented samples with the normal perpendicular to the magnetic field direction [90].

Finally, one needs to ask how such motions affect the analysis of oriented solid-state NMR spectra during structural studies. Figs. 3 and 4 show spectral simulations of a slightly tilted transmembrane helical peptide when reconstituted into oriented membranes at alignments of the sample normal ( $n$ ) parallel (Figs. 3A, D, G and 4A, D, G) or perpendicular to the magnetic field direction (Figs. 3B, E, H and 4B, E, H) as well as of non-oriented samples (Figs. 3C, E, I and 4C, E, I). Notably, motions around the membrane normal do not affect the resonance position of the oriented line shape at sample alignments of the normal parallel  $B_0$  [31,95] (cf. Figs. 3A, D and 4A, D). Whereas in the static case, tilt angle information is directly obtained by comparing the resonance position with the static powder pattern (Figs. 3A and 4A), fast averaging of the chemical shift or quadrupolar tensor results in a symmetric powder pattern line shape where the low field shoulder corresponds to the  $\delta_{11}$  tensor element (Figs. 3F and 4F). The  $\delta_{11}$  element is oriented parallel to the main axis of motion which in the setting shown in Fig. 3D–F is collinear with the membrane normal



**Fig. 3.** Simulations of proton-decoupled  $^{15}\text{N}$  solid-state NMR spectra of a  $10^\circ$  tilted transmembrane helical peptide, labeled at a single site with  $^{15}\text{N}$  and reconstituted into membranes oriented with the bilayer normal parallel (A, D, G) or perpendicular to the external magnetic field (B, E, H). Panels C, F and I show spectra from non-oriented samples which are superimposed in grey onto the respective oriented spectra shown in the same row. The simulations account for rotation around the bilayer normal (D–F), or rotation around the helix axis (G–I) and are compared to the static case (A–C). The CSA tensor used for simulations is 54, 76 and 230 ppm with  $\delta_{zz}$  covering an angle of  $17^\circ$  with the N–H bond ([31]). The ellipses shown to the left of the spectra illustrate the effects of averaging on the tensor where the vector represents the measured chemical shift value [31].

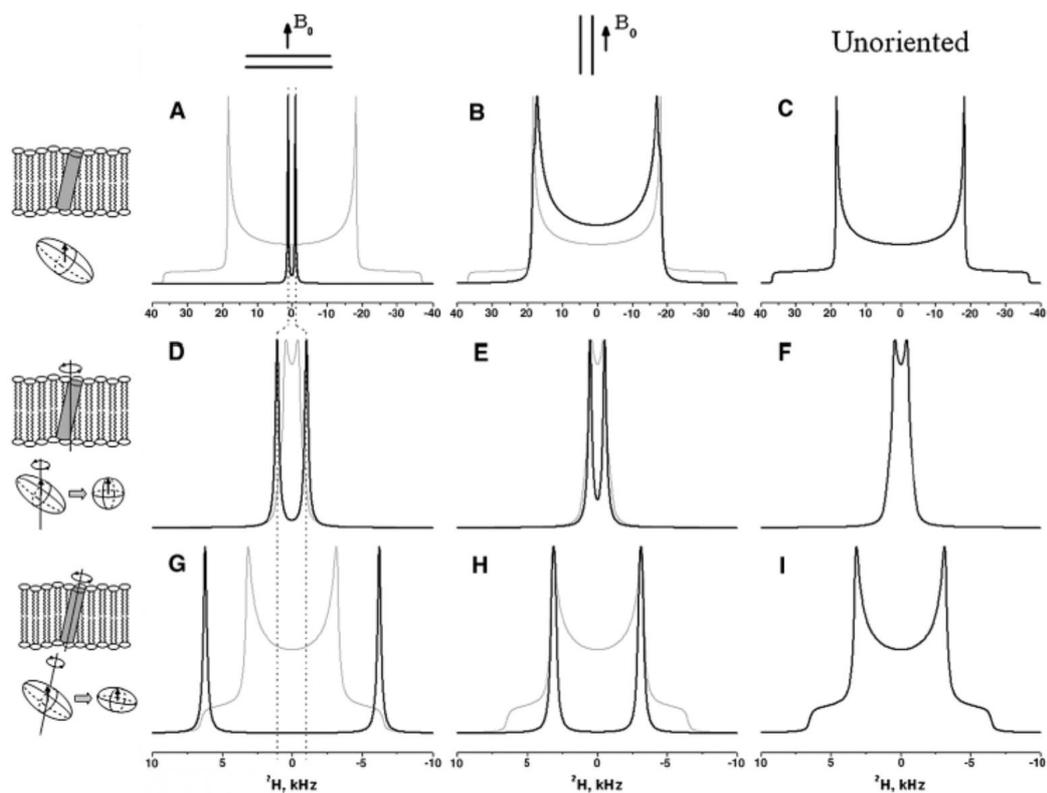
[31]. Therefore, by comparing the  $^{15}\text{N}$  resonance frequency obtained from uniaxially oriented samples ( $n \parallel B_0$ ) to the static tensor (or alternatively by comparing the averaged tensor to the static powder pattern), the tilt angle is obtained in the static case as well as in the case of rotational diffusion around the membrane normal (Fig. 3A, D). However, as discussed above, at settings with the membrane normal perpendicular to  $B_0$ , the oriented spectra are quite different when the cases of fast and slow rotational averaging around the membrane normal are compared to each other (Figs. 3B, E and 4B, E). By using this approach, averaging of the  $^{15}\text{N}$  chemical shift anisotropy, and in some instances the alanine  $^2\text{H}_3$  quadrupolar splitting, has been observed not only for transmembrane sequences such as Vpu, alamethicin or designed peptides but also for amphipathic helical peptides such as magainin or model sequences [45,89–92].

