

Université de Montréal

**Étude des mécanismes moléculaires de formation des pores des toxines formeuses
de pores par la spectroscopie de fluorescence**

Par

Nicolas Groulx

Département de Physique, Université de Montréal
Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures
En vue de l'obtention du grade de doctorat
En Physique
Option Biophysique et physiologie moléculaire

Août 2012

©, Nicolas Groulx, 2012

Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Étude des mécanismes moléculaires de formation des pores des toxines formeuses
de pores par la spectroscopie de fluorescence**

Présentée par :

Nicolas Groulx

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Yves Lapointe

président-rapporteur

Rikard Blunck

directeur de recherche

Lucie Parent

membre du jury

Michèle Auger

examineur externe

Antonella Badia

représentant du doyen

SOMMAIRE

Les toxines formeuses de pore (PFTs) sont des protéines exogènes responsables d'un grand nombre de maladies infectieuses qui perméabilisent les membranes cellulaires de leur hôte. La formation des pores ou l'introduction d'une enzyme dans le cytoplasme peut entraîner l'apparition de symptômes de maladies connues (l'anthrax, le botulisme) et, dans le pire des cas, la mort. Les mécanismes d'infection et de destruction des cellules infectées sont bien caractérisés. Toutefois, l'aspect dynamique des changements de conformation durant le processus de perméabilisation reste à découvrir pour la majorité des toxines formeuses de pore. Le but de cette thèse est d'étudier les mécanismes d'oligomérisation des PFTs, ainsi que la formation des pores à la membrane lipidique grâce à la spectroscopie de fluorescence. Nous avons choisi la toxine Cry1Aa, un bio pesticide produit par le bacille de *Thuringe* et qui a été rigoureusement caractérisé, en tant que modèle d'étude.

La topologie de la Cry1Aa à l'état actif et inactif a pu être résolue grâce à l'utilisation d'une technique de spectroscopie de fluorescence, le FRET ou transfert d'énergie par résonance entre un fluorophore greffé au domaine formeur de pore (D1) et un accepteur non fluorescent (le DPA ou dipicrylamine) localisé dans la membrane et qui bouge selon le potentiel membranaire. Le courant électrique, ainsi que la fluorescence provenant de la bicouche lipidique membranaire horizontale ont été enregistrés simultanément. De cette manière, nous avons pu localiser toutes les boucles reliant les hélices de D1 avant et après la formation des pores. Dans la forme inactive de la toxine, toutes ces boucles se trouvent du côté interne de la bicouche lipidique, mais dans sa forme active l'épingle $\alpha 3$ - $\alpha 4$ traverse du côté externe, alors que toutes les autres hélices demeurent du côté interne. Ces résultats suggèrent que $\alpha 3$ - $\alpha 4$ forment le pore.

Nous avons découvert que la toxine change significativement de conformation une fois qu'elle se trouve dans la bicouche lipidique, et que la Cry1Aa attaque la membrane lipidique de l'extérieur, mais en formant le pore de l'intérieur. Dans le but de caractériser la distribution de toxines à chaque extrémité de la bicouche, nous avons utilisé une technique de double FRET avec deux accepteurs ayant des vitesses de

translocation différentes (le DPA et l'oxonol) dans la membrane lipidique. De cette manière, nous avons déterminé que la toxine était présente des deux côtés de la bicouche lipidique durant le processus de perméabilisation.

La dynamique d'oligomérisation de la toxine dans une bicouche lipidique sans récepteurs a été étudiée avec une technique permettant le compte des sauts de fluorescence après le photoblanchiment des fluorophore liés aux sous unités composant un oligomère présent dans la bicouche lipidique supportée. Nous avons confirmé de cette manière que la protéine formait ultimement des tétramères, et que cet état résultait de la diffusion des monomères de toxine dans la bicouche et de leur assemblage subséquent.

Enfin nous avons voulu étudier le « gating » de la colicine Ia, provenant de la bactérie *E.Coli*, dans le but d'observer les mouvements que font deux positions supposées traverser la bicouche lipidique selon le voltage imposé aux bornes de la bicouche. Nos résultats préliminaires nous permettent d'observer un mouvement partiel (et non total) de ces positions, tel que le suggèrent les études de conductances du canal.

Mots clefs : toxines, pore, bicouche lipidique, FRET, Cry1Aa, colicine Ia, spectroscopie de fluorescence, DPA, TMRM, Oxonol

SUMMARY

Pore forming toxins (PFTs) are exogenous often pathogenic proteins that permeabilize the host membrane. Permeabilization or subsequent introduction of an enzyme leads to health disorders and sometimes death. Although the fundamental infection and destruction mechanisms are known, the underlying molecular basis and their link to the structural information remains undetermined for many pore forming toxins. The purpose of this thesis was to study the mechanisms of oligomerization on the membrane and pore formation of PFTs using fluorescence spectroscopy in planar lipid bilayer. We chose Cry1Aa as the most intensively studied member of *Bacillus thuringiensis*'s toxins.

In order to probe the topology both in inactive and active conformation, we used *Förster* resonance energy transfer (FRET) between a fluorophore site-directedly attached to different positions in the pore forming domain (D1) of Cry1Aa toxin and an acceptor compound dipicrylamine (DPA) in the membrane, which moves in response to the membrane potential. Electrical current and fluorescence emission from planar lipid bilayers in a horizontal configuration were simultaneously recorded. We probed all loops between the seven α helices of D1. All of them were located on the inner leaflet of the bilayer prior to pore formation. In the active form, the $\alpha3$ - $\alpha4$ hairpin were found to translocate back to the outer leaflet of the bilayer, whereas all other positions remained in the inner leaflet, suggesting that $\alpha3$ - $\alpha4$ are the pore lining helices.

The toxins undergo significant conformational changes once they enter the host membrane, and we found Cry1Aa to attack from the exterior but translocate to the interior. To estimate the distribution of the toxins on either side of the membrane, we used the double-FRET technique. Here, two different acceptors (DPA and oxonol) with different dynamics (time constants) allowed us to determine that approximately equal amounts of the toxin were present on either leaflet during the permeabilization process.

We also studied the oligomerization mechanism of Cry1Aa toxins inserted into supported lipid bilayers using a single subunit counting technique based on the step-wise

photodestruction (bleaching) of the attached fluorophores. This system allowed determining the number of subunits composing each oligomer. We found that oligomerization is a highly dynamic process which occurs after insertion into the bilayer by lateral diffusion. The final (likely the pore forming) entity of the toxin is tetrameric.

Finally, we used the same FRET approach to investigate the gating process of two positions of the pore forming domain of colicin Ia, an antibiotic toxin produced by *E. coli*. These positions were suspected to translocate reversibly from the outer to the inner leaflet during the gating process. In preliminary results, we found that these positions are moving between the two leaflets of the bilayer during pore formation.

Keywords: toxins, pore, lipid bilayer, FRET, Cry1Aa, colicin Ia, fluorescence spectroscopy, DPA, TMRM, Oxonol

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE	iii
SUMMARY	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES SYMBOLES ET DES ABRÉVIATIONS	xv
REMERCIEMENTS	xvii
I : INTRODUCTION	2
1. Les toxines formeuses de pores	3
1.1. Les techniques d'étude	5
1.1.1. L'électrophysiologie en voltage imposé	5
1.1.1.1. L'électrophysiologie en bicouche lipidique membranaire plane (BLM)	5
1.1.2. La spectroscopie de fluorescence	8
1.1.2.1. Le phénomène de luminescence	8
1.1.2.2. Le phénomène de fluorescence : concept général	9
1.1.2.3. La fluorescence : point de vue quantique	10
1.1.2.4. Le « quenching »	11
1.1.2.5. Le photoblanchiment	12
1.1.2.6. L'effet du solvant polaire	12
1.1.2.7. Le phénomène du FRET	13
1.1.2.8. Les fluorophores	15
1.2. La toxine Cry1Aa	16
1.2.1. Structure de la Cry1Aa	18
1.2.2. Le mécanisme d'insertion et de formation du pore	19
1.2.3. Les modèles d'insertion de la Cry1Aa	20
1.2.3.1. Le modèle du parapluie	20

1.2.3.2. Le modèle du canif	22
1.2.3.3. Le modèle du dragon enfoui	23
1.2.4. Les modèles d'oligomérisation de la Cry1Aa	24
1.3. La colicine Ia	26
1.3.1. Structure de la colicine Ia	27
1.3.2. Le « gating » de la colicine Ia	28
1.3.3. Les modèles de formation des pores	28
1.4. Étude de la topologie d'autres toxines	32
1.4.1. L'anthrax	32
1.4.2. Les cytosilines dépendantes du cholestérol	34
1.4.3. La toxine diphtérique	36
1.4.4. L'aérolysine	38
1.4.5. Les techniques en résumé	40
1.5. Hypothèses et objectifs	40
II : MÉTHODOLOGIE	45
2.1. Cry1Aa : matériel et méthode	46
2.1.1. Montage expérimental pour le FRET	46
2.1.2. Montage expérimental des tests de photoblanchiment en bicouche supportée	47
2.1.3. Conditions expérimentales particulière à l'étude de la Cry1Aa	49
2.1.3.1. Les fluorophores TMR, fluoresceine, DPA, oxonol et ANEP	49
2.2. Colicine Ia : matériel et méthode	52
2.2.1. Les solutions expérimentales	52
2.2.2. Le marquage des mutants	53
2.2.3. Composition des lipides des bicouches membranaires	53
2.2.4. Protocole expérimental	53

3 : RÉSULTATS et ANALYSES	54
3.1. Article 1.....	57
Abstract	58
Introduction	59
Materials and Methods	61
Results	64
Discussion	75
Acknowledgements	79
Appendix	80
Supplementary material.....	87
Figures and legends.....	88
References	101
3.2. Article 2.....	105
Abstract	105
Introduction	106
Materials and Methods	108
Results	111
Discussion	117
Acknowledgements	120
References	121
Figures and legends.....	125
Supplementary material.....	133
3.3. Résultats sur le « gating » de la colicine 1a	137
3.3.1. Les caractéristiques électriques des pores	137
3.3.2. La mutation S402C.....	138
3.3.3. Les mutations K511C et K524C	139
3.3.4. Court changement de potentiel membranaire.....	140

4 : DISCUSSION	143
4.1. Discussion sur la Cry1Aa.....	144
4.1.1. Le simple FRET révèle une internalisation de la toxine.....	144
4.1.1.1. Plusieurs modèles peuvent indiquer différentes conformations du pore.....	146
4.1.1.2. La topologie des domaines II et III.....	147
4.1.2. Le double FRET explique le faible $\Delta F/F$	148
4.1.3. Avantages et inconvénients.....	155
4.1.3.1. Dans le système de FRET.....	155
4.1.3.2. Dans le système de double FRET.....	157
4.1.4. L'oligomérisation de la Cry1Aa en tétramère.....	157
4.1.4.1. Retour sur les résultats de photoblanchiment.....	157
4.1.4.2. Modèle d'oligomérisation.....	164
4.1.4.3. Faiblesses du système de photoblanchiment.....	165
4.1.5. Développements futures.....	166
4.1.5.1. Topologie de la Cry1Aa.....	166
4.1.5.2. Étude sur l'oligomérisation.....	167
4.2. Discussion sur la colicine Ia.....	168
4.2.1. Effet des longues hyperpolarisations sur la corrélation de la fluorescence avec le courant.....	168
4.2.2. Le mouvement de K511 est mis en évidence pendant de plus courtes dépolarisations.....	170
4.2.3. Perspectives.....	171
5 : CONCLUSION	174
BIBLIOGRAPHIE	xviii
APPENDICE	xxxiv

LISTE DES TABLEAUX

Article 2

Table 1: Summary of the results.....135

DISCUSSION

Tableau 3.1. : Comparaison des taux de variation moyens de courant et de fluorescence durant l'ouverture et la fermeture des canaux pour un court temps de dépolarisation.141

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1.1 :	Les étapes générales de la formation des pores	3
Figure 1.2. :	Montage permettant d'étudier les caractéristiques électrophysiologiques des BLMs.....	7
Figure 1.3 :	Diagramme de Jablonski	9
Figure 1.4. :	Déplacement de Stokes	10
Figure 1.5. :	Efficacité de transfert énergétique en fonction de R_0	14
Figure 1.6. :	Structure cristalline de la Cry1Aa	18
Figure 1.7. :	Étapes menant à la formation du pore par la Cry1Aa	19
Figure 1.8. :	Différents modèles d'insertion de la Cry1Aa.....	20
Figure 1.9. :	Image en AFM du pore de la Cry1Aa.....	25
Figure 1.10. :	Structure cristalline de la colicine Ia.....	27
Figure 1.11. :	États ouvert et fermé de la colicine Ia.....	28
Figure 1.12. :	Description des états ouvert et fermé de la colicine Ia.....	30
Figure 1.13. :	Modèle toroïdal	31
Figure 1.14. :	Modèle du champignon pour la formation du pore par le PA.....	33
Figure 1.15. :	Étapes menant à la formation d'un pore par l'association de monomères de PFOs.	34
Figure 1.16. :	Conformation de la toxine diphtérique dans la membrane lipidique	37
Figure 1.17. :	Mode d'action de l'aérolysine	38
Figure 1.18. :	Boucle transmembranaire du domaine III de l'aérolysine	39
Figure 1.19. :	Caractéristiques du DPA	42
Figure 1.20. :	Marquage du domaine I de la Cry1Aa	43
Figure 1.21. :	Marquage du domaine formeur de pore de la colicine Ia.....	44

MÉTHODOLOGIE

Figure 2.1. :	Montage expérimental de FRET en BLM.....	46
---------------	--	----

Figure 2.2 :	Montage expérimental de stepbleaching en bicouche supportée	48
Figure 2.3. :	Structures du TMRM et de la fluorescéine	50
Figure 2.4. :	Spectres du TMRM et de la fluorescéine	50
Figure 2.5. :	Structures et spectres du DPA et de l'oxonol.....	51
Figure 2.6. :	Structure et spectres de di-8-ANEPPS	52

RÉSULTATS et ANALYSES

3.1. Article 1

Figure 1 :	Fluorescence topology assay	88
Figure 2 :	FRET signals of Cry1Aa mutants	89
Figure 3 :	Translocation of the α 3- α 4 hairpin.....	90
Figure 4 :	Confocal z-scan of labeled toxin in the bilayer.....	91
Figure 5 :	Double FRET experiments.....	92
Figure 6 :	The proposed mechanism of pore formation	93
Figure 7 :	Transient concentration decrease during translocation	94
Figure 8 :	Simulated double FRET responses	95
Supp. 9 :	FRET from oxonol to DPA	96

3.2. Article 2

Figure 1 :	Single toxin detection using fluorescence.....	127
Figure 2 :	Experimental distributions of photobleaching steps	128
Figure 3 :	Binomial Distributions	129
Figure 4 :	Theoretical model.....	130
Supp. 1 :	Experimental distributions in POPE-POPC	131
Supp. 2 :	Poisson Probability Density Function	132

3.3. Résultats sur la colicine Ia

Figure 3.1.:	Caractéristiques électrophysiologiques du pore de la colicine Ia	137
--------------	--	-----

Figure 3.2. :	Traces de courant et de fluorescence de S402C.....	138
Figure 3.3. :	Traces de courant et de fluorescence de K511C et K524C.....	139
Figure 3.4. :	Traces de courant et de fluorescence de K511C pendant de plus courtes pulsations	140

DISCUSSION

Figure 4.1. :	Fluorescence des domaines II et III Comparaison	147
Figure 4.2. :	Fluorescence du FRET et du double FRET	150
Figure 4.3. :	Positions du fluorophore en FRET donnant un signal semblable	151
Figure 4.4. :	Étapes de formation du pore de la diphtérie.....	153
Figure 4.5. :	Mécanismes de formation des pores	154
Figure 4.6 :	Saturation de fluorescence en bicouche supportée.....	159
Figure 4.7. :	Distribution des oligomères en fonction de la concentration de Cry1Aa utilisée	159
Figure 4.8. :	Distribution du F50C incubé dans des vésicules de DPhPC.....	161
Figure 4.9. :	État saturant de photoblanchiment des oligomères de Cry1Aa	163
Figure 4.10. :	Différence entre la microscopie conventionnelle et le TIRF	168

APPENDICE

Figure A1 :	Spectroscopie ATR	xxxviii
Figure A2 :	États ouvert et fermé de la colicine Ia	xliiii
Figure A3 :	Résidus de α 8- α 9 faisant face au lumen du pore de la colicine Ia .	xliv

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABRÉVIATIONS

A	Accepteur ou Absorbance ou Ampère
Å	Angstrom
ALP	Alkaline-phosphatase
AMP	Adénosine monophosphate
ANEP	AminoNaphthylEthenylPyridinium
ATP	Adénosine triphosphate
APN	Aminopeptidase N
BBM	Brush border membrane
BLM	Bicouche lipidique membranaire
BODIPY	<i>N</i> -(4,4-difluoro-5,7-diméthyl-4-bora-3a,4a-diaza- <i>S</i> -indacene-3-yl)méthyl)iodoacetamide
c	Concentration
Ca	Calcium
cal	calorie
CDC	Cytosiline dépendante du cholestérol
C_m	Capacitance membranaire
Cl	chlore
DPA	Dipicrylamine
DPhPC	1,2-di-(3,7,11,15-tétraméthylhexadécanoyl)- <i>sn</i> -glycéro-3phosphocholine
D	donneur
DiSBAC2	Bis-(1,3-diéthylthiobarbituric acid) oxonol
DT	Diphtheria toxin
E	Efficacité de transfert énergétique
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
EF	Facteur œdémateux
EMCCD	Electron-multiplicative charge-coupled device
EOL	Efficiency of labelling
ET	Energy transfert
F	Intensité de Fluorescence

FM	Fluorescein-maleimide
FQRNT	Fond de recherche en nature et technologie du Québec
FRET	Forster resonance energy transfert
G	Conductance
g	gramme
GEPROM	Groupe d'étude des protéines membranaires
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
H	Hydrogène
HB-EGF	Heparin Binding EGF-like growth factor
Hepes	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
h ν	Énergie du photon
IAEDANS	Acide 5-({2-[(iodoacétyl)amino]éthyl} amino)naphthalène-1-sulfonique
K	Potassium
l	litre
Q	Rendement quantique
LF	Facteur létal
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
Mol	Mole
MTSEA	2-((Biotinoyl)amino)ethyl methanethiosulfonate, <i>N</i> -Biotinylaminoethyl methanethiosulfonate
MTS-ET	méthanethiosulfonate ethyltrimethylammonium
N _A	Nombre d'Avogadro
Na	Sodium
NMDG	N-methyl-D-glucamine-Cl
NBD	Nitrobenzoxadiazole
O	Oxygène
Ox	Oxonol
PA	Antigène de protection
p _K	Perméabilité au potassium
PFT	Pore forming toxin
PFO	Perfringolysine

POPC	Palmitoyl-oleyl- <i>sn</i> -phosphatidylcholine
POPE	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
POPG	1-hexadecanoyl-2-(9Z-octadecenoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'-rac glycerol)
q	quenching
R	Constante des gaz parfaits
Rh	Rhodamine
R ₀	Distance de Förster
S	Siemens
s	seconde
SCAM	Substituted Cystein Accessibility Method
SD	Déviation standard
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide <i>gel</i> electrophoresis
TIRF	Total internal reflection fluorescence
TMRM	Tétraméthylrhodamine-5-maléimide
V	Volt
W	Watt
WT	Wild-type (toxine sauvage)
Z	Potentiel électrochimique
k _T (r)	Taux de transfert
R ₀	Distance de Forster
ε	Coefficient d'extinction molaire, ou permittivité d'un milieu
τ _D	temps de vie du donneur
λ	Longueur d'onde
Γ	Taux d'émission d'un fluorophore
Σ	Conductivité
Θ	Diamètre de l'ouverture de la membrane de téflon

REMERCIEMENTS

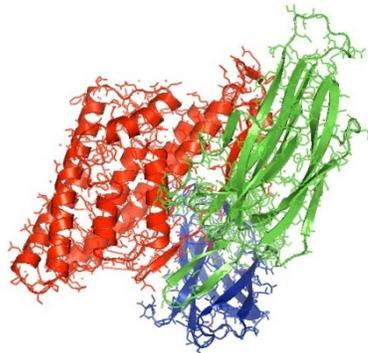
En premier lieu, j'aimerais remercier très chaleureusement mon directeur de recherche, Dr. Rikard Blunck. Grâce à lui, j'ai une solide formation qui a développé mon autonomie, ma rigueur scientifique et ma passion pour la biophysique. Son soutien et sa présence m'ont permis de terminer dans les temps ce travail et je dois avouer que je suis fier d'avoir pu me rendre jusqu'au bout de ma formation.

Je tiens également à remercier mes collègues de laboratoire : Hugo, Élise, Georges et Mireille. Ils ont été de très bons conseils et mes discussions avec eux m'ont permis d'apporter de belles réflexions sur mon travail. Ils ont été également de très bon support dans les temps sombres de ma thèse.

Évidemment, je tiens à aussi à saluer et remercier toute ma famille qui fut présente étape par étape du début de ma maîtrise à la fin de mon doctorat. Leur soutien et leur présence fut d'une grande importance dans l'accomplissement de mon travail.

Enfin, j'aimerais remercier chaleureusement les membres de mon jury : les Dr. Rikard Blunck, Lucie Parent, Jean-Yves Lapointe et Michèle Auger, d'avoir bien voulu prendre de leur temps pour évaluer ma thèse de doctorat.

INTRODUCTION



L'intérêt de l'étude des toxines réside dans leur omniprésence dans notre environnement. Du point de vue de la santé, elles peuvent être responsables de maladies infectieuses telles l'anthrax (par la toxine de la bactérie du bacille du charbon), le botulisme (de la toxine botulique) ou encore le tétanos (de la toxine tétanique). Elles peuvent servir dans nos cosmétiques, comme le botox (de la toxine botulique). On les retrouve dans certains traitements médicaux, comme la colicine 1a qui agit comme antibiotique. On les retrouve même dans nos pesticides, comme les toxines Cry (Alouf & Freer, 2006).

Les interactions de ces complexes protéiques à la surface des membranes des cellules qu'elles infectent sont grandement étudiées. Les méthodes de spectroscopies et d'électrophysiologies ont d'ailleurs permis d'établir, par exemple, quels domaines peuvent se lier à la membrane lipidique, lesquels s'y insèrent et quelles parties de ces domaines sont susceptibles de la traverser.

Toutefois ces méthodes n'ont pas été optimisées pour pouvoir observer la dynamique des mécanismes d'insertion et, s'il y a lieu, de perméabilisation.

Nous nous proposons dans cette étude d'étudier les mécanismes dynamiques de formation des pores de la toxine Cry1Aa (un pesticide biologique) et de la colicine 1a (une toxine antibiotique) par une technique de spectroscopie de fluorescence couplée à une technique d'électrophysiologie. De cette manière, la topologie du domaine formeur de pore durant le processus pourra être observée.

Dans un deuxième temps, la dynamique d'oligomérisation de la toxine Cry1Aa sera étudiée par une technique de spectroscopie de fluorescence basée sur le photoblanchiment.

La section introduction qui suit décrit les toxines formeuses de pores, particulièrement les toxines Cry1Aa et colicine 1a. Une revue de leurs modèles d'insertions sera proposée. Les principes de spectroscopie de fluorescence et d'électrophysiologie

nécessaires pour comprendre les expériences de cette thèse seront par la suite introduites. Ensuite, une brève revue sur les techniques d'études des mécanismes de formation des pores produites sur d'autres toxines formeuses de pore sera suggérée dans le but de mettre en évidence les limitations de ces techniques par rapport à celles que nous proposons dans cette étude.

Enfin, les hypothèses et objectifs de cette thèse seront amenés.

1. Les toxines formeuses de pores

Les toxines formeuses de pore sont des protéines produites par une grande variété de bactéries (l'anthrax, de *Bacillus anthracis*), d'insectes (la toxine mellitin de l'abeille par exemple) ou de plantes (la toxine 1,8-cineole contenue dans l'huile d'*Eucalyptus*) (Alouf & Freer, 2006). Ces toxines ciblent les membranes lipidiques des cellules hôtes et provoquent la formation de pores dans le but de permettre à un agent infectieux de pénétrer à l'intérieur de la cellule, ou encore, de causer sa lyse complète. La connaissance du mécanisme de formation de ces pores est d'une importance fondamentale, car à la base, c'est le processus par lequel la majorité des infections provoquées par ces toxines est possible. **Afin de savoir comment une toxine agit, il faut savoir comment le pore se forme et se comporte une fois incorporé dans la membrane cellulaire.**

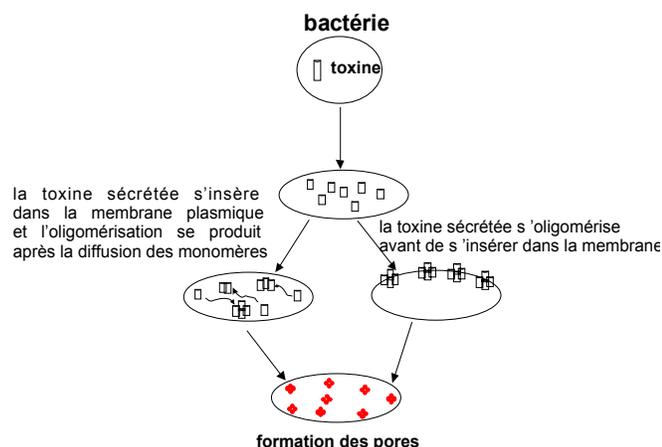


Figure 1.1. : Les étapes générales de la formation des pores : les bactéries produisent les toxines. Celles-ci vont se lier après diffusion dans la membrane plasmique ou vont former un pré-pore avant de se lier à la bicouche lipidique. La formation du pore survient ultimement.

Comme leur nom l'indique, les toxines formeuses de pores (PFT) forment des pores à la surface des membranes lipidiques (figure 1.1.), ce qui affecte sévèrement l'homéostasie de la cellule touchée. La structure des PFTs ainsi que leurs différents modes d'action sont bien documentés. Toutefois, le mécanisme moléculaire de la formation du pore demeure peu connu. Les techniques de spectroscopie, de microscopie et l'apport nouveau de la modélisation informatique sont autant d'outils qui permettent d'apporter plus de lumière sur la formation des pores et leur rôle dans la toxicité cellulaire.

Les PFTs se divisent en deux familles structurales : les α -PFTs et les β -PFTs. Les α -PFTs possèdent généralement au moins un domaine structuré en hélices α , agencées de manière à emprisonner une épingle hélicoïdale hydrophobe au sein des autres hélices. Les β -PFTs sont riches en feuillets β et contiennent peu de résidus hydrophobes dans leur structure primaire (Parker & Feil, 2005). Dans ce cas-ci, l'association des sous unités de toxines entre elles permet l'agencement de plusieurs feuillets β pour permettre la formation d'un barillet à la surface de la membrane plasmique (Gonzalez *et al.*, 2008).

On distingue deux mécanismes généraux de formation des pores (voir figure 1.1) :

Dans le premier, des monomères de toxines se lient à la surface membranaire, et suite à une baisse de pH, à une interaction hydrophobe ou à une interaction électrostatique, s'insèrent dans la bicouche lipidique et diffusent dans la membrane. Les monomères s'oligomérisent ensuite pour former un pore. C'est le mécanisme retrouvé chez les toxines formeuses de pores à activité dite cytolytique (Alouf & Freer, 2006).

Dans le second mécanisme, les monomères s'oligomérisent à la surface membranaire et forment un pré-pore qui s'insère dans la membrane suite à une baisse de pH et sert de passage à une composante toxique dans la cellule hôte. On retrouve ce mécanisme chez les PFTs faisant partie du groupe de toxines à activité cytotoxique (ou super groupe AB). Les α -PFTs s'oligomérisent en général avec moins de sous-unités (au plus une dizaine) alors que les β -PFTs peuvent en contenir jusqu'à plusieurs dizaines par barillet. Les toxines se lient soit à un récepteur spécifique, un peptide ou une composante de la

membrane (par exemple le cholestérol), soit simplement aux lipides en absence de récepteurs (Bayley *et al.*, 2005; Geny & Popoff, 2006; Alouf & Freer, 2006).

1.1. Les techniques d'étude

Plusieurs techniques d'études sont utilisées abondamment dans le cadre de l'étude des modèles d'insertion des toxines dans les bicouches lipidiques, sans pouvoir suivre le processus dynamique de la perméabilisation membranaire. Certaines d'entre elles, comme l'électrophysiologie en voltage imposé et la spectroscopie de fluorescence, peuvent être optimisées et couplées de manière à pouvoir étudier ce phénomène sous cet angle.

1.1.1. L'électrophysiologie en voltage imposé

Les méthodes d'électrophysiologie consistent à mesurer le flux ionique de part et d'autre d'une membrane biologique. On peut utiliser cette approche pour étudier des canaux membranaires insérés dans des bicouches artificielles en utilisant deux électrodes, l'une permettant de porter un côté de la membrane à un potentiel choisi alors que l'autre garde l'autre côté de la membrane à la masse. Idéalement, il faudrait étudier les caractéristiques des pores produits par une PFT dans son environnement physiologique, la cellule. Le patch clamp est une technique toute indiquée qui consiste à mettre en continuité électrique une micropipette de verre remplie d'une solution ionique définie avec la membrane d'une cellule vivante isolée. La résistance de la jonction pipette/membrane lipidique en parallèle avec la résistance membranaire ($R_m > 10^9 \Omega$) isole électriquement la portion de membrane du reste de la cellule. Le plus grand avantage de cette technique est de pouvoir détecter un très petit nombre de canaux dans la zone démarquée par l'extrémité de la pipette, sauf dans la configuration «whole cell», qui permet l'enregistrement en macrocourants de tous les canaux présents sur la membrane de la cellule. Toutefois, de par l'important bruit de fond en fluorescence qu'occasionneraient tous les autres composants indissociables de la cellule, il est préférable d'opter pour un environnement plus simple comme les bicouches lipidiques.

1.1.1.1. L'électrophysiologie en bicouche lipidique membranaire plane (BLM)

Les premières bicouches lipidiques planaires ont été formées en 1962 (Mueller *et al.*, 1962). La technique consiste à solubiliser une quantité de lipides dans un solvant non

polaire et stable (par exemple, le décane ($C_{10}H_{22}$) ou l'hexadécane ($C_{16}H_{34}$), qui font partie de la famille des alcanes). En utilisant la technique qui consiste à peindre et brosser les lipides sur une partition de téflon ayant un orifice (typiquement entre quatre-vingts et quelques centaines de microns) en son centre, on assista à la formation de la bicouche lipidique (Mueller *et al.*, 1962; Henn & Thompson, 1969). Les pôles hydrophobes des lipides vont s'orienter l'intérieur et les têtes polaires vont faire face au solvant. (Sharp *et al.*, 1991). Pendant ce temps, le solvant se réorganisera également pour se répartir en un tore autour de la partition de téflon et de la bicouche lipidique (Leitmannova, 2003). L'épaisseur de la bicouche variera en fonction de la structure des lipides utilisés, mais surtout en fonction du solvant. Typiquement, une bicouche de POPC (palmitoyl-oleyl-*sn*-phosphatidylcholine) solubilisée dans du n-décane ($C_{10}H_{22}$), permettra la formation d'une bicouche d'environ 50 Å d'épaisseur (Hanai *et al.*, 1965). L'utilisation d'un autre solvant organique, comme l'hexadécane ($C_{16}H_{34}$) permettra d'obtenir des bicouches lipidiques plus minces. La raison provient en grande partie du fait qu'il restera un peu de molécules de décane entre les feuillettes des phospholipides lorsque la bicouche va se former, alors que dans le cas de l'hexadécane, qui est une molécule plus grande, la presque totalité du solvant va se retrouver dans le tore d'hexadécane, en dehors de la bicouche (Leitmannova, 2003).

Parmi les approches électrophysiologiques, on peut distinguer les méthodes en courant imposé et en voltage imposé. Dans le premier cas, cette méthode permet de mesurer le potentiel membranaire causé par un courant appliqué. On peut aussi l'utiliser en voltage imposé, c'est-à-dire que l'on contrôle le voltage et l'on mesure le courant transmembranaire nécessaire pour maintenir ce potentiel (Hodgkin *et al.*, 1952; Schwarz & Rettinger, 2000).

Les bicouches lipidiques (BLMs) sont des environnements très stables et efficaces pour étudier les PFTs. Les tests en BLM permettent de contrôler la composition des solutions de part et d'autre de la membrane et de mesurer l'activité électrique des canaux insérés dans les BLMs par des méthodes d'électrophysiologie. (figure 1.2).

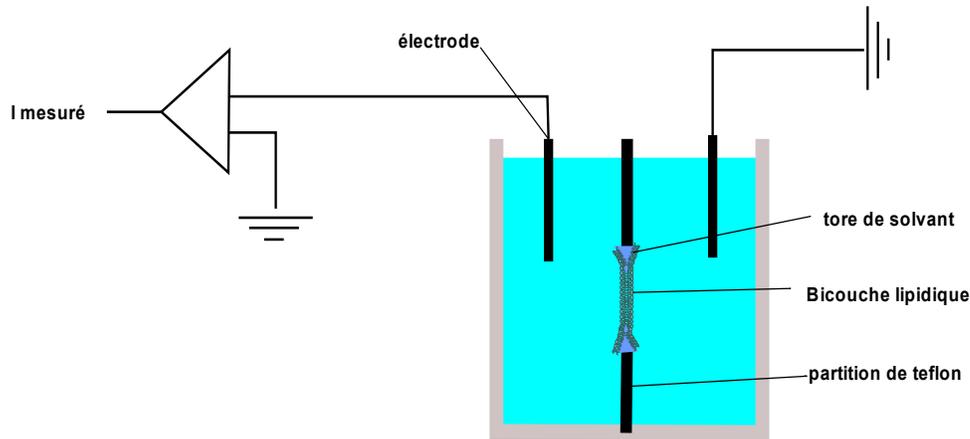


Figure 1.2 : Montage permettant d'étudier les caractéristiques électrophysiologiques des BLMs. Deux bains séparent chacun des deux feuillettes de la bicouche et une électrode d'injection fait varier le potentiel membranaire tandis que l'autre côté est mis à la masse.

Comme on peut le constater dans la figure 1.2, le système de deux compartiments séparés par une partition de téflon est électriquement fermé par la bicouche lipidique, imperméable aux ions contenus dans les solutions des bains (Mueller & Rudin, 1963).

Le système se comporte comme un condensateur plan dans lequel les solutions d'électrolytes des deux côtés de la membrane sont des disques conducteurs très rapprochés et la membrane joue le rôle du diélectrique. La capacitance de la membrane dépend donc de sa surface, de son épaisseur et de la constante diélectrique de la membrane. On peut donc approximer la capacitance théorique des membranes de lipides pour nos expériences à :

$$C_m = \frac{\pi a^2 \epsilon \epsilon_0}{d} (1)$$

C_m est la capacitance de la membrane, ϵ_0 est la permittivité du vide ($8,85 \times 10^{-12} \text{ Fm}^{-1}$), ϵ est la constante diélectrique de la membrane (évaluée entre 2 et 80 respectivement pour les lipides et l'eau), a est le rayon de la bicouche lipidique, d est la distance entre les deux feuillettes de la bicouche lipidique (Norgren & Jonsson, 2009).

Par contre, une fois que la bicouche est formée et stable, l'apparition d'un pore sélectif aux cations (ou aux anions) va créer une différence de potentiel membranaire. En

voltage imposé, cet effet sera détectable par le déplacement de charges aux bornes du canal afin de maintenir le potentiel tel qu'imposé par l'expérimentateur.

L'étude des propriétés physiques d'une protéine membranaire purifiée et insérée dans une bicouche lipidique synthétique est très avantageuse, car ce système est vierge, c'est-à-dire qu'il ne comporte aucune autre protéine que celle étudiée, et qu'il est facile d'utilisation en laboratoire. Le plus grand désavantage de cette méthode est que la moindre contamination dans nos échantillons de protéine ou de lipide a le potentiel d'affecter les résultats (Henn & Thompson, 1968; Henn & Thompson, 1969).

Normalement, en BLM le bruit de fond des tests d'électrophysiologie est très bas. Si on applique une série de voltages, l'addition de petites concentrations de toxines se lit par de petits sauts de courant desquels on peut déduire la conductance du pore. Par exemple, à partir de la conductance (G) de pores de grands diamètres, on peut calculer le rayon effectif ($G = \sigma\pi r^2/l$, G est la conductance, σ est la conductivité de la solution, r est le rayon du pore et l la longueur) (Alouf & Freer, 2006).

1.1.2. La spectroscopie de fluorescence

Parmi les techniques émergentes pour étudier les phénomènes microscopiques figurent les techniques de spectroscopie de fluorescence. Grâce à leurs apports, il est possible d'observer des mouvements de complexes protéiques, de mesurer les dimensions d'orifices microscopiques ou encore de mesurer la distance entre molécules (revus dans (Johnson, 2005)).

1.1.2.1. Le phénomène de luminescence

La luminescence est un phénomène d'émission de lumière non calorifique dont l'origine provient des différents états électroniques d'excitation de la matière : un électron excité va revenir dans un état de moindre énergie en émettant de la lumière. Selon la nature des états excités, la luminescence se divise en fluorescence (excitation des états singulets) ou en phosphorescence (excitation des états triplets).

1.1.2.2. Le phénomène de fluorescence : concept général

Une molécule fluorescente émettra un photon suite à l'excitation et la désexcitation de ses niveaux électroniques. D'un point de vue énergétique, on peut illustrer le phénomène de fluorescence par un diagramme de Jablonski (figure 1.3), dans lequel seront représentés les principaux niveaux électroniques excités S1, S2, ainsi que le niveau fondamental S0. Tous ces états énergétiques se séparent en sous-états énergétiques vibrationnels de la molécule excitée 0, 1 et 2.

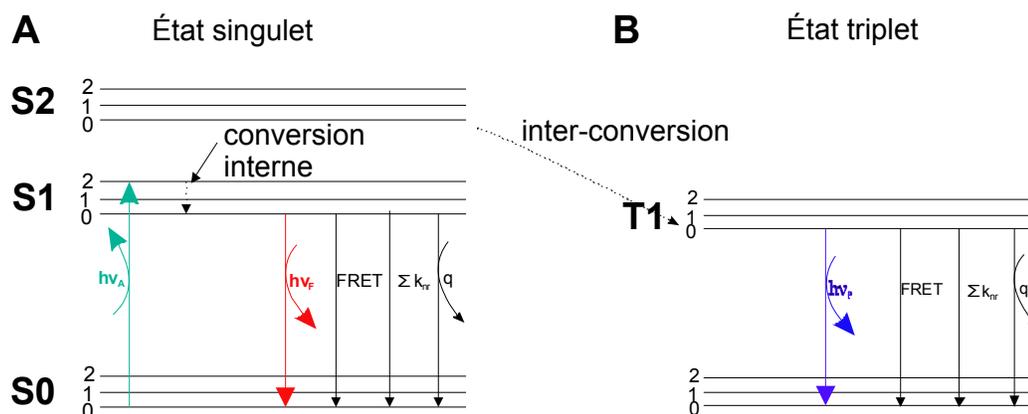


Figure 1.3.: Diagramme de Jablonski. A. Excitation électronique d'une molécule (vert) à différents niveaux d'excitation. Relaxation de tous les niveaux énergétique vers S1 à l'état sous-vibrationnel 0 (non radiatif). Retour à l'état fondamental avec l'émission d'un photon (rouge). On peut y retrouver tous les processus supplémentaires par lesquelles les électrons peuvent revenir à leur état fondamental, soit par « quenching » (q), qui est une perte non radiative de l'état excité du fluorophore, par FRET (processus par lequel l'énergie d'un fluorophore donneur est transmise à un autre fluorophore accepteur).

B. la phosphorescence : suite à l'excitation de la molécule (vert), les électrons entrent dans un état excité (S1). Soit l'état d'excitation permet un retour avec une grande probabilité de transition vers S0 dans le cas de la fluorescence ($h\nu_F$) (cela arrive si le spin de l'électron excité est antiparallèle par rapport au spin de l'électron en S0), ou bien l'électron excité a un spin parallèle à celui de l'électron en S0, ce qui le place dans un état triplet suite à quoi il va subir une conversion interne pour retourner à l'état S0 avec une basse probabilité de transition dans le cas de la phosphorescence ($h\nu_P$).