Furthermore, when the effects of motions around the helix axis are considered, the spectra shown in Figs. 3G–I and 4G–I are obtained. Here

we only show simulations for the full averaging around the helix axis but motions that correspond to fluctuation movements rather than full rotation result in outcomes intermediate between the two extremes shown in Figs. 3A–C and 4A–C and Figs. 3G–I and 4G–I, respectively.

We suspect that large amplitude motions around the helix normal are most likely to occur for transmembrane peptides with a small hydrophobic moment (i.e. low amphipathy) and/or little peptide–peptide interactions [45,90,96–98]. It is likely that in the presence of motional averaging around the helix axis the peptide exhibits enough freedom to also rotate around the membrane normal, which would introduce spectral features of both regimes. In order to facilitate the analysis of such motions, we have performed simulations that reveal the resulting spectral modifications of oriented solid-state NMR spectra (Figs. 3 and 4).

When the effect of motional averaging around the helix axis is calculated for oriented samples ( $n \parallel B_0$ ), only minor differences are



**Fig. 4.** Simulations of  $^2\text{H}$  solid-state NMR spectra of a  $10^\circ$  tilted transmembrane helical peptide,  $^2\text{H}_3$  labeled at a single alanyl methyl and reconstituted into membranes oriented with the bilayer normal parallel (A, D, G) or perpendicular to the external magnetic field (B, E, H). Panels C, F and I show spectra from non-oriented samples which are superimposed in grey onto the respective oriented spectra shown in the same row. The simulations account for rotation around the bilayer normal (D–F), or rotation around the helix axis (G–I) and are compared to the static case (A–C). The quadrupolar splitting used for simulations was 49 kHz aligned with the  $\text{C}_\alpha\text{--C}_\beta^2\text{H}_3$  bond taking into account three-site jump motions of the methyl group, librations and deviations from tetrahedral geometry [99]. Exact tensor orientations used for the simulations are  $\epsilon_{\parallel\beta} = 55^\circ$  and  $\epsilon_{\perp\alpha} = -44^\circ$ , with  $\epsilon_{\parallel\beta}$  being the angle between the  $\text{C}_\alpha\text{--C}_\beta^2\text{H}_3$  bond and the peptide axis, and  $\epsilon_{\perp\alpha}$  the angle covered by the vector connecting the helix axis and  $\text{C}_\alpha$  and the  $\text{C}_\alpha\text{--C}_\beta^2\text{H}_3$  bond projected onto a plane perpendicular to the helical axis. Please note that the quadrupolar splitting can be positive or negative and that a change of sign has occurred for panel G, the only splitting which is negative. The ellipses shown to the left of the spectra illustrate the effects of averaging on the tensor where the vector represents the measured quadrupolar splitting [31]. Please note the reduced scale in the case of motional averaging (D–I).

observed for the  $^{15}\text{N}$  chemical shift positions (Fig. 3A, G) thereby reflecting the fact that the unique tensor element  $\delta_{zz}$  of the amide chemical shift tensor (Fig. 3C;  $\delta_{xx}$ ,  $\delta_{yy}$ ,  $\delta_{zz}$  = 54 ppm, 76 ppm, 230 ppm) deviates by only a few degrees from the helix long axis [31].