Suite à l'absorption de la lumière par la molécule excitée (fluorophore), celle-ci va atteindre un état supérieur d'excitation en 10^{-15} s. Rapidement, cette molécule va relaxer jusqu'à son plus bas niveau vibrationnel S1. Ceci est un phénomène de conversion interne qui survient en moins de 10^{-12} s et qui est non-radiatif. Cela fait en sorte que

l'énergie absorbée lors de l'excitation de la molécule est plus grande que l'énergie émise lors du retour au niveau fondamental. Le déplacement de Stokes est l'observation empirique du phénomène et donc du déplacement vers les plus grandes longueurs d'ondes du spectre d'émission (voir figures 1.3 et 1.4).

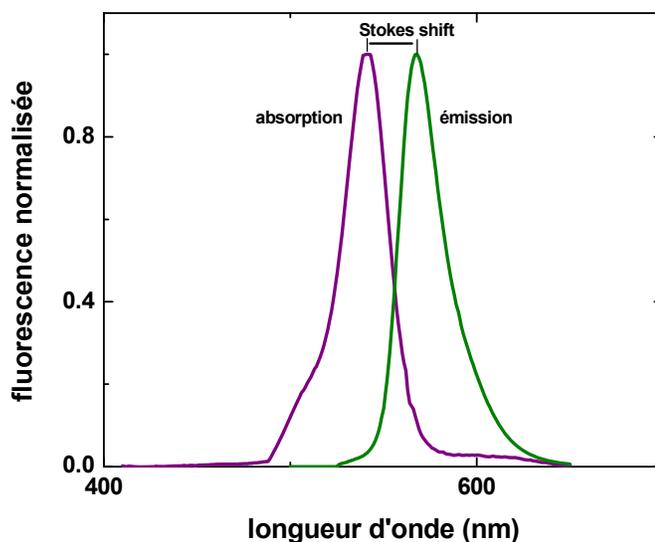


Figure 1.4. : déplacement de Stokes sur les spectres d'absorption et d'émission du tétraméthylrhodamine-5-maléimide (TMRM). Les spectres ont été mesurés dans de l'octanol, pour imiter un environnement lipidique.

Le temps de vie d'un fluorophore est le temps compris entre l'excitation de la molécule, sa relaxation vers un état d'équilibre thermique S1 et son retour à son énergie fondamentale (Lakowicz, 2006). L'étude des propriétés spectrales d'un fluorophore lié à une protéine peut donner des renseignements importants sur les changements d'environnement des régions marquées. Par exemple, quand la sonde NBD (le nitrobenzoxadiazole) passe d'un environnement aqueux vers un environnement lipidique, son spectre d'émission subit un déplacement vers les courtes longueurs d'onde (vers le bleu). Les variations d'intensité maximale des pics d'émission indiquent si un déplacement de l'hélice à l'intérieur de la bicouche a eu lieu.

1.1.2.3. La fluorescence : point de vue quantique

La fluorescence peut s'expliquer par la mécanique quantique : la combinaison des électrons dans l'état excité peut se faire de deux manières : soit ils se combinent de

manière à produire un spin total nul (état singulet), soit ils le font de manière à ce que le spin total soit égal à 1 (état triplet). Un électron de spin $1/2$ est toujours combiné en paire antiparallèle à l'état fondamental ($-1/2, +1/2$). Ce qui implique que le spin résultant est nul, d'où l'appellation S_0 de cet état. Dans le cas de la fluorescence, le spin de l'électron dans son état excité est d'orientation opposée au spin de l'électron resté dans l'état fondamental, il en résultera un électron qui entre dans un état excité singulet (on parle ici du passage de l'orbitale de l'électron de son état fondamental S_0 vers un état vibrationnel excité S_1 ou S_2 (voir figure 1.) suite à son excitation par un photon). Cette transition est permise par la mécanique quantique et se fait avec une haute probabilité de transition, ce qui explique pourquoi elle survient si rapidement (Turro NJ, 1978; Griffiths, 2004; Lakowicz, 2006).

Les molécules contenant des cycles aromatiques sont plus susceptibles de produire de la fluorescence. Les molécules contenant des atomes lourds sont plus susceptibles d'émettre de la phosphorescence (Lakowicz, 2006).

Plusieurs phénomènes peuvent affecter l'intensité de la fluorescence mesurée. Le phénomène de « quenching », l'effet du solvant polaire, le transfert d'énergie d'un fluorophore à un autre (FRET) sont quelques exemples de processus qui ont cet effet.

1.1.2.4. Le « quenching »

Plusieurs phénomènes décrits par le diagramme de Jablonski (voir figure 1.3) peuvent provoquer la désexcitation de S_1 vers S_0 . On appelle « quenching » le processus par lequel la molécule excitée perd son état d'excitation sans émettre de photon ce qui provoque une baisse d'intensité lumineuse de fluorescence.

Le « quenching » dit de collision survient lorsque le fluorophore entre en contact avec une molécule de la solution appelée « quencher ». Le fluorophore retourne alors à son état fondamental sans émission de photon. L'oxygène, les halogènes et les amines peuvent notamment agir comme « quenchers ». Le quenching de collision permet d'étudier l'accessibilité d'une région. Une région marquée avec un fluorophore sera très propice à être désexcitée si le fluorophore est accessible aux autres molécules présentes dans son environnement. Il y a aussi le quenching statique, par lequel un fluorophore

dans son état d'énergie fondamental va former un complexe non-fluorescent avec d'autres quenchers. Le quenching peut aussi survenir par atténuation de la lumière d'excitation soit par un composé présent dans l'environnement, ou par le fluorophore lui-même (Johnson, 2005; Lakowicz, 2006).

1.1.2.5. Le photoblanchiment

Le photoblanchiment est également un phénomène qui engendre une perte de fluorescence, à ne pas confondre avec le « quenching ». Le photoblanchiment survient dans l'état excité et résulte de la liaison covalente d'une molécule d'oxygène (typiquement) avec le fluorophore. Cela a pour effet de provoquer une incapacité permanente de la molécule à émettre un photon. Plus un fluorophore est stable, et plus les chances qu'il se lie avec l'oxygène sont faibles (Eggeling *et al.*, 1998).

Cette technique a été récemment exploitée en bicouche supportée dans le but d'étudier le nombre de sous unités présentes dans des protéines membranaires connues. Dans ce système, on observe la fluorescence d'une seule molécule à la fois et on observe que celle-ci change par des sauts discrets chaque fois qu'un fluorophore est photoblanchi (Ulbrich & Isacoff, 2007; McGuire & Blunck, 2009).

1.1.2.6 L'effet du solvant polaire

Le déplacement de Stokes n'est pas le seul phénomène qui provoque le déplacement des spectres d'émission des fluorophores. L'effet de la polarité du solvant provoque aussi cet effet. Le fluorophore possède un moment dipolaire dans l'état excité plus grand que dans l'état fondamental. Suivant une excitation, les dipôles du solvant peuvent se réorienter autour des dipôles formés par les fluorophores, ce qui a pour effet de diminuer l'énergie de l'état excité. Plus le solvant est polaire, plus les dipôles de ce solvant vont s'aligner avec ceux des fluorophores et ainsi minimiser l'énergie de l'état excité. Cela aura pour effet de déplacer le spectre d'émission vers les plus grandes longueurs d'ondes. Ainsi, un fluorophore passant d'un milieu lipidique à un milieu aqueux (très polaire) verra son spectre d'émission se déplacer vers de plus grandes longueurs d'ondes (Mercola *et al.*, 1972; Adkins *et al.*, 1983; Crowley *et al.*, 1993).

1.1.2.7. Le phénomène du FRET

Le transfert d'énergie par résonance (ou FRET pour Förster Resonance Energy Transfer) est un processus électrodynamique qui survient durant l'état excité d'un fluorophore (voir figure 1.3). C'est un phénomène qui apporte des renseignements sur la séparation spatiale entre deux molécules. Ce phénomène survient entre un donneur (D) qui se trouve dans un état excité et un accepteur (A), qui se trouve dans son état fondamental. Le spectre d'émission d'un donneur recouvre le spectre d'absorption de l'accepteur. Le FRET va survenir grâce à l'interaction d'un photon avec un donneur et est le résultat d'une interaction dipôle-dipôle entre le donneur et l'accepteur. Ce phénomène est basé sur le fait qu'un fluorophore est un dipôle oscillant qui peut échanger de l'énergie avec un autre dipôle oscillant avec une fréquence de résonance semblable. Le taux de transfert énergétique va dépendre avant tout de la distance entre le donneur et l'accepteur, de l'importance du recouvrement entre le spectre d'absorption de l'accepteur et du spectre d'émission du donneur et enfin de l'orientation relative des deux molécules entre elles. Suite au transfert de cette énergie du donneur à l'accepteur, ce dernier va réémettre un photon à sa propre longueur d'onde d'émission (Johnson, 2005).

Le taux de transfert énergétique entre le donneur et l'accepteur, ainsi que l'efficacité de transfert énergétique entre les deux molécules sont deux caractéristiques importantes du FRET. On peut les trouver en fonction de la distance entre les deux molécules ou encore par leurs propriétés spectrales.

Si on considère une simple paire donneur-accepteur séparés par une distance (r), le taux de transfert ($k_T(r)$) entre le donneur et l'accepteur est donné par :

$$k_t(r) = 1/\tau_D (R_0/r)^6 \quad (2)$$

où k_t est le taux de transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur, r est la distance séparant le donneur de l'accepteur, τ_D est le temps de vie du donneur en l'absence de l'accepteur et R_0 est la distance de Förster (distance pour laquelle l'efficacité E de transfert est de 50%).

Connaissant la valeur de R_0 , on peut calculer l'efficacité de transfert énergétique (voir figure 1.5.) pour une simple paire D-A séparés par une distance r :

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (3)$$

Les valeurs de R_0 sont comparables à la longueur des macromolécules (30Å-60Å), et pour cette raison, on peut se servir du FRET comme règle à mesurer entre des grosses protéines sur lesquelles on lie de façon covalente deux fluorophores qui peuvent entrer en résonance (Lakowicz, 2006).

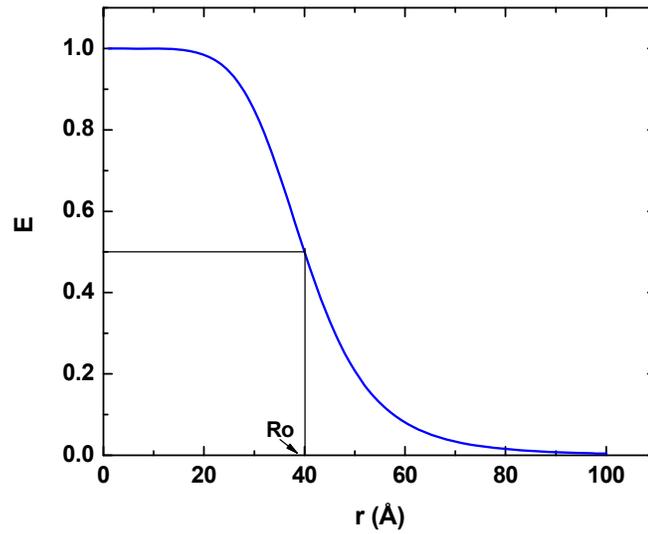


Figure 1.5.: variations de l'efficacité de transfert énergétique en fonction de la distance séparant le donneur de l'accepteur.

On peut aussi calculer le taux de transfert énergétique en fonction des propriétés spectrales du donneur et de l'accepteur :

$$k_T(r) = \frac{Q_D \kappa^2}{\tau_D r^6} \left(\frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N_A n^4} \right) \int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (4)$$

où Q_D est le rendement quantique du donneur en l'absence de l'accepteur, n est l'indice de réfraction du milieu, N_A est le nombre d'Avogadro, r est la distance entre le donneur et l'accepteur et τ_D est le temps de vie du donneur en l'absence de l'accepteur. F_D est l'intensité de la fluorescence du donneur dans un certain intervalle de longueur d'onde λ . $\epsilon_A(\lambda)$ est le coefficient d'extinction molaire de l'accepteur à une longueur d'onde λ . Le

terme κ^2 est un facteur décrivant l'orientation relative dans l'espace de transition des dipôles du donneur et de l'accepteur. On peut réécrire l'équation (2) en fonction de l'équation (4) afin de pouvoir obtenir une équation permettant de calculer la distance R_0 en fonction des propriétés spectrales du donneur et de l'accepteur :

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2 Q_D}{128\pi^5 N n^4} \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (5)$$

1.1.2.8. Les fluorophores

Le phénomène de fluorescence s'effectue en deux étapes : l'excitation et l'émission de lumière par une molécule appelée chromophore, ou plus communément fluorophore. Un fluorophore, qui est une molécule rigide constituée de cycles aromatiques, peut être représenté par un dipôle qui interagira avec la lumière pour le faire passer d'une orbitale fondamentale vers une orbitale excitée.

Un fluorophore se caractérise par ses spectres d'absorption et d'émission (figure 1.4); son efficacité d'absorption de la lumière (le coefficient d'extinction molaire ε) ; son rendement quantique (Q) ; sa stabilité et son temps de vie (voir plus haut) (revu par (Johnson, 2005)).

Le rendement quantique est le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés. Il est une fonction du taux d'émission du fluorophore (Γ) et du taux de décroissance non radiatif vers l'état fondamental (k_{nr}).

Ainsi, on peut calculer Q :

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (6)$$

Le rendement quantique peut être très proche de l'unité si le taux non radiatif est négligeable. Il devient d'autant plus important de travailler avec un fort rendement quantique à mesure que l'on travaille avec un faible nombre de molécules.

Le temps de vie de l'état excité est le temps que prend le fluorophore pour passer d'un état excité vers son état fondamental. Il se définit par l'équation suivante :

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + knr} \quad (7)$$

Le coefficient d'extinction molaire (ε) est une mesure de l'absorption de la lumière par le fluorophore. On peut calculer cette valeur à partir de la loi de Beer-Lambert, qui donne la perte d'intensité d'un faisceau lumineux monochromatique :

$$\varepsilon = \frac{A}{c \cdot d} \quad (8)$$

Où A est l'absorbance (ou densité optique, c'est-à-dire une mesure de la capacité d'un milieu à absorber la lumière. A est le rapport entre l'intensité perdue dans un milieu et l'intensité incidente, il est donc sans unité) de la solution traversée, c est la concentration du fluorophore que rencontre le faisceau lumineux à travers une épaisseur d de substance (cm). Les unités de ε sont données en $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

L'intensité de la fluorescence va dépendre de ses caractéristiques et des différents phénomènes qui peuvent survenir lors de l'excitation des fluorophores. En effet, les phénomènes d'extinction de fluorescence (quenching), de photoblanchiment et de transfert d'énergie de résonance (FRET) peuvent influencer grandement sur l'intensité de la fluorescence (voir section 2.2.7.) (Lakowicz, 2006). Une plus grande description des fluorophores utilisés dans le cadre de cette étude est établie en section 2.3.1.

Ces méthodes, communément utilisées dans l'étude des structures et des fonctions, ont permis de mettre au point plusieurs modèles de formation des pores pour différentes toxines. Les toxines à activité cytolytiques Cry1Aa et colicine Ia ont été choisies dans cette thèse, surtout à cause du grand nombre d'expériences qui ont été produites dans le but de connaître leur topologie par rapport à la bicouche lipidique durant le processus de « gating » et aussi leur processus d'oligomérisation.

1.2. La toxine Cry1Aa

Parmi les toxines à activité cytolytique on retrouve les Cry et Cyt. Celles-ci sont d'un grand intérêt environnemental car elles servent de bio pesticides depuis plus de 80 ans (Sanahuja *et al.*, 2011). Elles sont produites par le bacille de *Thuringe* (*Bacillus thuringiensis*), une bactérie à Gram positif isolée au début de 20^e siècle par un

bactériologiste japonais à partir de vers à soie infectés, mais décrite scientifiquement pour la première fois, à Thuringe, en Allemagne. Cette bactérie est très répandue dans notre environnement, on la retrouve dans les sols du monde entier, ainsi que sur les feuilles des végétaux (Kumar *et al.*, 1996). Plusieurs bio pesticides sont le fruit de la recherche sur les toxines produites par le bacille de Thuringe.

Lors de son cycle de sporulation, *B. thuringiensis*, sécrète des cristaux parasporaux (Bulla, Jr. *et al.*, 1980) composés de protéines appelées δ -endotoxines, extrêmement toxiques pour plusieurs types d'insectes (lépidoptères, diptères, coléoptères), d'invertébrés (nématodes) et d'acariens (Pigott & Ellar, 2007). Les toxines Cry se dénombrent désormais à plus de 100 sous-familles et peuvent cibler les insectes envahissant les champs de légumes, de tabac, de coton, de riz, etc.

La toxicité spécifique envers différents insectes a servi de base à l'élaboration de la première nomenclature. Cry est le terme qui désigne le gène de la toxine elle-même, suivi d'un chiffre romain (Hofte & Whiteley, 1989) :

- I désigne la spécificité de toxicité aux lépidoptères;
- II celle aux lépidoptères et aux diptères;
- III aux coléoptères;
- IV aux diptères uniquement.

Cependant, une nouvelle nomenclature régit maintenant la désignation des différents gènes codant des toxines Cry. Cette nouvelle nomenclature est basée sur le degré d'homologie de structure primaire entre les toxines et les chiffres romains sont remplacés par des chiffres arabes. Les deux nomenclatures sont toujours utilisées, mais dans le cas de cette étude, nous avons opté pour la plus vieille pour des raisons de simplicité et de cohérence avec le laboratoire collaborateur.

1.2.1. Structure de la Cry1Aa

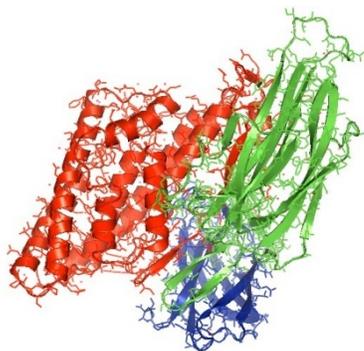


Figure 1.6. : *structure cristalline (résolution de 2.25Å) de la Cry1Aa. Le domaine I (formation des pores) est en rouge, le domaine II en vert et le domaine III en bleu (PDB : 1CIY, (Grochulski et al., 1995), logiciel PYMOL).*

La toxine Cry1Aa (ou CryIA(a)) est composée de trois domaines distincts (figure 1.6).

Le domaine I contient 7 hélices α anti-parallèles agencées en forme de baril, avec au milieu, l'hélice hydrophobe $\alpha 5$. Les hélices externes sont amphipatiques. Les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ constituent le segment le plus hydrophobe de ce domaine et joueraient un rôle important dans la formation du pore à cause de cette propriété (Grochulski *et al.*, 1995).

Le domaine II comprend trois feuilletts β agencés de manière à former un prisme triangulaire. La structure de ce domaine suit une topologie en clef grecque. Les résidus faisant face à l'intérieur de ce complexe sont de nature hydrophobe ou aromatique (Grochulski *et al.*, 1995).

Le domaine III est composé de deux feuilletts β antiparallèles formant un sandwich. Les deux longues boucles qui connectent ensemble ces deux feuilletts interagissent avec le domaine I. Les domaines II et III sont responsables de la liaison de la toxine avec leurs récepteurs (Aronson *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995), tandis que le domaine I est responsable de l'insertion dans la membrane et de la formation des pores (figure 1.5.) (Schwartz *et al.*, 1997b).

1.2.2. Le mécanisme d'insertion et de formation du pore

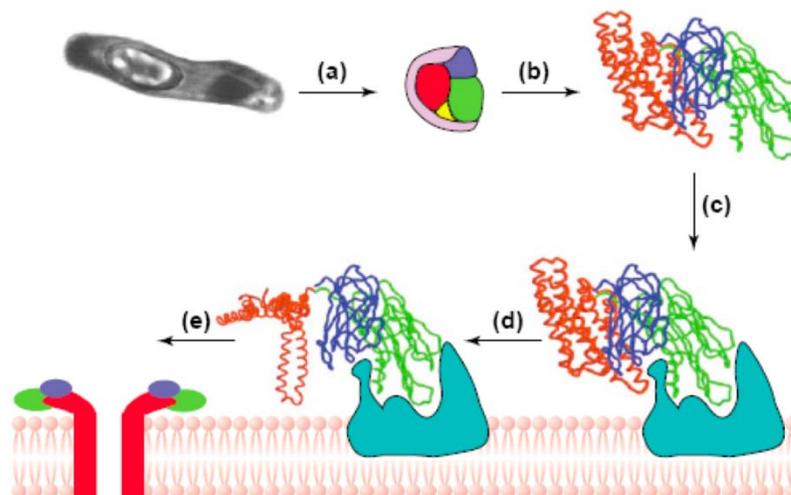


Figure 1.7. : Étapes menant à la formation du pore par la CryIAa : le bacille produit la protoxine qui doit être digérée pour donner la forme active de la toxine. Celle-ci s'associe à un récepteur spécifique, ce qui permet aux hélices du domaine I de s'insérer dans la membrane. L'oligomérisation de quatre toxines formerait un pore (de Maagd *et al.*, 2001).

Bien que l'écosystème de la bactérie soit méconnu, on soupçonne que le spore produit par la bactérie est ingéré par les larves d'insectes à partir de la surface des feuilles des végétaux, dans le sol, les fourrages ou encore les insectes morts (de Maagd *et al.*, 2001). Une fois ingérée par l'insecte, la forme inactive de la toxine, la protoxine (environ 120 kDa) (figure 1.7. a), est solubilisée grâce au pH très alcalin de l'intestin des insectes et digérée par des protéases intestinales similaires à la trypsine ou la chymotrypsine, menant à la forme active de la toxine (figure 1.7. b) (Tojo & Aizawa, 1983; Milne & Kaplan, 1993; Bah *et al.*, 2004). Une fois activée, la toxine se lie ensuite à des récepteurs membranaires (figure 1.7. c), comme l'aminopeptidase N (APN) (Knight *et al.*, 1994; Pigott & Ellar, 2007), ou la cadhérine (Vadlamudi *et al.*, 1995; Pigott & Ellar, 2007). L'association de plusieurs monomères de toxines entre eux provoque ensuite la formation d'un pore de 20 à 26Å de diamètre qui déstabilise totalement le milieu des cellules intestinales de l'organisme qui a ingéré la bactérie (Peyronnet *et al.*, 2001). Ce déséquilibre est causé par l'abolition des gradients ioniques et métaboliques, entraînant le gonflement et la lyse cellulaires, et finalement la mort de l'insecte (Knowles & Ellar, 1987; Ogiwara *et al.*, 1992; Grochulski *et al.*, 1995; Bravo *et al.*, 2007).

1.2.3. Les modèles d'insertion de la Cry1Aa

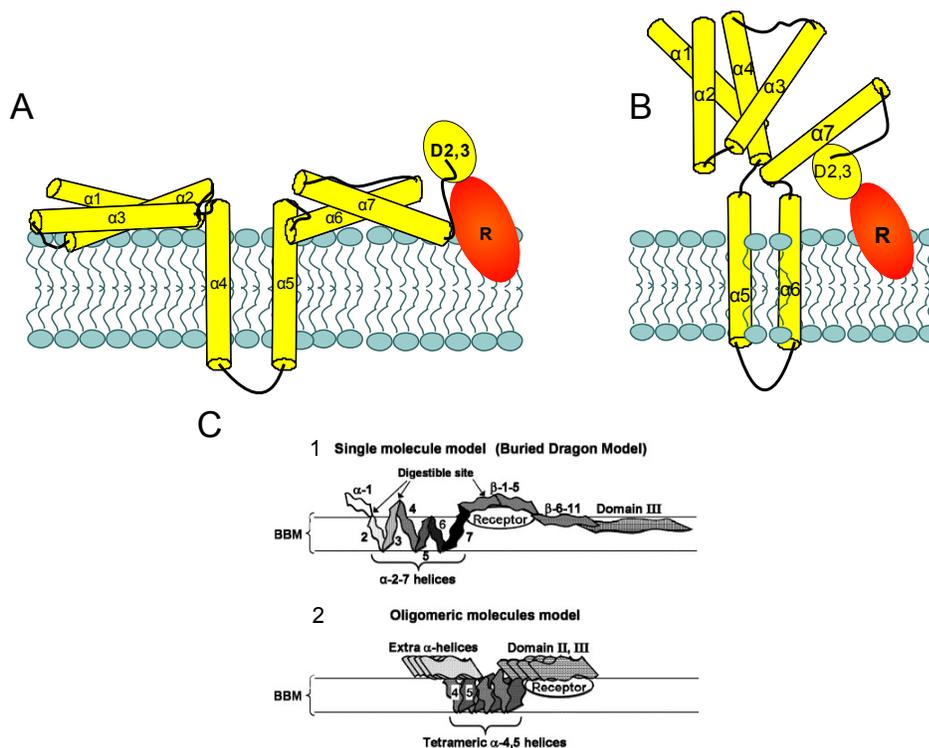


Figure 1.8. : différents modèles d'insertion et de formation de pore de la Cry1Aa :

A. Modèle du parapluie : les hélices 4 et 5 du domaine formeur de pore traversent la membrane tandis que les autres reposent sur le dessus de la membrane.

B. Modèle du canif : la toxine se lie au récepteur et le domaine formeur de pore se réarrange pour permettre aux hélices α_5 et α_6 de traverser la bicouche.

C. Modèle du dragon enfoui (1) pour un monomère et (2) pour un tétramère (Tomimoto et al., 2006; Nersesian et al., 2011)

Il existe plusieurs modèles théoriques d'insertion de la toxine dans la membrane cellulaire (figure 1.8), ce qui indique un processus difficile à caractériser. En effet, les données expérimentales recueillies jusqu'à présent sont souvent contradictoires.

1.2.3.1. Le modèle du parapluie

Dans le premier modèle, dit du parapluie (figure 1.8. (A)), les hélices du domaine formeur de pore (domaine I) se déplient et s'étalent à la surface de la membrane lipidique. Les deux hélices majoritairement hydrophobes, α_4 et α_5 , ainsi rapprochées de

la surface cellulaire, traversent la membrane d'une extrémité à l'autre (Schwartz *et al.*, 1997a) alors que les autres hélices restent étendues à la surface (Gazit *et al.*, 1998; Masson *et al.*, 1999). Ce modèle a été proposé suite à la résolution de la structure d'une toxine homologue, la CryIIIa (Von Tersch *et al.*, 1994), et par comparaison avec des toxines ayant des structures similaires comme les colicines ou la toxine diphtérique (Lakey *et al.*, 1991; Parker & Pattus, 1993).

Plusieurs études appuient ce modèle. Par exemple, la création de deux mutations cystéines par mutagenèse dirigée (voir appendice 1.1.1) à l'intérieur du domaine formeur de pore pour provoquer un pont disulfure entre les deux cystéines et ainsi restreindre les mouvements de deux hélices lors de la formation des pores aura pour effet de diminuer l'activité canal de la toxine (dans le cas où la restriction touche une hélice impliquée directement dans ce processus). De cette manière, le groupe de Schwartz *et al.* a pu suggérer que les hélices $\alpha 4$ - $\alpha 5$ ou $\alpha 5$ - $\alpha 6$ étaient probablement impliquées dans la formation des pores, selon le modèle du parapluie ou encore celui du canif (voir figure 1.8), sans toutefois pouvoir confirmer l'un ou l'autre (Schwartz *et al.*, 1997a).

Gazit *et al.* ont exprimé et isolé toutes les hélices du domaine formeur de pore dans le but d'étudier leur orientation préférentielle par rapport à la membrane lipidique par une technique de spectroscopie infrarouge (voir appendice 1.1.4 pour plus de détails). Dans ces conditions, toutes les hélices semblent adopter des orientations parallèles à la membrane lipidique, sauf $\alpha 4$ - $\alpha 5$ qui semblaient s'orienter à 90° (Gazit *et al.*, 1998). Ces expériences appuient le modèle du parapluie, mais n'ont été menées qu'avec les hélices seules, sans considérer les restrictions que le reste de la protéine peut leur imposer.

On a vu plus haut que quand la sonde NBD (le nitrobenzoxadiazole) passe d'un environnement aqueux vers un environnement lipidique, son spectre d'émission subit un déplacement vers les courtes longueurs d'onde (vers le bleu). Cette propriété a été appliquée pour étudier l'insertion des hélices $\alpha 5$ et $\alpha 7$ de la Cry1Aa lors de l'interaction de la toxine avec des BBMV. Dans ces conditions, les deux extrémités de l'hélice $\alpha 7$ sont demeurées en surface tandis que la partie N-terminale de $\alpha 5$ subit un déplacement vers l'intérieur de la membrane lipidique, appuyant ainsi le modèle du parapluie (Gazit & Shai, 1995).

En traitant des mutants cystéines de la Cry1Aa avec la n-biotinylaminoethyl methanethiosulfonate (MTSEA-biotine), le groupe de Schwartz a pu identifier les régions impliquées dans la formation des pores (voir appendice 1.1.2 pour une description plus détaillée). Après avoir fait réagir la biotine avec la streptavidine, ils ont déterminé que les régions entourant l'hélice $\alpha 4$ (les épingles $\alpha 3$ - $\alpha 4$ et $\alpha 5$ - $\alpha 6$) étaient impliquées dans la formation des pores (appuyant ainsi les modèles du parapluie et du canif (voir figure 1.8)), car l'activité de la toxine était diminuée par la réaction avec la streptavidine (voir appendice 1.1.2) (Girard *et al.*, 2009a).

Un SCAM (« Substituted Cystein Accessibility Method ») de l'hélice $\alpha 4$ a ensuite été réalisé, ce qui veut dire que tous les résidus de l'hélice ont été remplacés, un par un, par une cystéine. La formation des pores par chaque mutant n'a pas affecté significativement les vésicules traitées par ces toxines (voir appendice 1.1.2). La perte de fonction du pore formé par les toxines mutantes suggère que l'hélice $\alpha 4$ est transmembranaire, selon le modèle du parapluie (Girard *et al.*, 2008; Girard *et al.*, 2009b).

Il est à noter qu'une diminution significative de l'activité des pores est observé lorsque les résidus chargés de l'hélice $\alpha 3$ sont remplacés par un résidu neutre ou de charge opposée, ce qui suggère également que l'hélice $\alpha 3$ est impliquée dans les mécanismes de formation des pores (Vachon *et al.*, 2002).

1.2.3.2. Le modèle du canif

Le modèle du canif (figure 1.8. (B)) propose qu'une fois la toxine liée à la membrane lipidique via un récepteur, les hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ se détachent du domaine formeur de pores et se déplacent à travers la membrane lipidique, tel un canif (voir figure 1.8 (B)). Contrairement au modèle du parapluie, il n'y aurait pas de réarrangement des autres hélices du domaine à la surface de la bicouche lipidique (Knowles & Ellar, 1987; Lakey *et al.*, 1991; Knowles, 1994).

Les expériences de restriction de mouvement des hélices du domaine formeur de pore par la création d'un pont disulfure entre deux cystéines, ainsi que les expériences de SCAM couplées avec le complexe biotine/streptavidine (voir section 1.2.3.1) montrent

que les hélices $\alpha 4$ - $\alpha 5$ et $\alpha 5$ - $\alpha 6$ affectent l'activité du pore et qu'elles sont susceptibles de traverser la membrane lipidique (Schwartz *et al.*, 1997a; Girard *et al.*, 2009a).

1.2.3.3. Le modèle du dragon enfoui

Le modèle du dragon enfoui (« buried dragon model ») (figure 1.8. (C)) est basé sur l'étude de 3 sites de digestion de la toxine, ce modèle propose que les hélices $\alpha 2$ à $\alpha 7$ du domaine formeur de pores interagissent fortement avec la membrane plasmique. Il y aurait plusieurs possibilités de conformations de la toxine selon qu'elle se présente en monomère ou en oligomère. Ainsi, dans le cas du monomère, la molécule va se réarranger de manière à laisser l'hélice $\alpha 1$ à la surface de la membrane, tandis que les autres hélices sont antiparallèles et distribuées entre les deux feuilletts de la membrane, ce qui offre une possibilité de former un pore. Dans cette conformation, les domaines II et III restent également à la surface. Dans sa forme tétramérique, proposée par une étude de microscopie à force atomique révélant la présence de tétramère à la surface de la bicouche lipidique (figure 1.9), le pore serait formé des hélices $\alpha 4$ - $\alpha 5$ avec les autres hélices des domaines I et II reposant à la surface (voir figure 1.8 (C)), comme dans le modèle du parapluie.

Ce sont majoritairement les expériences de digestion ciblée qui ont permis de mettre au point ce modèle. Celles-ci suggèrent que les boucles reliant les hélices $\alpha 2$ - $\alpha 3$, $\alpha 4$ - $\alpha 5$ et $\alpha 6$ - $\alpha 7$ (figure 1.8 (C)) sont susceptibles de pouvoir traverser la membrane. Un complexe BBMV/toxine est exposé à la Pronase (une protéase non spécifique) afin de provoquer la digestion des fragments protéiques exposés à la solution externe. Par la suite, ce complexe est traité avec des détergents afin d'isoler la toxine des BBMVs et étudié en «western blot» pour déterminer quelles sections de la toxine ont été protégées lors de la digestion. C'est de cette manière que le modèle du dragon enfoui a été suggéré pour le pore monomérique (figure 1.8 (C)) (Tomimoto *et al.*, 2006). Toutefois, on fait l'hypothèse que toutes les BBMVs ont pu être totalement éliminées, sans contrôle pour le prouver.

Des études de fluorescence sur des mutations cystéines de la toxine Cry1A reconstituées dans des BBMV ont aussi suggéré que la toxine subissait de grands changements de

conformation durant la formation des pores. Plusieurs positions du domaine formeur de pore, ainsi que celles de deux autres domaines, ont été marquées avec la sonde IAEDANS (acide 5-(2-[(iodoacétyl)amino]éthyl)amino)naphthalène-1-sulfonique, qui est désexcitée dans un environnement lipidique) ou par la sonde acrylodane qui, une fois excitée à 360 nm, va émettre à des longueurs d'ondes de grandes énergies (460 nm) si elle se trouve dans un environnement lipidique. Les expériences de spectroscopies produites ont révélé que la majorité des positions étudiées se sont déplacés à l'intérieur de la bicouche lipidique (toutes sauf l'hélice $\alpha 1$ du domaine formeur de pore). Ces observations vont à l'encontre des modèles du parapluie et du canif, mais supportent le modèle du dragon enfoui pour des pores monomériques (Nair & Dean, 2008).

Une étude similaire portant sur la Cry1Ab va à l'encontre de ces résultats, suggérant plutôt que dans ces conditions, les domaines 2 et 3 devraient rester à la surface de la bicouche lipidique tandis que certaines sections discrètes dont la boucle reliant les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$ du domaine I se retrouvent insérées entre les deux feuillets lipidiques (Zavala *et al.*, 2011).

1.2.4. Les modèles d'oligomérisation de la Cry1Aa

Deux modèles décrivent l'oligomérisation de la Cry1Aa.. Le premier modèle, qui est le plus souvent mentionné, suggère que les monomères de toxine se lient à la membrane lipidique et y diffusent pour s'assembler en oligomères et finalement en pore fonctionnel. La présence de récepteurs dans la membrane accélérerait grandement le processus (Peyronnet *et al.*, 2000; Peyronnet *et al.*, 2001), mais l'oligomérisation de la toxine ne nécessite pas forcément la présence d'un récepteur (Schwartz *et al.*, 1993). Des complexes protéiques de différents niveaux d'oligomérisation se retrouveraient dans la membrane lipidique, allant du monomère au tétramère. Cependant, la plupart des groupes de recherche semblent s'accorder sur le fait que le pore fonctionnel serait un tétramère (figure 1.9) (Grochulski *et al.*, 1995; Masson *et al.*, 1999; Vie *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, 2007), bien que d'autres semblent penser que le monomère seul puisse former un pore fonctionnel (Tomimoto *et al.*, 2006).

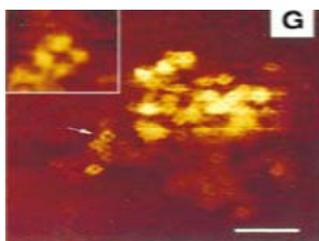


Figure 1.9. : Image en microscopie à force atomique de la Cry1Aa. Cette image suggère que le pore fonctionnel de la Cry1Aa est un tétramère (Vie *et al.*, 2001).

En fait, il n'y a aucune preuve qui écarte la possibilité que les autres oligomères puissent aussi former des pores, même si le dimère de Cry1Ab a été isolé dans des liposomes (voir appendice 1.2.2) et testé en bicouche et s'est révélé inactif dans ces conditions (Gomez *et al.*, 2002).

Des mesures d'électrophysiologie en bicouche lipidique plane ont quant à elles révélé plusieurs niveaux de sous-conductances. Les plus importantes pouvant s'élever à plusieurs centaines de picosiemens. D'autres niveaux de sous-conductances moins importants allant d'une à plusieurs dizaines de picosiemens étaient également présents, indiquant soit la présence de sous-états de conduction, ou de pore de plus petite taille formés par différents types d'oligomères (Slatin *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1993; Lorence *et al.*, 1995; Peyronnet *et al.*, 2001).

Une analyse de gels d'acrylamide a été utilisée pour étudier l'oligomérisation de la Cry4Ba sur des liposomes (ou VULs, vésicules unilamellaires larges). Ainsi, des VULs sont mises en présence de la toxine et les échantillons traités sont chauffés dans un tampon de chargement (« loading buffer ») pour permettre aux protéines présentes de migrer sur le gel d'acrylamide selon leur poids moléculaire. Ces expériences ont révélé que les monomères, dimères et trimères étaient présents dans les liposomes, avec une prédominance des trimères après 2h d'incubation. Ces expériences suggèrent que la toxine Cry peut s'oligomériser une fois liée à la bicouche lipidique et que le niveau d'oligomérisation des complexes protéiques est dépendant du temps, comme le propose ce premier modèle (Likitvivatanavong *et al.*, 2006).

Un second modèle propose que les monomères s'assemblent d'abord en pré-pore avant de s'insérer dans la membrane lipidique pour former un pore fonctionnel. En effet, la toxine Cry1Ab a été incubée dans des liposomes contenant un récepteur semblable à la cadhérine, puis les tétramères ont été isolés et testés sur des BBMV (voir appendice 1.2.2). Comme ceux-ci étaient actifs, ces expériences appuient le modèle qui suggère que l'oligomérisation précède l'insertion dans la bicouche lipidique (Gomez *et al.*, 2002). Il est même suggéré par des observations de microscopie atomique que la Cry1A puisse former des réseaux de toxines à la surface des membranes (Laflamme *et al.*, 2008), ou que tout le domaine I puisse s'insérer entre les deux feuillets de la bicouche lipidique (Nair & Dean, 2008).

Aucune de ces expériences ne peut préciser la nature de la dynamique d'oligomérisation de la Cry1Aa. La limitation majeure est que les prises de mesures sont faites une fois que les pores sont formés et qu'aucune technique utilisée ne permet d'étudier le phénomène pendant la période d'incubation.

1.3. La colicine Ia

Les colicines sont elles aussi des toxines à activité cytolytique produites par des bactéries, telles *Escherichia coli* (CA1, CA2), *Shigella* (CA44) et *Citrobacter*, communément appelé colibacille (Fredericq & Levine, 1947). Chez certaines souches d'*E. coli*, on retrouve des gènes codant pour des toxines destinées à d'autres bactéries, généralement dans le but de réduire la compétition pour des nutriments. Les colicines ont donc une action antibiotique: les colicines de la classe E1, ainsi que la colicine Ia créent des pores aqueux sélectifs au potassium et ainsi dépolarisent les membranes (Gould & Cramer, 1977; Davidson *et al.*, 1984), la colicine E3 bloque la synthèse des protéines (Bowman *et al.*, 1971) et la colicine M provoque la dégradation du peptidoglycan (Harkness & Braun, 1990; Cao & Klebba, 2002).