In contrast, the  $\text{C}_\alpha\text{--C}_\beta^2\text{H}_3$  axis, which is also the alignment of the main tensor element of the deuterium quadrupole splitting in deuterio-methyl-alanine, covers an angle of about 55° with the helix long axis [99] and a perfectly transmembrane oriented helix would result in a close to zero quadrupolar splitting. However, any movement around the helix long axis causes considerable changes in the spectral appearance of this site (cf. Fig. 4A–C with G–I). Molecular dynamics simulations indeed indicate that averaging over an ensemble of peptide orientations as it was observed for hydrophobic model peptides, results in pronounced modifications of the  $^2\text{H}$  NMR spectra. Whereas on first view the quadrupolar splittings are suggestive of an apparently small tilt angle independent of lipid composition, i.e. even under conditions of hydrophobic mismatch, molecular dynamics simulations show considerably increased tilt angles albeit with a pronounced distribution of rotational pitch angles [97,98]. The ensemble of molecular alignments, taking into account the full distribution of tilt and rotational pitch angles observed during these simulations, allows one to back calculate the experimental deuterium NMR spectra [97,98] and the result agrees well with the tilt angle analysis from  $^{15}\text{N}$  solid-state NMR spectra [96].

In conclusion, solid-state NMR spectroscopy works with peptides and proteins reconstituted with extended lipid bilayers in their fluid phase and has been used to investigate a number of dynamic aspects including topological equilibria, lateral and rotational diffusion as well as oligomerization. It thereby helps to establish a more complete picture of the events in fluid phase membranes than structural studies alone would provide.

## Acknowledgements

The gift of labeled alamethicin by Joe D. J. O'Neil and Xing Li from the University of Manitoba, Winnipeg, Canada is most gratefully acknowledged. We are thankful to Vaincre la Mucoviscidose (TG0602), Association pour la Recherche sur le Cancer (No. 3892), the Agence Nationale pour la Recherche, the RMN Grand-Est Network, the International Center for Frontier Research in Chemistry (IFRC) and the European Commission under the 6th Framework Programme (BIOCNTROL, MCRIN – 33439) for supporting our projects. The Institute for Supramolecular Chemistry of the University of Strasbourg (ISIS) is acknowledged for hosting the laboratory.

## References

- G.E. Tusnady, Z. Dosztanyi, I. Simon, Transmembrane proteins in the Protein Data Bank: Identification and classification, *Bioinformatics* 20 (2004) 2964.
- P. Raman, V. Cherezov, M. Caffrey, The membrane Protein Data Bank, *Cell. Mol. Life Sci.* 63 (2006) 36.
- J. Heberle, J. Fitter, H.J. Sass, G. Büldt, Bacteriorhodopsin: the functional details of a molecular machine are being resolved, *Biochem. Chem.* 85 (2000) 229.
- C. Toyoshima, Ion pumping by calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum, *Adv. Exp. Med. Biol.* 592 (2007) 295.
- C. Olesen, M. Picard, A.M. Winther, C. Gyrop, J.P. Morth, C. Ovig, J.V. Møller, The structural basis of calcium transport by the calcium pump, *Nature* 450 (2007) 1036.
- B.P. Pedersen, M.J. Buch-Pedersen, J.P. Morth, M.G. Palmgren, P. Nissen, Crystal structure of the plasma membrane proton pump, *Nature* 450 (2007) 1111.
- S.J. Singer, G.I. Nicolson, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science* 175 (1972) 720.
- B. Bechinger, A dynamic view of peptides and proteins in membranes, *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2008) 3028.
- G.A. Woolley, B.A. Wallace, Model ion channels: gramicidin and alamethicin, *J. Membr. Biol.* 129 (1992) 109.
- M.S. Sansom, Alamethicin and related peptaibols—model ion channels, *Eur. Biophys. J.* 22 (1993) 105.
- B. Bechinger, Structure and functions of channel-forming polypeptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin, *J. Membr. Biol.* 156 (1997) 197.
- B. Leitgeb, A. Szekeres, L. Manczinger, C. Vagvolgyi, I. Kredics, The history of alamethicin: a review of the most extensively studied peptaibol, *Chem. Biodivers.* 4 (2007) 1027.