1.3.1. Structure de la colicine Ia

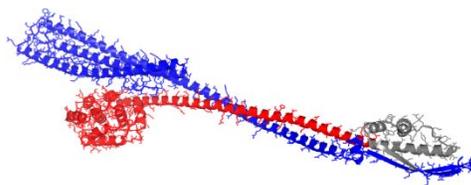


Figure 1.10. : *structure cristalline de la colicine Ia. Le domaine formeur de pore est en rouge, le domaine de translocation en bleu et le domaine de liaison au récepteur en gris (PDB: 1CII, (Wiener et al., 1997).*

La colicine Ia se présente comme une protéine transmembranaire ayant trois domaines distincts. Le domaine R (figure 1.10, en gris) est responsable de la liaison de la toxine à un récepteur spécifique (certaines porines, par exemple l'Ompf ou la FepA). Le domaine de translocation (figure 1.10, en bleu) traverse la membrane externe et permet au domaine formeur de pore (figure 1.10, en rouge) d'atteindre la membrane interne des bactéries à Gram négatif (Greig *et al.*, 2009) pour créer un pore. La présence de protéines périplasmiques, telles TolA, TolB, TolC ou TonB est nécessaire pour permettre la translocation de la protéine à travers la membrane externe (Cao & Klebba, 2002). Une fois insérée dans la membrane de son hôte, la colicine Ia initie son activité pathogène à travers un pore aqueux suite à une baisse du pH et une dépolarisation membranaire (Mel & Stroud, 1993; Zakharov *et al.*, 2004).

Les données de cristallographie présentent un domaine formeur de pore composé de 10 hélices. Insérées dans la membrane plasmique, les hélices $\alpha 8$ - $\alpha 9$ forment une épingle hydrophobe entourée des autres hélices. Cette paire d'hélices initie le changement de conformation de la toxine qui permettrait par la suite la formation du pore et par extension du canal, d'autres grands changements de conformations dépendants du pH et du voltage (Duche *et al.*, 1994; Lindeberg *et al.*, 2000). La structure interne du canal de la colicine Ia a été étudiée en analysant l'effet de molécules neutres sur la conductance du canal. Il a été déterminé que le diamètre de l'ouverture du côté externe de la membrane est de 18 Å, tandis que l'ouverture du côté interne est de 10 Å (Krasilnikov *et al.*, 1998). L'intérieur du pore serait plus étroit avec 7 Å de diamètre (Kienker *et al.*,

2008; Krasilnikov *et al.*, 1998; Klimpel *et al.*, 1992). L'état ouvert fut caractérisé aussi par une grande flexibilité du canal permettant à des peptides ayant jusqu'à 26Å de diamètre liés sur la partie N-terminale du domaine formeur de pore de traverser le pore (Kienker *et al.*, 2003).

1.3.2. Le « gating » de la colicine Ia

L'ouverture et la fermeture du pore (ou « gating ») de la colicine Ia est étroitement liée au potentiel membranaire : le pore s'ouvre à des potentiels de voltage supérieurs à +50 mV et se ferme quand celui-ci est maintenu à moins de -50mV (Jakes *et al.*, 1999). Bien que la topologie du canal par rapport à la membrane dans l'état ouvert et fermé soit connue (Qiu *et al.*, 1996), la dynamique du processus n'a pas été élucidée. Des études récentes en bicouche lipidique planaire suggèrent que cette dépendance au voltage est relayée par un senseur de voltage au milieu du pore qui serait également sensible au pH. Une diminution du pH provoque une diminution du potentiel de membrane nécessaire à l'ouverture et la fermeture du canal. Un pH plus alcalin va provoquer l'effet inverse. Enfin, il est suggéré par l'analyse de mesures électrophysiologiques que l'ouverture du canal se fasse en deux étapes : une phase rapide, exponentielle et une plus lente, linéaire. Nogueira et Varanda pensent que la phase rapide est le fruit du mouvement des monomères oligomérisés et que la phase lente serait plutôt attribuée aux monomères qui continuent de s'insérer dans la membrane (Nogueira & Varanda, 1988).

1.3.3. Les modèles de formation des pores

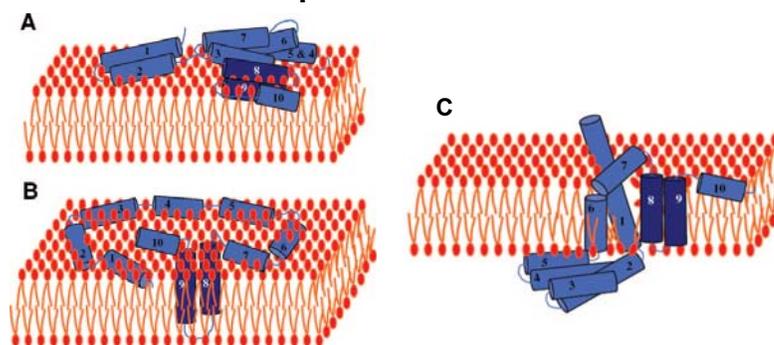


Figure 1.11. États de colicine Ia. A. Modèle du canif de l'état fermé: les hélices 1-2 s'éloignent et exposent l'épingle hydrophobe B. Modèle du parapluie de l'état fermé. Toutes les hélices reposent à la surface pendant que l'épingle hydrophobe traverse la membrane. C. Repliement des hélices dans l'état ouvert à partir du modèle du parapluie. Modifié de (Cascales *et al.*, 2007).

Comme pour la toxine Cry, il n'y a pas de modèle unique pour décrire la formation des pores de la colicine 1a. Les modèles du parapluie et du canif sont récurrents pour décrire cette toxine (Padmavathi & Steinhoff, 2008). Dans l'état fermé (figure 1.11 A), l'épingle hydrophobe (formée de $\alpha 8$ - $\alpha 9$) traverserait la membrane pour servir d'ancrage tandis que les autres hélices demeureraient couchées à la surface. L'état ouvert serait caractérisé par les hélices $\alpha 2$ à $\alpha 5$ passant à travers la bicouche (Lakey *et al.*, 1991; Qiu *et al.*, 1996; Slatin *et al.*, 1994).

Ces résultats ont été surtout observés par des expériences de SCAM sur le domaine formeur de pore, couplées à la technique de biotinylation (voir figure 1.12 et appendice 1.3.1 pour une description détaillée). En faisant réagir la biotine avec la streptavidine incubée du côté *cis* ou *trans* de la bicouche lipidique, il a été possible de déterminer quelles sections étaient immobiles du côté *cis* et lesquelles bougeaient en direction du côté *trans* dans l'état ouvert, selon le modèle du parapluie (Qiu *et al.*, 1996). Ce sont des expériences de SCAM couplée à l'électrophysiologie (voir appendice 1.3.2) qui ont permis de déterminer la topologie de l'épingle $\alpha 8$ - $\alpha 9$ dans le lumen du pore et de confirmer qu'elle est transmembranaire dans l'état ouvert et fermé (Kienker *et al.*, 2008).

Des mesures de fluorescences impliquant la technique de FRET ont également été produites sur la colicine pour caractériser l'état ouvert et fermé du pore. Le FRET entre la sonde fluorescente accepteur IEDANS (liée à une cystéine sur le hélice $\alpha 1$, la boucle liant $\alpha 4$ et $\alpha 5$ et les hélices $\alpha 7$ à 9) et l'acide aminé fluorescent tryptophane (donneur) situé localement dans les hélices 5 à 7 ont permis de déterminer quelles hélices se rapprochent et s'éloignent par rapport aux hélices $\alpha 8$ et $\alpha 9$ (voir figure 1.21) contenant le tryptophane. Il a été observé que lors de l'insertion de la toxine dans la membrane, les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ s'éloignent de l'épingle hydrophobe $\alpha 8$ et $\alpha 9$, qui demeure statique. C'est d'ailleurs grâce à ces expériences que furent élaborés les modèles du parapluie (Lakey *et al.*, 1991) et du canif (Lakey *et al.*, 1993) pour caractériser l'état fermé. Ces expériences ont été produites sur la colicine A, une toxine homologue à la colicine 1a et qui agit de manière similaire (perméabiliser les membranes internes des bactéries à gram négatif et causer la mort cellulaire par perte de K^+) (Lakey *et al.*, 1992). De plus ces

changements de conformation ont été vérifiés sur la colicine 1a par RMN (Luo *et al.*, 2005).

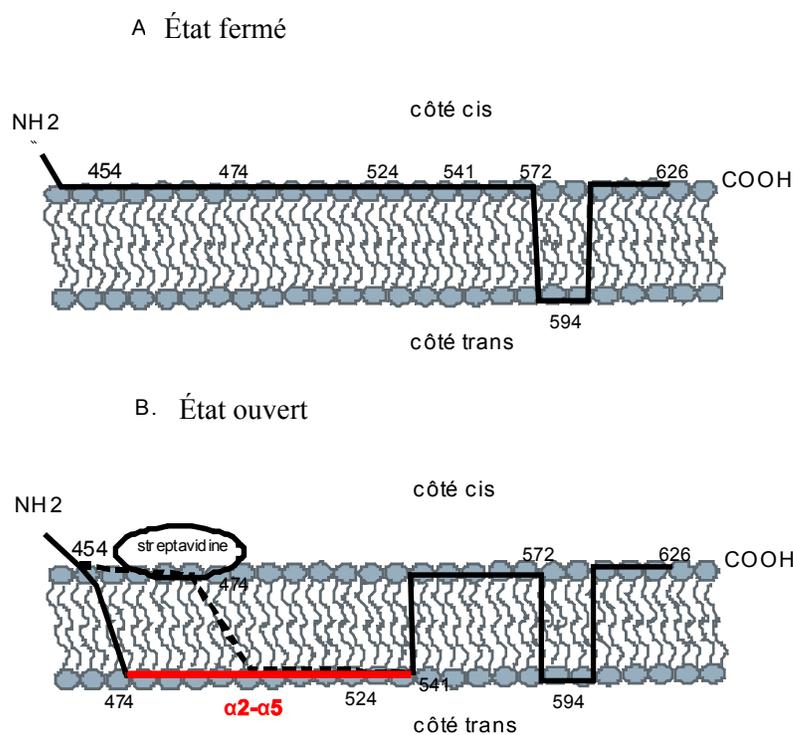


Figure 1.12. : Description de l'état ouvert et de l'état fermé de la colicine 1a. Dans les deux états, une région autour du résidu 594 correspondant aux hélices $\alpha 8$ - $\alpha 9$ traverserait spontanément la bicouche lipidique pour servir d'ancrage. A) À l'état fermé, seule la boucle $\alpha 8$ - $\alpha 9$ est transmembranaire b) À l'état ouvert, les hélices $\alpha 2$ - $\alpha 5$ traversent la bicouche. Les pointillés indiquent que si la streptavidine est liée quelque part entre $\alpha 2$ - $\alpha 5$, cela n'empêchera pas les autres hélices de traverser et de former un pore d'ouverture plus petite.

Le modèle du canif s'applique également à l'état fermé du pore (figure 1.11 B). Ce modèle préconise que les hélices du domaine formeur de pore resteraient regroupées à la surface de la bicouche pendant que les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ s'éloigneraient pour permettre d'exposer l'épingle hydrophobe à l'intérieur de la membrane (Cascales *et al.*, 2007; Lakey *et al.*, 1993). Aucun des deux modèles n'a été pleinement validé, mais dans les deux cas les hélices $\alpha 8$ - $\alpha 9$ doivent être exposées à la bicouche pour initier les changements de conformation qui mènent à l'état ouvert. L'état ouvert (figure 1.11 C) est caractérisé par un réarrangement de la conformation des hélices $\alpha 2$ à $\alpha 5$ qui vont elles aussi traverser la membrane et ouvrir le pore.

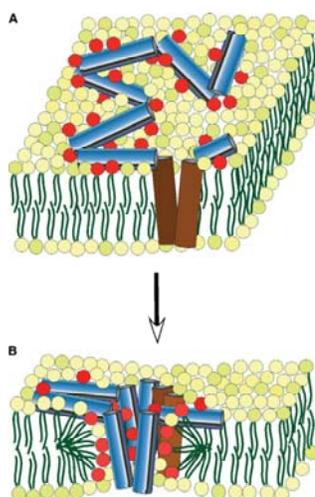


Figure 1.13 : *Modèle toroïdal pour un pore formé par une sous-unité de toxine. A) À l'état fermé, $\alpha 8$ - $\alpha 9$ (en brun) sont insérées dans la bicouche tandis que $\alpha 1$ - $\alpha 7$ et $\alpha 10$ (bleu) demeurent en surface. B) À l'état ouvert, les résidus chargés des hélices $\alpha 3$ - $\alpha 7$ interagissent avec les lipides anioniques (en rouge) et changent de conformation pour devenir transmembranaires (Sobko *et al.*, 2004).*

Le pore pourrait aussi adopter une conformation qui suit un modèle toroïdal (figure 1.13). Dans ce modèle, les lipides jouent un rôle important dans la formation du pore, en opposition avec les modèles de pores précédemment cités, dans lesquels les pores sont formés uniquement d'hélices α et dont la conductance ionique serait due à l'association de monomères d'hélices amphiphiles (Yang *et al.*, 2001; Mel & Stroud, 1993). Le modèle toroïdal implique qu'une couche de lipides se replie sur elle-même, entre chaque segment transmembranaire, après l'insertion d'hélices α amphiphiles dans les têtes polaires des lipides (Ludtke *et al.*, 1996; Zakharov *et al.*, 2004). Bien que ce modèle a surtout été proposé pour la formation des pores de la colicine E1, il n'est pas exclu qu'il puisse s'appliquer aussi à la colicine Ia, dont le domaine formeur de pore est similaire à celui de la colicine E1 (Sobko *et al.*, 2004)(Jakes *et al.*, 1999). Ce pore serait possiblement le fruit d'une oligomérisation de 6 à 8 monomères à la membrane (Greig *et al.*, 2009). Mais il demeure possible que le monomère de la toxine puisse produire un canal fonctionnel de 8-9Å (Kienker *et al.*, 2008)(Sobko *et al.*, 2004).

Le processus dynamique de la formation des pores reste encore à élucider : en effet, la structure cristalline n'est pas une représentation de la toxine dans son état actif et la caractérisation des mouvements du domaine formeur de pore durant le processus de « gating » n'a pas été résolue.

1.4. Étude de la topologie d'autres toxines

La spectroscopie de fluorescence et l'électrophysiologie en voltage imposé sont les techniques communément utilisées pour étudier les mécanismes d'insertion des toxines Cry et colicines, ainsi que l'oligomérisation de celles-ci dans la bicouche lipidique. L'oligomérisation des sous unités et la topologie par rapport à la bicouche ont également été étudiées dans le cas d'autres toxines. En ce qui concerne l'oligomérisation, il n'y a pas de précédent qui permette de comprendre la dynamique d'assemblage des sous-unités de toxines en pré-pore ou encore suite à leur diffusion dans la bicouche lipidique. Les expériences les plus communes consistent à mesurer le poids moléculaire des oligomères présents en solution ou dans un environnement lipidique comme les vésicules et de les comparer au poids moléculaire du monomère. Les gels de Coomassie et les westerns blot sont des expériences récurrentes pour étudier ces assemblages protéiques, mais leur utilité se limite bien souvent à donner un poids moléculaire.

1.4.1. L'anthrax

Certaines toxines envahissent les cellules de manière subtile et ce, sans détruire de façon immédiate la membrane, comme l'anthrax, qui est une toxine à activité cytotoxique. L'anthrax est le nom que l'on attribue à un collectif composé de trois protéines. En effet, les gènes codant pour l'anthrax permettent la production de trois chaînes polypeptidiques indépendantes, soit le facteur létal (LF), le facteur œdémateux (LE) (ces deux derniers étant des enzymes transportées à l'intérieur de la cellule) et l'antigène de protection (PA) (Young & Collier, 2007; Abrami *et al.*, 2005). Le PA est seul responsable de la formation du pore par son oligomérisation en heptamères (ou octamères) et par l'insertion subséquente d'une grande boucle de feuillet β du domaine 2, d'où sont appelées $2\beta_2$ - $2\beta_3$. La structure primaire du PA ne contient aucune cystéine. Ces pores ont la particularité d'être sélectifs aux cations. En bicouche planaire

dépourvue de récepteurs, le canal s'ouvre et se ferme à des potentiels positifs et négatifs, respectivement (le côté externe ou *cis* étant à la masse) (Benson *et al.*, 1998; Nassi *et al.*, 2002).

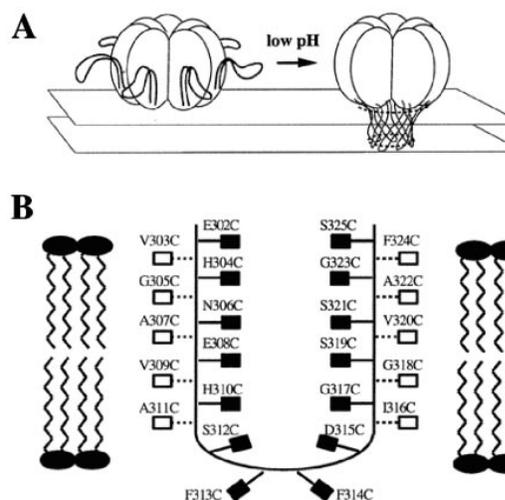


Figure 1.14. : Modèle du champignon proposé pour la formation du pore par le PA.

- a) Oligomérisation du PA en heptamère suivi d'un changement de pH qui provoque l'insertion de la boucle $2\beta_2-2\beta_3$.
- b) Position possible de la boucle $2\beta_2-2\beta_3$ dans la membrane (Qa'dan *et al.*, 2005)

Il a déjà été prouvé que le PA s'assemble en pré-pore à la bicouche qui, après acidification, subira un changement de conformation au niveau des boucles $2\beta_1-2\beta_4$ du domaine II. Cette section se réarrangera en motif en clef grecque pour permettre aux sections $2\beta_2-2\beta_3$ de traverser la bicouche lipidique (Finkelstein, 1985; Blaustein *et al.*, 1989). La technique de SCAM précédemment expliquée a été appliquée pour vérifier si ces sections font effectivement partie du lumen du pore. Chaque mutation cystéine a été testée par réaction avec le MTS-ET (méthanethiosulfonate ethyltriméthylammonium), qui va se lier par pont disulfure au résidu cystéine. Les cystéines liées au MTS-ET et faisant face au lumen du pore ont bloqué l'état ouvert et celles faisant face aux lipides n'ont pas altéré le courant ionique. Grâce à ces expériences, le modèle de la figure 1.14(B) a été proposé (Benson *et al.*, 1998; Nassi *et al.*, 2002).

Afin de valider le modèle du champignon, des expériences de fluorescence impliquant la sonde NBD (excitation à 488 nm et émission à 544 nm) liée au PA ont été produites sur des cellules de hamster (CHO) dans le but de caractériser le lumen du pore dans la conformation suggérée (voir figure 1.14 b). L'intensité d'émission du NBD (qui augmente quand la sonde passe d'un environnement polaire à un environnement lipidique) provenant des cellules marquées a été mesurée dans le temps et comparée à l'intensité du NBD en solution dans un solvant organique (le DMSO). Dans ces conditions, l'intensité de fluorescence provenant des fluorophores attachés aux cystéines faisant face au lumen selon le modèle proposé est demeurée constante, tandis que celle faisant face aux lipides a augmenté, en accord avec le modèle du champignon (Nassi *et al.*, 2002).

1.4.2. Les cytosilines dépendantes du cholestérol

Les cytosilines dépendantes du cholestérol (CDCs) sont des toxines formeuses de pores à activité cytolytique qui reconnaissent le cholestérol de la membrane lipidique comme principal récepteur. Le membre le plus connu est la toxine produite par *Clostridium perfringens*, la perfringolysine (PFO).

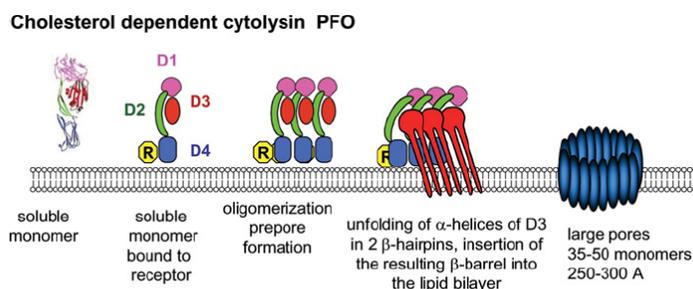


Figure 1.15. : étapes menant à la formation d'un pore par l'association de monomères de PFOs. Les monomères s'associent en forme de L, et le pré-pore subit un changement de conformation qui permet aux domaines I et III de se rapprocher de la membrane. Durant la formation du pore, le domaine III s'insère dans la bicouche lipidique (Geny & Popoff, 2006).

Clostridium perfringens est un bacille qui est responsable de très nombreux cas de gangrène et de septicémie. La PFO est une molécule hydrophile en forme de barre allongée et riche en feuillettes β . Elle est formée de 4 domaines. La grande affinité de la

PFO pour le cholestérol lui permettrait de se concentrer et de s'organiser en barillet à la membrane, afin de faciliter son oligomérisation et son insertion (Gilbert, 2005; Rossjohn et al., 1997). Les monomères de PFO se lient au cholestérol par la boucle hydrophobe au sommet du sandwich β du domaine IV et s'oligomérisent pour former un pré-pore. Il y a ainsi association de 40 à 50 monomères associés en barillet à la surface membranaire. Les domaines I, II et IV s'insèrent en forme de L et le complexe s'associe de façon similaire avec les toxines voisines pour structurer un cylindre, lequel s'insère dans la membrane par interaction hydrophobe du domaine III avec la bicouche pour former le pore aqueux de 250 à 300 Å (voir figure 1.15) (revu dans (Geny & Popoff, 2006)).

La topologie de deux domaines de cette toxine à la membrane lipidique a été étudiée durant sa transition de la conformation en pré-pore à celle en pore. Des mutations cystéines ont été introduites ponctuellement aux extrémités du domaine I et III afin de pouvoir y lier une sonde fluorescente donneur, la *N*-(4,4-difluoro-5,7-diméthyl-4-bora-3a,4a-diaza-*S*-indacene-3-yl)méthyl)iodoacetamide (sonde BODIPY, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement 490 et 510 nm). Les lipides (POPE) composant les vésicules lipidiques ont été marqués avec une sonde fluorescente accepteur, la Rh (la rhodamine, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement 570 et 590 nm). Le complexe BODIPY-toxine va donc entrer en phénomène de FRET avec le complexe Rh-PE et les variations d'efficacité de transfert énergétique entre les deux complexes vont permettre de calculer la distance normale entre la bicouche lipidique et le résidu marqué. Ces expériences ont été produites sur la toxine dans sa conformation en pore, et la mutation supplémentaire F318A a permis de reproduire ces expériences en conservant la conformation du pré-pore.

Ces expériences ont révélées que la toxine se lie à la membrane lipidique en forme de L et s'associe en barillet pour former un pré-pore. Les sondes des domaines I et III se trouvant respectivement à 110 Å et 72 Å de la bicouche, respectivement. Le pré-pore subirait un changement de conformation qui permettrait aux domaines I et III de se rapprocher de la membrane (la sonde du domaine I et III s'étant rapprochée à 99 Å et 62 Å respectivement de la membrane lipidique). Finalement, le pré-pore s'insère dans la

bicouche pour permettre au domaine III de traverser la bicouche lipidique, avec le domaine I qui reste en dehors (Ramachandran *et al.*, 2005).

1.4.3. La toxine diphtérique

La toxine de la diphtérie (DT), un puissant inhibiteur de synthèse protéique, est produite par *Corynebacterium diphtheriae* et fournit un exemple d' α -PFT à activité cytotoxique. C'est une toxine de 58 kDa comportant trois domaines: un domaine de liaison en C terminal formé d'un feuillet β , un domaine T au milieu riche en hélices α qui s'insère dans la membrane et un domaine enzymatique en N-terminal. La DT se lie à la membrane via un récepteur. Elle est ensuite clivée par une furine (une protéase cellulaire) en deux sous-unités (le domaine catalytique et le reste de la protéine), liées par un pont disulfure. La DT est ensuite internalisée par des vésicules pour rejoindre l'endosome de tri. Suite à la liaison à la membrane par le domaine C terminal et à l'acidification de l'endosome, les hélices α 8-9 du domaine T traversent la membrane. Il s'ensuit un réarrangement des hélices α 5-7 pour former un canal sélectif aux cations. Le pore formé possède un diamètre de 24Å et est constitué d'environ 20 à 24 sous-unités (Bell *et al.*, 1997). Enfin, le domaine catalytique adopte une conformation compacte et non rigide qui lui permettra de traverser la membrane de l'endosome et d'accéder au cytoplasme (Geny & Popoff, 2006; Zalman & Wisniewski, 1984).

La topologie de la toxine diphtérique a été établie par des expériences de fluorescence sur des vésicules traitées avec la toxine. Dans ce cas-ci, diverses portions de protéines ont été conçues séparément. Une protéine ne contenant que le domaine formeur de pore (T) et une protéine ne contenant que le domaine catalytique lié au domaine formeur de pore (T) ont été produites, sachant qu'elles étaient également actives après une baisse du pH à 5, et que la conformation du complexe ne comprenant que le domaine catalytique à la membrane est la même que celle de la protéine sauvage (Kachel *et al.*, 1998; Rosconi & London, 2002; Hayashibara & London, 2005; Wang *et al.*, 2006). Des mutations cystéines ont été produites dans le domaine T entre les hélices α 5 à α 9 afin de pouvoir étudier les effets de l'interaction du domaine A avec le domaine T sur la topographie de ces hélices par rapport à la membrane lipidique.

Des vésicules lipidiques ont été produites puis traitées avec la toxine marquée avec du bimane ou du BODIPY. Le bimane est une sonde fluorescente dont le spectre d'émission se déplace vers le bleu quand il pénètre dans un environnement non polaire. Le déplacement de la longueur d'onde d'émission maximale du bimane lié à chacune des mutations cystéines a été mesuré pour étudier la position relative à la membrane des résidus. Ces expériences ont été reproduites en marquant les toxines mutantes avec la sonde BODIPY. L'accessibilité du BODIPY à un anticorps spécifique, l'anti-BODIPY a été mesurée dans le but d'établir, le cas échéant, le degré d'insertion des positions enfouies dans la bicouche lipidique. Des expériences similaires ont été produites sur les trois domaines de la toxine diphtérique afin de pouvoir caractériser la topologie de la molécule avant et après son insertion dans la bicouche lipidique (voir figure 1.16).

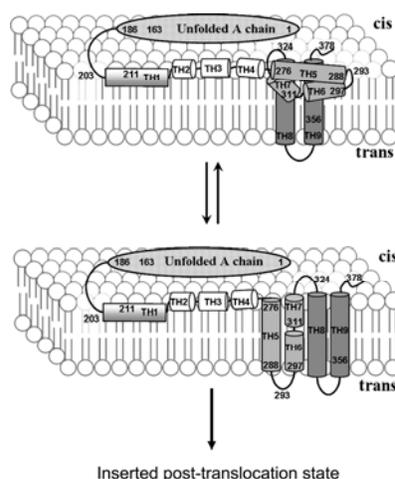


Figure 1.16 : Conformations de la toxine diphtérique durant son insertion dans la bicouche lipidique. Les hélices $\alpha 8-9$ traversent spontanément la membrane et ensuite une réorganisation des hélices $\alpha 5-7$ leur permet de devenir transmembranaires durant la formation du pore (Wang & London, 2009).

Ces techniques de fluorescence ont permis d'établir que les hélices $\alpha 8-9$ s'insèrent spontanément dans la bicouche avec les hélices $\alpha 5-7$ partiellement enfouies. Ensuite elles changent encore de conformation pour permettre aux hélices $\alpha 5-7$ de s'enfouir plus profondément pour devenir transmembranaires, et finalement le domaine A interagit avec la bicouche et le domaine T pour traverser la membrane lipidique (Kachel *et al.*, 1998; Rosconi & London, 2002; Hayashibara & London, 2005; Wang *et al.*, 2006; Wang & London, 2009). Le processus de translocation du domaine A n'est pas encore

connu, mais il est suggéré que celui-ci change de conformation pour passer à travers la membrane lipidique sans toutefois passer par le pore (Geny & Popoff, 2006; Zalman & Wisniewski, 1984).

1.4.4. L'aérolysine

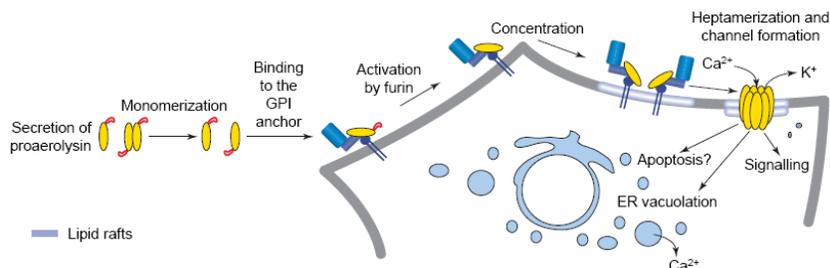


Figure 1.17 : mode d'action de l'aérolysine (Abrami *et al.*, 2000).

L'aérolysine est sécrétée par une bactérie à Gram négatif de la famille des *Aeromonas* et a une activité hémolytique. Elles sont dangereuses pour un grand nombre d'animaux et causent des problèmes gastro-intestinaux chez l'homme. Ces bactéries produisent une protoxine bilobée, la proaérolysine (un précurseur hydrosoluble) de 52kDa. Ce précurseur reconnaît de façon spécifique le motif glycosylphosphatidylinositol (GPI) des membranes plasmiques. Une protéase cellulaire vient ensuite cliver 40 résidus du domaine C-terminal, ce qui permet à la toxine activée de s'oligomériser en heptamère pour former un pore (figure 1.17) dont l'ouverture (0.6 à 1 nm de diamètre) peut être contrôlée par le voltage (ouverture entre $\pm 70\text{mV}$) (Wilmsen *et al.*, 1990) et qui mènera la cellule à la lyse osmotique (Parker & Feil, 2005).

Cette toxine est composée de 4 domaines. Le rôle de chacun des domaines n'a pas encore été établi. Mais il est fortement suggéré que les domaines III et IV soient responsables de la formation des pores et que le pore lui-même est produit par le domaine III. Une grande boucle du domaine III comprenant une trentaine de résidus pourrait d'ailleurs être transmembranaire et faire partie du lumen du pore de l'aérolysine (Parker *et al.*, 1994; Tsitrin *et al.*, 2002). Cette propriété a été suggérée, car la création de plusieurs ponts disulfures entre deux cystéines insérées entre les positions 240 et 300 de la boucle a provoqué une inhibition de l'activité hémolytique de la toxine (Rossjohn *et al.*, 1998; Iacovache *et al.*, 2006).

Les gels de Coomassie des toxines mutantes en solutions ont montré que l'oligomérisation n'est pas affectée par les doubles mutations cystéines, ou toute autre mutation cystéine simple dans la boucle étudiée. De plus, les expériences d'électrophysiologie en voltage imposé ont montré qu'en conditions non-réductrices, les mutants ne pouvaient pas former de canaux. En ajoutant un agent réducteur comme le β -mercaptoethanol (β MeOH) dans la solution d'expérimentation, les toxines mutantes ont pu retrouver leur capacité à former des pores, suggérant que ces ponts disulfures sont accessibles à l'agent réducteur et qu'ils pourraient faire partie du lumen du pore (Iacovache *et al.*, 2006).

Enfin, un SCAM a été effectué sur toute la boucle du domaine III pour déterminer quels résidus faisaient partie du lumen du pore. Tous les mutants cystéines ont été mis en présence de la sonde MTSEA-biotine, car les positions faisant face aux lipides ne peuvent pas se lier au MTSEA et n'affecteront pas la fonction du pore.



Figure 1.18 : Boucle transmembranaire du domaine III de l'aérolysine, les résidus en rouges ont réagi avec le MTSEA-biotine et font face au lumen du pore, les résidus en noir n'ont pas réagi avec le MTSEA-biotine et font face aux lipides (Iacovache *et al.*, 2006)

D'après ces résultats et aussi d'après la nature hydrophobe des résidus composant la boucle, il est suggéré que l'oligomérisation en heptamère va amener l'ensemble des 7 boucles à se tordre en forme de rivet dans la bicouche (Iacovache *et al.*, 2006).

1.4.5. Les techniques en résumé

La topologie des toxines par rapport à la membrane lipidique peut être étudiée de plusieurs manières. Premièrement, avec un système de vésicules lipidiques, on peut observer des variations des caractéristiques spectrales des fluorophores qui sont liés à une position particulière qui change ou pas d'environnement. Dans cette optique, la mutagénèse dirigée pour remplacer un résidu quelconque par une cystéine, a permis pour les expériences en vésicules autant qu'en bicouche lipidique de marquer les positions étudiées. Pour les deux systèmes, cela a permis aussi de produire des expériences de biotine/streptavidine et de FRET. Les expériences de biotinylation en vésicules ont permis d'étudier comment les variations spectrales pouvaient être influencées par le maintien de la conformation du pore soit en position fermée ou ouverte. En bicouche, le même effet fut étudié sur le « gating » pour ainsi permettre d'identifier les positions susceptibles d'être mobiles.

La technique du SCAM couplée avec l'électrophysiologie ou la fluorescence est populaire pour caractériser la topologie du lumen du pore par rapport à la bicouche lipidique. Dans tous les cas, la même limitation est notable : les observations obtenues proviennent d'une conformation en particulier. Il faut changer les conditions d'expérimentation pour étudier une autre conformation. Il n'est pas possible d'étudier la dynamique de la formation du pore, ou encore la dynamique de « gating » dans ces conditions.

1.5. Hypothèses et objectifs

Les mécanismes d'insertion des toxines Cry dans les bicouches lipidiques ont été grandement étudiés (voir section 1.1.3.). En ce qui concerne la Cry1Aa, il est admis que les monomères de toxine s'assemblent en pores à la membrane. Aucun consensus n'existe toutefois sur le processus d'insertion de la toxine dans la bicouche lipidique et la dynamique du phénomène de perméabilisation n'a pas été étudié (voir section 1.1.3 et 1.1.4). Parmi les modèles d'insertion suggérés, on retrouve le modèle du canif, le modèle du parapluie et celui du « dragon enfoui ». Ces modèles ne font que suggérer une conformation finale de la toxine après son insertion dans la membrane une fois que le

pore est formé. Toutefois, la topologie de la toxine par rapport à la bicouche lipidique ne demeure pas statique durant le processus de perméabilisation. Il n'y a pas d'études qui ont porté directement sur le phénomène pour pouvoir le caractériser. De plus, les différents groupes de recherche ne s'accordent pas sur le nombre de sous-unités fonctionnelles nécessaires à l'apparition d'un courant ionique transmembranaire. Alors que certains groupes proposent que le pore fonctionnel de la Cry1Aa comporte quatre sous unités, d'autres suggèrent que des niveaux d'oligomérisation inférieurs au tétramère de Cry1Aa pourraient produire un pore fonctionnel (Peyronnet *et al.*, 2001; Tomimoto *et al.*, 2006).

Afin de comprendre comment une toxine agit, il est important de comprendre comment les pores se forment. Même si dans certains cas la présence du pore n'est pas la cause de la destruction cellulaire (les toxines à activité cytotoxiques, par exemple), il reste néanmoins que la formation du pore est une étape commune à toutes les infections provoquées par ces toxines. Ceci permettra entre autre de mieux comprendre le mode d'action de maladies létales telles l'anthrax, le botulisme ou la diphtérie.

Nous proposons de tester l'hypothèse selon laquelle les processus d'insertion et subséquent de formation des pores des toxines dans leur environnement lipidique impliquent d'importants changements de conformations qui rendront leurs structures différentes de celles proposées par les structures cristallines (Grochulski *et al.*, 1995; Gazit *et al.*, 1998; Wiener *et al.*, 1997; Qiu *et al.*, 1996).

L'originalité de la méthode que nous avons utilisée provient du fait que la topologie de la Cry1Aa a été étudiée en bicouche lipidique par des méthodes de FRET (permettant de mesurer le mouvement des positions étudiées) de façon simultanée avec l'électrophysiologie en voltage imposé afin de relier le « gating » du canal et le mouvement de la position du résidu étudié.

La première partie du travail consiste à étudier la formation des pores de la toxine Cry1Aa. Nous testons l'hypothèse que la toxine Cry1Aa se lie à la membrane lipidique sous forme de monomère. Par la suite, la protéine subit divers changements de conformations qui lui permettraient de s'assembler en différents oligomères qui comprendraient au plus 4 sous-unités. Enfin, le complexe protéique pourrait subir

d'autres changements de conformation qui lui permettraient de perméabiliser la membrane. L'objectif premier dans le cadre de l'étude de la Cry1Aa est d'établir la topologie du domaine formeur de pores de la toxine en déterminant de quel côté de la bicouche lipidique se trouve chacune des hélices durant le processus de perméabilisation de la membrane. Pour ce faire, chaque boucle reliant ces hélices est marquée avec un fluorophore (voir figure 1.20) dit donneur (le Tétraméthylrhodamine-5-maléimide, ou TMR5M) alors qu'un « quencher » ou un accepteur, le dipicrylamine (DPA), se retrouve dans la membrane. Le DPA est une molécule dont la charge nette est négative et qui est lipophile. Cette molécule va se répandre dans la bicouche lipidique, et se déplacera normalement en fonction du potentiel membranaire. Le spectre d'émission du TMRM recouvre le spectre d'absorption du DPA (voir figure 1.19 (a)), la théorie du FRET (voir section 2.2.7) indique que le TMRM peut transférer son état excité au DPA (qui est un « quencher »), avec $R_0 = 35 \text{ \AA}$ (Groulx *et al.*, 2010). Les variations de fluorescence du TMRM avec le DPA vont indiquer de quel côté de la membrane lipidique se trouve la région de la protéine marquée (voir 1.19 (b)).

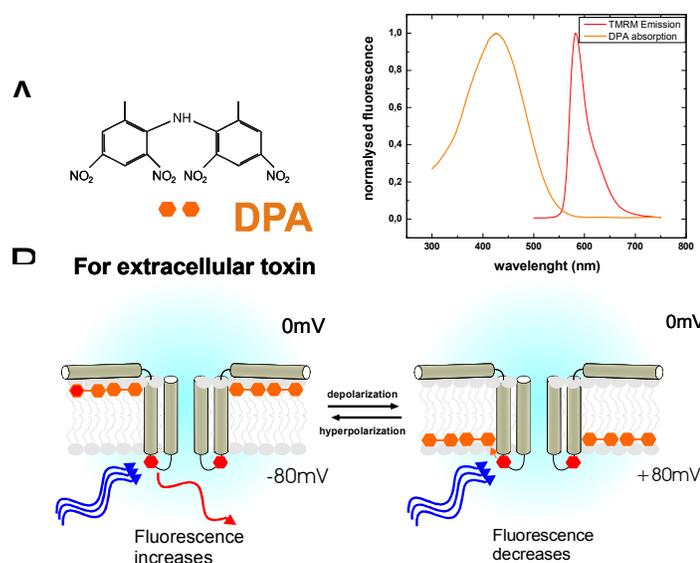


Figure 1.19. : (a) l'émission du TMRM recouvre l'absorption du DPA, ce leur permet d'entrer en FRET ($R_0 = 35 \text{ \AA}$). (b) le DPA entre en interaction avec le TMRM lorsqu'il se trouve à proximité. Il en résulte une diminution de la fluorescence. Quand le DPA est déplacé de l'autre côté de la bicouche, la fluorescence augmente (modifié de (Groulx *et al.*, 2010)).

Cette technique nous permettra de déterminer laquelle ou lesquelles de ces régions subit un changement de conformation et traverse la membrane, donc forment le pore. Une étude de double FRET impliquant deux accepteurs présents dans la membrane (le DPA et l'oxonol) et un donneur (la fluorescein-5-maleimide) localisé aux mêmes positions que celles étudiées pour les expériences simple FRET nous permettra d'étudier plus précisément la position de chacun des mutants entre les deux feuillettes de la bicouche lipidique.