- L.G. Gordon, D.A. Haydon, The unit conductance channel of alamethicin, *Biochim. Biophys. Acta* 255 (1972) 1014.
- G. Boehm, Statistical analysis of alamethicin channels in black lipid membranes, *J. Membr. Biol.* 19 (1974) 277.
- N. Vedovato, G. Rispoli, A novel technique to study pore-forming peptides in a natural membrane, *Eur. Biophys. J.* 36 (2007) 771.
- W. Hanke, G. Boehm, The lowest conductance state of the alamethicin pore, *Biochim. Biophys. Acta* 596 (1980) 456.
- M.S.P. Sansom, The biophysics of peptide models of ion channels, *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 55 (1991) 139.
- R.J. Taylor, R. de Levie, "Reversed" alamethicin conductance in lipid bilayers, *Biophys. J.* 59 (1991) 873.
- I. Thøgersen, B. Schiøtt, T. Vosegaard, N.C. Nielsen, E. Tajborski, Peptide aggregation and pore formation in a lipid bilayer: a combined coarse-grained and all atom molecular dynamics study, *Biophys. J.* 95 (2008) 4837.
- E.S. Sainilov, H. Friedrich, X. Li, P. Bertani, S. Reissmann, C. Hertweck, J.D. O'Neil, J. Raap, B. Bechinger, Structure and alignment of the membrane-associated peptaibol amplitosponin A and alamethicin by oriented  $^{15}\text{N}$  and  $^{31}\text{P}$  solid-state NMR spectroscopy, *Biophys. J.* 96 (2009) 86.
- N.J. Traaseth, J.J. Buffly, J. Zamoon, G. Veglia, Structural dynamics and topology of phospholamban in oriented lipid bilayers using multidimensional solid-state NMR, *Biochemistry* 45 (2006) 13827.
- J.J. Buffly, N.J. Traaseth, A. Mazzioni, P.L. Gor'kov, E.Y. Chekmenev, W.W. Brey, G. Veglia, Two-dimensional solid-state NMR reveals two topologies of sarcoplipin in oriented lipid bilayers, *Biochemistry* 45 (2006) 10939.
- S.K. Kandasamy, D.K. Lee, R.P. Nanga, J. Xu, J.S. Santos, R.G. Larson, A. Ramamoorthy, Solid-state NMR and molecular dynamics simulations reveal the oligomeric ion-channels of TM2-GABA(A) stabilized by intermolecular hydrogen bonding, *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (2009) 686.
- K. He, S.J. Ludtke, W.T. Heller, H.W. Huang, Mechanism of alamethicin insertion into lipid bilayers, *Biophys. J.* 71 (1996) 2669.
- P. Luginbuhl, K. Wuthrich, Semi-classical nuclear spin relaxation theory revisited for use with biological macromolecules, *Prog. NMR Spec.* 40 (2002) 199.
- J.W. Peng, G. Wagner, Investigation of protein motions via relaxation measurements, *Methods Enzymol.* 239 (1994) 563.
- A. Bockmann, High-resolution solid-state MAS NMR of proteins-Crh as an example, *Magn. Reson. Chem.* 45 (2007) S24–S31.
- T.A. Egnorova-Zachernyuk, J. Hollander, N. Fraser, P. Gast, A.J. Hoff, R. Cogdell, H.J.M. de Groot, M. Baldus, Heteronuclear 2D-correlations in a uniformly  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  labeled membrane-protein complex at ultra-high magnetic fields, *J. Biomol. NMR* 19 (2001) 243.
- H. Saito, S. Tuzi, S. Yamaguchi, M. Tanio, A. Naito, Conformation and backbone dynamics of bacteriorhodopsin revealed by  $^{13}\text{C}$ -NMR, *Biochim. Biophys. Acta* 1460 (2000) 39.
- O. Soubias, V. Rest, O. Saurel, A. Milon,  $^{15}\text{N}$  T<sub>2</sub>' relaxation times of bacteriorhodopsin transmembrane amide nitrogens, *Magn. Reson. Chem.* 42 (2004) 212.
- B. Bechinger, C. Sizun, Alignment and structural analysis of membrane polypeptides by  $^{15}\text{N}$  and  $^2\text{H}$  solid-state NMR spectroscopy, *Concepts Magn. Reson.* 18A (2003) 130.
- A. Ramamoorthy, S. Thennarasu, D.K. Lee, A. Tan, L. Maloy, Solid-state NMR investigation of the membrane-disrupting mechanism of antimicrobial peptides MSI-78 and MSI-994 derived from magainin 2 and melittin, *Biophys. J.* 91 (2006) 206.
- A.J. Mason, P. Bertani, G. Moulay, A. Marquette, B. Perrone, A.F. Drake, A. Kichler, B. Bechinger, Membrane interaction of chrysophanin-1, a histidine-rich antimicrobial peptide from red sea bream, *Biochemistry* 46 (2007) 15175.
- B. Bechinger, R. Kinder, M. Helmle, T.B. Vogt, U. Harzer, S. Schinzel, Peptide structural analysis by solid-state NMR spectroscopy, *Biopolymers* 51 (1999) 174.
- K.J. Hallock, D.K. Lee, J. Omnaas, H.L. Mosberg, A. Ramamoorthy, Membrane composition determines pardaxin's mechanism of lipid bilayer disruption, *Biophys. J.* 83 (2002) 1004.
- K.J. Hallock, D.K. Lee, A. Ramamoorthy, MSI-78, an analogue of the magainin antimicrobial peptides, disrupts lipid bilayer structure via positive curvature strain, *Biophys. J.* 84 (2003) 3052.
- C. Aisenbrey, B. Bechinger, Tilt and rotational pitch angles of membrane-inserted polypeptides from combined  $^{15}\text{N}$  and  $^2\text{H}$  solid-state NMR spectroscopy, *Biochemistry* 43 (2004) 10502.
- M. Ouellet, J.D. Doucet, N. Voyer, M. Auger, Membrane topology of a 14-mer model amphipathic peptide: a solid-state NMR spectroscopy study, *Biochemistry* 46 (2007) 6597.
- R.M. Veith, C.M. Moraes, J.M. Rea-ende, C. Aisenbrey, M.P. Benqueimer, D. Rivelloso, A.P. Valente, F.C. Almeida, B. Bechinger, Structure and membrane interactions of the antibiotic peptide dermadistinctin by solution and oriented  $^{15}\text{N}$  and  $^{31}\text{P}$  solid-state NMR spectroscopy, *Biophys. J.* 96 (2009) 2194.
- S. Wu, C. Kim, Pore structure, thinning effect, and lateral diffusive dynamics of oriented lipid membranes interacting with antimicrobial peptide protegrin-1: P-31 and H-2 solid-state NMR study, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 11402.
- H.W. Huang, Y. Wu, Lipid-alamethicin interactions influence alamethicin orientation, *Biophys. J.* 60 (1991) 1079.
- F.Y. Chen, M.T. Lee, H.W. Huang, Sigmoidal concentration dependence of antimicrobial peptide activities: a case study on alamethicin, *Biophys. J.* 82 (2002) 908.
- C.L. North, M. Barranger-Matys, D.S. Caffiso, Membrane orientation of the N-terminal segment of alamethicin determined by solid-state  $^{15}\text{N}$  NMR, *Biophys. J.* 69 (1995) 2392.
- M. Bak, R.P. Bywater, M. Höbner, J.K. Thomsen, K. Adelhorst, H.J. Jakobsen, O.W. Sørensen, N.C. Nielsen, Conformation of alamethicin in oriented phospholipid bilayers determined by N-15 solid-state nuclear magnetic resonance, *Biophys. J.* 81 (2001) 1684.

- [45] B. Bechinger, D.A. Smadnev, A. Ogrci, X. Li, N.V. Swicichewa, T.V. Ovcinnikova, [D.J. O'Neil, J. Raap,  $^{15}\text{N}$  and  $^{31}\text{P}$  solid-state NMR investigations on the orientation of zearalenone II and alamethicin in phosphatidylcholine membranes, *Biochemistry* 40 (2001) 9428.
- [46] F. Porcelli, B. Buck, D.K. Lee, K.J. Hallock, A. Ramamoorthy, G. Veglia, Structure and orientation of paraxidin determined by NMR experiments in model membranes, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 45815.
- [47] S.E. Malenbaum, A.R. Merrill, E. London, Membrane-inserted colicin E1 channel domain: a topological survey by fluorescence quenching suggests that model membrane thickness affects membrane penetration, *J. Nat. Toxins* 7 (1998) 269.
- [48] C. Aisenbrey, M. Gusan, S. Lambotte, P. Jasperse, J. Georgescu, U. Harzer, B. Bechinger, Specific isotope labeling of colicin E1 and B channel domains for membrane topological analysis by oriented solid-state NMR spectroscopy, *Chem. Bio. Chem.* 9 (2008) 944.
- [49] S.E. Malenbaum, R.J. Collier, E. London, Membrane topography of the T domain of diphtheria toxin probed with single tryptophan mutants, *Biochemistry* 37 (1998) 17915.
- [50] L. Prongidi-Fix, Structural and thermodynamic investigations of membrane-associated polypeptides and peptide/DNA transfection complexes, PhD Thesis, University Louis Pasteur Strasbourg (2005).
- [51] C. Aisenbrey, U.S. Sudheendra, H. Ridley, P. Bertani, A. Marquette, S. Nedelkina, J.H. Lalely, B. Bechinger, Helix orientations in membrane-associated Bcl-X(L) determined by  $^{15}\text{N}$ -solid-state NMR spectroscopy, *Eur. Biophys. J.* 37 (2007) 71.
- [52] B. Bechinger, Towards membrane protein design: pH dependent topology of histidine-containing polypeptides, *J. Mol. Biol.* 263 (1996) 768.
- [53] B. Bechinger, J.M. Ruyschaert, E. Goormaghtigh, Membrane helix orientation from linear dichroism of infrared attenuated total reflection spectra, *Biophys. J.* 76 (1999) 552.
- [54] L. Prongidi-Fix, M. Sugawara, P. Bertani, J. Raya, C. Leboigne, A. Kichler, B. Bechinger, Self-promoted uptake of peptide/DNA transfection complexes, *Biochemistry* 46 (2007) 11253.
- [55] C. Aisenbrey, E. Goormaghtigh, J.M. Ruyschaert, B. Bechinger, Translocation of amino acyl residues from the membrane interface to the hydrophobic core: Thermodynamic model and experimental analysis using ATR-FTIR spectroscopy, *Mol. Membr. Biol.* 23 (2006) 363.
- [56] C. Aisenbrey, R. Kinder, E. Goormaghtigh, J.M. Ruyschaert, B. Bechinger, Interactions involved in the realignment of membrane-associated helices: an investigation using oriented solid-state NMR and ATR-FTIR spectroscopies, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 7708.
- [57] A.J. Mason, W. Moussaoui, T. Abdelrhman, A. Boukhari, P. Bertani, A. Marquette, P. Shooshtarizadeh, G. Moulay, N. Boehm, B. Guerois, R.J.H. Savers, A. Kichler, M.H. Metz-Boutigue, E. Candolfi, G. Prevost, B. Bechinger, Structural determinants of antimicrobial and antiplasmodial activity and selectivity in histidine rich amphipathic cationic peptides, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 119.
- [58] M. Hong, Structure, topology, and dynamics of membrane peptides and proteins from solid-state NMR spectroscopy, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 10340.
- [59] T. Doherty, A.J. Waring, M. Hong, Dynamic structure of disulfide-removed linear analogs of tachyplesin-1 in the lipid bilayer from solid-state NMR, *Biochemistry* 47 (2008) 1105.
- [60] U.H. Durr, K. Yamamoto, S.C. Im, L. Waskell, A. Ramamoorthy, Solid-state NMR reveals structural and dynamical properties of a membrane-anchored electron-carrier protein, cytochrome b(5), *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 6670.
- [61] U.H.N. Durr, L. Waskell, A. Ramamoorthy, The cytochromes P450 and b(5) and their reductases - Promising targets for structural studies by advanced solid-state NMR spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (2007) 3235.
- [62] A. Ramamoorthy, Y. Wei, D. Lee, PSEMA solid-state NMR spectroscopy, *Annual. Reports. on. NMR. Spectroscopy* 52 (2004) 1.