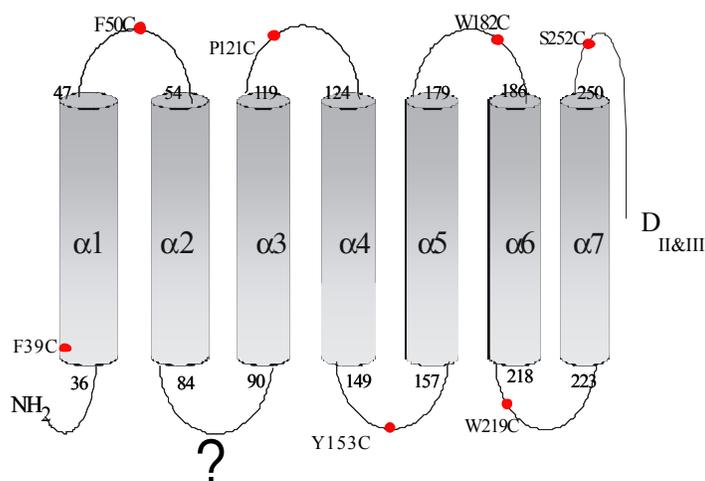


Figure 1.20. : différentes positions marquées sur le domaine formeur de pore de la toxine Cry1Aa. Le domaine est constitué de 7 hélices reliées entre elles. Les positions marquées se trouvent dans ces boucles. Le point d'interrogation représente une mutation qui n'a pas pu être produite. Modèle 2D inspiré de (Schwartz et al., 1997a)

La seconde partie du travail consistera à étudier la dynamique d'oligomérisation de la toxine. Nous voulons aussi déterminer si l'insertion de la toxine dans la membrane lipidique précède ou non l'oligomérisation. Une étude de photoblanchiment sera menée afin de déterminer le degré d'oligomérisation des pores (voir section 2.2.5). Les résultats seront comparés aux modèles actuels et éventuellement, un modèle amélioré de formation des pores sera proposé.

Finalement, la dynamique du « gating » de la colicine 1a, c'est-à-dire, les mouvements qui sont produits par certaines régions de la toxine lors de l'ouverture et de la fermeture du canal, est un phénomène qui n'a pas été décrit jusqu'à maintenant. Nous proposons

de tester l'hypothèse selon laquelle la cinétique de formation des pores s'effectuerait en 2 étapes (Nogueira & Varanda, 1988).

Il nous a été offert par le groupe du Dr. Finkelstein (départements de physiologie & biophysique et neurosciences, école de médecine Albert Einstein), de vérifier cette hypothèse en testant trois différentes positions du domaine formeur de pore.

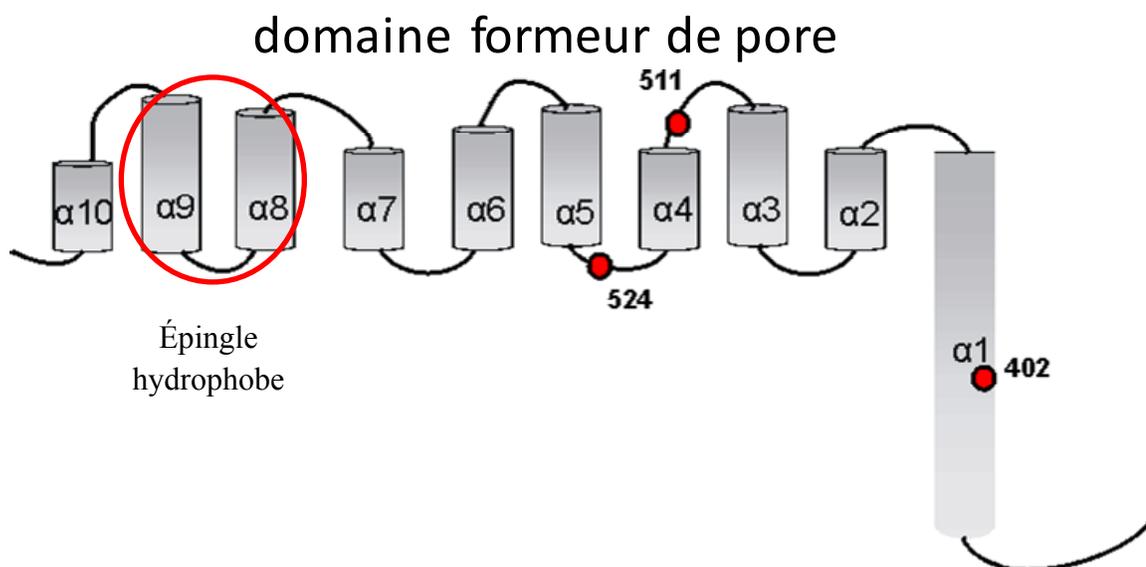
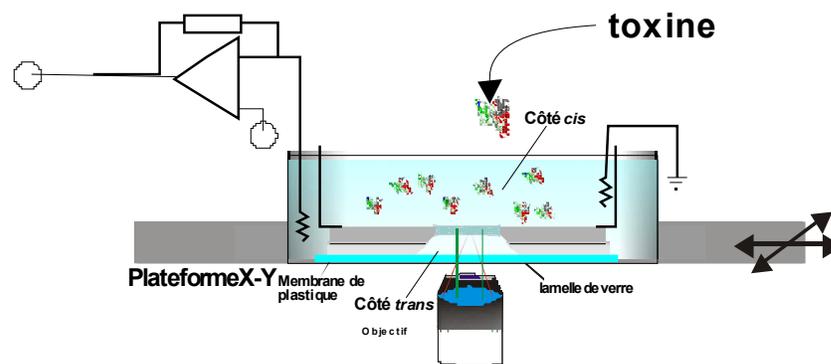


Figure 1.21. : Structure secondaire prédite (Wiener *et al.*, 1997) et positions des mutations étudiées sur le domaine formeur de pore de la colicine 1a

La première position, S402 (figure 1.21), sur l'hélice 1 lui confère théoriquement la particularité de ne pas bouger de la membrane interne, même durant la formation du pore. Les deux autres positions se trouvent dans les boucles reliant les hélices $\alpha 3$ - $\alpha 4$ et $\alpha 4$ - $\alpha 5$. Ces deux autres positions, respectivement K511 et K524 sont supposées réagir à une dépolarisation membranaire et se retrouver du côté cytosolique de la membrane plasmique (Slatin *et al.*, 1994; Qiu *et al.*, 1996). Si les positions testées suivent bien la cinétique à deux étapes comme le propose le modèle du parapluie, les variations de fluorescences devraient changer en suivant une cinétique en 2 états.

MÉTHODOLOGIE



2.1. Cry1Aa : matériel et méthode

La méthodologie appliquée dans cet ouvrage a été grandement expliquée dans les deux articles déjà publiés et soumis (voir section 3). Il s'agit majoritairement d'expériences de FRET (voir introduction 1.1.2.7) combinées à l'électrophysiologie afin d'étudier les mécanismes moléculaires de formation des pores des PFTs. La toxine Cry1Aa a été étudiée dans deux articles. Les mutants de la Cry1Aa ont été produits par le groupe des Drs. Jean-Louis Schwartz et de Raynald Laprade.

2.1.1. Montage expérimental pour le FRET

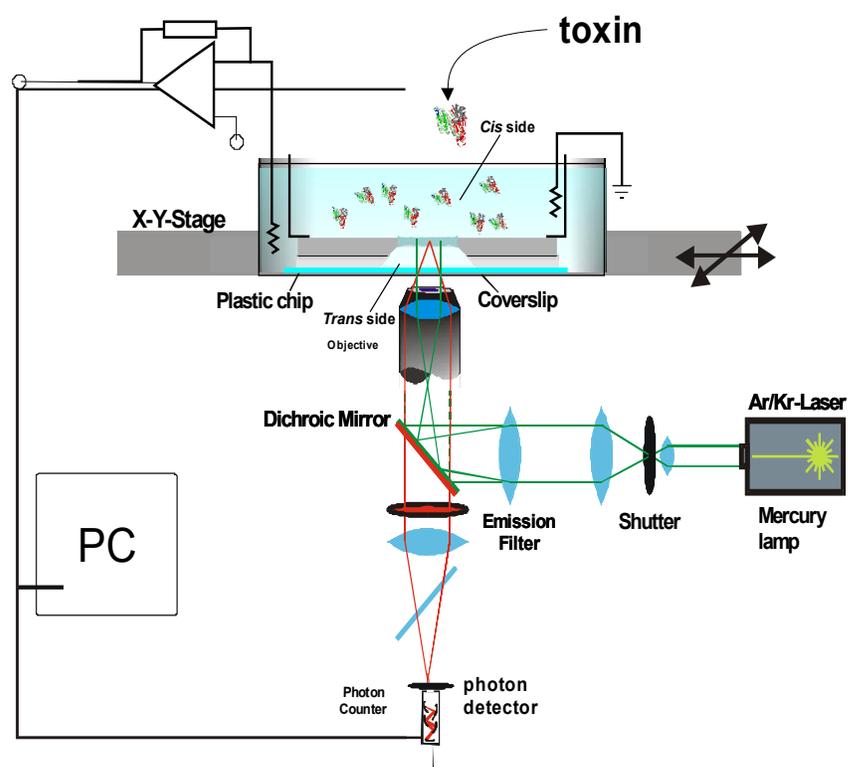


Figure 2.1. : montage expérimentale pour les expériences de FRET en BLM. Figure adaptée de (Groulx et al., 2010)

La figure 2.1. représente le montage utilisé dans la grande majorité des manipulations : une chambre externe repose sur un support monté sur un microscope inversé. Une chambre interne sera apposée et soutenue au dessus de l'objectif de manière à centrer l'orifice circulaire d'environ 200 μm de la partition de téflon au dessus de l'objectif. De

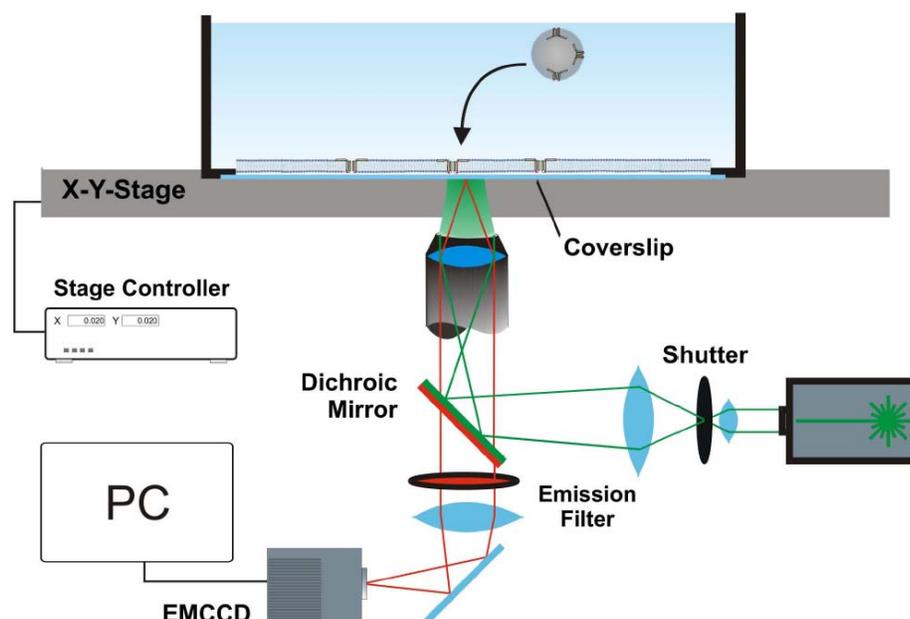
cette manière, un accès optique à la bicouche lipidique peinte sur cet orifice sera possible. Le système est relié à un amplificateur d'électrophysiologie (Axopatch-1D, Axon Instruments, Union City CA) utilisé en voltage imposé. Le côté où l'on rajoute la toxine (voir figure 2.1.) est mis à la terre et est appelé côté *cis*. L'autre côté est relié à l'électrode d'injection (voir introduction 1.1.1) et est appelé côté *trans*. L'échantillon sera excité soit avec une lampe au mercure dont la lumière sera filtrée pour exciter l'échantillon à la longueur d'onde appropriée, soit avec une diode-laser à 532 nm (World Star Technology). Une fois excité, l'échantillon va réémettre de la lumière dont l'émission sera filtrée par un filtre d'émission. Cette lumière d'émission sera captée par une photodiode reliée à un amplificateur Photomax 200 (Dagan Corp.) puis amplifiée pour pouvoir produire le signal de fluorescence étudié.

2.1.2. Montage expérimental des tests de photoblanchiment en bicouche supportée

Une technique récente mise au point par (Ulbrich & Isacoff, 2007) permet de combiner l'étude des protéines dans un environnement très stable, les vésicules, et la propriété de photoblanchiment du fluorophore. Si l'efficacité de marquage de la protéine étudiée est proche de 100%, alors il devient possible d'étudier le nombre de sous-unités qui forment le pore. L'idée est de reconstituer les protéines dans des vésicules lipidiques qui seront injectées à faible concentration dans la chambre externe du côté *cis* (voir figure 2.2). Les vésicules formeront ainsi une bicouche supportée sur lamelle de verre. En utilisant une caméra CCD (« charged coupled device ») de haute sensibilité, les pores sont spatialement dissociables. Dans ces conditions, la fluorescence provenant d'un pixel provient d'un seul pore ou canal.

Une fois que les vésicules contenant les protéines sont fusionnées à la lamelle de verre pour former une bicouche lipidique, il suffit d'éclairer les protéines marquées à leur longueur d'onde d'excitation, ce qui aura pour effet de provoquer le photoblanchiment des fluorophores. Si l'efficacité de marquage approche 100%, cela veut dire que tous les monomères composant les pores/canaux sont marqués. Il s'en suivra une diminution globale de la fluorescence provenant de la lamelle de verre provoquée par le photoblanchiment successif des différentes sous-unités. De cette manière, il suffit d'établir les statistiques du nombre de sauts de fluorescence jusqu'au niveau de bruit

pour déterminer le nombre de sous-unités qui composent la protéine (Ulbrich & Isacoff, 2007; Blunck *et al.*, 2008).



2.2. : montage pour les tests en bicouches supportées
adapté de (Groulx *et al.*, 2011)

Le montage en bicouche supportée est essentiellement le même que celui en bicouche conventionnelle (figure 2.1.). Il n’y a toutefois pas de besoin de chambre interne étant donné que les vésicules fusionnent directement sur la lamelle de verre pour former une bicouche lipidique. Un laser émet une longueur d’onde de 532 nm et illumine l’échantillon. La lumière réémise par l’échantillon est recueillie par une caméra à haute sensibilité EMCCD refroidie (iXon+ 860BV, Andor Technology).

Les expériences ont été menées en bicouches planaires qui ne contenaient pas les récepteurs. La raison principale est que ces expériences ont pour but d’étudier le mouvement des toxines. Des pores sont observables sans avoir besoin d’introduire les récepteurs qui sont normalement présents dans les bordures en brosse des cellules visées par la toxine. La première étape à suivre quand une toxine formeuse de pore fonctionnelle sans récepteur est étudiée est de connaître tous ses mécanismes moléculaires de formation des pores avant d’étudier ces mêmes mécanismes en présence

des récepteurs pour pouvoir les comparer. C'est pourquoi ce travail sur les dynamiques de formation des pores et d'oligomérisation de la Cry1Aa a été mené sans récepteurs présents dans la phase lipidique.

2.1.3. Conditions expérimentales particulière à l'étude de la Cry1Aa

2.1.3.1. Les fluorophores TMR, fluoresceine, DPA, oxonol et ANEP

On distingue plusieurs types de fluorophores. Il y a les fluorophores intrinsèques, dont la fluorescence est due aux acides aminés aromatiques tels le tryptophane (Trp), la tyrosine (Tyr) et la phénylalanine (Phe). Ces molécules sont excitables dans les UV. On retrouve également les fluorophores extrinsèques. On retrouve également les fluorophores extrinsèques, qui pourront être liés à des molécules non fluorescentes comme des protéines ou des lipides (Lakowicz, 2006).

Ces fluorophores de marquage sont liés de façon covalente ou non covalente aux protéines d'étude. Les sondes covalentes peuvent posséder différents types de groupes réactifs, pour permettre le couplage avec des groupements amines, sulfhydryls ou histidines des protéines (Weber, 1951).

Les fluorescéines et les rhodamines sont des exemples de sondes extrinsèques qui ont été grandement utilisées. Elles ont des spectres d'absorption très étendus, possèdent de grands coefficients d'extinction molaire et sont insensibles à la polarité du solvant. Dans le cas de cette étude, le groupement réactif maléimide a été utilisé pour permettre de créer un lien covalent avec une cystéine ajoutée à la structure primaire de la protéine d'étude (la protéine sauvage étant dépourvue de cystéine) (Groulx *et al.*, 2010).

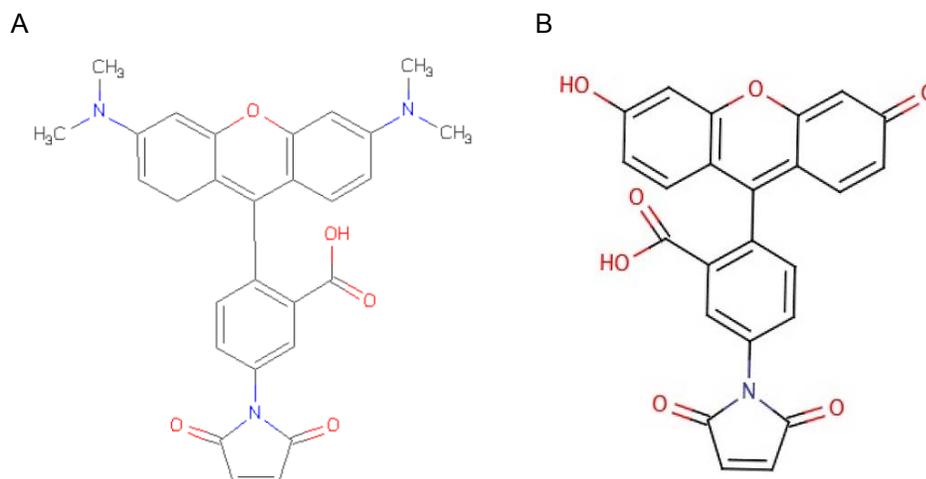


Figure 2.3. : A. structure de tétraméthylrhodamine-5-maléimide (<http://xray.bmc.uu.se/hicup/RHO/index.html>). B. structure de la fluoresceine-5-maléimide (www.scbt.com).

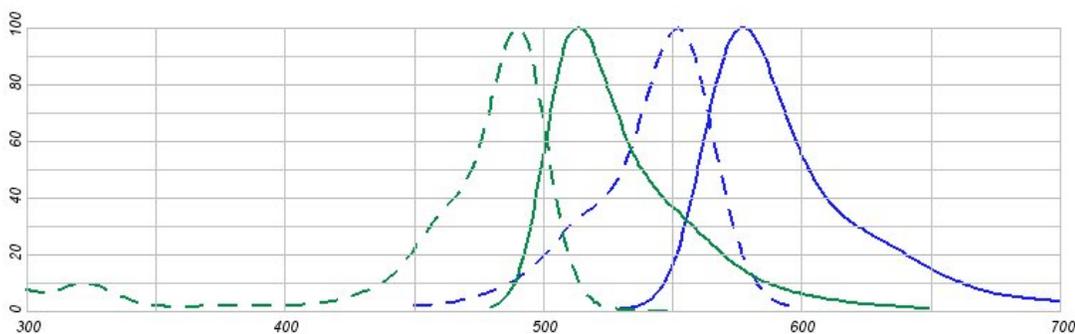


Figure 2.4. : spectres d'excitation (ligne pointillée) et d'émission (ligne pleine) de la fluoresceine (vert) et du TMRM (bleu)

Il existe également des sondes membranaires amphiphiles dépendantes du voltage qui vont se déplacer d'un côté à l'autre de la bicouche selon le potentiel membranaire que l'on pourra imposer. On retrouve entre autre le dipycrilamine (DPA) et les oxonols (Gonzalez & Tsien, 1995; Chanda *et al.*, 2005a). Il devient alors possible de faire diverses expériences de FRET avec des sondes liées sur des protéines et qui interagissent avec d'autres sondes contenues dans la membrane des cellules.

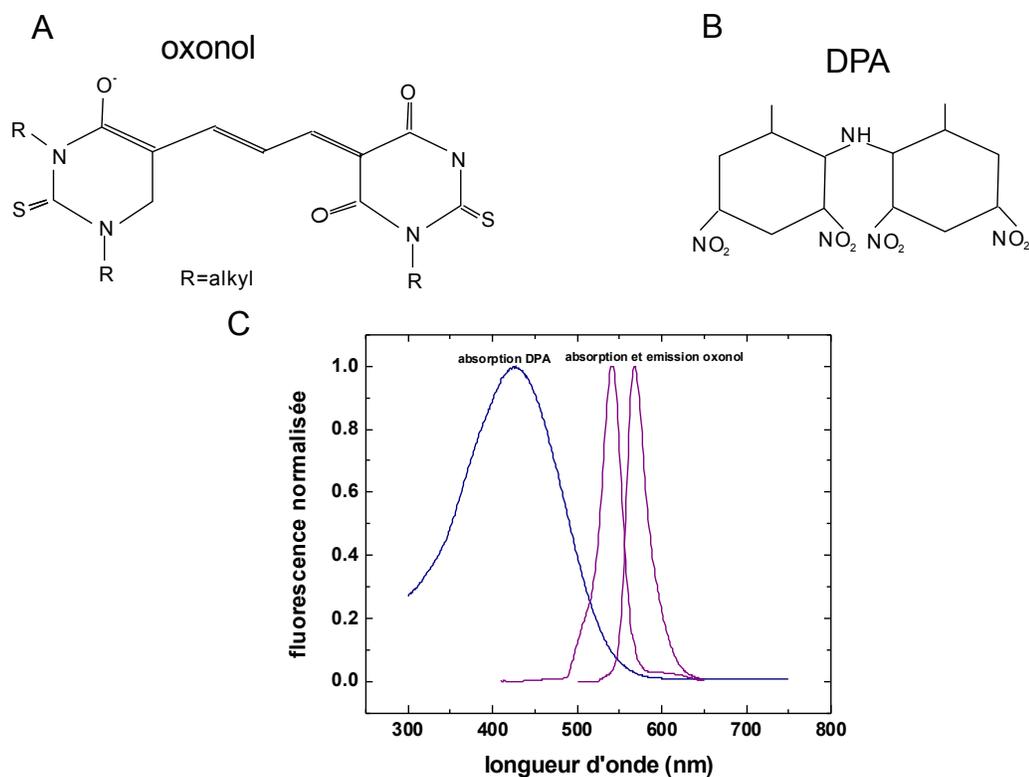


Figure 2.5. Caractéristiques des accepteurs utilisés : structures de l'oxonol (A) et du DPA (B) et spectres d'absorption du DPA (bleu) et spectres d'excitation et d'émission de l'oxonol (en mauve) dans l'octanol (C).

Notons que le DPA est une sonde ne possédant pas de spectre d'émission, c'est une molécule qui absorbe dans une grande gamme de longueurs d'ondes sans émettre de photon en retour (voir figure 2.5.).

La sonde de type ANEP (AminoNaphthylEthenylPyridinium), di-8-ANEPPS (figure 2.6.) est une sonde sensible au potentiel qui permet la détection rapide des changements de potentiels membranaires. Cette sonde est très peu susceptible de se faire internaliser et reste intercalée entre les phospholipides composant le feuillet externe de la membrane lipidique. Le groupement alkyle du composé étant très long, cela confine ce fluorophore au feuillet externe de la membrane. Cette sonde n'émet pas de fluorescence en solution aqueuse, mais devient très fluorescente si elle entre en contact avec des lipides. Cette sonde est aussi connue pour sa très grande photostabilité et sa très faible toxicité sur les cellules animales en culture. Il est notamment très avantageux d'utiliser cette sonde, car elle peut facilement indiquer une variation de fluorescence de 10-15% par rapport à la

fluorescence de base si on applique une variation de potentiel membranaire de 100 mV (Loew *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1998).

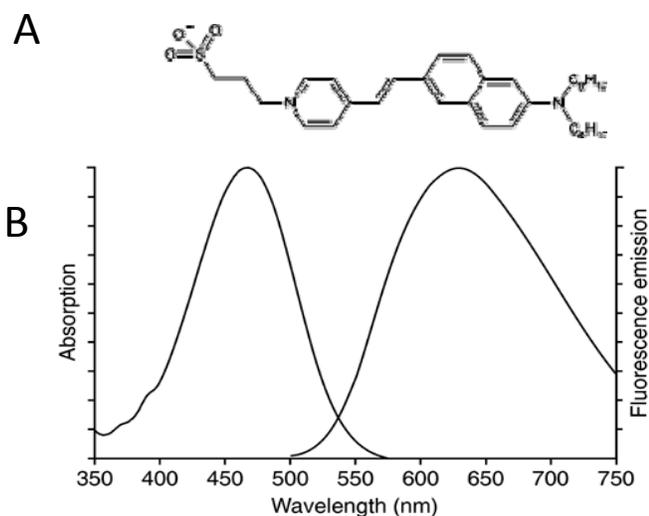


Figure 2.6. : A. structure de di-8-ANEPPS

www.enzolifesciences.com/ENZ-52204/di-8-anepps

B. spectres d'absorption et d'émission de la di-8-ANEPPS

www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/Product-Spectra.3167lip.html

Les conditions de travail : protocoles, solutions, constitution des lipides tant pour les expériences en FRET que de photoblanchiment sont décrites en détail dans les articles qui suivent à la section 3.

2.2. Colicine 1a : matériel et méthode

2.2.1. Les solutions expérimentales

Il y a deux types de solutions utilisées pour traiter la colicine 1a : la solution d'entreposage et la solution d'expérimentation.

- La solution d'entreposage comprend 50 mM d'acide borique; 300 mM NaCl; 2 mM d'EDTA. Le pH de la solution est ajusté à 9.
- La solution expérimentale comprend 100mM de KCl; 5mM CaCl₂; 20mM de Hepes; 1mM de EDTA. Le pH est ajusté à 7.

2.2.2. Le marquage des mutants

La colicine Ia sauvage ne contient pas de cystéine. Le marquage des mutants où une cystéine a été introduite a été effectué avec du TMRM et a suivi le même protocole de marquage que la Cry1Aa (voir article 1.). L'efficacité de marquage (EOL = #fluorophores liés/# protéines) fut de 0,48 pour le S402C, de 0,8 pour le K511C et de 1,1 pour le K524C. Un seul marquage a été nécessaire pour nos échantillons. En marquant la protéine sauvage en parallèle, on peut estimer le marquage non spécifique obtenu dans tous les cas. Le EOL de la protéine sauvage fut de $0,09 \pm 0.1$

2.2.3. Composition des lipides des bicouches membranaires

Le composé lipidique est constitué de POPG et POPC en proportion 1:4 (Avanti Polar Lipids, 20 mg/mL) à partir d'un stock de lipides en suspension dans du CHCl_3 . Le CHCl_3 est évaporé avec un jet d'azote et les lipides sont re-suspendus dans de l'hexadécane à une concentration de 20 mg/ml (Sigma-Aldrich, Oakville, ON).

2.2.4. Protocole expérimental

Le protocole expérimental est semblable à celui utilisé pour la Cry1Aa (voir article 1 et figure 2.1). Les solutions interne et externe contiennent 10 μM DPA.

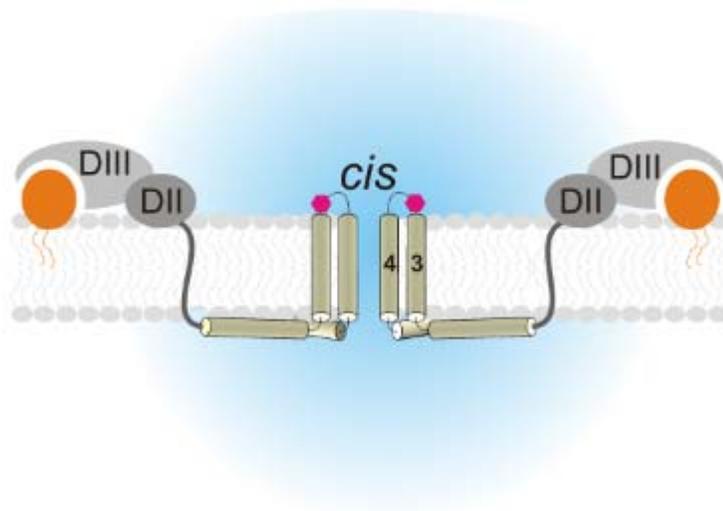
La bicouche lipidique membranaire est peinte sur un orifice de 200 μm . Une fois la bicouche électriquement stable, on peut injecter la toxine (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) du côté *cis* (voir figure 2.1). Un voltage est imposé aux extrémités de la bicouche lipidique, le côté *cis* étant mis à la masse. L'incorporation des vésicules dans la membrane se mesure par les variations du courant capacitif de la bicouche. Le temps d'incubation de 5 à 10 min est suffisant pour obtenir une quantité appréciable de canaux. Finalement il faut laver la chambre externe (du côté *cis*) avec au moins cinq fois son propre volume pour s'assurer qu'il ne reste plus de toxines en suspension.

Au moment de la prise de mesures, il faut exciter l'échantillon marqué avec le TMRM à la longueur d'onde de 545/25 nm et enregistrer la bonne longueur d'onde émise de 605/70 nm.

RÉSULTATS

et

ANALYSES



1. IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT ET PROGRAMME

Nom	Groulx, Nicolas
Code permanent	GRON06028100
Titre et numéro de programme	PH.D. PHYSIQUE option biophysique/physiologie moléculaires 3-200-1-00

2. LISTE DES ARTICLES PROPOSÉS

1. Nicolas Groulx, Marc Juteau et Rikard Blunck; **Rapid Topology Probing using Fluorescence Spectroscopy in Planar Lipid Bilayer: The pore-forming mechanism of the toxin Cry1Aa of *B. thuringiensis***; Journal of General Physiology; vol. 136, no.5, 497-513, publié en novembre 2010
2. Nicolas Groulx*, Hugo McGuire*, Raynald Laprade, Jean-Louis Schwartz et Rikard Blunck; **Oligomerization Study of Single Pore Forming Cry1Aa toxins of *B. Thuringiensis* using Fluorescence Spectroscopy Reveals Tetramerization**; Journal of Biological Chemistry; publié en décembre 2011

*ces deux auteurs ont contribué également

Pour l'article 1, j'ai produit les protéines expérimentales, j'ai produit toutes les expérimentations/contrôles et l'analyse des résultats. L'idée d'établir la topologie 2D du domaine formeur de pore fut la mienne. J'ai contribué à l'écriture et aux simulations statistiques de l'article et ai contribué à la production des figures apparaissant dans l'article. Docteur Blunck a rédigé l'article, a développé le système de mesure, ainsi que la théorie du double-FRET.

Pour l'article 2, premièrement l'idée d'étudier l'oligomérisation de la toxine grâce à cette technique fut suggérée ma suggestion, j'ai purifié les protéines expérimentales, et ai participé aux prises de mesures expérimentales et ai fait l'analyse des distributions des

données. Hugo et moi avons écrit la première version de l'article et toutes les figures qui se trouvent dedans. Hugo McGuire a participé à l'écriture et aux prises de données expérimentales en plus d'avoir contribué aux simulations statistiques de l'article. Docteur Blunck a grandement contribué à l'écriture, surtout de la version finale publiée et aux simulations numériques statistiques de l'article. Jean-Louis Schwartz et Raynald Laprade ont contribué à l'écriture de l'article.

1. Rapid Topology Probing using Fluorescence Spectroscopy in Planar Lipid Bilayer : The pore-forming mechanism of the toxin Cry1Aa of *B. thuringiensis*

Nicolas Groulx^{1,3}, Marc Juteau^{2,3} and Rikard Blunck^{1,2,3*}

¹Departments of Physics and ²of Physiology and ³Groupe d'étude des protéines membranaires (GÉPROM), Université de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

RUNNING TITLE: pore-forming mechanism of Cry1 of *B. thuringiensis*

*To whom correspondence should be addressed:

Rikard Blunck
Université de Montréal
Departments of Physics and of Physiology
C.P. 6128 succ. Centre-ville
Montréal, QC H3C 3J7
Canada

Abstract

Pore-forming toxins, many of which are pathogenic to humans, are highly dynamic proteins that adopt a different conformation in aqueous solution than in the lipid environment of the host membrane. Consequently, their crystal structures obtained in aqueous environment do not reflect the active conformation in the membrane, making it difficult to deduce the molecular determinants responsible for pore formation. To obtain structural information directly in the membrane, we introduce a fluorescence technique to probe the native topology of pore-forming toxins in planar lipid bilayers and follow their movement during pore formation. Using a FRET approach between site-directedly labeled proteins and an absorbing compound (dipicrylamine) in the membrane, we simultaneously recorded the electrical current and fluorescence emission in horizontal planar lipid bilayers formed in plastic chips. With this system, we mapped the topology of the pore-forming domain of Cry1Aa, a biological pesticide from *B. thuringiensis*, by determining the location of the loops between its seven α -helices. We found that the majority of the toxins initially traverses from the *cis*- to the *trans*-leaflet of the membrane. Comparing the topologies of Cry1Aa in the active and inactive state in order to identify the pore-forming mechanism, we established that only the α 3- α 4 hairpin translocates through the membrane from the *trans*- to the *cis*-leaflet whereas all other positions remained constant. As toxins are highly dynamic proteins, populations that differ in conformation might be present simultaneously. To test the presence of different populations, we designed double-FRET experiments, where a single donor interacts with two acceptors with very different kinetics (dipicrylamine and oxonol). Due to the non-linear response of FRET and the dynamic change of the acceptor distribution, we can deduce the distribution of the acceptors in the membrane from the time-course of the donor fluorescence. We found that Cry1Aa is present on both membrane leaflets.

KEYWORDS: pore-forming toxins, fluorescence spectroscopy, planar lipid bilayer, *Bacillus thuringiensis*, Förster resonance energy transfer (FRET)

Introduction

The method of choice in determining the 3-dimensional structure of a membrane protein is solving the high-resolution crystal structure. However, crystallization is time consuming and crystal structures are difficult to obtain. Moreover, in the case of more flexible proteins, such as pore-forming toxins, crystal structures often do not reflect the structure in the native membrane. Many pore-forming toxins adopt in solution a different conformation than in their target membrane, for they undergo major conformational changes that are often related to the pore-forming mechanism. This class of proteins includes the toxins of the pathogens *Clostridium botulinum* (Botulinum Neurotoxins), *Clostridium tetani* (Tetanus toxin) and *Bacillus anthracis* (Anthrax toxin), which are all potentially lethal to humans, but also the toxins of *Bacillus thuringiensis*, one of which (Cry1Aa) we studied here.

Cry1Aa is widely used as a biological pesticide in forestry due to its high specificity for insects belonging to the family of lepidoptera (Schnepf *et al.*, 1998), whose larvae damage forests and crop. Its protoxin is taken up by the larvae through ingestion and is activated by proteases in the digestive tract (Ogiwara *et al.*, 1992; Knowles, 1994). It unfolds its cytolytic activity in the midgut of the larvae. Then, the toxins lead, after binding to a specific receptor and pore formation in the membrane, to cell destruction and finally death (Peyronnet *et al.*, 2001).

The crystal structure of Cry1Aa has been solved in 1995 (Grochulski *et al.*, 1995), followed by the crystal structures of several other toxins of *B. thuringiensis* (Boonserm *et al.*, 2005; Cohen *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Li *et al.*, 1991; Akiba *et al.*, 2009). Cry1Aa shows a typical 3-domain structure (Fig. 1b). Domains II and III are responsible for receptor binding (Schnepf *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1995; Aronson *et al.*, 1995), and Domain I, consisting of 7 α -helices α 1- α 7, is responsible for pore formation (Schwartz *et al.*, 1997b). Pores formed by Cry1Aa have been well characterized by electrophysiology. Schwartz *et al.* (Peyronnet *et al.*, 2000) demonstrated that the pores show well-defined conductivity and selectivity for cations. The permeability, as shown by Peyronnet *et al.* (Peyronnet *et al.*, 2001), is dependent also on the size of the cation. At higher concentrations, however, the conductivity increases, suggesting larger pore

diameter (Peyronnet *et al.*, 2001). The pore-forming entity for the well-defined pores has been suggested to be tetrameric based on atomic force microscopy (Vie *et al.*, 2001). Finally, the helix $\alpha 4$ has been shown by means of mutagenesis and electrophysiology to be the pore-lining helix (Vachon *et al.*, 2004). The presence of the receptors favors annealing of the toxin to the membrane but is not necessary for pore formation (Peyronnet *et al.*, 2001).

Based on the above results, the “umbrella” model has been proposed. According to this model, the seven α -helices of domain I anneal to the outer leaflet of the membrane and form tetramers (Gazit *et al.*, 1998), and in order to achieve pore formation, the $\alpha 4$ - $\alpha 5$ hairpins translocate through the bilayer to form an ion conducting pore in the center (Fig. 1d). Recent findings that helices other than $\alpha 4$ also insert into the membrane, however, suggest that the refolding of Cry1Aa may be more complex than has been previously recognized (Nair & Dean, 2008; Tomimoto *et al.*, 2006). Yet, attempts at uncovering the molecular mechanism of pore formation of Cry1Aa have been hampered by the fact that the refolding occurs after binding to the membrane, and, thus, cannot be presently imaged using crystallography, which provides the structure in solution, i.e., before entering the membrane.

Here, we present a novel technique using Förster resonance energy transfer (FRET) between site-directedly labeled toxins and the membrane, which allows probing of the topology of Cry1Aa in a planar lipid bilayer where they are assumed to adopt their native conformation. We used a horizontal bilayer chamber design with which we can image a planar lipid bilayer with a high-numerical aperture objective (Fig. 1a). We have simultaneous electrical and optical access to the membrane so that we can control the membrane potential and measure electric currents as well as record the fluorescence changes. With this technique, we have been able to observe the topology of Cry1Aa after its insertion into the membrane, and to successfully examine and elucidate its pore-forming mechanism.

Materials and Methods

Mutagenesis, purification and labeling of Cry1Aa

Cry1Aa constructs in plasmid vectors pMP39 and pBA1 were described earlier (Bah *et al.*, 2004; Masson *et al.*, 1990). Cysteine mutations were introduced using Quikchange (Stratagene, LaJolla, CA) and amplified using Qiagen Miniprep Kits (Qiagen, Mississauga, ON) following standard protocols. Constructs were sequenced in order to verify mutations. Most mutants were transformed into *B. thuringiensis* (BT) except S39C, which was grown in *E. coli* strain DH5. Bacteria were grown 3 days in YT at 37°C containing 10 µg/ml tetracycline or 100 µg/ml ampicilline for DH5 and BT, respectively. Protoxins were isolated as described in Masson *et al.* (Masson *et al.*, 1990). Protoxins were digested with 0.125 mg/ml trypsin (Invitrogen, Burlington, ON) in 50 mM NaCl, 50 mM NaCO₃ adjusted to pH 10.5 for 90 min. at 37°C. Activated toxins were centrifuged for 90 min at 200,000 g to remove lipids and other insoluble material. Toxins were then purified by fast protein liquid chromatography using a Mono-Q anion exchange column. Toxin was eluted with a 50 to 500 mM NaCl gradient in carbonate buffer (pH 10.5). Precipitates formed by dialyzing purified toxins against distilled water were collected and stored at 4°C. Purity was verified by SDS gel electrophoresis.

Toxins were labeled for 1 h with a 10-fold excess of TMR- or fluorescein-maleimide (Invitrogen, Burlington, ON). Unbound dye was removed by incubation with biobeads (62 mg/ml) for 2 successive rounds of 90' each, or by buffer exchange using concentrators (25 kDa, Amicon, Millipore, Billerica, MA). The labeling ratio was determined by comparing the protein concentration (Bradford assay, Pierce, Rockford, IL) with the fluorophore concentration (absorption). For fluoresceine labeling, W219C had low accessibility and showed a labeling ratio after removal of excess label of 0.32. The other mutants had a labeling ratio of 0.9 ± 0.3 . Cry1Aa-WT had low unspecific labeling (labeling ratio 0.06 ± 0.03), that was negligible with respect to the specific labeling.

Spectra were measured in a SPEX fluorolog spectrometer. Fluorophores were dissolved in octanol in order to mimic lipid environment.