- [63] A. Ramamoorthy, Beyond NMR spectra of antimicrobial peptides: dynamical images at atomic resolution and functional insights, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 35 (4) (2009) 201.
- [64] J.M. Resende, C.M. Moraes, M.V. Prates, A. Cesa, F.C.L. Almeida, N.C.C.R. Mundim, A.P. Valente, M.P. Bemquerer, D. Pilo-Veloso, B. Bechinger, Solution NMR structures of the antimicrobial peptides phylosepins-1, -2, and -3 and biological activity: the role of charges and hydrogen bonding interactions in stabilizing helix conformations, *Peptides* 29 (2008) 1633.
- [65] L. Shi, N.J. Traaseth, R. Verardi, A. Cembran, J. Gao, G. Veglia, A refinement protocol to determine structure, topology, and depth of insertion of membrane proteins using hybrid solution and solid-state NMR restraints, *J. Biomol. NMR* 2009 Jul 14. [Electronic publication ahead of print].
- [66] N.J. Traaseth, L. Shi, R. Verardi, D.G. Mullen, G. Barany, G. Veglia, Structure and topology of monomeric phospholamban in lipid membranes determined by a hybrid solution and solid-state NMR approach, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106 (25) (2009) 10165.
- [67] S. Tuzi, A. Naito, H. Saito, Temperature-dependent conformational change of bacteriorhodopsin as studied by solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR, *Eur. J. Biochem.* 239 (1996) 294.
- [68] M. Kamihira, A. Watts, Functionally relevant coupled dynamic profile of bacteriorhodopsin and lipids in purple membranes, *Biochemistry* 45 (2006) 4304.
- [69] M. Kamihira, T. Vosegaard, A.J. Mason, S.K. Straus, N.C. Nielsen, A. Watts, Structural and orientational constraints of bacteriorhodopsin in purple membranes determined by oriented-sample solid-state NMR spectroscopy, *J. Struct. Biol.* 149 (2005) 7.
- [70] G.S. Husbison, S.O. Smith, J.A. Pardoan, C. Winkle, J. Lugtenburg, J. Herzfeld, R. Mathies, R.G. Griffin, Dark-adapted bacteriorhodopsin contains 13-cis, 15-syn and all-trans, 15-anti retinal Schiff bases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81 (1984) 1706.
- [71] M. Helmle, H. Patzelt, W. Gartner, D. Osterheit, B. Bechinger, Refinement of the geometry of the retinal binding pocket in dark adapted bacteriorhodopsin by heteronuclear solid-state NMR distance measurements, *Biochemistry* 39 (2000) 10066.
- [72] H. Dudaohic, O. Helluin, E. Lea, A.R. Mackie, S. Ladha, Coupling optical and electrical measurements in artificial membranes: lateral diffusion of lipids and channel forming peptides in planar bilayers, *Biol. Proc. Online* 1 (81-91) (1998) 81.
- [73] T. Heimburg, H. Seeger, A. Hac, T. Schlotzer, Diffusion in lipid membranes as studied by fluorescence correlation spectroscopy and Monte Carlo simulations, *Biophys. J.* 82 (2002) 5474.
- [74] J. Koflach, P. Schwille, W.W. Webb, G.W. Feigenson, Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy, *P. N. A. S. USA* 96 (1999) 8461.
- [75] F. Stallmach, P. Galvosas, Spin echo NMR diffusion studies, *Annu. Rep. Nmr Spectrosc.* 61 (61) (2007) 51.
- [76] C. Glaubitz, A. Watts, Magic angle oriented sample spinning (MAOS)—a new approach toward biomembrane studies, *J. Magn. Reson.* 130 (1998) 305.
- [77] G. Orad, G. Lindblom, Lateral diffusion studied by pulsed field gradient NMR on oriented lipid membranes, *Magn. Reson. Chem.* 42 (2004) 123.
- [78] F. Wunderlich, A. Ronai, V. Speth, J. Seelig, A. Blume, Thermotropic lipid clustering in tetrahymena membranes, *Biochemistry* 14 (1975) 3730.
- [79] P. Cicuta, S.L. Keller, S.J. Veatch, Diffusion of liquid domains in lipid bilayer membranes, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 3328.
- [80] A.J. Mason, A. Martinez, C. Glaubitz, O. Danos, A. Kichler, B. Bechinger, The antibiotic and DNA-transferring peptide LAH4 selectively associates with, and disorders, anionic lipids in mixed membranes, *FASEB J.* 20 (2006) 320.
- [81] K. Jacobson, O.G. Mouratzen, R.G.W. Anderson, Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics, *Nat. Cell Biol.* 9 (2007) 7.
- [82] A.K. Kenworthy, Have we become overly reliant on lipid rafts? Talking Point on the involvement of lipid rafts in T-cell activation, *Embo Reports* 9 (2008) 531.
- [83] S. Munro, Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115 (2003) 377.
- [84] C. Gillis, O. Randel, H. Casalta, E. Sackmann, R. Zom, T. Bayerl, Anisotropic motion of cholesterol in oriented DPPC bilayers studied by quasielastic neutron scattering: the liquid-ordered phase, *Biophys. J.* 77 (1999) 331.
- [85] D.R. Fooksman, M. Edidin, B.C. Barrios, Measuring rotational diffusion of MHC class I on live cells by polarized FR, *Biophys. Chem.* 130 (2007) 10.
- [86] P.G. Saffin, M. Delbruck, Brownian motion in biological membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72 (1975) 3111.
- [87] C. Li, H. Qin, F.P. Gao, T.A. Cross, Solid-state NMR characterization of conformational plasticity within the transmembrane domain of the influenza A M2 proton channel, *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (2007) 3162.
- [88] V. Wray, R. Kinder, T. Federau, P. Henklein, B. Bechinger, U. Schubert, Solution structure and orientation of the transmembrane anchor domain of the HIV-1 encoded virus protein U (Vpu) by high-resolution and solid-state NMR spectroscopy, *Biochemistry* 38 (1999) 5272.
- [89] C. Aisenbrey, P. Bertani, P. Henklein, B. Bechinger, Structure, dynamics and topology of membrane polypeptides by oriented  $^2\text{H}$  solid-state NMR spectroscopy, *Eur. Biophys. J.* 36 (2007) 451.
- [90] C. Aisenbrey, B. Bechinger, Investigations of peptide rotational diffusion in aligned membranes by  $^2\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$  solid-state NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 16676.
- [91] S.D. Cady, C. Goodman, C.D. Tatro, W.F. DeGrado, M. Hong, Determining the orientation of uniaxially rotating membrane proteins using unoriented samples: a  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , and  $^{15}\text{N}$  solid-state NMR investigation of the dynamics and orientation of a transmembrane helical bundle, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 5719.
- [92] L. Prongidi-Fix, P. Bertani, B. Bechinger, The membrane alignment of helical peptides from non-oriented  $^{15}\text{N}$  chemical shift solid-state NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 8430.
- [93] C. Aisenbrey, C. Sizun, J. Koch, M. Herget, U. Abele, B. Bechinger, R. Tampe, Structure and dynamics of membrane-associated ICP47, a viral inhibitor of the MHC I antigen-processing machinery, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 30365.
- [94] J. Frye, A.D. Albert, B.S. Selinsky, P.L. Yeagle, Cross polarization P-31 nuclear magnetic resonance of phospholipids, *Biophys. J.* 48 (1985) 547.
- [95] T. Vosegaard, K. Bertelsen, J.M. Pedersen, L. Thogersen, B. Schlotz, E. Tajkhorshid, T. Skrydstrup, N.C. Nielsen, Resolution enhancement in solid-state NMR of oriented membrane proteins by anisotropic differential linebroadening, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 5028.
- [96] U. Harzer, B. Bechinger, The alignment of lysine-anchored membrane peptides under conditions of hydrophobic mismatch: a CD,  $^{15}\text{N}$  and  $^{31}\text{P}$  solid-state NMR spectroscopy investigation, *Biochemistry* 39 (2000) 13106.
- [97] S. Ozdirekcan, C. Etchebest, J.A. Killian, P.F. Fuchs, On the orientation of a designed transmembrane peptide: toward the right tilt angle? *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 15174.
- [98] S. Esteban-Martin, J. Salgado, The dynamic orientation of membrane-bound peptides: bridging simulations and experiments, *Biophys. J.* 93 (2007) 4278.
- [99] E. Strandberg, S. Ozdirekcan, D.T. Rijkers, P.C. Van Der Weil, R.E. Koeppe, R.M. Uskamp, J.A. Killian, Tilt angles of transmembrane model peptides in oriented and non-oriented lipid bilayers as determined by  $^2\text{H}$  solid-state NMR, *Biophys. J.* 86 (2004) 3709.
- [100] E.S. Salnikow, A.J. Mason, B. Bechinger, Membrane order perturbation in the presence of antimicrobial peptides by  $^2\text{H}$  solid-state NMR spectroscopy, *Biochimie* 91 (2009) 743.
- [101] V. Vidovic, L. Prongidi-Fix, B. Bechinger, S. Weiten, Production and isotope labeling of antimicrobial peptides in *Escherichia coli* by means of a novel fusion partner that enables high-yield insoluble expression and fast purification, *J. Pept. Sci.* 15 (2009) 278.