Fluorescence setup for planar lipid bilayer

The fluorescence setup is based on a Zeiss Axiovert 200 inverted microscope with a 60x water objective (NA = 0.9, Zeiss, Toronto, ON). For TMR-excitation, a 30 mW laser (532 nm, World Star Technology, Toronto, ON) was extended to fill out the backpupil of the objectives and focused onto the back-focal plane. For blue excitation, a mercury lamp (Zeiss, Toronto, ON) was used. Excitation light was filtered with a 470/40 and 545/25 excitation filter, and emission by a 504/12 and 605/70 for fluorescein and TMR, respectively. Emission was collected with a Photomax 200 (Dagan Corp., Minneapolis, MN) fluorescence amplifier with an avalanche photodiode as a detector. For the general experiments, emission was focused onto the detector. For confocal measurements, the focusing lens was removed, and the detector placed in the image plane and aligned in xyz-direction to the excitation spot. For the confocal scan, the motorized z-drive of a Zeiss Observer microscope was utilized to adjust the z-position in steps of 0.1 μm , and the fluorescence intensity was recorded for each level. The “point spread function” for our configuration was determined by scanning a single fluorescent bead (1 μm).

Bilayers were formed in a horizontal orientation in polymer chips (150 μm thickness) with a geometry similar to the one described previously (Pantoja *et al.*, 2001). They had a small conical chamber on the bottom with a 150-250 μm aperture to the top. The plastic chip was placed above a coverslip giving optical access for the objective of an inverted microscope (Fig. 1a). The horizontal bilayer is formed inside of the top round aperture. For electrical control, the electrodes of a patch-clamp amplifier are connected to the *cis* and *trans* chambers via agar bridges. Small access channels allowed fluid exchange and electrical access to the bottom chamber. The chips were glued to standard 35 mm plastic petri-dishes. As *trans* chamber, a 50 mm petri-dish with a concentric hole was used, at the bottom of which a glass coverslip was glued. Current was recorded using an Axopatch-1D (Axon Instruments, Union City, CA) and was stored on a PC using GPatchM (University of California at Los Angeles).

FRET measurements with DPA

Lipids were prepared from chloroform stock solution by evaporation of the solvent and resuspension of the lipids in decane (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, 10mg/ml). Bilayers

were formed by painting the lipids over the hole with a small glass rod. Only synthetic phospholipids and purified cholesterol (Avanti Polar Lipids) in the composition POPE:POPC:cholesterol 7:2:1 (w:w:w) were used. Bilayer formation was monitored by capacitance measurements. Recording-solutions were *cis* 150 mM N-methyl-D-glucamine-Cl, 10 mM Hepes, 1 mM CaCl₂ and *trans* 150 mM KCl, 10 mM Hepes, 1 mM CaCl₂; solutions were adjusted with HCl or KOH to respective pH. DPA (10 μM) was added to the solution prior to bilayer formation. Toxins were added to the *cis* chamber from 2 mg/ml stock solution to a final concentration of 30-40 nM. After 8-10 min incubation time, non-annealed toxin was vigorously washed away (4-5 times). The relative fluorescence change was determined from the difference of the steady state fluorescence values before the pulse and at the end of the pulses normalized to fluorescence *F* before application of the pulse. Pore-forming ability of all labeled mutants was verified by electrophysiology in planar lipid bilayer.

We verified that not a “leak” of the oxonol fluorescence into donor emission was responsible for the signals observed in double-FRET experiments. We determined the emission intensity of oxonol through either direct excitation or energy transfer from the toxin at blue excitation used for the double-FRET experiments. The ratio of oxonol to fluorescein emission was 1-10 dependent on the toxin concentration. The fluorescein emission filter will let pass maximally 0.006% of the oxonol emission. The contribution of oxonol to total fluorescence during the experiments was thus less than 0.06%, which would be twofold the maximal dF/F that could be generated by the oxonol in the fluorescein signal. It is thus negligible with respect to the signals.

Energy transfer efficiency for two acceptors

For double FRET experiments, the toxins were labeled with fluorescein-maleimide (FM), which transfers energy both to oxonol and DPA (Fig. 1c). The situation is different than in the case of a single donor and acceptor, as both oxonol and DPA act as acceptors, while the toxin-bound fluorophore is the donor. We, therefore, have to consider two energy transfers from the toxin to two different acceptors. The energy transfer efficiency *ET* is given by

$$ET(t) = \frac{\sum_i k_T(t)_i}{\tau_D^{-1} + \sum_i k_T(t)_i} \quad (1)$$

where τ_D^{-1} is the fluorescence lifetime of the donor in the absence of acceptors and the k_T are the rate constants to the respective acceptors i . These rate constants are a function of the R_{0i} of the donor-acceptor pair and the mean distance as a function of time $r_i(t)$ between the donor and the respective acceptor i .

$$k_T(t)_i = \tau_D^{-1} \left(\frac{R_{0i}}{r_i(t)} \right)^6 \quad (2)$$

The mean distance $r_i(t)$ between the donor and the acceptor depends on the number of acceptors in the respective leaflet (see appendix).

With (2), the energy transfer efficiency ET can be written as

$$ET(t) = \frac{I}{I + \frac{I}{\left(\frac{R_{0DPA}}{r_{DPA}(t)} \right)^6 + \left(\frac{R_{0oxo}}{r_{oxo}(t)} \right)^6}} \quad (3)$$

Results

Experimental Design

Figure 1d illustrates the principle of the method. It is a Förster resonance energy transfer (FRET) assay between the fluorescently labeled toxin and an acceptor located in the membrane. To site-directed label the toxin, a cysteine was introduced in the loops between the helices of domain I. An organic thiol-reactive fluorophore (tetramethylrhodamine-maleimide, TMRM, or fluorescein-maleimide), which acted as a donor in the FRET system, was covalently bound to the cysteine. Dipicrylamine (DPA), an amphiphatic negatively-charged compound that partitions into the membrane, served as acceptor. Due to their net negative charge, DPA molecules are distributed between the outer and the inner membrane leaflet according to the membrane potential (Fernandez *et al.*, 1983; Chanda *et al.*, 2005a; Chanda *et al.*, 2005b) where they are located between

the headgroups on either side but are not found in the hydrophobic core. Throughout the manuscript, we use the convention that the potential is measured at the inside (*trans*) with respect to ground on outside (*cis*; Fig. 1d) in analogy to the cell model. At saturating negative potentials, the DPA is, therefore, located at the headgroups of the outer leaflet (*cis*) and, at positive potentials, at the headgroups of the inner leaflet (*trans*).

Because the absorption of DPA overlaps with the emission spectra of both fluorescein and TMR (Fig. 1c), FRET occurs between the fluorophore attached to the toxin and DPA located in the membrane ($R_0 = 45 \text{ \AA}$ and 35 \AA , respectively). DPA itself is an absorber and not fluorescent. FRET efficiency is, thus, monitored by donor emission intensity. The position of the fluorophore, and thereby also that of the mutated residue in the protein, relative to the membrane normal can be detected by the direction of the fluorescence change upon reversal of the membrane potential (Chanda *et al.*, 2005a; Chanda *et al.*, 2005b). A change in the membrane potential moves the DPA either closer to or further from the fluorophore (Fig. 1d). Let us assume that the labeled position is located on the internal leaflet (Fig. 1d, *green hexagon*). Applying a positive membrane potential (*left*) attracts the negatively charged DPA to the internal leaflet. The distance between the fluorophore and the DPA is short ($< R_0$), resulting in high energy transfer efficiency and, thus, low donor emission. If membrane polarity is reverted to negative potential, the DPA moves to the outer leaflet (Fig. 1d, *right*). Then, the distance between the donor (toxin) and acceptor (DPA) is at least the thickness of the bilayer ($> 50 \text{ \AA}$) and therefore larger than the R_0 , which means low energy transfer efficiency and high donor emission. Consequently, we will observe a pulse to higher fluorescence in the donor emission signal during a negative test pulse from +100 mV to -80 mV and back to +100 mV. For reasons of symmetry, a fluorophore located in the external leaflet will result in lower donor fluorescence in response to a negative voltage pulse.

In order to verify that our technique correctly reports the position of a fluorophore in the bilayer, we tested the fluorescence response of DPA and a static fluorophore, of which we know the location. We added the static fluorescent probe di-8-ANEPPS (Invitrogen, Burlington, ON) that intercalates into the *cis* leaflet of the bilayer between the

headgroups (Ries *et al.*, 2004), and added to the solution DPA (10 μ M), which subsequently enters the membrane. Figure 1e shows the voltage dependence of the signal. (Note that the fluorophore is now located on the opposite side compared to Fig. 1d.) At positive potential (inside, *trans*), the DPA occupied the inner leaflet far from the ANEPPS on the outer leaflet (> 50 Å), leading to very little FRET and high donor (ANEPPS) fluorescence (Fig. 1e). During a negative pulse to -80 mV, the DPA moved to the outer leaflet and came close to ANEPPS. Energy transfer efficiency was high and fluorescence decreased (Fig. 1e). Upon return to +80 mV, the fluorescence recovered (DPA returned to the inner leaflet). The ANEPPS experiment shows that we can determine whether a fluorophore is located in the inner or outer leaflet by the change in fluorescence upon voltage inversion; a fluorophore located in the outer leaflet provokes a negative fluorescence change when pulsing from +80 mV to -80 mV (Fig. 1e) while a fluorophore located in the inner leaflet will generate a positive fluorescence change (Fig. 1d). It is important to note that these signals *per se* are caused not by the movement of the toxin/fluorophore itself but merely by the movement of our probe (DPA). Moving the probe has the great advantage that we can determine not only the movement of any labeled residue but also the location of any *static* labeled position with respect to the membrane surface.

On the other hand, it also means that careful attention has to be paid on non-specific labeling since any fluorophore in the membrane will produce a signal. We, therefore, started by determining whether any signal originated from unspecific labeling. As wildtype Cry1Aa (Cry1Aa-WT) does not contain any native cysteines, any labeling of Cry1Aa-WT toxin would be unspecific. For each preparation, we, therefore, also labeled Cry1Aa-WT parallel to the cysteine mutants in order to ascertain that the ratio between specific and unspecific labeling was sufficiently high. Excess dye was removed (see Materials and Methods) and the efficiency of labeling was determined (EOL, number of fluorophores per toxin protein). EOL of Cry1Aa-WT was $< 0.06 \pm 0.03$ and the EOL of the cysteine mutants ≈ 1 (0.9 ± 0.3). This meant that although it was impossible to remove all fluorophores from the Cry1Aa-WT sample, only a very small amount of nonspecifically bound fluorophores remained in the sample. Nevertheless, since our method is sensitive enough to detect the signal originating from all static fluorophores,

we had to ensure that the non-specific signal does not alter our results. We found a normalized fluorescence change of labeled Cry1Aa-WT incorporated into a horizontal bilayer of 0.5 ± 0.3 % (Fig. 2c). Since we used only samples for experiments where the EOL of the cysteine mutants was at least 8 to 10 fold higher than WT, the dF/F of 0.5 % originating from the non-specific signal contributed less than 1/10 to 1/8 to the final signal corresponding to a normalized fluorescence change of 0.05-0.06 %. This value is significantly lower than the values detected in the cysteine mutants (see below), showing that nonspecific labeling had no significant influence on the specific signal.

Topology of domain I of Cry1Aa in planar lipid bilayer

The pore-forming domain I consists of seven α -helices ($\alpha 1$ - $\alpha 7$) connected by short loops of 4-6 amino acids (Grochulski *et al.*, 1995). $\alpha 2$ - $\alpha 7$ have the typical length for transmembrane helices (22-32 amino acids; $\alpha 2$ is broken in the center, $\alpha 1$ is only 12 amino acids long). Assuming that the helices do not significantly bend in the native conformation, one can construct the topology of Cry1Aa once the vertical positions of the short loops in the membrane are known.

In order to identify the location of all loops of domain I, we created a mutant for each loop by introducing a single cysteine to the respective loop (Fig. 2a). Cysteine mutants for all loops, except for the $\alpha 2$ - $\alpha 3$ loop, expressed functionally. The conductance of the pores in 150 mM KCl was between 266 ± 50 pS and 444 ± 79 pS. In asymmetric 150 mM NMG / 150 mM K, the reversal potential was -26.6 mV, indicating a $p_K/p_{\text{NMG}} = 2.8$. These electrophysiological properties of the pores are in accordance with those reported previously (Peyronnet *et al.*, 2001; Peyronnet *et al.*, 2000). The structure and pore-forming mechanism of the toxin remained thus largely unaltered by the mutation or the subsequent labeling with the fluorophore.

To identify the positions of the toxin that change conformation during pore formation, ideally, we would follow the evolution of the signals with time. However, the toxins all arrive at the membrane at different times and their translocation is, thus, not synchronized. Taking a cue from a previous study showing the pH dependence of the velocity of pore formation, we attempted to better synchronize the translocation of toxins. Vachon *et al.* (Vachon *et al.*, 2004) showed that although no significant effect of

pH on pore-forming activity of Cry1Aa-WT has been observed in insect brush border membranes (BBM) in the steady state, the rate of pore formation of both Cry1Aa-WT and mutants is generally accelerated in BBM at neutral pH in comparison to basic pH. Vachon's finding implies that toxins can be kept in a state of low activity at basic pH during the annealing to the membrane before pore formation is "allowed" at neutral pH. We, therefore, incubated the toxin at pH 9 for 10-15 minutes, thus minimizing the number of toxins translocating during the incubation period. We, then, washed excess toxin, took a first measurement, and subsequently varied the proton concentration to pH 7. Although pore-formation was observed also at pH 9 (data not shown), the rate of pore formation was increased at pH 7, and thus any difference between basic and neutral pH is likely related to conformational changes linked to pore formation. We do not know the origin of the pH dependence, but the toxins thus treated show their typical pore-forming behavior, indicating that they still assume their native functional conformation at pH 7.

Following this procedure for the loop mutants, we incubated planar lipid bilayer with the TMRM-labeled mutant toxins (30-40 nM) and measured current and fluorescence intensity. We applied a negative test pulse (+100 mV/-80 mV/+100 mV) both in the absence and presence of DPA. A negative, hyperpolarizing pulse provokes, as outlined above, a *decrease* in fluorescence for the duration of the pulse if the labeled position is located in the *outer (cis)* leaflet, and, conversely, an *increase* in fluorescence if the labeled position is located in the *inner (trans)* leaflet. In absence of DPA, no voltage-dependent fluorescence change was observed.

In the presence of DPA, the fluorescence signal at pH 9 for all labeled positions in the different loops of domain I initially *increased* during an hyperpolarizing pulse, indicating that they are mostly located on the inner leaflet (*trans*) with respect to the midline of the bilayer (Fig. 2b). The average normalized fluorescence change (dF/F) was $1.2 \pm 0.2 \%$ with little variation among the mutants (Fig. 2c). These results suggested that the toxins do not simply initiate their pore-forming action from the outer surface of the bilayer but rather that the entire domain I unfolded once it reached the membrane

and inserted into the membrane crossing the midline of the bilayer such that the helices of domain I became immersed in the inner leaflet.

A more detailed consideration of the fluorescence signals indicate that the fluorescence does not stay constant after the rapid translocation of DPA but that still some variations are observed (e.g. Fig. 2b P121C). This might be a hint that the toxin changes its conformation in the bilayer dependent on the voltage. This was to be expected if the helices are crossing the membrane suggesting a high mobility.

Loop $\alpha 3$ - $\alpha 4$ translocates through the membrane for pore formation

The fact that pore formation is accelerated at pH 7 in comparison to pH 9 leads to the conclusion that differences in the topology at both pH values should be correlated with pore formation. When we altered the proton concentration from pH 9 to pH 7, most loop positions remained on the intracellular side with the exception of S39C (N-terminus) and P121C ($\alpha 3$ - $\alpha 4$ loop). The signal of S39C changed in 50% of all cases to the outer leaflet. S39 is located in the N-terminus of helix $\alpha 1$ and may therefore be more flexible. The signal of P121C reversed its direction in 58 % of the cases (Fig. 2b, N=24), indicating that the majority of the $\alpha 3$ - $\alpha 4$ loops was located in the outer leaflet. The majority of them must therefore have moved through the membrane from the inner to the outer leaflet. The transition of P121C is a clear indication that the helices $\alpha 3$ and $\alpha 4$ are involved in pore formation. In addition, we never observed pore formation before the signal of P121C was reversed, suggesting that translocation of the $\alpha 3$ - $\alpha 4$ hairpin is a prerequisite for pore formation.

Nevertheless, occasionally pore formation was observed already at pH 9 because the toxins, in spite of being kept in a state of low activity at pH 9, were not fully inactive. Although pore formation was never observed without prior movement of the $\alpha 3$ - $\alpha 4$ hairpin, we still wanted to ensure that the difference in fluorescence at both pH is truly due to the pore forming process. We, therefore, sought a mutation that kept the channel in a fully inactive state at pH 9. The R131E mutant, inserting a charge reversal in the helix $\alpha 4$, had been shown in a volumetric assay to be biologically active only at neutral pH 7 and completely inactive in basic conditions (pH 9) (Vachon *et al.*, 2004). As this result was obtained in BBM in the presence of receptors, it remained to be verified

whether the biological activity is directly correlated with pore formation. We, thus, tested the pore-forming activity of Cry1Aa-R131E in planar lipid bilayer, and found that no pore formation of Cry1Aa-R131E occurred at pH 9 whereas in 45% of all experiments, pore formation was observed after switching to pH 7 (Cry1Aa-WT: 30%). Note that the percentages are underestimated, as tests were stopped when bilayers broke and were counted as negative if no pore formation was yet observed although breakage might have been induced by too strong Cry1Aa pore formation. Since activity of mutants is defined by its ability to form pores, the results demonstrated that the R131E mutant remained in a non-active conformation at pH 9 and became active at pH 7. Thus with R131E, we now have a mutant, which we can switch between an inactive and an active state.

In order to follow the movement of the $\alpha 3$ - $\alpha 4$ loop, which we found to be important for pore formation, we added a cysteine in the $\alpha 3$ - $\alpha 4$ loop at position T122 in the R131E mutant (R131E-T122C). When T122C-R131E was exposed to the pH protocol, we found that at pH 9 (inactive), the fluorescence signal in the presence of DPA indicated that the $\alpha 3$ - $\alpha 4$ loop was confined to the inner leaflet in all cases. After changing to pH 7, in 7 of 10 experiments, the signal switched from the internal to the external leaflet (Fig. 3, *bottom*). Please note that in the 3 experiments during which the signal remained the same, also no pore formation was observed. The switch of the signal when changing to the active conformation confirms the data we obtained from position P121 and demonstrates that the $\alpha 3$ - $\alpha 4$ loop moves through the membrane for pore formation (Fig. 3, *top*). Since the loop is very short, the C-terminal $\alpha 3$ and N-terminal $\alpha 4$ also have to follow this movement suggesting translocation of the $\alpha 3$ - $\alpha 4$ hairpin during pore formation. This agrees with the umbrella model in so far as the $\alpha 3$ - $\alpha 4$ loop is external and the $\alpha 4$ - $\alpha 5$ loop internal. Helix $\alpha 4$ forms the pore lining helix as demonstrated earlier (Vachon *et al.*, 2004). Nevertheless, we found the other helices to be internal in this study. The translocation process is, thus, initiated from the inside (Fig. 3, *top*). The $\alpha 3$ - $\alpha 4$ helices and partly $\alpha 1$ were also the only ones we found to be transmembrane, indicating that they are responsible for pore formation. As we observed transition of the

hairpin prior to pore formation, the translocation step is necessary but not sufficient for pore formation.

Background fluorescence is not responsible for low dF/F

At a concentration of 10 μM DPA, we expect approximately 16 600 DPA molecules per μm^2 (Chanda *et al.*, 2005a). From this number, we can calculate the mean area per DPA molecule and, thereby, the mean distance between donor and acceptor (see appendix). The maximal fluorescence change due to FRET between DPA and TMR ($R_0 = 35 \text{ \AA}$) for a 50 \AA movement of DPA through the membrane was calculated to be $dF/F = 18\%$, assuming that the donors are located close to the headgroups of one leaflet of the membrane (Lakowicz, 2006). In our experiments above, however, our mean relative fluorescence change was only $1.2 \pm 0.2\%$.

One possible explanation for the relatively low relative fluorescence change dF/F is high background fluorescence from unspecific labeling or from unbound toxins in the *cis* chamber. Unspecific labeling was above excluded as a source of background fluorescence and, thus, cannot cause a low dF/F . To test, then, whether additional background fluorescence arises from unbound toxins in the *cis* chamber, we made a confocal z-scan of the fluorescence across the bilayer. We formed a diffraction limited spot with a green laser (532 nm) and used the sensitive surface of the photodiode as pinhole detector ($\text{\AA} \approx 100 \mu\text{m}$). We then measured fluorescence originating only from the diffraction limited spot every 0.1 μm in z-direction. Figure 4 shows the fluorescence distribution before and after vigorous washing. After washing, the fluorescence intensity agrees well with the point spread function (Fig. 4, *red*) determined with a fluorescent bead, indicating that the fluorescence originated mainly from the bilayer and that background fluorescence from the *cis* chamber was negligible. The diminished dF/F thus has a different origin than background fluorescence.

Double FRET measurements

The value of dF/F must, then, be intrinsically relatively low, which, in turn, suggests that our assumptions above are not applicable to Cry1Aa. Our assumptions, to repeat, were that the fluorophores were located between the headgroups of the lipids furthest away from the DPA and that they were located only in one leaflet of the membrane. If either

one of the assumptions is not true, the intrinsic dF/F decreases. First, due to the distance dependence of FRET, a large fluorescence change is expected only if a large distance change occurs. If, however, the fluorophore is located closer to the centerline rather than between the headgroups of the lipids, the distance between DPA and fluorophore does not change as much as predicted (Fig. 5a, *center*). In the extreme case that the fluorophore is located directly on the centerline, there will be no distance change at all in the steady state.

Second, we may have more than one population of toxins. Toxins are very dynamic and behave differently than integral membrane proteins expressed in the plasma membrane. Consequently, not all toxins need to have the same conformation or to be located at the same position in the membrane. This is particularly likely if the toxin, as we found above, binds to the membrane and relocates to the opposite leaflet. A certain percentage of the toxins will remain on the outer leaflet. In this case, the acceptors move away from one donor population but at the same time closer to the opposite one (Fig. 5a, *top*). Consequently, the superposed fluorescence change of both will be dependent on their distribution between both leaflets. If there were exactly the same amount of toxin on both sides, no fluorescence change would be observed in the steady state.

With the “steady state” measurements we performed above, it was not possible to explore whether one of the two cases mentioned is responsible for the diminished dF/F or even to distinguish between them. In order to study the distribution and location of the toxins in more detail, we devised “double FRET” experiments using a single donor (fluorescein) attached to the toxins with two different acceptor molecules with very different translocation time constants, DPA and oxonol (DiSBAC₂, Anaspec, San Jose, CA). DPA and oxonol transit through the membrane with a time constant of 0.5 ms and 300 ms, respectively (see supplementary material). The different time constants of DPA and oxonol produce two effects during the translocation leading to a dynamic fluorescence change (see appendix for details): (1) a transient “dilution” of the oxonol during its slow transition occurs that temporarily increases the donor acceptor distance; and (2) a transient situation arises where DPA is on one, oxonol on the other side. Due to these two effects, different fluorescence signals will be evoked by differently distributed

donors. The donors can be distributed between both leaflets (Fig. 5a, *top*), centered along the midline of the membrane (Fig. 5a, *center*) or located on only one surface of the membrane (Fig. 5a, *bottom*).

In case of “distributed” donors, the system is symmetric so that the initial and final fluorescence will be identical. However, during the movement of oxonol, the concentration in both layers is decreased leading to a transient increase in distance to all donors and, thereby, to a transient increase in the donor fluorescence, as shown in the simulated fluorescence traces (Fig. 5c, *left, blue trace*). During DPA translocation, the same effect occurs, but it is too rapid to resolve (note that the graph is in semi-logarithmic scale).

In addition, during the interval when DPA is in one leaflet and oxonol on the other, donors on both sides of the bilayer (both populations) are close to an acceptor (Fig. 5a *top*), leading (transiently) to higher transfer efficiency and lower fluorescence (Fig. 5c, *right, blue trace*). Although both the positive and negative transients occur at all acceptor concentrations, their relative amplitude differs with the concentration. At lower concentrations, the transient increase is observed, at high concentrations mainly the transient decrease (see appendix for details).

For “centered” donors, initial and final donor fluorescence are also equal (Fig 5a, *centered*), and the transient increase due to the “dilution” of the oxonol is observed (Fig. 5c, *left, red trace*). In contrast, the fluorescence is not decreased in the interval when DPA and oxonol occupy opposite leaflets. For a fluorophore at the centerline, the distance between donor and acceptor on either leaflet is the same (Fig. 5c, *right, red trace*). Finally, a donor located only on one surface of the bilayer, still has a small transient due to the dilution of oxonol, but it is insignificant in relation to the large fluorescence change due to the DPA and oxonol translocations (Fig. 5c, *left, black trace*).

Thus, investigating the dynamic fluorescence response in double FRET experiments allows us to distinguish between the cases of donors only at one surface of the membrane (Fig. 5a, *bottom*), “distributed” donors on both surfaces (Fig. 5a; *top*), or

“centered” donors located nearer to the centerline of the membrane (Fig. 5a, *center*). If we observe a positive transient at low acceptor concentrations, we can be sure that the low dF/F is caused by either distributed toxins or because they are close to the centerline. If we observe a negative transient at higher concentrations, we can be certain that those toxins are distributed on both sides of the membrane.

DISTRIBUTION OF THE TOXIN IN THE MEMBRANE

We tested the double FRET experiments with all our loop mutants and observed for all except S39C (N-terminus) a clear transient decrease in donor fluorescence (Fig. 5b). The transient decrease unambiguously indicated that the toxin is distributed between both leaflets. In P121C, Y153C and W182C, we occasionally also observed positive transients, which was likely due to a lower acceptor concentration in those bilayers (bleaching), or a negative and positive simultaneously (intermediate concentrations, Fig. 5d). As mentioned above, positive transients can occur at both centered and distributed toxins. It is not surprising to find the toxin distributed between both sides if it is added to the *cis* side and has to translocate to the *trans* leaflet.

The two N-terminal positions F50C and S39C were difficult to recognize. The signal of F50C was not as clear as the other positions. For S39C, we were not able to obtain clear signals in either direction. Instead, we observed slow conformational changes that indicated that the N-terminus seems highly movable in the membrane, which is in accordance with our findings in the single FRET measurements. S39C was, apart from the $\alpha 3$ - $\alpha 4$ loop, the only position changing its position.

We observed one peculiarity with the position W219C. When polarizing the membrane from positive potentials, the expected negative transient was observed, however, when returning to positive potential, the fluorescence only showed a very slow signal (Fig. 5b). When inverting the polarities, the slow signal occurs first, followed by the expected fast transient. This signal is explained if the W219 position is moving more towards the midline during the negative membrane potential. Upon return of the DPA, only very small signals will be observed (close to midline), followed by a superposition of the return of the W219 to its original position (closer to the DPA, negative) and the transition of the oxonol (further from the toxin, positive).

In summary, the transients that we observed in the majority of cases indicated that the reduced relative fluorescence change was caused not by additional background fluorescence but rather by the donor (labeled position of the toxin) being distributed between both leaflets. We, thus, have two populations of toxins, one which already translocated and another which remained on the *cis* side.

Discussion

The FRET measurements in a horizontal planar lipid bilayer geometry presented in this study facilitate rapid determination of the topology of purified toxins while simultaneously monitoring their function via electrophysiological access to the bilayer. We investigated topology and pore formation mechanism of the Cry1Aa toxin of *Bacillus thuringiensis*, and found that domain I of Cry1Aa of *B. thuringiensis* inserts into the membrane and accumulates in its inner (*trans*) leaflet. From the data of $\alpha 1$ - $\alpha 2$ and DI-DII loops, we know that a fraction of the toxin remains in the external leaflet, which is consistent with the toxin moving through refolding from the outer to the inner leaflet.

Comparing “inactive” (pH 9) and active (pH 7) conformation, the $\alpha 3$ - $\alpha 4$ loop and variably also the N-terminus were the only ones that switched their position and were found in the outer leaflet. Because at the same time the $\alpha 4$ - $\alpha 5$ loop remained on the internal leaflet, the helix $\alpha 4$ had to be transmembrane and would be the pore lining helix as demonstrated earlier (Vachon *et al.*, 2004). We cannot, with certainty, decide whether $\alpha 3$ is transmembrane since the $\alpha 2$ - $\alpha 3$ loop mutants did not express functionally. However, either $\alpha 2$ or $\alpha 3$ also has to be transmembrane because the $\alpha 1$ - $\alpha 2$ loop was localized in the internal leaflet. As the $\alpha 3$ - $\alpha 4$ loop is initially located on the internal leaflet, it is more likely that only one hairpin ($\alpha 3$ - $\alpha 4$) traverses the membrane in order to form the pores. Moreover, transmembrane structures are a prerequisite for ion conduction, and both $\alpha 3$ and $\alpha 4$ have the correct length for transmembrane helices (22-32 amino acids). The $\alpha 5$ - $\alpha 6$ loop was also on the internal side of the membrane but showed some mobility in the double FRET experiments. Mobility of $\alpha 5$ had been shown to be crucial for the pore-forming activity of Cry1Aa (Schwartz *et al.*, 1997a). We found

that $\alpha 5-7$ are all located in the inner leaflet. The linker between domains I and II, on the other hand, was very flexible, which may be caused by the missing receptor binding of domains II and III. These results suggest that domain I of Cry1Aa traverses by refolding through the membrane to the inner leaflet and forms the pore from the inside by sliding the helices $\alpha 3$ and $\alpha 4$ through the membrane (Fig. 6).

This view is reinforced by the functional data. We never observed pore formation when the $\alpha 3-\alpha 4$ loop was not located on the external leaflet, although they were located initially in the inner leaflet. We found that the translocation step takes place prior to observation of pores. We can, thus, conclude that the initial step is translocation of the $\alpha 3-\alpha 4$ hairpin. The final step might be oligomerization as the pores are thought to be formed by oligomers; however, from our data we cannot yet decide during which step the toxins oligomerize. Future FRET experiments between toxin monomers may give an answer here. The strict correlation between translocation of the $\alpha 3-\alpha 4$ hairpin from the inside to the outside and the subsequent pore formation confirm that $\alpha 3-\alpha 4$ translocation is the initial pore-forming mechanism.

It was unexpected to find such a large domain (28 kDa) translocating through the membrane. This is a modification of the umbrella model, according to which the helices $\alpha 4-\alpha 5$ traverse the membrane from the outside. Also in the umbrella model, the $\alpha 3-\alpha 4$ loop is located on the external, the $\alpha 4-\alpha 5$ loop on the internal side of the membrane. The difference to our data is the location of the other helices of domain I (i.e. helices not directly involved in pore formation). However, the presence of helices $\alpha 1-\alpha 2$ and $\alpha 5-\alpha 7$ on the internal leaflet would explain why in AFM measurements of Cry1Aa the observed structures were too small to accommodate the extra helices (Vie *et al.*, 2001; Laflamme *et al.*, 2008).

Cry1Aa had also been proposed to be inserted into the membrane previously (Nair & Dean, 2008; Tomimoto *et al.*, 2006). Nair *et al.* (Nair & Dean, 2008) recently used fluorescently labeled cysteine mutants of Cry1Aa and Cry1Ab to monitor whether the fluorophores remained in aqueous solution or entered into the membrane by quenching with external iodide. They found, as us, that the positions that they tested were not

exposed to external solution anymore. While their results agree with our findings, they could not further identify the location of the residues with their quenching assay in vesicles. Our method is not restricted to external accessibility, but may be utilized for any position of the protein within the membrane.

Similarly, Tomimoto et al. (Tomimoto *et al.*, 2006) suggested insertion of domain I of Cry1Aa based on digestion patterns (“buried dragon” model). According to Tomimoto’s model, $\alpha 1$ lies on the external surface whereas $\alpha 2$ - $\alpha 7$ all are anti-parallel transmembrane helices. Domains II and III are external. The model is based on 3 digestible sites in the $\alpha 1$ - $\alpha 2$ loop, the $\alpha 3$ - $\alpha 4$ loop and domain II. We agree with the $\alpha 3$ - $\alpha 4$ loop being accessible. The $\alpha 1$ - $\alpha 2$ loop might also in part be accessible for enzymes, considering that we showed that the toxin, and in particular the position F50 in the $\alpha 1$ - $\alpha 2$ loop, distributes between both leaflets, so that a population on the external leaflet exists.

While the pore-forming mechanism was already identified using the single FRET assay, the double FRET technique added information about the distribution of the proteins in the membrane. This information is not necessary for well-defined integral membrane proteins, such as ion channels whose topology remains, in general, static, apart from small conformational changes. Toxins, in contrast, are highly dynamic proteins in the membrane, and thus their topology needs to be investigated in more detail. The double FRET technique provides a possibility to obtain this information. The double FRET experiments allowed us to distinguish clearly between background fluorescence and signals coming from the membrane. We were also able to determine the distribution within the membrane – information that was not available with previous methods. While lipids fluorescently labeled at different position in the acyl chain have been used in previous studies, they provide only an averaged static signal lacking the information about the distribution. We found the toxin to be very mobile within the membrane, which may be related to its pore-forming activity. Domains II-III bind in the native environment to the receptor on the external side of the host membrane. Consequently, either domain II or III has to be transmembrane. We tested a few residues on domains II and III (M283, S373, N462, A606, data not shown), but they also were located in the

inner leaflet. However, the bilayer system is receptor-free, possibly allowing domains II and III a higher mobility than in the native system.

For proteins expressed in mammalian cells, the dynamic FRET method between protein and membrane can be used in patch-clamped cells (Blunck *et al.*, 2004; Chanda *et al.*, 2005a) or voltage-clamped oocytes (Chanda *et al.*, 2005b). In a cell system, however, the labeling is more susceptible to background fluorescence due to surface cysteines and unspecific binding to the membrane surface. Both effects are minimized in the bilayer system. Background labeling is a major concern for all FRET measurements because non-specifically attached fluorophores in close proximity to the donor or acceptor would lead to high transfer efficiency and thus to false results. In the bilayer environment, we can verify the specific labeling of the proteins prior to intercalation into the membrane. The membrane was formed from synthetic lipids only in order to ensure that no background fluorescence originates from the lipids. Black lipid membranes, however, contain residual amount of solvent (here decane), which slightly increase membrane thickness.

The strategy we chose here closes the gap between the more indirect biochemical approaches and the structure determination by x-ray crystallography or electron microscopy. While it does not provide Å-resolution, it provides structural information in the native conformation. Fluorescence spectroscopy of horizontal planar lipid bilayers gives us electrical control of the membrane simultaneously with optical access. This way, we can observe the conformational changes of the membrane proteins and correlate them with the function (electrical current). To our knowledge, this is the first report of monitoring conformational changes of membrane proteins in planar lipid bilayers under electrophysiological control using fluorescence spectroscopy.

The technique is not restricted to toxins alone, but may be applied to all membrane proteins that can be reconstituted in planar lipid bilayer. We also performed, for instance, fluorescence measurements on reconstituted ion channels in the horizontal planar lipid bilayers (*unpublished results*). The technique may be transferred even to mammalian cells, as toxins would be labeled before addition to the cells and background

fluorescence would be kept to a minimum. We expect the technique to find a widespread application in the investigation of molecular mechanisms of membrane proteins.

Acknowledgements

We would like to thank Mireille Marsolais for technical assistance and Luke Masson for providing the Cry1Aa-pMP39, -pBA1 and some of the cysteine mutants. The project was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council (327201DG), Canada Research Chairs (202965) and the Canadian Foundation for Innovation (202965) to R.B. and by GÉPROM (Fonds de la recherche en santé Québec). N.G. holds a student fellowship by the Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies.

Appendices

APPENDIX A: DISCUSSION OF THE NON-LINEAR EFFECTS IN DOUBLE FRET EXPERIMENTS TRANSIENT DECREASE IN ACCEPTOR CONCENTRATION DURING TRANSLOCATION

Two effects arise in double FRET experiments with two types of acceptors in the membrane. The first occurs during the transition of either of the two acceptors, and the second is a “steady-state” effect occurring after the fast translocation of DPA but before the slow one of oxonol. Let us consider first the effect caused by the “dilution” effect of the acceptors during its translocation. We will discuss only one single acceptor type with two donors in opposite leaflets of the membrane upon a hyperpolarizing voltage step. For reasons of symmetry, reversed potentials result in identical signals. Initially, all acceptors are on the internal leaflet (inside is positive). The acceptors have thus a long distance to the donors on the outer leaflet and these are fully fluorescent. On the inner leaflet, the donors have a mean distance r from an acceptor, which is inversely proportional to the square root of the acceptor concentration (see appendix B). Figure 7b shows the dependence of the ET efficiency on the distance. Let us assume that, at the initial concentration, r equals R_0 . Then, 50% of the fluorescence is transferred to the acceptor.

When the potential is reversed, the acceptors leave the inner leaflet and translocate to the outer leaflet with a certain transition probability. Hence, the concentration in the inner leaflet decreases exponentially at the same rate as the concentration in the outer leaflet increases. When half the acceptors have moved, the concentration – and with it the mean distance r – is equal in both leaflets (Fig. 7a, *center*). Now donors on the inner and the outer leaflet will also have the same ET efficiency and the same fluorescence intensity (Fig. 7b, (3)). As the concentration is halved on the internal leaflet, the distance is $\sqrt{2} = 1.41$ times longer. In our example ($r = R_0$), r increased to $1.41 R_0$ and the energy transfer decreased from 50% to 11.2%. Thus, instead of the outer donors emitting nearly 100%¹ and the inner ones emitting 50%, all donors emit 89.8%. The overall fluorescence intensity is therefore increased. The underlying reason is that the slope is steeper

¹ In fact, if the thickness of the bilayer is $\approx R_0$, it follows from Pythagoras’ rule that $r \approx 1.41R_0$ and ET $\approx 11\%$. Thus there is no change yet in the fluorescence of the outer donors.

between R_0 and $1.41 R_0$ than at longer distances (Fig. 7b). However, this is only a transient situation as donors continue to translocate to the outer leaflet. Once all donors are in the outer leaflet, the situation is inverted to the initial one (Fig. 7a, *right*). The acceptors on the outer leaflet now have a mean distance r to the donors while the donors on the inner leaflet are relatively far away (fully fluorescent). Thus, due to the nonlinearity in the distance dependence of the ET efficiency, the temporary concentration and distance change during the redistribution of the acceptors lead transiently to higher fluorescence. This effect is significant only if the distance r is close to R_0 . At higher and lower concentrations/distances, the transient becomes smaller (results of simulations on the concentration dependence are shown in appendix B).

As we have two acceptors, this positive fluorescence transient occurs twice per reversal of the potential, once when the DPA translocates and a second time when oxonol translocates (Fig. 5c, *left*). The DPA transient, however, is too fast to be evident in our system (please note that the time scale is logarithmic). For this reason, it was not detectable in the simple FRET experiments. For a pulse from positive to negative and back to positive potentials, we still obtain two transients for the oxonol, one at the beginning and another at the end of the pulse. For this effect to occur, it makes no difference whether we have two donors equally distributed between the two leaflets or one donor located close to the midline of the bilayer (Fig. 5c, *blue and red traces*). The decisive factor is that the system is symmetric and, thus, the averaged distances to acceptors in the initial and final state are (approximately) equivalent. If, in contrast, one donor is located in just one of the leaflets, a steady increase or decrease of donor fluorescence occurs (Fig. 5c, *black trace*).

ACCEPTOR DISTRIBUTION LEADS TO TRANSIENT FLUORESCENCE DECREASE DURING POTENTIAL REVERSAL

In the presence of two acceptor types, there develops a second effect originating from the coordination between the two acceptors (Fig. 5a), which allows us to distinguish between a centered fluorophore or two distributed ones. Let us first assume two donors on opposite leaflets (Fig. 5a, *top*). The location of the two types of acceptors on the internal leaflet leads to energy transfer from the fluorophores to both oxonol and DPA.

Upon applying a hyperpolarizing pulse, first DPA translocates with a time constant of 0.5 ms creating a transient situation where the oxonol is located on the inner and DPA on the outer leaflet. Thus, fluorophores (donors) on the inner leaflet will transfer their energy to oxonol and the ones on the outer to DPA with an efficiency dependent on the acceptor concentration. While donors in the inner leaflet will have increased their fluorescence, donors on the outer leaflet will have decreased theirs. The effect on the overall fluorescence is always a decrease (both leaflets are quenched) but the amount varies with acceptor concentrations.

Let us assume that the concentration is such that $r = R_0$ for both acceptor types. Then according to equation 3, the inner leaflet donors would transfer more than 99% of their energy to the acceptor and less than 1% of the total fluorescence intensity would remain. Under the assumption that R_0 equals approximately the bilayer thickness, r would equal $1.41 \cdot R_0$ for the outer donors. Hence their fluorescence intensity would be at 67%. After DPA has translocated, donors in both the inner and outer leaflet would fluoresce with 1.5% of their maximal fluorescence intensity. The overall fluorescence intensity would be very low (3% compared to 67%). Once the oxonol has followed to the outer leaflet, the intensity would return to its initial value (Fig. 5c, *right panel, blue trace*). The actual differences in fluorescence intensity are, in fact, slightly lower than calculated above because DPA and oxonol both follow exponential decays. The idealized situation, depicted in our consideration, where all DPA is on one side and all oxonol on the other, never occurs in that clarity. (The calculations for exact simulations are given in appendix B.)

If a donor is located in the center of the bilayer (Fig. 5a, *center*), the distances to the acceptors in the outer or inner leaflet are equal, and thus, no decrease in fluorescence intensity occurs. Here, only the transient increases due to the temporary concentration decreases as described above are observed. Likewise, no negative transient is observed when one fluorophore is located in either the outer or the inner leaflet. During translocation, the acceptors move steadily further away (or closer towards) the fluorophore and a steady increase (decrease) in fluorescence is observed (Fig. 5a,

bottom). Thus, if we observe a negative transient in the double FRET experiments, the donors are distributed between the outer and inner leaflets of the membrane.

Both effects the transient increase as well as the transient decrease occur at all concentrations, but their amplitudes shift from one to the other dependent on the range of concentrations. The two effects have their origin in the nonlinearity of the ET-distance relationship and are optimized at the respective saturation ranges at short and long distance. While at low concentrations mainly the transient increases are observed, at high concentrations the transient decrease predominates (Fig. 5c & 8e,f).

APPENDIX B: SIMULATIONS OF DONOR FLUORESCENCE IN DOUBLE FRET EXPERIMENTS

Upon inverting the polarity of the membrane from positive to negative potentials, the acceptors translocate from the inner to the outer leaflet following an exponential decay so that the number of acceptors on the inner leaflet for oxonol ($Ox(t)_i$) and DPA ($DPA(t)_i$) is given by:

$$Ox(t)_i = Ox(0) \cdot e^{-t/\tau_{Ox}} \quad (1)$$

$$DPA(t)_i = DPA(0) \cdot e^{-t/\tau_{DPA}} \quad (2)$$

Where $\tau_{Ox/DPA}$ is the time constant of translocation and $Ox(0)/DPA(0)$ the total number of the respective receptor in the bilayer. The number of acceptors on the outer leaflet is given by:

$$Ox(t)_o = Ox(0) \cdot (1 - e^{-t/\tau_{Ox}}) \quad (1a)$$

$$DPA(t)_o = DPA(0) \cdot (1 - e^{-t/\tau_{DPA}}) \quad (2a)$$

The mean distance $2x(t)$ between two acceptors in a leaflet is given by the acceptor concentration.

$$2 \cdot x = \sqrt{\frac{A}{N(t)\pi}} \quad (3)$$

with A : surface of the bilayer

N : number of acceptors of a specific type in the bilayer leaflet. $N(t)$ will have to be replaced with $Ox(t)_i$, $Ox(t)_o$, $DPA(t)_i$, or $DPA(t)_o$.

Thus, the mean distance between the donor and the nearest acceptor parallel to the membrane is $x(t)$. Acceptors other than the nearest one will not have any significant influence on the FRET efficiency since the rate constant (see below) would be less than 1.6% of the nearest one.

Thus, we will obtain for each donor four distances to oxonol and DPA on the inner and outer leaflet. If the donor is located at a fraction p of the thickness d of the membrane, the distances $r(t)$ can be calculated using simple geometric considerations (Fig. 7c):

$$r_i(t) = \sqrt{x_i(t)^2 + p^2 d^2} \quad (4)$$

and

$$r_o(t) = \sqrt{x_o(t)^2 + (1-p)^2 d^2} \quad (5)$$

dependent on which side the acceptor is located (i: inner; o: outer leaflet). x_i and x_o are calculated from equation (3) with $N_i(t)$ given by equations (1) and (2) for oxonol and DPA, respectively. $N_o(t)$ is accordingly given by equations (1a) and (2a).

The four rate constants of energy transfer $k_T(t)$ for each $r(t)$ are given by

$$k_T(t) = \tau_D^{-1} \left(\frac{R_0}{r(t)} \right)^6 \quad (7)$$

with τ_D being the fluorescence lifetime of the donor in the absence of the acceptors.

The energy transfer efficiency ET is then given by

$$ET(t) = \frac{\sum k_T(t)}{\tau_D^{-1} + \sum k_T(t)} \quad (8)$$

With these formulas, the development over time of the fluorescence for donors located at different positions in the membrane can be calculated.

- (1) A donor located close to the centerline of the membrane ($p \approx 0.5$) would have a very small difference whether the acceptors are located outside or inside. ($p \approx 1 - p$).
- (2) A donor located inside ($p = 0$) would always remain relatively far from an acceptor on the outside ($r(t) > d$) and vice versa for a donor located outside ($p = 1$).
- (3) If the donors are distributed on two position, one inside ($p = 0$) and another outside ($p = 1$), the fluorescence intensity $F_{i/o}$ for both donors are calculated separately and added to the overall fluorescence intensity F_{total} according to the distribution ratio b (= number of donors inside/total number of donors).

$$F_{total} = b F_i + (1-b) F_o.$$

We simulated the time course of fluorescence for fluorophores either located at a single location in the membrane or distributed on both leaflets with variable distribution between both leaflets. The acceptors were all located on the internal leaflet at start and translocated to the outer leaflet with time constants of 0.5 ms and 300 ms for DPA and oxonol, respectively. The R_0 were 45 Å and 51 Å for DPA and oxonol, respectively. The bilayer was assumed to be 150 μm in diameter with a thickness of 50 Å.

The results are summarized in figure 8. In panels a, c and e, the results for distributed donors are shown, in panels b, d and f the results for one donor located at different positions in the membrane. The case of one donor on the outside is included in panels a-d as a limiting value ($b = 0$, $p = 1$). It is marked in green. Red marks the “ideal” case ($b = 0.5$ and $p = 0.5$, respectively).

In figures 8a & b, the fluorescence intensity at a low acceptor concentration (1600/μm²) is shown. The distribution between the two leaflets (Fig. 8a) varied from $b = 0$ to 1 in steps of 0.25. The red trace shows equal distribution between both leaflets. In figure 8b, the fluorescence responses for donors positioned at a fraction p within the bilayer are

shown. The fluorescence trace in red here represents the donor located in the center of the bilayer ($p = 0.5$). In both cases, the trace shows two distinct transient fluorescence increases. The x-axis is displayed logarithmic, which means that the first transient occurs extremely fast, while the second, more pronounced one, is slow. The cause for the positive transients is the temporary decrease in concentration of the acceptors. While the concentration in the inner leaflet decreases, it increases on the outer leaflet. During the translocation, the closest acceptor is therefore relatively far from the donors (see Fig. 7). Thus, if a clear transient is observed during a voltage step, the donors – and hence the labeled position of the toxin – have to be either located in the center of the bilayer or distributed between both leaflets (Fig. 5b).

In figures 8c & d, the same cases as above are shown for higher concentrations (22300 acceptors/ μm^2). For a donor in the center of the bilayer (Fig. 8d), the shape of the fluorescence intensity curve has not changed qualitatively. For the distributed donors (Fig. 8c), in contrast, the positive transients have diminished in relation to the total fluorescence change. Instead, a negative transient, most prominent in the red trace, developed. This negative transient occurs during the temporary situation after DPA but before oxonol have translocated. In this situation, every donor is close to an acceptor so that overall fluorescence is decreased. If we can observe a negative transient in our experiment, the respective labeled position of the toxin is distributed between both leaflets of the membrane (Fig. 5d).

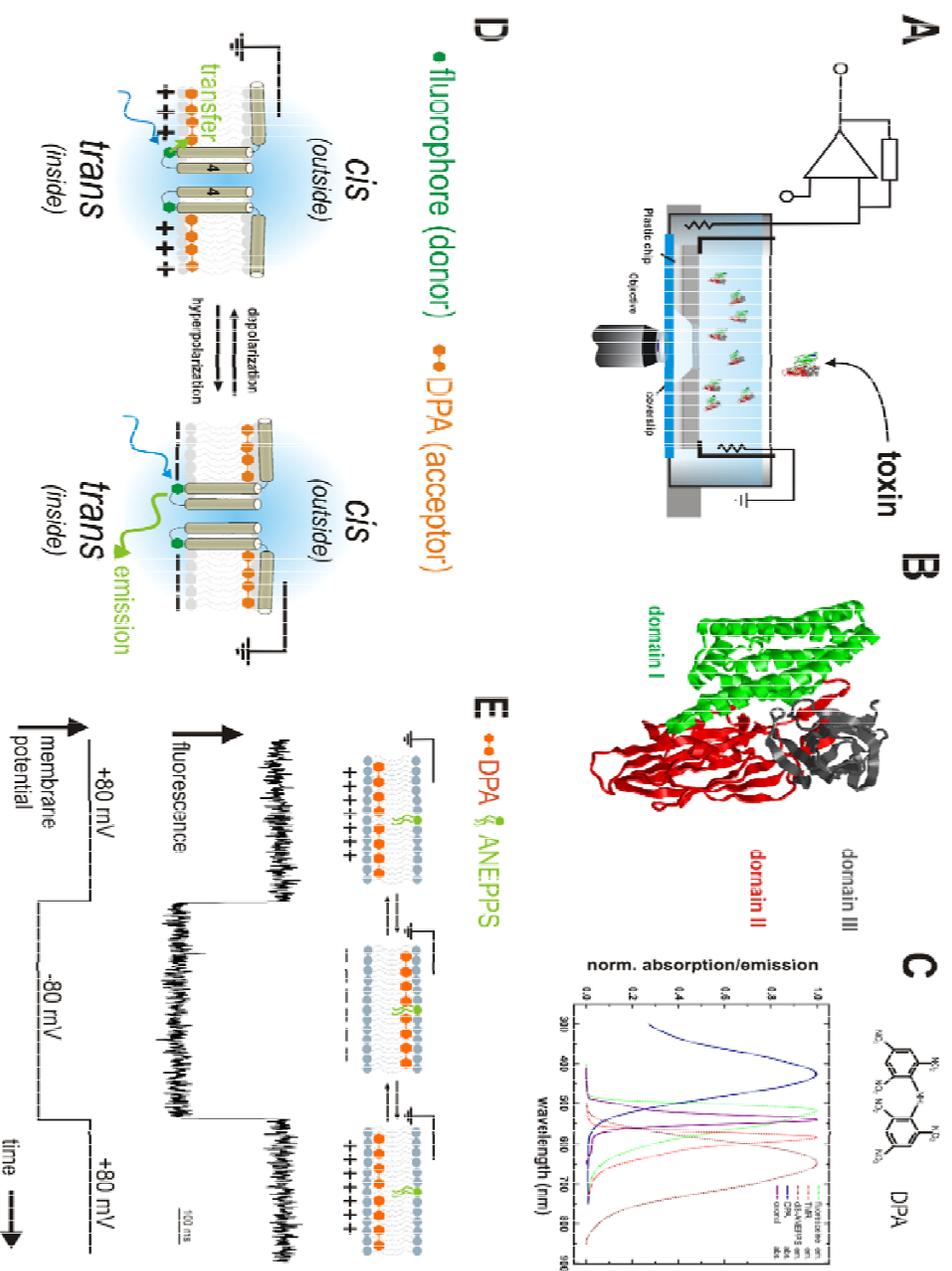
In figures 8e & f, the dependence of the fluorescence responses on the total acceptor concentration is shown. We always kept both acceptors at the same concentration in order to mimic the experimental conditions most accurately. Figure 8f shows that there is an optimal concentration of around 6400 acceptors/ μm^2 , where the positive transients are highest. At higher concentrations, the negative transient in figure 8e develops while the positive transients decrease.

Supplementary material

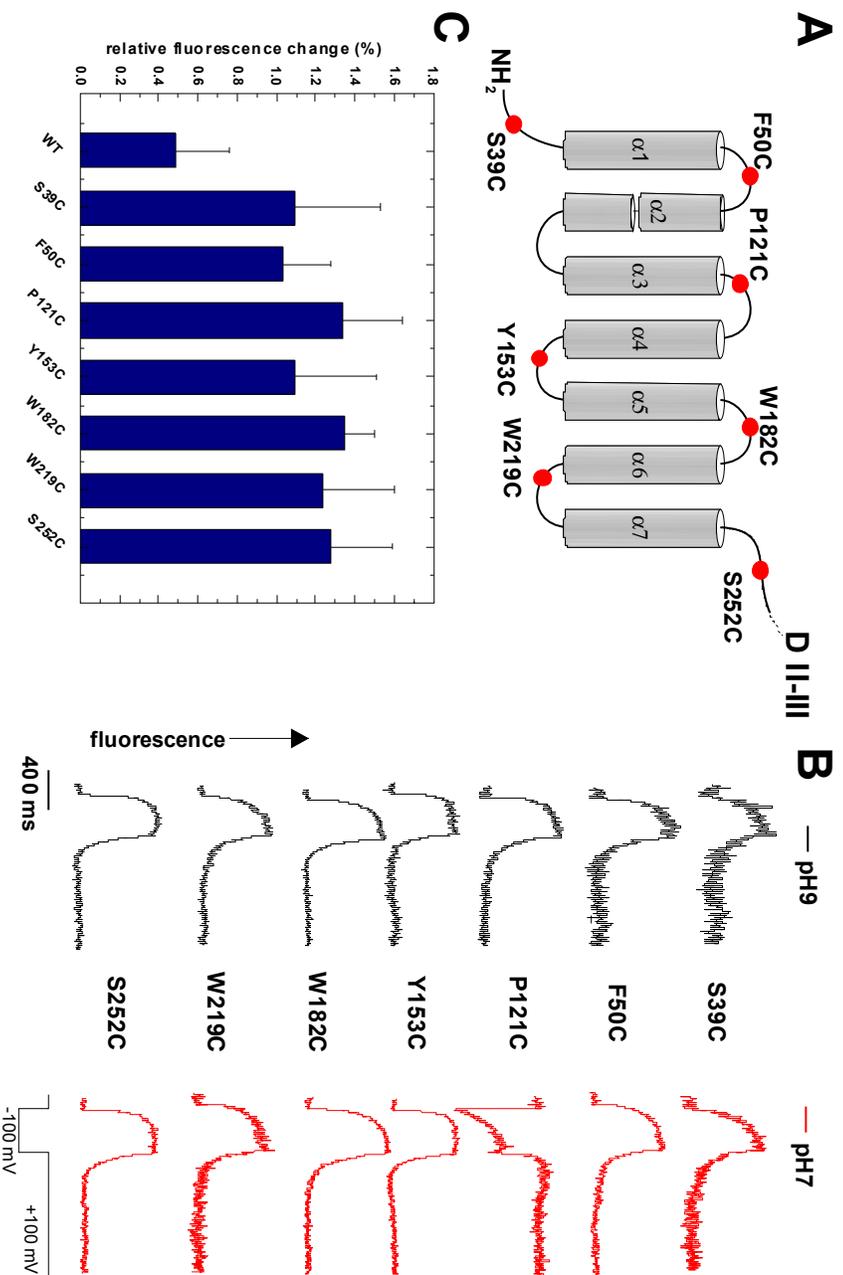
Time constants of DPA and oxonol in planar lipid bilayer

The translocation time constants of both DPA and oxonol can be determined by measuring the FRET signal between the two compounds. To this end, both compounds are added at the same time to the bilayer. As DPA absorption overlaps with TMRM emission, FRET will occur from oxonol (donor) to DPA (acceptor). The movement of the two compounds in the bilayer can, thus, be monitored by exciting oxonol fluorescence as shown in supplementary figure 1. As both compounds are negatively charged, they will originally be in the same leaflet. Upon potential reversal, DPA and oxonol will both translocate to the other side of the membrane, but with different time constants. When a pulse was applied, DPA translocated immediately to the other side (transition 1 in suppl. Fig. 1), thereby creating a transient situation, in which the two acceptors were on opposite sides of the membrane. At this time the distance was larger and donor fluorescence high. Once the oxonol had followed (slow time constant, transition 2), both compounds were close again and fluorescence was low. Upon reversal of the potential, exactly the same events occur in the same order (for reasons of symmetry, transition 3&4). Thus, the on and off time constants of the resulting transients in response to a depolarizing pulse will provide the time constants for DPA and oxonol, respectively.

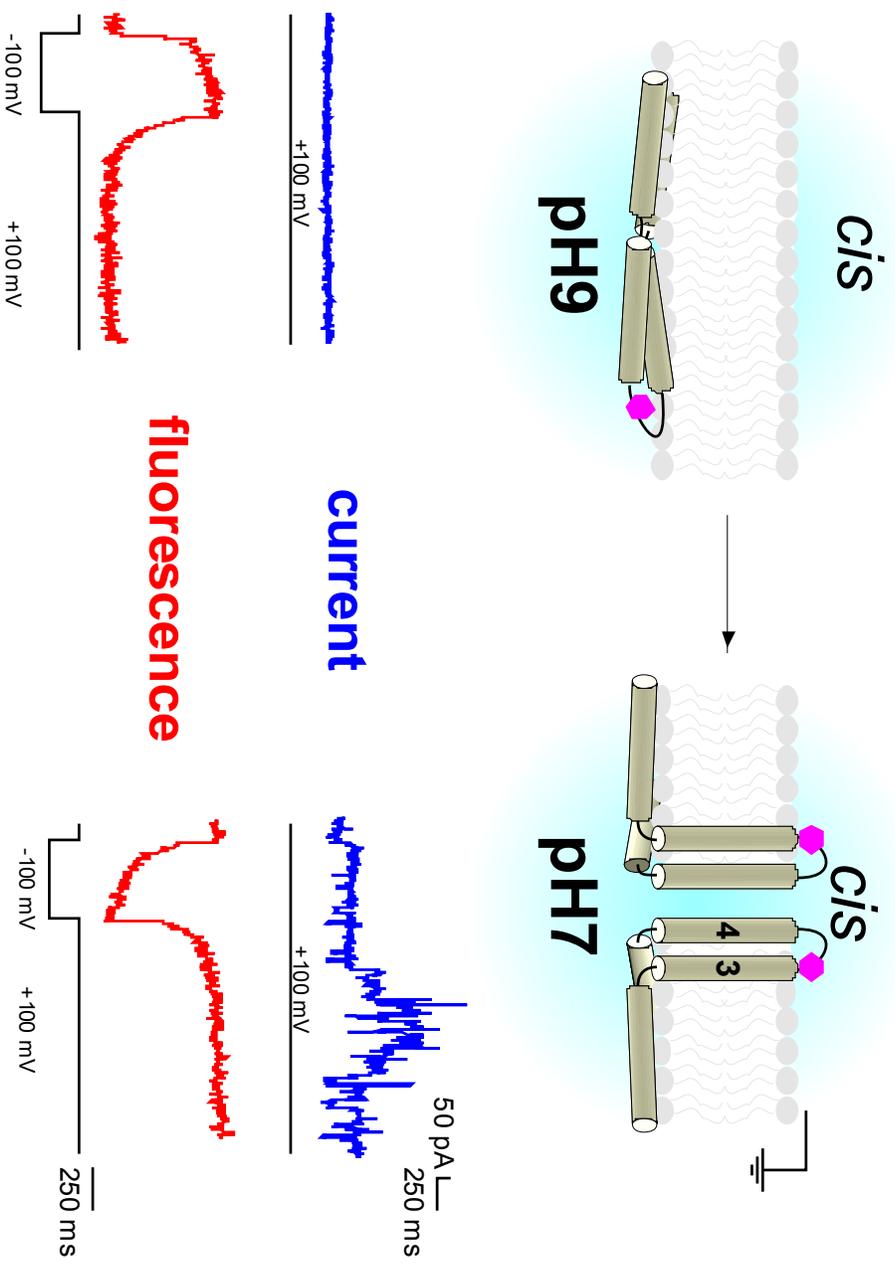
Groulx et al. Fig. 1



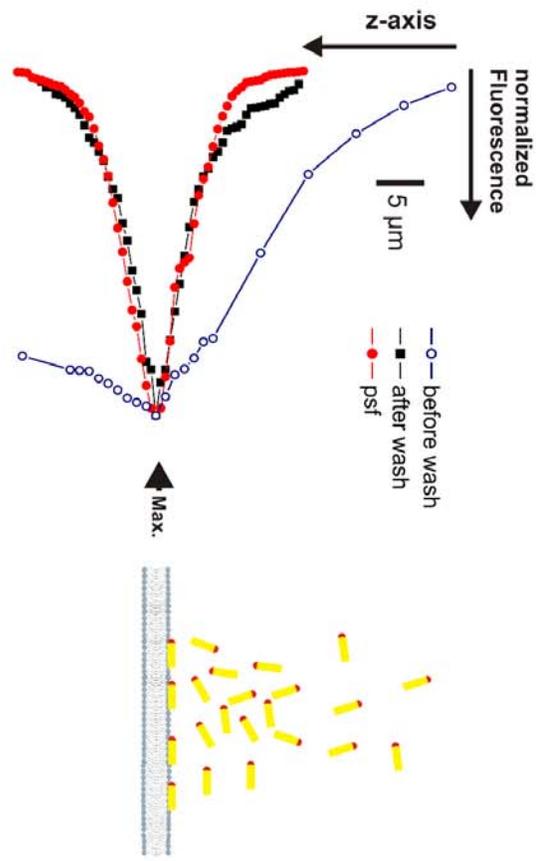
Groulx et al. Fig. 2



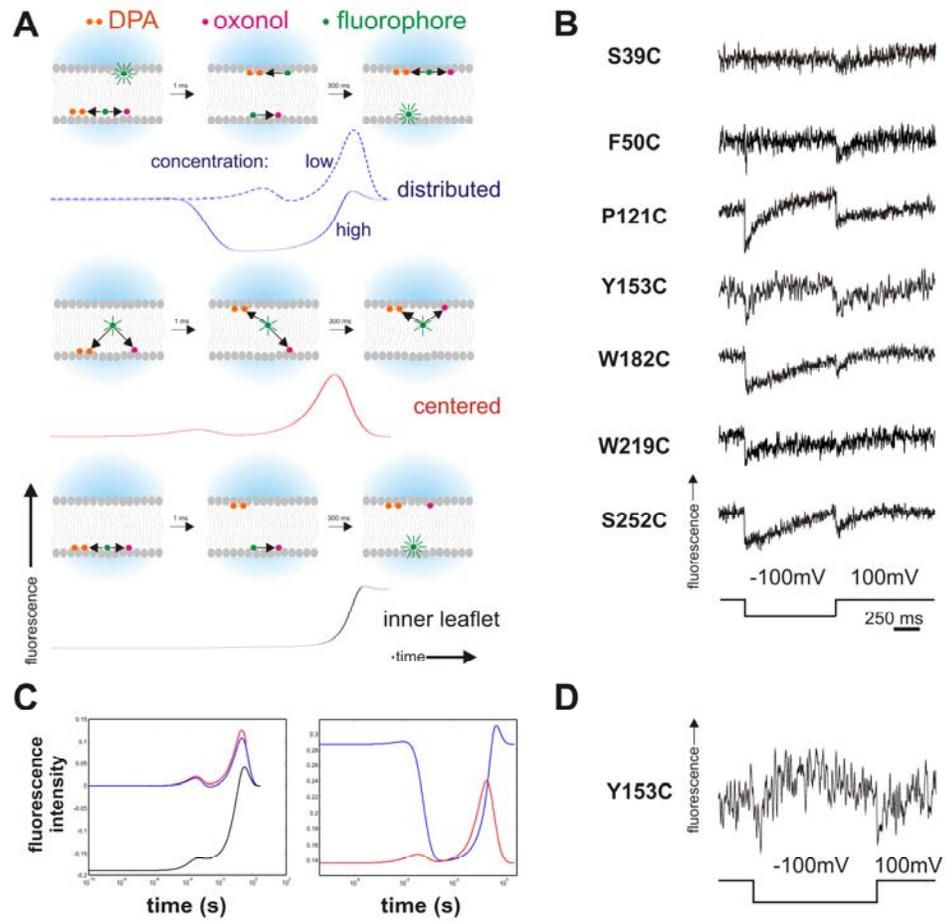
Groulx et al. Fig. 3



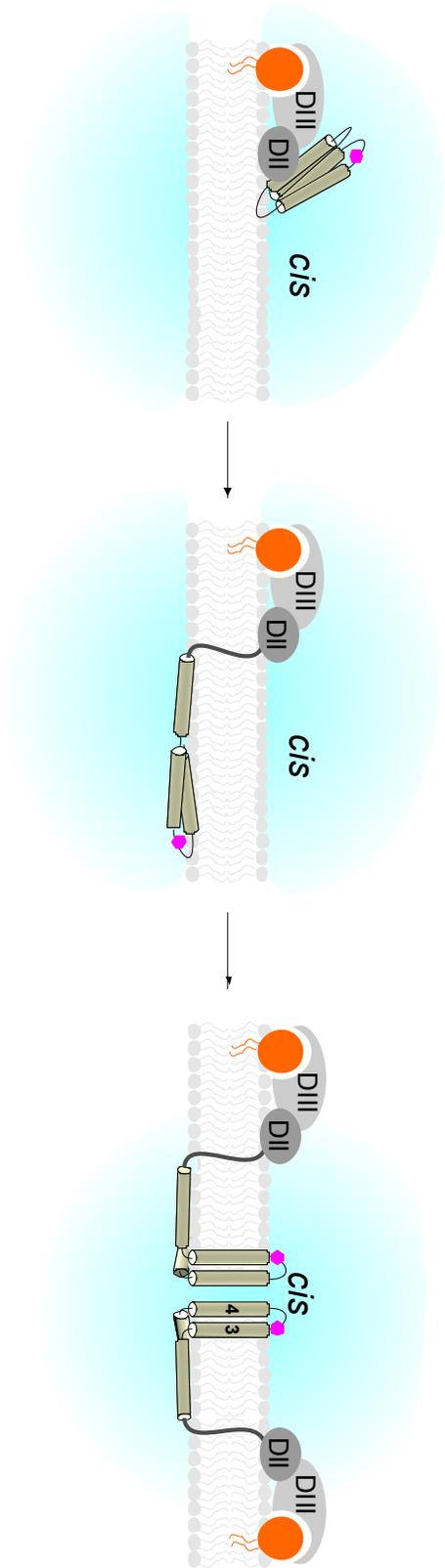
Groulx et al. Fig. 4



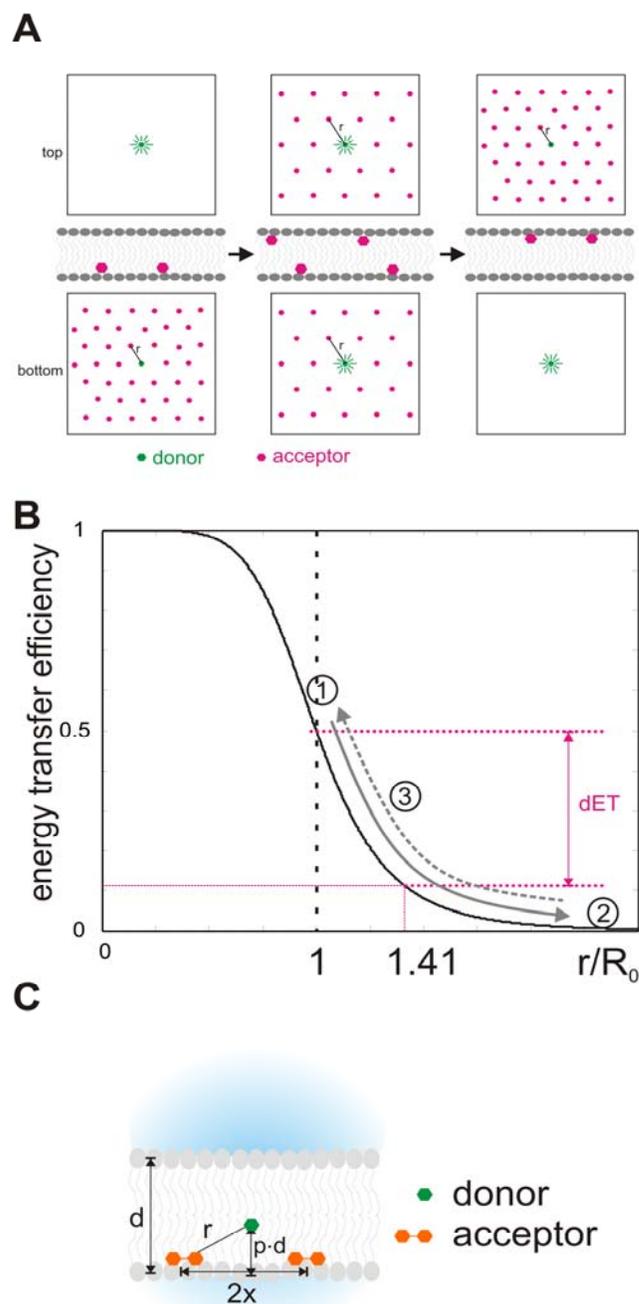
Groulx et al. Fig. 5



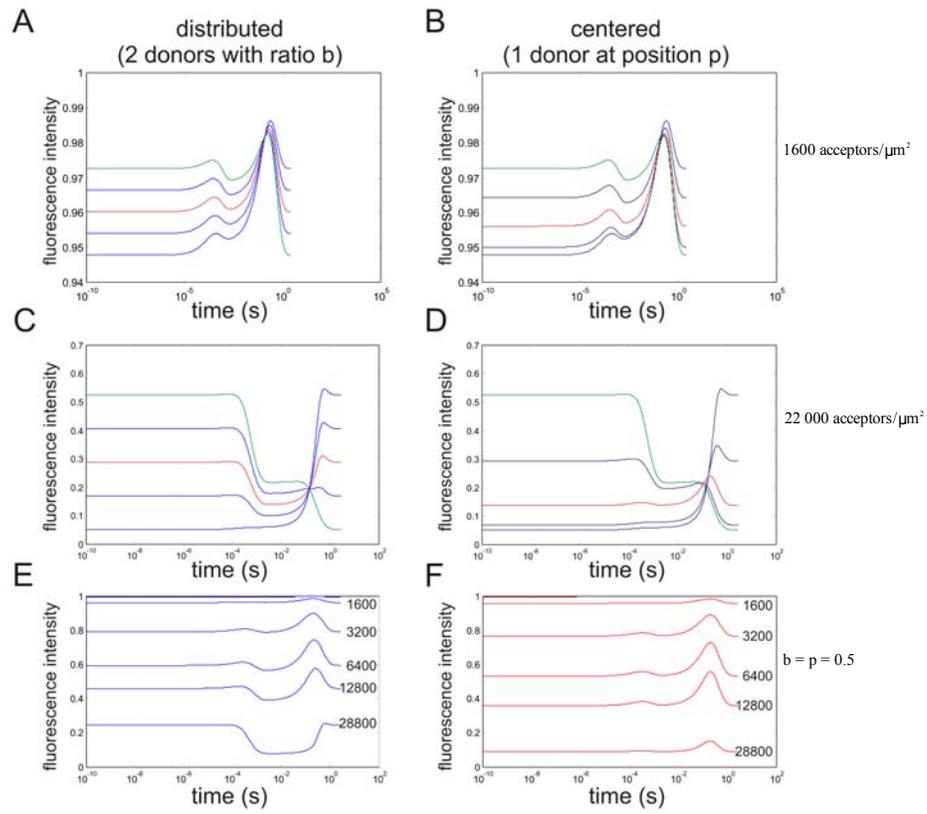
Groulx et al. Fig. 6



Groulx et al. Fig. 7



Groulx et al. Fig. 8



Supplementary figure 1

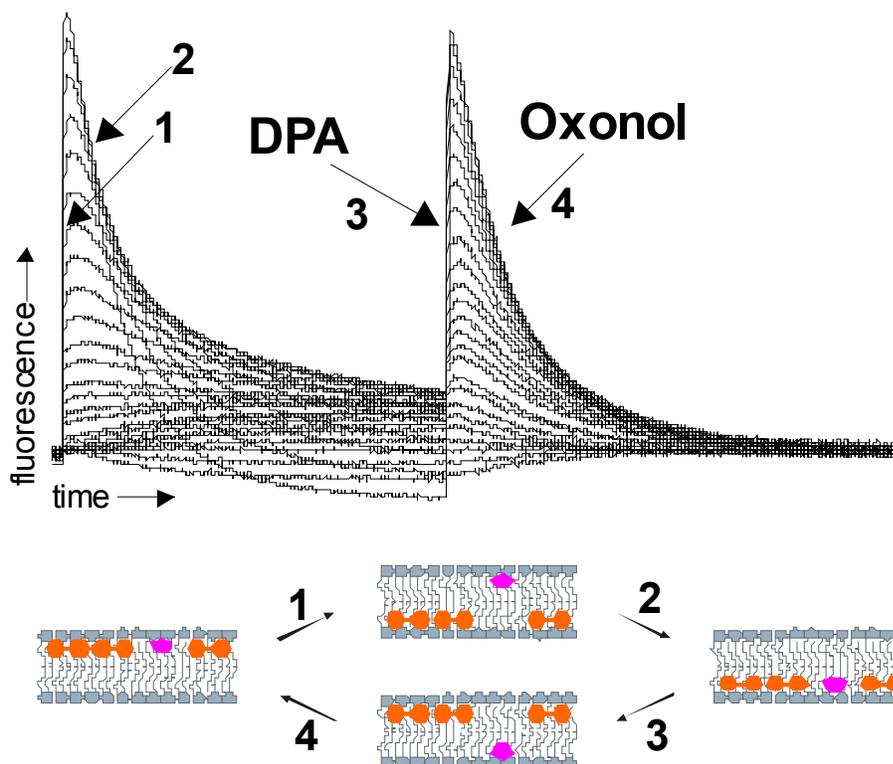


Figure Legends

Figure 1 - Fluorescence topology assay

(a) Horizontal planar lipid bilayer configuration for optical access: The bilayer is formed in the aperture ($\varnothing = 80\text{-}200\ \mu\text{m}$) of a small plastic chip (*grey*). The chip with access channels on the bottom is placed on a glass coverslip facilitating the bilayer to be imaged with a high NA objective. Electrical currents are recorded with a patch-clamp amplifier. The configuration is mounted on the stage of an inverted microscope. **(b)** Structure of Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995). The three domains are shown in green (I), red (II) and grey (III). **(c)** Structure of dipicrylamine (DPA, *top*), absorption spectrum of DPA (*blue*) and emission spectra of tetramethylrhodamine (TMR, *red*), fluorescein (*green*) and di-8-ANEPPS (*brown*): DPA is a negatively charged amphiphatic compound, which absorbs in the visible spectral range. It overlaps with TMR as well as with fluorescein emission wavelengths with an R_0 of 35 Å and 45 Å, respectively. **(d)** “Umbrella” model and DPA assay: According to the umbrella model, the helices 4 and 5 translocate through the membrane and form the ion conducting pore. With the DPA assay, we can detect the location of a labeled residue (*green hexagon*) in the toxin by depolarizing and hyperpolarizing the membrane, and thereby moving the DPA (*double orange hexagon*) from one leaflet to the other. It only comes to energy transfer (and thus reduced donor fluorescence) if the DPA and the fluorophore are located on the same side of the membrane (*see text for details*). **(e)** Control experiment with a membrane-fixed dye. Di-8-ANEPPS inserts into the membrane between the headgroups. Due to its long hydrophobic tail, it cannot translocate to the inner leaflet. In response to a hyperpolarizing voltage pulse (*bottom*), the DPA moves to the outer leaflet close to the fluorophores resulting in energy transfer and reduced fluorescence (*center*). Upon returning the voltage, the signal recovers. Please note that the fluorophore is opposite to (d).

Figure 2 - FRET signals of Cry1Aa mutants

(a) Position of cysteine mutants of domain I. Mutants in every loop were investigated except the $\alpha 2\text{-}\alpha 3$ loop, as mutants in this loop did not express. **(b)** Fluorescence traces (TMR) of the mutants in (a). Fluorescence traces were taken for a hyperpolarizing pulse

(+100 mV / -80 mV / +100 mV) at pH 9 (*black traces*) and after exchange to pH 7 (*red traces*). (c) Relative fluorescence changes of mutants in (a) (dF/F ; mean \pm SD) of the cysteine mutants in (a).

Figure 3 – Translocation of the α 3- α 4 hairpin

Results for the T122C-R131E mutant: The fluorophore translocates through the membrane upon activation by pH change. The fluorescence signal (*red*) reverses as a response to a negative pulse (+100mV/-80mV/+100mV), and pore formation is observed after pH change. Pore formation (*blue*, 100mV) is observed only at pH 7. Considering that the other positions are located at the intracellular leaflet, we suggest a model for pore formation as depicted here (*top*). The entire domain I translocates to the internal leaflet. Subsequently, helices α 3 and α 4 reach through the membrane and form the ion conducting pore from the internal side. The magenta hexagon depicts the fluorophore attached to the α 3- α 4 loop. Two toxins are shown on the right as it is thought that toxins oligomerize for pore formation. Please note that the pulse protocols for the current and fluorescence traces are not identical. Currents are shown only from +100 mV.

Figure 4 – Confocal z-scan of labeled toxin in the bilayer

Confocal z-scans through a bilayer after incubation with labeled toxin. The fluorescence was concentrated to the bilayer after rigorous washing of the toxin as described in the methods section. In red, the “point spread function” (psf) is shown. It was determined with a 1 μ m fluorescent bead.

Figure 5 – Double FRET experiments

(a) Timeline of double FRET in response to a hyperpolarizing pulse. Depicted are the principle states (as cartoons) and respective simulated fluorescence double FRET signals below for high acceptor concentration for the instances where the fluorophores are distributed between the two leaflets (*top*), located close to the center (*center*) or located in just one leaflet (*bottom*). Black arrows indicate energy transfer between toxin (fluorophore) and acceptor (oxonol and DPA) for close or medium distance. While in

the *centered* case, the fluorescence will show two transients (on a logarithmic scale) during the movement of the acceptors, *distributed* toxins will lead to a transient fluorescence decrease while fluorophores on both sides are transferring energy to oxonol or DPA. A fluorophore located on only one side will lead to a monotonous increase as the acceptors move away. For distributed donors, the fluorescence response for low acceptor concentrations is shown as a dashed line for comparison (see text for details)

(b) Results of the double FRET experiments for the cysteine mutants (Fig. 2a). The traces show a double negative transient as a response to a depolarizing pulse. **(c)** Simulated fluorescence response (semi-logarithmic scale) of toxins located close to the center (*red*), distributed between both leaflets (*blue*) and located on only one side (*black*) for a low (6400 acceptors/ μm^2 , *left*) and high (22300 acceptors/ μm^2 , *right*) concentration in response to a hyperpolarizing pulse. The negative transient in the fluorescence response for *distributed* toxins occurs only at high concentrations. **(d)** Trace of double FRET of Y153C where negative and positive transients are visible. This occurs at intermediate acceptor concentrations.

Figure 6 – The proposed mechanism of pore formation

The Cry1Aa toxin first binds to the membrane-bound receptor with domains II and III. In the subsequent step, the α -helical domain I unfolds and transits to the internal (trans) leaflet. For pore formation to occur, the $\alpha 3$ - $\alpha 4$ hairpin inserts into the membrane and reaches to the other side. Several toxins oligomerize in order to form the water-filled pore.