## **RESUME**

LAH<sub>4</sub> est un peptide antibactérien de 26 acides aminés qui est capable de se complexer à l'ADN et de permettre son transfert dans les cellules eucaryotes. La structure, la topologie du peptide associé aux membranes, ainsi que ses interactions avec l'ADN ont été étudiées par RMN. Afin d'obtenir le peptide marqué uniformément en <sup>15</sup>N et/ou <sup>13</sup>C, nous avons développé une stratégie d'expression chez *E. coli* qui a permis la production de 10 mg de peptide P-LAH<sub>4</sub> purifiés (avec addition d'une proline en N-terminale) par litre de culture. Nous avons montré que malgré l'addition d'une proline, le peptide P-LAH<sub>4</sub> conserve son caractère antibactérien et transfectant d'ADN. L'étude de sa structure dans des micelles de DPC à pH= 5,5 par RMN du liquide a permis l'attribution des résonances des noyaux N<sub>H</sub>, H<sub>N</sub>, C<sub>α</sub>, C<sub>β</sub> et H<sub>α</sub> pour 90 % des résidus et a montré que le peptide adopte une conformation en hélice  $\alpha$  des résidus A4 à A23. Les études par RMN <sup>15</sup>N du solide du peptide reconstitué dans les bicouches orientées de POPC à pH= 5,5 et à pH= 6,9, indique que le peptide est orienté parallèlement à la membrane à pH= 5,5 et incliné d'environ 10 ° par rapport à la normale à la bicouche à pH = 6,9. De plus, le peptide adopte également une structure en hélice  $\alpha$  dans ces bicouches aux deux pH. La technique REDOR appliquée sur les complexes P-LAH<sub>4</sub>/ADN à pH= 5 nous apprend que les résidus lysines sont proches des noyaux <sup>31</sup>P de l'ADN, contrairement aux résidus histidines, ce qui suggère un modèle d'interaction dans lequel le peptide agirait avec l'ADN par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques via ses extrémités. Le marquage sélectif en <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N sur chacune des quatre lysines séparément révèle que les lysines 2, 24 et 25 ont un environnement assez similaire en <sup>31</sup>P. De plus, 90 % des noyaux <sup>15</sup>N $\epsilon$  des lysines 2 et 24 se trouvent proches des noyaux <sup>31</sup>P, contrairement à la lysine 25 (40 %). Ceci suggère que les lysines 2 et 25 sont les résidus « moteurs » dans l'interaction avec l'ADN.

**Mots-clés :** peptide amphipathique, expression chez *E. coli*, purification, Résonance Magnétique Nucléaire, REDOR, structure, topologie, mécanisme antibactérien, mécanisme de transfection, interactions macromoléculaires.