Figure 7 – Transient concentration decrease during translocation

(a) Schematic of the dynamics of acceptor distribution during the translocation process. At positive potential (inside), the negatively charged acceptors are all in the inner leaflet (*left*). Once the potential reverses to negative, they exponentially relocate to the outer leaflet. At some time during the translocation process, the concentration on both sides is equal (*center*). Now the mean distance to the acceptor $r(t)$ is 1.41 times longer than initially (inner leaflet). In the new steady state (*right*), all acceptors are in the outer leaflet, and the situation is inverted to the initial one.

(b) Relation between energy transfer efficiency and distance between donor and acceptor. The distance is a function of the concentration of the acceptors in the membrane. Numbers indicate distances (and ET) at the initial state for the inner (1) and outer (2) leaflet, as well as at equal concentrations for both leaflets (3), assuming the concentration is such that the initial value of $r(t) = R_0$. The arrows indicate how the distance and ET change during a voltage pulse (dynamic fluorescence response) for the inner (solid) and outer (dashed) leaflet. dET indicates the difference in energy transfer for the donors in the inner leaflet between initial (1) and equal state (3). A positive transient is generated as a result of the change of ET between (1) and (3) is larger than between (2) and (3).

(c) Variables used in formulas: d : thickness of the bilayer; r : distance between donor and acceptor; $2x$: mean distance between two acceptors in one leaflet; p : fraction of the bilayer at which the fluorophore is located

Figure 8 – Simulated double FRET responses

Simulated fluorescence traces (semi-logarithmic scale) for donors distributed between both leaflets (a, c, e) and donors located at a fraction p of the membrane (c, d, f).

(a & b) Concentration of 1600 acceptors/ μm^2 with a distribution between both leaflets of $b/(1-b)$ or located at a position p in the bilayer. The red curve indicates $b=0.5$ (equal distribution) or $p=0.5$ (center of the bilayer), respectively.

(c & d) Same as (a & b) but with a concentration of 22300 acceptors/ μm^2 .

(e & f) b or $p = 0.5$ with increasing concentrations x acceptors/ μm^2 (x as indicated).

Supplementary Figure 1 – FRET from oxonol to DPA

Timing of DPA (*orange double hexagons*) and oxonol (*magenta hexagons*) movement. Oxonol and DPA are both negatively charged, but translocate between the leaflets with different time constants. Upon inverting the polarity, the DPA translocates rapidly to the other leaflet and oxonol fluorescence increases (1). As soon as the oxonol follows (2),

oxonol fluorescence decreases again since energy is transferred to DPA. For reasons of symmetry, the direction of the potential change makes no difference (3 & 4).

References

- Akiba,T., Y.Abe, S.Kitada, Y.Kusaka, A.Ito, T.Ichimatsu, H.Katayama, T.Akao, K.Higuchi, E.Mizuki, M.Ohba, R.Kanai, and K.Harata. 2008. Crystal structure of the parasporin-2 bacillus thuringiensis toxin that recognizes cancer cells. *J. Mol. Biol.*
- Aronson,A.I., D.Wu, and C.Zhang. 1995. Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a Bacillus thuringiensis protoxin gene. *J. Bacteriol.* 177:4059-4065.
- Bah,A., F.K.van, R.Brousseau, and L.Masson. 2004. The Bacillus thuringiensis Cry1Aa toxin: effects of trypsin and chymotrypsin site mutations on toxicity and stability. *J. Invertebr. Pathol.* 85:120-127.
- Blunck,R., D.M.Starace, A.M.Correa, and F.Bezanilla. 2004. Detecting rearrangements of shaker and NaChBac in real-time with fluorescence spectroscopy in patch-clamped mammalian cells. *Biophys. J.* 86:3966-3980.
- Boonserm,P., P.Davis, D.J.Ellar, and J.Li. 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J. Mol. Biol.* 348:363-382.
- Chanda,B., O.K.Asamoah, R.Blunck, B.Roux, and F.Bezanilla. 2005a. Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement. *Nature* 436:852-856.
- Chanda,B., R.Blunck, L.C.Faria, F.E.Schweizer, I.Mody, and F.Bezanilla. 2005b. A hybrid approach to measuring electrical activity in genetically specified neurons. *Nat. Neurosci.* 8:1619-1626.

- Cohen,S., O.Dym, S.Albeck, E.Ben-Dov, R.Cahan, M.Firer, and A.Zaritsky. 2008. High-resolution crystal structure of activated Cyt2Ba monomer from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Mol. Biol.* 380:820-827.
- Fernandez,J.M., R.E.Taylor, and F.Bezanilla. 1983. Induced capacitance in the squid giant axon. Lipophilic ion displacement currents. *J. Gen. Physiol* 82:331-346.
- Gazit,E., R.P.La, M.S.Sansom, and Y.Shai. 1998. The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin are consistent with an "umbrella-like" structure of the pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:12289-12294.
- Grochulski,P., L.Masson, S.Borisova, M.Pusztai-Carey, J.L.Schwartz, R.Brousseau, and M.Cygler. 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* 254:447-464.
- Knowles,B.H. 1994. Mechanism of action of *bacillus-thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins. *Advances in Insect Physiology, Vol 24* 24:275-308.
- Laflamme,E., A.Badia, M.Lafleur, J.L.Schwartz, and R.Laprade. 2008. Atomic force microscopy imaging of *bacillus thuringiensis* Cry1 toxins interacting with insect midgut apical membranes. *J. Membr. Biol.* 222:127-139.
- Lakowicz,J.R. 1999. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2nd ed. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.
- Lee,M.K., B.A.Young, and D.H.Dean. 1995. Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216:306-312.
- Li,J.D., J.Carroll, and D.J.Ellar. 1991. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353:815-821.
- Liu,C.Q., S.D.Nuttall, H.Tran, M.Wilkins, V.A.Streltsov, and M.R.Alderton. 2008. Construction, crystal structure and application of a recombinant protein that lacks

- the collagen-like region of BclA from *Bacillus anthracis* spores. *Biotechnol. Bioeng.* 99:774-782.
- Masson,L., G.Prefontaine, L.Peloquin, P.C.Lau, and R.Brousseau. 1990. Comparative analysis of the individual protoxin components in P1 crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* isolates NRD-12 and HD-1. *Biochem. J.* 269:507-512.
- Nair,M.S. and D.H.Dean. 2008. All domains of Cry1A toxins insert into insect brush border membranes. *J. Biol. Chem.* 283:26324-26331.
- Ogiwara,K., L.S.Indrasith, S.Asano, and H.Hori. 1992. Processing of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 60:121-126.
- Pantoja,R., D.Sigg, R.Blunck, F.Bezanilla, and J.R.Heath. 2001. Bilayer reconstitution of voltage-dependent ion channels using a microfabricated silicon chip. *Biophys. J.* 81:2389-2394.
- Peyronnet,O., V.Vachon, J.L.Schwartz, and R.Laprade. 2000. Ion channel activity from the midgut brush-border membrane of gypsy moth (*Lymantria dispar*) larvae. *J. Exp. Biol.* 203:1835-1844.
- Peyronnet,O., V.Vachon, J.L.Schwartz, and R.Laprade. 2001. Ion channels induced in planar lipid bilayers by the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa in the presence of gypsy moth (*Lymantria dispar*) brush border membrane. *J. Membr. Biol.* 184:45-54.
- Ries,R.S., H.Choi, R.Blunck, F.Bezanilla, and J.R.Heath. 2004. Visualizing the Substrate Dependence on the Structure and Dynamics of Black Lipid Membranes. *Journal of Physical Chemistry B* 108:16040-16049.
- Schnepf,E., N.Crickmore, R.J.Van, D.Lereclus, J.Baum, J.Feitelson, D.R.Zeigler, and D.H.Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.

- Schwartz, J.L. and R.Laprade. 2000. Membrane permeabilization by *Bacillus thuringiensis* toxins: protein insertion and pore formation. *In* Entomopathogenic bacteria: From Laboratory to Field Application. Charles JF, A.Delecluse, and C.Nielsen-Le Roux, editors. Kluwer Academic Publishers, 199-218.
- Schwartz, J.L., Y.J.Lu, P.Sohnlein, R.Brousseau, R.Laprade, L.Masson, and M.J.Adang. 1997. Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. *FEBS Lett.* 412:270-276.
- Tomimoto, K., T.Hayakawa, and H.Hori. 2006. Pronase digestion of brush border membrane-bound Cry1Aa shows that almost the whole activated Cry1Aa molecule penetrates into the membrane. *Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.* 144:413-422.
- Vachon, V., G.Prefontaine, C.Rang, F.Coux, M.Juteau, J.L.Schwartz, R.Brousseau, R.Frutos, R.Laprade, and L.Masson. 2004. Helix 4 mutants of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa display altered pore-forming abilities. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6123-6130.
- Vie, V., M.N.Van, P.Pomarede, C.Dance, J.L.Schwartz, R.Laprade, R.Frutos, C.Rang, L.Masson, F.Heitz, and G.C.Le. 2001. Lipid-induced pore formation of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa insecticidal toxin. *J. Membr. Biol.* 180:195-203.

2. SINGLE MOLECULE FLUORESCENCE STUDY OF THE *B. THURINGIENSIS* TOXIN CRY1AA REVEALS TETRAMERIZATION*

Nicolas Groulx^{1,3†}, Hugo McGuire^{1,3†}, Raynald Laprade^{1,3}, Jean-Louis Schwartz^{1,2,4} and Rikard Blunck^{1,3,4}

¹Groupe d'Étude des Protéines Membranaires (GÉPROM), ²Centre SÈVE, Departments of ³Physics and ⁴Physiology, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

†N.G. and H.M. contributed equally to this work

*Running title: Tetramerization of *B. thuringiensis* toxin Cry1Aa

To whom correspondence should be addressed: Rikard Blunck, Université de Montréal, Departments of Physics and of Physiology, C.P. 6128 succ. Centre-ville, Montréal, QC H3C 3J7, Canada

Keywords: single subunit counting; pore-forming toxins; Bt toxin; single molecule fluorescence; supported bilayer

Background: The stoichiometry of pore-forming toxins is frequently unknown because crystal structures do not reflect the active conformations.

Results: We used single subunit counting on fluorescently-labeled Cry1Aa toxins of *B. thuringiensis* to follow its oligomerization process.

Conclusion: We determined that the final architecture of the pores is tetrameric.

Significance: The stochastic analysis introduced permits to apply single subunit counting to dynamic processes as oligomerization.

Summary

Pore forming toxins constitute a class of potent virulence factors that attack their host membrane in a 2- or 3-step mechanism. After binding to the membrane often aided by specific receptors, they form pores in the membrane which either unfolds a cytolytic activity in itself or provides a pathway to introduce enzymes into the

cells that act upon intracellular proteins. The elucidation of the pore forming mechanism of many of these toxins represents a major research challenge. As the toxins often refold after entering the membrane, their structure in the membrane is unknown, and key questions such as the stoichiometry of individual pores and their mechanism of oligomerization remain unanswered. In this study, we used single subunit counting based on fluorescence spectroscopy in order to explore the oligomerization process of the Cry1Aa toxin of *Bacillus thuringiensis*. Purified Cry1Aa toxin molecules labeled at different positions in the pore forming domain were inserted into supported lipid bilayer and the photobleaching steps of single fluorophores in the fluorescence time traces were counted to determine the number of subunits of each oligomer. We found that toxin oligomerization is a highly dynamic process that occurs in the membrane and that tetramers represent the final form of the toxins in a lipid bilayer environment.

INTRODUCTION

Pore forming toxins (PFT) are endogenous and potentially harmful proteins synthesized in a wide variety of bacteria, plants, animals and insects (Alouf & Freer, 2006). Their specificity for certain hosts permits the use of PFTs as biopesticides or in medical treatment. So are several toxins produced by *Bacillus thuringiensis* (Bt) a widely used biological alternative to chemical pesticides due to their specificity for certain insects of various orders, their low remanence in the environment, the absence of effects on mammals and humans, and the slow onset of resistance in target organisms (for review see Schnepf *et al.*, 1998). Like other Bt toxins, Cry1Aa, which is toxic only to *Lepidoptera* insects, is ingested by the larvae as a protoxin and activated by proteases in the midgut of the larvae (Hofte & Whiteley, 1989). The activated toxin is thought to then bind variably to different types of gut epithelial surface proteins (reviewed in Pigott & Ellar, 2007). Subsequently, it will intercalate in the membrane, where it refolds to form pores responsible for cell destruction (Knowles, 1994; Schnepf *et al.*, 1998; Zavala *et al.*, 2011; Peyronnet *et al.*, 2001; Groulx *et al.*, 2010). The crystal structure of Cry1Aa presents three functional domains (Fig. 1A) (Grochulski *et al.*, 1995). Domains II and III are involved in receptor binding and structural integrity (Schnepf *et al.*, 1998; Aronson *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995; Pigott & Ellar, 2007), whereas domain I, consisting of

seven α -helices, is responsible for pore formation (Walters *et al.*, 1993; Schwartz & Laprade, 2000; Groulx *et al.*, 2010)).

Previous studies have shown that helix $\alpha 4$ of domain I lines the pores formed by Cry1Aa in planar lipid bilayers (Masson *et al.*, 1999) and in brush border membrane vesicles from *Manduca sexta* larva epithelial gut cells (Girard *et al.*, 2009a; Girard *et al.*, 2009b). Yet, little information is available on the final architecture of the functional pores, i.e., whether they are monomeric or oligomeric, and, in the latter case, how many subunits make up the pores and whether oligomerization takes place before or after membrane insertion.

Several studies have approached the question of Bt toxin oligomerization in solution and in receptor-free artificial membranes. In solution, Bt toxin oligomers or aggregates of a large range of sizes have been observed (Walters *et al.*, 1994; Guereca & Bravo, 1999; Masson *et al.*, 2002). In receptor-free bilayers, a number of different Bt toxins formed ion channels with principal conductances of several hundreds of pS, but smaller conducting levels down to a few pS were also observed, indicative of the presence of conducting substates, smaller size channels of a lower order of oligomerization, or both (Slatin *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1993; English *et al.*, 1994; Grochulski *et al.*, 1995; Lorence *et al.*, 1995; Smedley *et al.*, 1997; Peyronnet *et al.*, 2001; Peyronnet *et al.*, 2002). In brush-border membrane vesicles, Cry1Aa forms pores with a diameter of 24-26 Å (Carroll & Ellar, 1997). A similar diameter of 20-26 Å was obtained in the case of Cry1C in receptor free bilayers as used in the current study (Peyronnet *et al.*, 2002). It was proposed that these channels formed clusters of various sizes that gated cooperatively, resulting in multiple conductance states. On the other hand, trimers of Cry4Ba toxin, but also monomers and dimers, were detected in liposomes according to SDS page analysis (Likitvivanavong *et al.*, 2006).

We recently studied the pore forming mechanism of Cry1Aa using fluorescence spectroscopy (Groulx *et al.*, 2010) and found in our system that the pore-forming mechanism includes the insertion of the hairpin consisting of the α -helices $\alpha 3$ - $\alpha 4$ into the membrane from the inner to the outer leaflet, while the rest of domain I remained on the inner leaflet. This intercalation of the hairpin preceded pore formation suggesting an

intermediate step, which might be lateral diffusion and oligomerization. Direct visual demonstration of pore-like structures of Bt toxins in lipid membranes was provided by atomic force microscopy (AFM) (Vie *et al.*, 2001; Laflamme *et al.*, 2008; Puntheeranurak *et al.*, 2005) and electron microscopy (Ounjai *et al.*, 2007). AFM measurements visualized a depression of diameter ~ 15 Å surrounded by four elements, each of which had a diameter of ~ 14 Å corresponding to the size of single α -helices or hairpin loops. The observed structures were, thus, consistent with a tetrameric stoichiometry as proposed earlier (Masson *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 1997b). According to our proposed model (Groulx *et al.*, 2010) mainly the $\alpha 3$ - $\alpha 4$ loop protrude from the external membrane leaflet which would explain the size of the structures. Nevertheless, each Cry1Aa toxin contains seven α -helices and consequently five loops in the pore-forming domain I, rendering it impossible to predict how many toxin molecules contribute to each pore forming unit without additional information. Furthermore, the same toxin is suggested to form trimeric complexes in 2-dimensional membrane associated toxin crystals, as revealed by electron microscopy (Ounjai *et al.*, 2007).

In the present work, we set out to determine the number of subunits that comprise the Cry1Aa oligomers using a single-molecule fluorescence approach based on photobleaching step analysis (Ulbrich & Isacoff, 2007; Blunck *et al.*, 2008; Tombola *et al.*, 2008; Simonson *et al.*, 2010). Since single fluorophores photobleach in a step-like behavior, the number of photobleaching steps occurring in a single labeled protein is equivalent to the number of fluorophores attached to it. In our case, each toxin monomer was labeled with a single fluorophore. Therefore, the number of photobleaching steps indicated how many subunits were present in individual Cry1Aa oligomers. Our results show that Cry1Aa forms tetramers in artificial membranes and suggest that oligomerization takes place after insertion into the lipid bilayer.

Experimental Procedures

Purification, labeling and reconstitution of Cry1Aa into lipid vesicles

Cry1Aa constructs in plasmid vectors pMP39 and pBA1 were described earlier (Groulx *et al.*, 2010; Masson *et al.*, 1990). In order to monitor the fluorescence emission from

fluorescently labeled Cry1Aa subunits using thiol-reactive fluorophores, cysteines were introduced into domain I by site-directed mutagenesis at positions F50 and P121 in the loop located between helices $\alpha 1$ and $\alpha 2$ and helices $\alpha 3$ and $\alpha 4$, respectively. Mutations were inserted using Quikchange (Stratagene) and amplified using Qiagen Miniprep Kits (Qiagen) following standard protocols. Constructs were sequenced in order to verify mutations.

Both mutants were transformed into *Bt* strain Cry HD-73. The bacteria were grown 72 hrs in YT media at 37°C containing 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin. Protoxins were solubilized, trypsin activated and toxins purified by fast protein liquid chromatography as described previously (Masson *et al.*, 1990). Purity was verified by SDS gel electrophoresis. All mutants were labeled with 10-fold excess of tetramethylrhodamine-5-maleimide (TMRM) (Invitrogen) for 60 minutes. Unbound dye was removed by buffer exchange using concentrators (30 kDa, Amicon, Millipore). The labeling ratio was determined by comparing the protein concentration (Bradford assay, Pierce) with the fluorophore concentration (absorption). The average labeling ratio after washing was 0.8 ± 0.2 . Cry1Aa-WT had low unspecific labeling (0.06 ± 0.03 ; see *Results*). Unilamellar vesicles at 2.5 mg/ml lipid concentration were formed from POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) and POPE (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) at (1:1) mass ratio or from DPhPC (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; all Avanti Polar Lipids) in the experiment buffer using the same method as described previously (Blunck *et al.*, 2008). All mutants were finally reconstituted in unilamellar vesicles at concentrations of 0.17 $\mu\text{g/ml}$ to 2.33 $\mu\text{g/ml}$ diluted from a stock solution of 33 $\mu\text{g/ml}$ in experiment buffer (100 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM CaCl_2 at pH 7). Preparations were sonicated and vortexed briefly to allow proper mixing and, finally, incubated overnight at 4°C prior to measurements.

Fluorescence Measurements of Toxins in Supported Bilayer.

Borosilicate glass coverslips were washed by 30' sonication in different solvents in the order: Alconox (Fischer Scientific), acetone and anhydrous ethanol. Between each step, the coverslips were rinsed with H_2O (MilliQ, filtered at 0.2 μm). Coverslips were stored in H_2O and dried under a steady N_2 stream immediately before use. At the recording

intensities below 1.5 mW, almost no background fluorescence was detected from the top of the coverslip. 5 μ l of mutant/vesicle mixture was added to 400 μ l of experiment buffer on a clean coverslip. After 45 min, the vesicles formed supported bilayers on the coverslip, and excess vesicles were carefully washed off with experiment buffer using a micropipette.

Fluorescence was measured using an inverted microscope (Axiovert 200, Zeiss). A 30 mW, 532-nm laser (World Star Tech) was selected as the excitation source. Excitation light (<1.5 mW) was defocused to a diameter of \approx 10 mm. Emission was collected with a 63 \times N.A. 1.49 objective (Zeiss) and filtered by a 610/75 nm emission filter in combination with a Z532 dichroic mirror (Chroma Technologies). Images were recorded with an EMCCD Camera (iXon⁺ 860BV, Andor Technology) (Fig. 1B). In order to ensure complete photobleaching of the spots, each fluorescence recording was acquired until the image has reached a stable emission level (background) (\sim 5').

Photobleaching Data Analysis.

Images were analyzed using a Matlab (Mathworks) routine written in-house. The intensity of a single pixel spot was plotted over time and further analyzed whether it met the selection criteria: only spots that showed clear photobleaching steps were considered to ensure that only single oligomers were observed (see below). We observed occasionally modulation of fluorescence intensity which might have caused by blinking or movement of the protein/fluorophore. Although these traces were included in the analysis of the number of photobleaching steps, the fluorescence modulation itself was not further analyzed as we were interested only in the stoichiometry of the pore.

For every analyzed trace, we determined the number of photobleaching steps since they correspond to the number of labeled subunits forming a toxin oligomer (Ulbrich & Isacoff, 2007; Blunck *et al.*, 2008). Subunit counting statistics were first fitted to a Poisson distribution.

$$P(k) = e^{-\lambda} \frac{\lambda^k}{k!} \quad (\text{eq. 1})$$

where $P(k)$ represents the Poisson distribution probability as a function of k , the number of photobleaching steps, and λ denotes the average number of subunit. The Poisson distribution provides information on the average number of subunits within stochastically distributed oligomers.

The binomial distribution, on the other hand, is suitable only if the oligomerization results in a specific number of subunits:

$$P(k) = \binom{n}{k} \cdot p^k q^{n-k} \quad (\text{eq. 2})$$

where $P(k)$ represents the binomial distribution probability as a function of k , the number of photobleaching steps, n is the number of subunits expected, p represents the probability of detecting an existing subunit and $q = (1-p)$ the probability of not detecting it (photobleached or not labeled). Fitting was done by least squares optimization.

RESULTS

The toxin oligomerizes as a tetramer

Our aim was to establish whether we can deduce from the observed distribution of photobleaching steps the stoichiometry – if any – of the Cry1Aa pores. To this end, the toxins were fluorescently labeled using thiol-reactive chemistry and supported bilayers were formed on the surface of glass coverslips from liposomes containing the labeled Cry1Aa toxins in variable concentrations. Distinct fluorescent spots were observed in the supported bilayer. The measurement of the efficiency of labeling $\text{EOL} = 0.76 \pm 0.02$ (i.e. the number of fluorophores per monomer; see EXPERIMENTAL PROCEDURES) established that not more than one fluorophore was attached to each monomer, meaning that each photobleaching event corresponds to a single subunit (monomer, Fig. 1D). However, the number of bleaching steps is only the minimal number of subunits found in each oligomer as not every subunit is observed via fluorescence due to incomplete labeling or previous photobleaching.

We found previously that the labeled Cry1Aa toxins form pores in planar lipid bilayers like the wildtype toxin (Groulx *et al.*, 2010). Fluorescence from TMRM-labeled Cry1Aa

toxins was observed from the supported bilayer using epifluorescence and was found to display fluorescence intensity in distinct spots distributed over the entire field of view ($49\ \mu\text{m} \times 49\ \mu\text{m}$; Fig. 1C). Experiments were performed with Cry1Aa mutants F50C and P121C using two different lipid compositions: POPE:POPC (1:1) and DPhPC in order to verify whether the observed oligomerization distribution is specific to either the labeling position in the pore forming domain or to the lipid composition (fluidity). We analyzed the photobleaching behavior of the single spots. Most spots displayed a step-like photobleaching behavior, which confirmed that each spot contained only a few fluorophores (Fig. 1D). The exceptions were a few spots which fluoresced very intensely and followed an exponential bleaching behavior. These spots were likely caused by aggregated toxins or other impurities in the sample and were, thus, excluded from further analysis. We also excluded spots, which were not fully bleached after the entire bleaching period (5 min.) or where toxins moved during the exposure time as well as when the baseline did not remain constant. In those cases, the number of bleaching steps could not be confidently determined.

The observed spots were specific to the labeled toxins. Background measurements in the absence of toxins showed low number of spots (14 ± 2). In presence of labeled wild-type Cry1Aa, which contains no endogenous cysteines, we found 110 ± 16 spots, which was ~ 5.5 times lower than the number observed in the presence of labeled mutants. This ratio was consistent with the level of unspecific labeling (1/13) resulting in a ratio in the range of 6.3 and 2.6 if the proteins contain 2 and 6 subunits, respectively. Although the unspecific labeling only slightly influences the histograms (the probability of finding 2 non-specifically attached fluorophores is in one oligomer $< 0.6\%$), we will consider its influence below.

We determined the number of bleaching steps for each fluorescent spot from reconstituted toxin preparations at increasing concentrations between 0.17 and $2.33\ \mu\text{g/ml}$ and analyzed the histograms representing the number of bleaching steps found under the different conditions. At even higher concentrations ($> 2.33\ \mu\text{g/ml}$), the spot density was close to the spatial resolution limit such that the spots were no longer distinct from one another. The type of distribution found in the histograms will give us

information about the oligomerization. A randomly composed oligomer would follow a Poisson distribution, while an oligomer with a defined stoichiometry would rather display a binomial distribution. We, therefore, fitted the histograms of bleaching steps to both a Poisson distribution (eq.1; see PHOTOBLEACHING DATA ANALYSIS) – by minimizing the difference between the data and the fit as a function of the average (λ) – and to binomial distributions for different number of subunits n (dimer, trimer, tetramer etc., eq.2). For the binomial distributions, an additional fit parameter p was introduced, representing the probability of observing an existing subunit with fluorescence. While it is related to the efficiency of labeling (EOL), its value remains slightly lower because photobleaching prior to the measurement occurred to a certain extent.

At the lowest concentration (0.17 $\mu\text{g/ml}$), both toxin mutants photobleached to the greatest part in a single step ($67.5 \pm 3.3\%$) in both lipid compositions (Fig. 2A,B & Suppl. Fig. S1A,B) with a lower occurrence of dimers, trimers and tetramers (in average $24.2 \pm 2.4\%$, $6.6 \pm 0.8\%$, and $1.8 \pm 0.7\%$, respectively). These results show that only minimal variations were observed between the different mutants and lipid environments. We found this to be consistent in all our measurements. A Poisson distribution with $\lambda = 1.07 \pm 0.04$ was the best fit to our results. Even though a binomial distribution with the number of subunits $n = 4, 5$ and 6 also fits the distribution, the associated probability p would have to be too low in each case (<0.26 ; see suppl. Table S1 for all results). As this is significantly lower than the EOL, a random number of subunits – as described by the Poisson distribution – seems to be the most likely interpretation.

With increasing concentration of toxin in the bilayer, a shift in the distribution can be observed with both toxin mutants F50C and P121C and independent of the lipid composition (Fig. 2A,B & Suppl. Fig. S1A,B). At the highest concentration used here, the number of monomers observed decreased and the distribution shifted steadily towards an increased number of tri- and tetramers and a low number of pentamers. Interestingly, a steep drop occurred between tetramers and pentamers and only twice hexamers were observed among a total of 9129 spots that were analyzed.

It appeared that the type of distribution observed with increasing concentration was shifting from a Poisson type to a binomial one (Fig. 3). At low concentration ($<$

0.81 $\mu\text{g/ml}$), the optimized p values for a binomial distribution of the number of labeled subunits per oligomer was still lower than 0.38 ± 0.03 . This value was significantly different than the EOL value, meaning that there was no defined stoichiometry at low toxin concentrations, and up to concentrations of 0.81 $\mu\text{g/ml}$ the distribution was most appropriately described by a Poisson distribution. In contrast, the histograms were best fitted by a binomial distribution at higher concentrations, at which the distributions significantly deviated from Poisson distributions (Fig. 3). This suggested that the toxins now assume a defined stoichiometry.

The high number of four photobleaching steps that we found in the histograms excludes a di- and trimeric stoichiometry. Intuitively, one would presume a tetrameric pore-forming entity, however, as we still find a low number of five subunits, tetra-, penta- or hexameric ($n = 4, 5$ and 6) structures would be possible models. Fitting the distributions to binomial distributions resulted in values of p , the probability of a subunit being detected, significantly lower than the EOL ($p < 0.5$) for $n = 5$ and 6 . This and the steep drop from four to five observed steps would argue against oligomers with more than four subunits.

To obtain a more objective measure whether the pore-forming entity is indeed tetrameric, we determined the statistical probability to obtain the experimentally observed number of pentamers assuming a pentameric distribution ($n = 5$). We did this by considering the values to be Poisson-distributed around the theoretically predicted value for a binomial distribution with $n = 5$ for the highest two concentrations 1.59 and 2.33 $\mu\text{g/ml}$ for all four experimental conditions (see suppl. Information). The probability p was either optimized by a binomial fit with $n = 5$ to all the distribution or calculated directly from the frequency of 4 bleaching steps. In both cases, the probability that the experimentally observed frequency of 5 steps originated from a pentameric binomial distribution with p was below 1%. Moreover, in each of the eight cases, the observed value was consistently at the lower end of the Poisson distribution and not spread evenly over the entire spectrum, as would be expected if they were stochastically distributed. We can thus conclude with a 99% certainty that the toxins form tetramers.

If the pore-forming entity of the toxins is tetrameric, the low number of 5 and 6 bleaching steps observed still remained to be explained (Fig. 2A,B). Theoretically two explanations are possible assuming a tetrameric distribution: (i) there was more than one tetramer present in the spots; and (ii) some tetramers contained more than four fluorophores. The first possibility, we can directly rule out again. With more than 50% of all spots showing 3 or 4 fluorophores, the probability of not finding any spots that contain 7 or 8 bleaching steps would be negligible. The second possibility, on the other hand, is consistent with the unspecific labeling rate for wildtype toxin. The ratio of specific to non-specific labeling was 0.76/0.06, meaning that approximately every 13th monomer had an extra fluorophore attached non-specifically. We fitted, therefore, the distributions obtained at concentrations 1.6 and 2.3 $\mu\text{g/ml}$ to a double binomial fit, where each monomer has a probability p and a different probability u of being labeled specifically and non-specifically, respectively. The distributions fitted the experimental data very well with $p = 0.64 \pm 0.04$ and $u = 0.04 \pm 0.03$. The low number of 5 and 6 photobleaching steps are thus explained by non-specific labeling to some of the monomers, and the observed histograms are consistent with a tetrameric pore-forming entity of Cry1Aa.

Concentration dependent evolution of Cry1Aa oligomerization

The shift of the distribution from a Poisson to a binomial distribution with increasing concentration of the toxin in the bilayer suggests that the stoichiometry is dependent on the toxin *availability*. While at high concentrations a tetrameric structure forms, at lower concentrations a more arbitrary stoichiometry exists. This raises the question as to which oligomerization state of the toxin intercalates into the membrane. It had, for instance, been suggested that – in the presence of receptors – a tetrameric pre-pore forms in solution, which then is inserted as such into the membrane (Gomez *et al.*, 2002), whereas other authors proposed that the monomers enter the membrane first (Schnepf *et al.*, 1998; Aronson *et al.*, 1999). To further investigate the evolution of the stoichiometry, we analyzed the development of the distribution as a function of toxin concentration.

Figure 4B shows the average number of bleaching steps $\langle n \rangle$, i.e. the population mean, found for increasing toxin concentrations in the incubation solution. As the distribution, and thus $\langle n \rangle$, varies with increasing concentrations, the oligomer composition in the membrane must also be different. If at lower concentrations the stoichiometry remained unchanged, identical distributions with lower absolute number of spots should have been observed. On the other hand, if the oligomerization were random, we would expect Poisson distributions for all concentrations and a linear dependence of $\langle n \rangle$ on the concentration. Thus, in contrast to our results, no saturation should be observed.

The *availability* of the toxins is given by two parameters; first by the concentration of the toxin in the solution, and second, by the ratio of toxins per unilamellar vesicle. Let us first consider the concentration of the toxin. The oligomerization of the Cry1Aa tetramer can be described by a kinetic model, where the association constant equals $K_a = \alpha/\beta$ [Cry1Aa], where α [Cry1Aa] is the association rate, β the dissociation rate and [Cry1Aa] the concentration of Cry1Aa in solution (Fig. 4A). In such a model, the number of oligomers consisting of n subunits is given by (see suppl. Information):

$$A_n = K_a^{n-1} A_1.$$

From this distribution, we can calculate the expected value $\langle n \rangle$ for the average number of bleaching steps (monomers; Fig. 4B; *blue curve*). $\langle n \rangle$ saturates at a value of 2.6 corresponding to a tetramer with a labeling probability of 0.65. This value corresponds well to the EOL of 0.76 for the cysteine mutants if we also consider a certain bleaching probability. We found an association constant $K_a = 3.34 \text{ mol}^{-1}$.

On the other hand, in order to obtain a sufficiently low number of toxins to be able to perform the subunit counting experiments, it was necessary to decrease the toxin concentration to a concentration that the number of toxin monomers and vesicles in the solution became comparable. We estimated the ratio between toxin monomers and vesicles (toxin/vesicle) assuming vesicle radii varying from 25 nm (small unilamellar vesicles (SUVs)) to ~500 nm (large unilamellar vesicles (LUVs)). In all cases, the ratio toxin/vesicle was close to or smaller than one at the low concentrations. For a typical radius of 200 nm, the ratio was 1.4. However, we can be certain that availability of the

monomers was not the limiting factor at the higher concentrations used considering that the ratio increased to 18.9 at a toxin concentration of 2.33 $\mu\text{g/ml}$. In a random distribution of toxins onto the available vesicles, tetramers may only form in those vesicles which contain at least four toxin molecules. However, if for instance five molecules were present in a specific vesicle, a tetramer may be formed, but a single monomer will remain. These “overhang” molecules will significantly influence the oligomerization and will also lead to a concentration dependence of $\langle n \rangle$. We fitted the observed evolution of $\langle n \rangle$ assuming a Poisson distribution of the available toxins onto the vesicles with an average vesicle radius of $r = 252.5 \text{ nm}$, a labeling probability of $p = 0.69$ assuming full tetramer formation ($K_a \gg 1$; Fig. 4B, *red curve*). The curve fits the data well indicating that also the distribution of monomers onto vesicles may explain the concentration dependence, in which case K_a does not need to be concentration dependent.

As both possibilities, a concentration dependent K_a and the vesicle/toxin ratio, would explain the evolution of $\langle n \rangle$, we cannot deduce whether oligomerization process itself is concentration dependent. However, the curve obtained in figure 4B indicates that not only tetramers are present in the bilayer but several oligomerization states coexist (monomers, dimers, trimers and tetramers). Formation of a pre-pore is thus not a prerequisite to membrane insertion but also monomers effectively enter the membrane. The maximal oligomerization state remains the tetramer.

The coexistence of different oligomers would explain the significant difference between the p value of the tetramer binomial fit and the EOL. If several oligomerization states coexist, the observed distribution will be a sum of binomial distributions (one for each oligomerization state). At high concentration, even if we are very close to the expected tetrameric binomial distribution, other states may still exist and, thus, shift the distribution at some extent to smaller probabilities p .

DISCUSSION

This study is the first direct demonstration of oligomerization, up to the tetrameric level, of Cry1A toxins. We used fluorescence spectroscopy based on the step-wise photobleaching principle in order to count the number of subunits present in Cry1Aa

toxin pores within a supported bilayer free of toxin receptors. The experiments demonstrated that the oligomerization involves not more than 4 subunits (Fig. 2). The results were not significantly affected neither by the lipid composition (POPE:POPC versus DPhPC) nor by the position of labeling (F50C versus P121C). They also showed that several oligomerization states coexist in the bilayer. The measurements were, nevertheless, limited by the highest concentration that can be used and still obtain a spatial separation between the toxin oligomers. Figures 2 and 4 confirm that the oligomerization saturates with four subunits, indicating that in the concentration range observed here the tetrameric structure is the final state suggesting it to be the pore-forming unit.

The existence of Bt toxin oligomers in receptor-free artificial membranes (planar lipid bilayers and liposomes) has been proposed for several Bt toxins, mainly as a result of the observation of subconducting states in planar lipid bilayer experiments (Slatin *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1993; Grochulski *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 1997a; Smedley *et al.*, 1997; Peyronnet *et al.*, 2001; Peyronnet *et al.*, 2002) and liposome permeabilization assays (Haider & Ellar, 1989; Gazit & Shai, 1995; Likitvivanavong *et al.*, 2006). Furthermore, a tetrameric configuration was suggested, based on the biophysical properties of the pores (Schwartz *et al.*, 1997a; Masson *et al.*, 1999). First direct evidence for a tetrameric pore came from atomic force microscopy measurements in supported lipid bilayers (Vie *et al.*, 2001; Puntheeranurak *et al.*, 2005; Laflamme *et al.*, 2008). In the AFM measurements, however, it was impossible to determine how many toxin molecules were involved in forming the four identical observed structures. In contrast, Cry4Ba toxin were observed by electron crystallography to form trimers in 2D crystals (Ounjai *et al.*, 2007) and a tetrameric arrangement of trimers was obtained by computational simulation of intermolecular interactions in sixteen Bt toxin homologous sequence (Torres *et al.*, 2008). In this study, we were able to directly show the tetrameric nature of the Cry1Aa-pores because each toxin monomer contained a single fluorophore such that the number of fluorescent steps recorded corresponded to the number of toxin molecules that formed an individual pore.

Studies on cell and membrane vesicle permeabilization (Martin & Wolfersberger, 1995; Knowles & Ellar, 1987; Carroll & Ellar, 1993; Carroll & Ellar, 1997; Villalon *et al.*, 1998), AFM measurements (Vie *et al.*, 2001) and planar lipid bilayer data (Peyronnet *et al.*, 2002) provided an estimate of Bt toxin pore diameter ranging between 15 and 26 Å. The pores' maximum conductance in 150 mM KCl is 250-450 pS (Groulx *et al.*, 2010; Peyronnet *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 1993). These observations are consistent with a tetrameric structure for Bt pores when comparing them with potassium channels, whose tetrameric pore is also comprised of 8 α -helices. Their central pore sizes up to 12 Å in diameter away from the 2-4 Å-wide selectivity filter and shows conductances up to 250 pS in physiological conditions (Latorre *et al.*, 1982).

Whether the process of Bt toxin oligomerization occurs before membrane insertion or takes place within the membrane, was still unresolved. Data on toxin aggregation or oligomerization in solution, i.e., before it partitions into the membrane, is scarce and variable ranging from monomers to oligomers with 8 to 10 subunits (Feng & Becktel, 1994; Walters *et al.*, 1994; Guereca & Bravo, 1999; Masson *et al.*, 2002). It was suggested that the toxin assembles into stable oligomer barrels (pre-pores) before inserting into the bilayer (Gomez *et al.*, 2002) but also that monomers insert into the bilayer first and, subsequently, diffuse laterally in the membrane to associate into multimers to form pores (Aronson & Shai, 2001; Haider & Ellar, 1989; Tigue *et al.*, 2001). In the present study, we established that the oligomerization process may be described by a kinetic model as shown in figure 4A. Nevertheless, we could not distinguish whether the oligomerization occurs in the membrane or in solution before insertion since both possibilities are consistent with our data. However, the concentration-dependent distributions, observed here, make evident that the toxins can enter the membrane in their monomeric state because a large number of monomers were observed at low concentrations. Thus, we showed that oligomeric pre-pore formation is not a necessary step in the mode of action of Bt toxins, as suggested previously (Aronson *et al.*, 1999; Tigue *et al.*, 2001).

We favor the possibility that the oligomerization process occurs within the membrane since the structure of the toxin changes after intercalation into the membrane (Groulx *et*

al., 2010; Nair & Dean, 2008; Tomimoto *et al.*, 2006; Alzate *et al.*, 2009). Our previous study showed that pore formation occurred after the insertion of the toxin into the bilayer and with a temporal delay between the observed necessary conformational change and pore formation (Groulx *et al.*, 2010). The delay would be consistent with a lateral diffusion of the monomers in order to assemble to tetramers. Also in AFM studies, a time-dependent increase of the size of the observed structures was described resulting in a final size of 350 Å for the entire complex (Laflamme *et al.*, 2008).

Numerous studies have attempted to assess the role of toxin receptors in oligomerization, either before insertion into the membrane, in terms of pre-pore formation, or within the membrane, in terms of pore formation by toxin monomers (Bravo *et al.*, 2011). While in our system no receptors were present, the fact that the pores have identical properties whether they were mediated by receptors or intercalated into the membrane autonomously suggests that a similar pore architecture prevails.

In conclusion, we found – using single subunit counting – that Cry1Aa of *B. thuringiensis* enter the membrane in monomeric form and that it assembles to tetrameric pores in the lipid bilayer. The single subunit counting technique utilized for the analysis was different from previous studies where integral membrane proteins with a fixed stoichiometry were investigated (Ulbrich & Isacoff, 2007; Blunck *et al.*, 2008; Tombola *et al.*, 2008; Simonson *et al.*, 2010). The highly dynamic nature of the oligomerization process and presence of a mixture of oligomeric states required the employment of advanced stochastic analysis of histograms and a high number of spots had to be analyzed in order to statistically distinguish between different models. We expect that studying oligomerization using single molecule fluorescence will help understand this highly dynamic protein-protein interaction for a number of similar proteins.

Acknowledgements

We would like to thank Marc Juteau and Mireille Marsolais for technical assistance, Luke Masson for providing the Cry1Aa-pMP39, -pBA1 and some of the cysteine mutants and Georges A. Haddad for comments on the manuscript. The project was

funded by NSERC (327201DG to R.B. and 171373DG to J-L.S. and R.L.), CRC (202965 to R.B.), CFI (202965 to R.B.) and by GÉPROM. N.G. and H.M. held student fellowships by FQRNT. The research group GÉPROM and the research center SÈVE are funded by FRSQ and FQRNT, respectively.

Reference List

1. Alouf, J. E. and Popoff, M. R. (2006) *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*, 3rd Ed., Elsevier, Amsterdam, Netherlands
2. Schnepf, E., Crickmore, N., Van, R. J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., and Dean, D. H. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 775-806
3. Höfte, H. and Whiteley, H. R. (1989) *Microbiol. Rev.* **53**, 242-255
4. Pigott, C. R. and Ellar, D. J. (2007) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 255-281
5. Knowles, B. H. (1994) *Adv. Insect Physiol.* **24**, 275-308
6. Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., and Soberón, M. (2011) *Insect Biochem. Mol. Biol.* **41**, 423-431
7. Peyronnet, O., Vachon, V., Schwartz, J. L., and Laprade, R. (2001) *J. Membr. Biol.* **184**, 45-54
8. Groulx, N., Juteau, M., and Blunck, R. (2010) *J. Gen. Physiol.* **136**, 497-513
9. Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J. L., Brousseau, R., and Cygler, M. (1995) *J. Mol. Biol.* **254**, 447-464
10. Aronson, A. I., Wu, D., and Zhang, C. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 4059-4065
11. Lee, M. K., Young, B. A., and Dean, D. H. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 306-312
12. Walters, F. S., Slatin, S. L., Kulesza, C. A., and English, L. H. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 921-926
13. Schwartz, J. L. and Laprade, R. (2000) Membrane permeabilisation by *Bacillus thuringiensis* toxins: protein insertion and pore formation. In Charles, J., ., Delécluse, A., and Nielsen-Leroux, C., editors. *Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application*, Kluwer Associate Publishing, Norwell, MA, USA

14. Masson, L., Tabashnik, B. E., Liu, Y. B., Brousseau, R., and Schwartz, J. L. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 31996-32000
15. Girard, F., Vachon, V., Lebel, G., Préfontaine, G., Schwartz, J. L., Masson, L., and Laprade, R. (2009) *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 575-580
16. Girard, F., Vachon, V., Préfontaine, G., Marceau, L., Schwartz, J. L., Masson, L., and Laprade, R. (2009) *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 359-365
17. Walters, F. S., Kulesza, C. A., phillips, A. T., and English, L. H. (1994) *Insect Biochem. Mol. Biol.* **24**, 963-968
18. Guereca, L. and Bravo, A. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1429**, 342-350
19. Masson, L., Mazza, A., Sangadala, S., Adang, M. J., and Brousseau, R. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1594**, 266-275
20. Slatin, S. L., Abrams, C. K., and English, L. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**, 765-772
21. Schwartz, J. L., Garneau, L., Savaria, D., Masson, L., Brousseau, R., and Rousseau, E. (1993) *J. Membr. Biol.* **132**, 53-62
22. English, L., Robbins, H. L., Von Tersch, M. A., Kulesza, C. A., Ave, D., Coyle, D., Jany, C. S., and Slatin, S. L. (1994) *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **24**, 1025-1035
23. Lorence, A., Darszon, A., Diaz, C., Lievano, A., Quintero, R., and Bravo, A. (1995) *FEBS Lett.* **360**, 217-222
24. Smedley, D. P., Armstrong, G., and Ellar, D. J. (1997) *Mol. Membr. Biol.* **14**, 13-18
25. Peyronnet, O., Nieman, B., Genereux, F., Vachon, V., Laprade, R., and Schwartz, J. L. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1567**, 113-122
26. Carroll, J. and Ellar, D. J. (1997) *Eur. J. Biochem.* **245**, 797-804
27. Likitvivatanavong, S., Katzenmeier, G., and Angsuthanasombat, C. (2006) *Arch. Biochem. Biophys.* **445**, 46-55
28. Vie, V., Van, M. N., Pomarede, P., Dance, C., Schwartz, J. L., Laprade, R., Frutos, R., Rang, C., Masson, L., Heitz, F., and Le, G. C. (2001) *J. Membr. Biol.* **180**, 195-203

29. Laflamme, E., Badia, A., Lafleur, M., Schwartz, J. L., and Laprade, R. (2008) *J. Membr. Biol.* **222**, 127-139
30. Puntheeranurak, T., Stroh, C., Zhu, R., Angsuthanasombat, C., and Hinterdorfer, P. (2005) *Ultramicroscopy* **105**, 115-124
31. Ounjai, P., Unger, V. M., Sigworth, F. J., and Angsuthanasombat, C. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **361**, 890-895
32. Schwartz, J. L., Lu, Y. J., Sohnlein, P., Brousseau, R., Laprade, R., Masson, L., and Adang, M. J. (1997) *FEBS Lett.* **412**, 270-276
33. Ulbrich, M. H. and Isacoff, E. Y. (2007) *Nat. Methods* **4**, 319-321
34. Das, S. K., Darshi, M., Cheley, S., Wallace, M. I., and Bayley, H. (2007) *Chembiochem.* **8**, 994-999
35. Blunck, R., McGuire, H., Hyde, H. C., and Bezanilla, F. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 20263-20268
36. Tombola, F., Ulbrich, M. H., and Isacoff, E. Y. (2008) *Neuron* **58**, 546-556
37. Simonson, P. D., Deberg, H. A., Ge, P., Alexander, J. K., Jeyifous, O., Green, W. N., and Selvin, P. R. (2010) *Biophys. J.* **99**, L81-L83
38. Masson, L., Prefontaine, G., Peloquin, L., Lau, P. C., and Brousseau, R. (1990) *Biochem. J.* **269**, 507-512
39. van, F. K., Gringorten, J. L., Milne, R. E., Gauthier, D., Pusztai, M., Brousseau, R., and Masson, L. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1650-1655
40. Ding, H., Wong, P. T., Lee, E. L., Gafni, A., and Steel, D. G. (2009) *Biophys. J.* **97**, 912-921
41. Lenn, T., Gkekas, C. N., Bernard, L., Engl, C., Jovanovic, G., Buck, M., and Ying, L. Y. (2011) *Chemical Communications* **47**, 400-402
42. Garcia, H. G., Lee, H. J., Boedicker, J. Q., and Phillips, R. (2011) *Biophysical Journal* **101**, 535-544
43. Gomez, I., Sanchez, J., Miranda, R., Bravo, A., and Soberon, M. (2002) *FEBS Lett.* **513**, 242-246
44. Aronson, A. I., Geng, C., and Wu, L. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2503-2507

45. Schwartz, J. L., Juteau, M., Grochulski, P., Cygler, M., Prefontaine, G., Brousseau, R., and Masson, L. (1997) *FEBS Lett.* **410**, 397-402
46. Haider, M. Z. and Ellar, D. J. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **978**, 216-222
47. Gazit, E. and Shai, Y. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 2571-2578
48. Torres, J., Lin, X., and Boonserm, P. (2008) *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 392-397
49. Martin, F. G. and Wolfersberger, M. G. (1995) *J. Exp. Biol.* **198**, 91-96
50. Knowles, B. H. and Ellar, D. J. (1987) *Biochim. Biophys.* **924**, 509-518
51. Carroll, J. and Ellar, D. J. (1993) *Eur. J. Biochem.* **214**, 771-778

Figure Legends

Figure 1 – Single toxin detection using fluorescence

(a) Domains of Bt toxin Cry1Aa according to crystal structure (23). (b) Setup for photobleaching experiments with supported bilayers: a 532nm laser excites fluorophores present in supported bilayers formed on a glass coverslip. A high numerical aperture objective collects the emitted light and directs it to an EMCCD camera. (c) Dispersion of fluorescent spots at incubation concentrations 0.17 $\mu\text{g/ml}$ (*left*), 1.21 $\mu\text{g/ml}$ (*center*) and 2.33 $\mu\text{g/ml}$ (*right*). (b) For each spot the fluorescence time trace was determined and the number of photobleaching steps counted (*arrows*).

Figure 2 – Experimental distributions of photobleaching steps

Distribution of (a) F50C and (b) P121C bleaching steps in DPhPC vesicles containing variable toxin concentrations incubated overnight. The numbers under the columns indicate the number of steps observed, N marks the number of spots analyzed for each concentration.

Figure 3 -- Binomial Distributions

Distribution of F50C oligomers in DPhPC vesicles at 0.17 $\mu\text{g/ml}$ (*left*) and 2.33 $\mu\text{g/ml}$ (*right*) of toxin incubated overnight fitted with a Poisson distribution (*top*) and a binomial distribution with $n = 4, 5$ and 6 (*bottom*).

Figure 4 – Theoretical model

(a) Kinetic model explaining the stepwise oligomerization process of the toxin. The forward rate is concentration dependent. (b) Fit of the population mean values of the number of bleaching steps fitted with the model in (a) (*blue*) and dependent on the vesicle/toxin ratio (*red*).

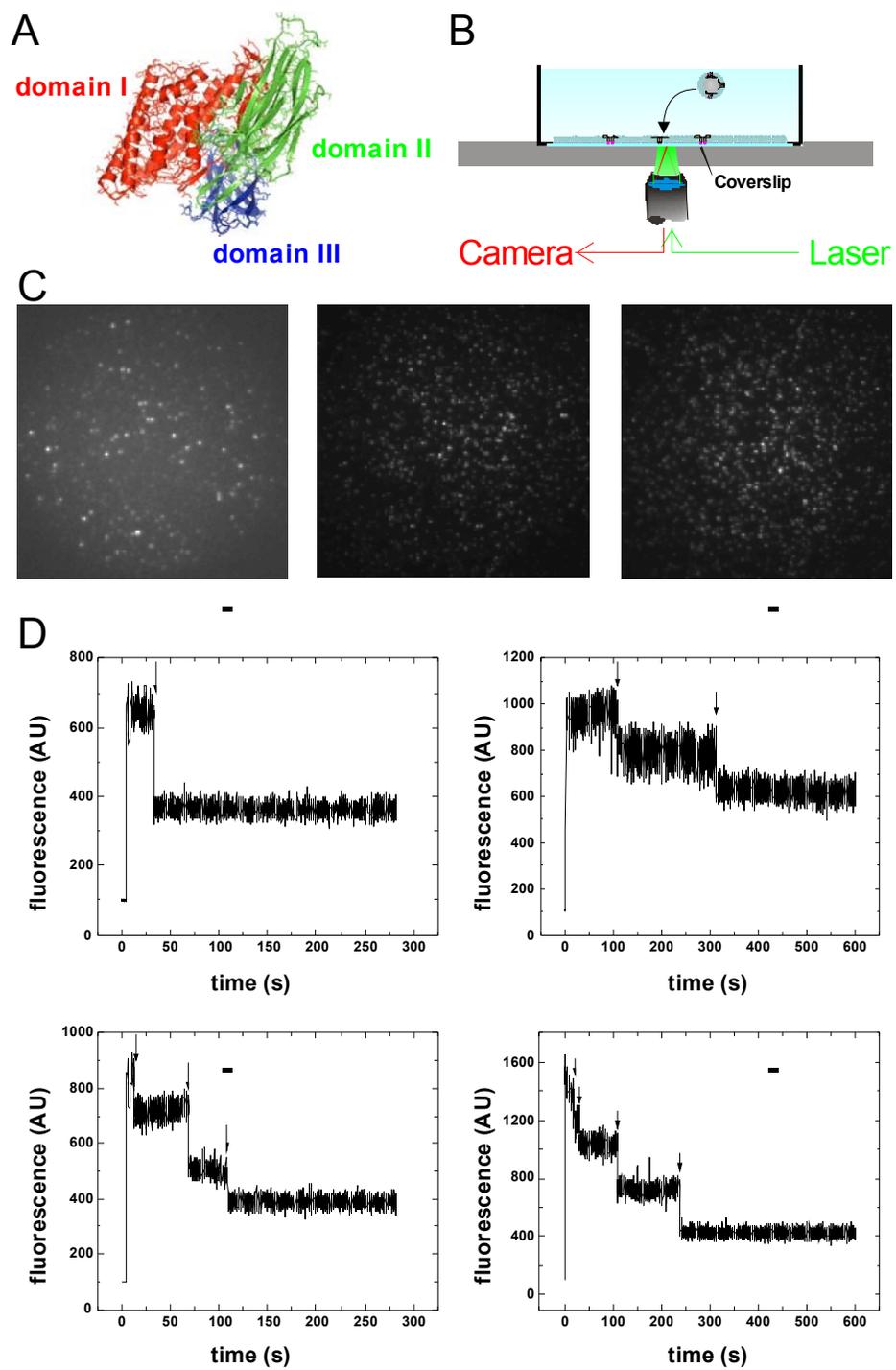
Supplementary figure 1 - Experimental distributions in POPE-POPC

Distribution of (a) F50C and (b) P121C bleaching steps in POPE-POPC vesicles containing variable toxin concentrations incubated overnight. The numbers under the columns indicate the number of steps observed, N marks the number of spots analyzed for each concentration.

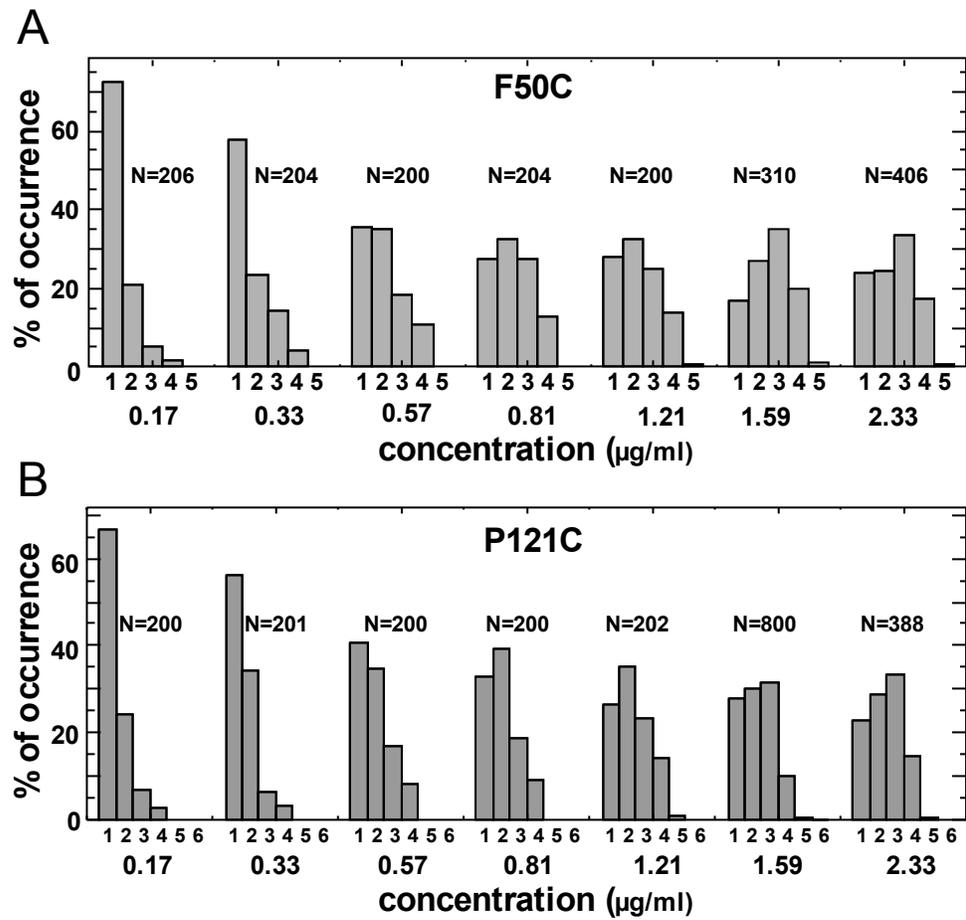
Supplementary figure 2 – Poisson Probability Density Function

$\langle x \rangle$ depicts the value for the occurrence of pentamers, which is theoretically to be expected according to a binomial fit to the observed data. x is the experimentally observed number of pentamers. The curve gives the probability to observe x pentamers. For all experimental conditions, x was found in the lower tail of the Poisson distribution.

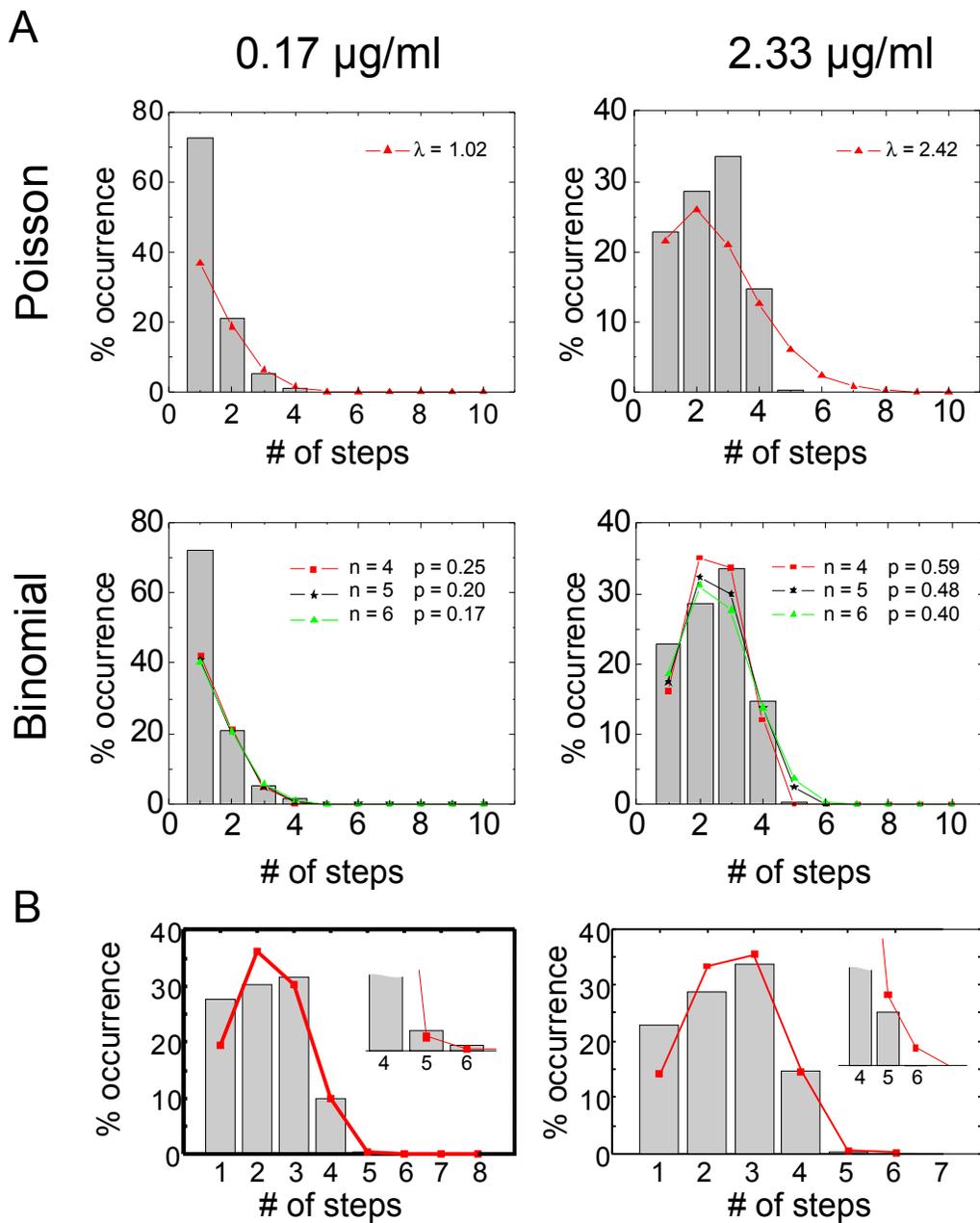
Groulx et al. - Fig. 1



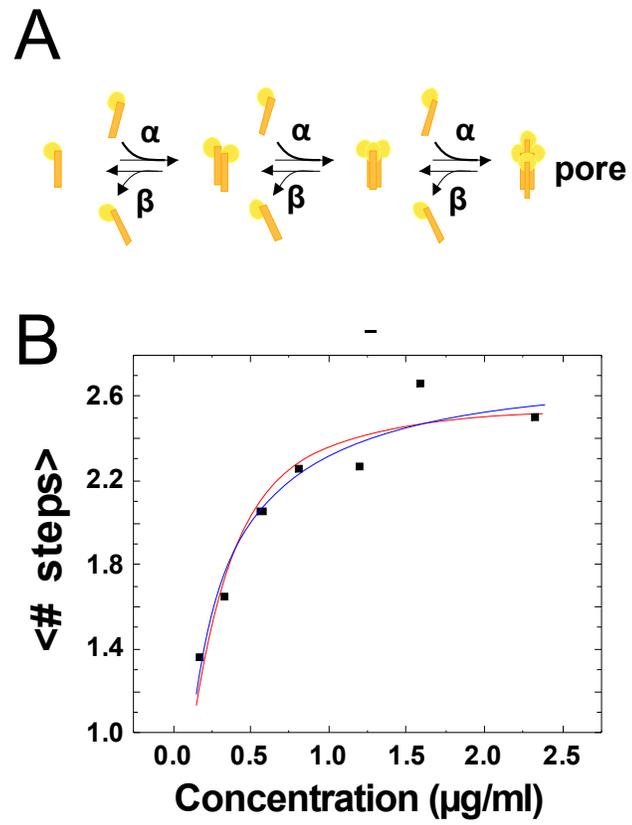
Groulx et al. - Fig. 2



Groulx et al. - Fig. 3

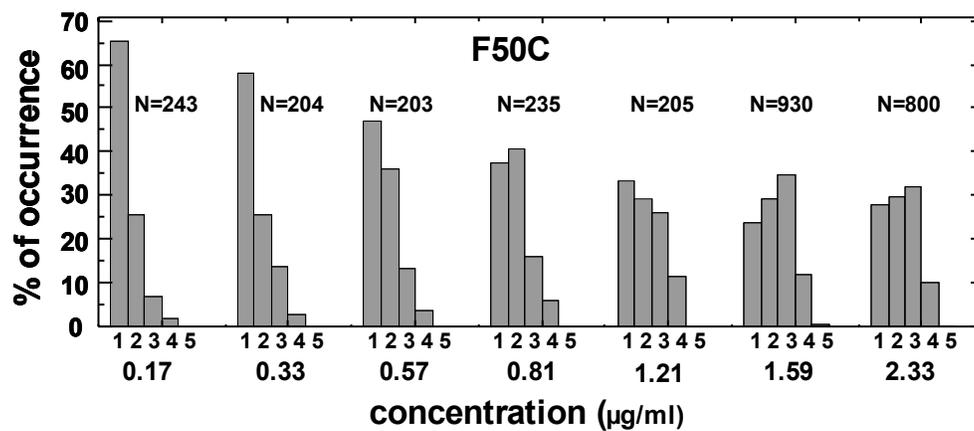


Groulx et al. - Fig. 4

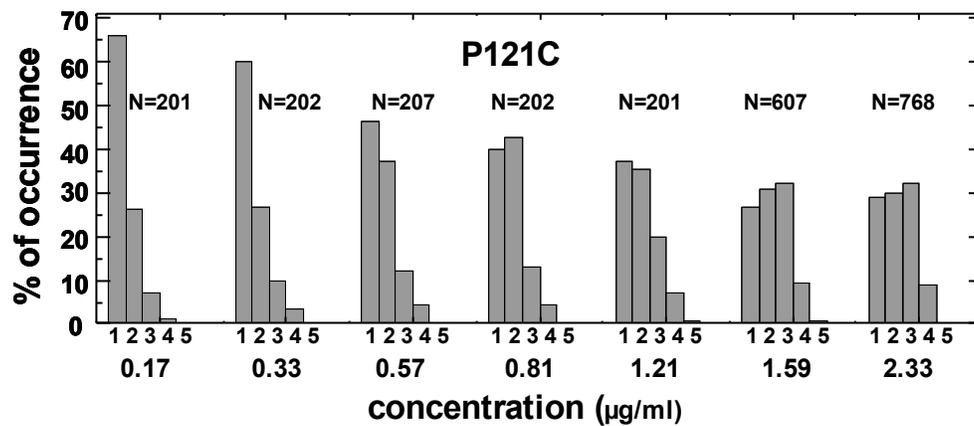


Supplementary figure 1

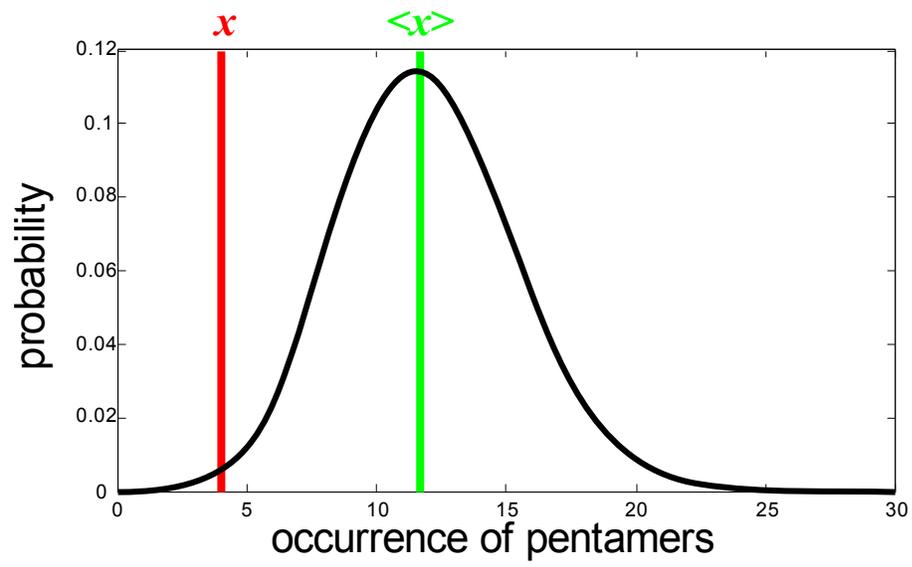
A



B



Supplementary figure 2



Supplementary Material I

Derivation of oligomer distribution

According to the model in figure 4A, an oligomer consisting of n monomers is given by

$$A_n = (K_a)^{n-1} A_1 = \left(\frac{\alpha'}{\beta}\right)^{n-1} A_1$$

with $\alpha' = \alpha$ [Cry1Aa]. The above statement is equivalent to the equation

$$A_n = K_a A_{n-1} = \frac{\alpha'}{\beta} A_{n-1}$$

This can be shown for A_2 from the differential equation describing the temporal evolution of A_1 :

$$\frac{d}{dt} A_1 = -\alpha' A_1 + \beta A_2,$$

and in equilibrium

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} A_1 &= 0 \\ \Rightarrow A_2 &= \frac{\alpha'}{\beta} A_1 \end{aligned}$$

We will show that this is true for A_{n+1} under the assumption that it is true for A_n .

$$\frac{d}{dt} A_n = \alpha' A_{n-1} - (\alpha' + \beta) A_n + \beta A_{n+1}$$

with

$$A_{n-1} = \frac{\beta}{\alpha'} A_n$$

follows

$$\frac{d}{dt} A_n = \beta A_n - (\alpha' + \beta) A_n + \beta A_{n+1}$$

which should equal zero in equilibrium, thus

$$A_{n+1} = \frac{\alpha'}{\beta} A_n$$

As it is true for A_2 , it is thus iteratively true for all A_n .

Calculation of the probability to observe x pentamers in an ensemble of N measurements.

The probability p for the binomial distribution with $n = 5$ is determined by fitting the histogram directly or by calculation from the number of tetramers as this would be least contaminated by lower order oligomers. For both p , the number of expected pentamers $\langle x \rangle$ was calculated using

$$\langle x \rangle = N p^5,$$

where N is the number of total spots analyzed (the number of invisible spots with no label is negligible for the higher concentrations).

The probability $prob(x)$ to observe exactly x pentamers in an ensemble of N measurements assuming a pentameric stoichiometry with labeling probability p is:

$$prob(x) = \frac{\langle x \rangle^x}{x!} \exp(-\langle x \rangle) = \frac{(Np^5)^x}{x!} \exp(-Np^5)$$

Supplementary table

P121C											
			occurrence (%)								
lipids	Concentration (µg/ml)	N	1	2	3	4	5	6	P4	P5	λ
DPhPC	0.17	200	66.50	24.00	7.00	2.50	0.00	0.00	0.26	0.21	1.07
DPhPC	0.33	201	56.22	34.33	6.47	2.99	0.00	0.00	0.31	0.25	1.23
DPhPC	0.57	200	40.50	34.50	17.00	8.00	0.00	0.00	0.39	0.32	1.61
DPhPC	0.81	200	33.00	39.50	18.50	9.00	0.00	0.00	0.44	0.36	1.84
DPhPC	1.21	202	26.73	35.15	23.27	13.86	0.99	0.00	0.50	0.41	2.15
DPhPC	1.59	800	27.70	30.19	31.55	9.94	0.50	0.12	0.53	0.43	2.19
DPhPC	2.33	388	22.94	28.61	33.51	14.69	0.26	0.00	0.59	0.48	2.42
POPC-POPE	0.17	201	65.67	26.37	6.97	1.00	0.00	0.00	0.27	0.22	1.10
POPC-POPE	0.33	202	59.90	26.73	9.90	3.47	0.00	0.00	0.28	0.23	1.16
POPC-POPE	0.57	207	46.38	37.20	12.08	4.35	0.00	0.00	0.35	0.28	1.43
POPC-POPE	0.81	202	40.10	42.57	12.87	4.46	0.00	0.00	0.39	0.32	1.58
POPC-POPE	1.21	201	37.31	35.32	19.90	6.97	0.50	0.00	0.42	0.34	1.72
POPC-POPE	1.59	607	26.85	30.64	32.29	9.56	0.49	0.16	0.54	0.44	2.21
POPC-POPE	2.33	768	28.78	29.95	31.90	8.98	0.39	0.00	0.53	0.43	2.15
F50C											
DPhPC	0.17	206	72.33	20.87	5.34	1.46	0.00	0.00	0.25	0.20	1.02
DPhPC	0.33	204	57.84	23.53	14.22	4.41	0.00	0.00	0.28	0.23	1.18
DPhPC	0.57	200	35.50	35.00	18.50	11.00	0.00	0.00	0.42	0.35	1.79
DPhPC	0.81	204	27.45	32.35	27.45	12.75	0.00	0.00	0.52	0.42	2.17
DPhPC	1.21	200	28.00	32.50	25.00	14.00	0.50	0.00	0.51	0.42	2.14
DPhPC	1.59	310	16.77	27.10	35.16	20.00	0.97	0.00	0.65	0.53	2.70
DPhPC	2.33	406	24.14	24.63	33.25	17.24	0.74	0.00	0.60	0.49	2.48
POPC-POPE	0.17	243	65.43	25.51	7.00	2.06	0.00	0.00	0.27	0.22	1.09
POPC-POPE	0.33	204	57.84	25.49	13.73	2.94	0.00	0.00	0.29	0.23	1.19
POPC-POPE	0.57	203	46.80	35.96	13.30	3.94	0.00	0.00	0.35	0.28	1.43
POPC-POPE	0.81	235	37.45	40.43	16.17	5.96	0.00	0.00	0.41	0.33	1.68
POPC-POPE	1.21	205	33.17	29.21	26.24	11.39	0.00	0.00	0.47	0.39	1.98
POPC-POPE	1.59	930	23.59	29.35	34.47	12.06	0.53	0.00	0.58	0.47	2.37
POPC-POPE	2.33	800	28.00	29.50	32.13	10.13	0.25	0.00	0.53	0.43	2.19

Table 1- Summary of the results

Table showing the summary of the distributions for F50C and P121C for both lipid compositions. N gives the number of experiments, P4 and P5 the probabilities p for a binomial distribution with $n = 4$ and 5 , respectively. λ is the fit parameter for Poisson distributions to each condition.

3.3. Résultats sur le « gating » de la colicine 1a

3.3.1.. Les caractéristiques électriques des pores

L'ouverture des pores formés par la colicine 1a est sensible au potentiel membranaire. Si le côté cis de la membrane est mis à la masse, un potentiel membranaire plus négatif que le potentiel de repos est nécessaire pour voir le courant ionique provenant des pores. Pour faciliter la terminologie, nous appellerons hyperpolarisation ces pulses imposés pour ouvrir ces pores.

Typiquement, on peut imposer un potentiel de repos de 10 à 50 mV et un changement de potentiel allant de -50 à -100mV pour obtenir une bonne ouverture du canal. Le courant électrique sera caractérisé par une augmentation rapide au début, puis à une augmentation plus lente, linéaire par après. Pour toute variation de potentiel supérieure à -10mV, le canal restera fermé.

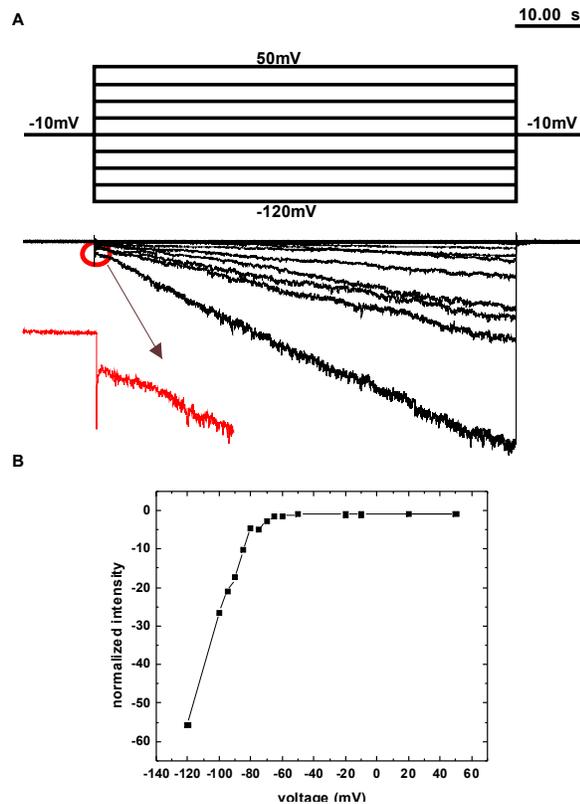


Figure 3.1. : A) tracés de courant produits par la colicine 1a à différents voltages. La trace rouge montre la phase rapide au début B) courbe courant/voltage caractéristique de la colicine 1a. Pour ces expériences $n=3$

La figure 3.1. montre une série de courants de la colicine 1a en présence de concentrations symétriques de solutions ioniques dans les deux chambres. La courbe I/V n'est pas linéaire. À potentiels plus négatifs que le potentiel de repos, le canal s'ouvre et dès que le potentiel imposé atteint environ -50 mV le canal se referme et reste fermé quelle que soit la dépolarisation imposée à la bicouche lipidique.

3.3.2. La mutation S402C

Le résidu S402 est positionnée proche du centre de l'hélice $\alpha 1$ et est supposé demeurer du côté *cis* quel que soit le potentiel membranaire imposé (Qiu *et al.*, 1996).

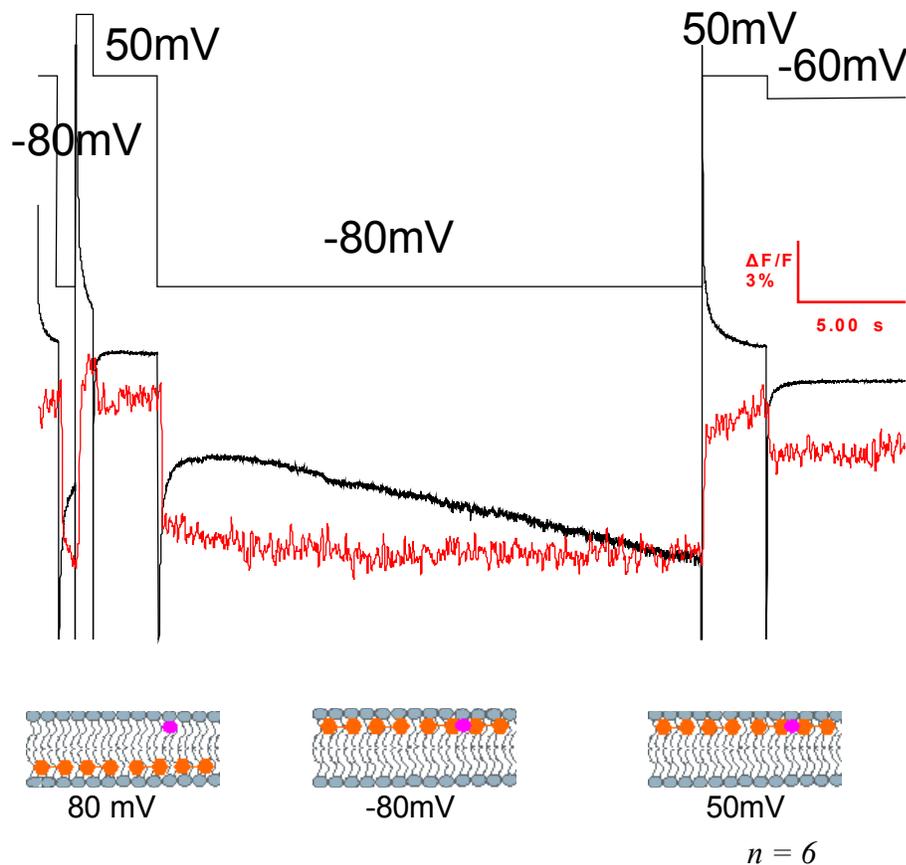


Figure 3.2. : tracés de courant (noir) et de fluorescence (rouge) caractérisant S402C lors d'une expérience de FRET avec le DPA (boule orange) comme donneur et le TMRM (boule magenta) comme accepteur lié à une cystéine. La variation initiale de la fluorescence représente le mouvement du DPA et la variation secondaire représente la variation de la position de la cystéine marquée (voir figure 1.21 et sections 1.5 et 2.2 pour les détails des expériences et des positions du marquage). n représente 6 expériences similaires.

Comme le montre la figure 3.2., les pores produits par la colicine ont développé plus de 4.3 ± 2.6 nA de courant lorsque le potentiel membranaire a été porté à -80 mV (trace en noir). De plus, le $\Delta F/F$, soit les variations de fluorescence (trace rouge) entre le niveau de base à 50 mV et la fluorescence enregistrée à -80 mV ($4.8 \pm 2.8\%$), indique clairement que cette position est demeurée immobile du côté *cis* pendant le processus, soit toujours immobile du côté *cis*.

3.3.3. Les mutations K511C et K524C

La position K511 se trouve sur la boucle reliant $\alpha 3$ - $\alpha 4$, et la position K524 sur la boucle reliant $\alpha 4$ - $\alpha 5$ (voir figure 3.3.). Ces positions sont supposées traverser totalement la membrane lipidique pour se retrouver de l'autre côté lorsque le pore s'ouvre (Slatin *et al.*, 1994; Qiu *et al.*, 1996). On veut vérifier si effectivement ce mouvement a lieu et s'il est possible de le caractériser grâce au FRET.

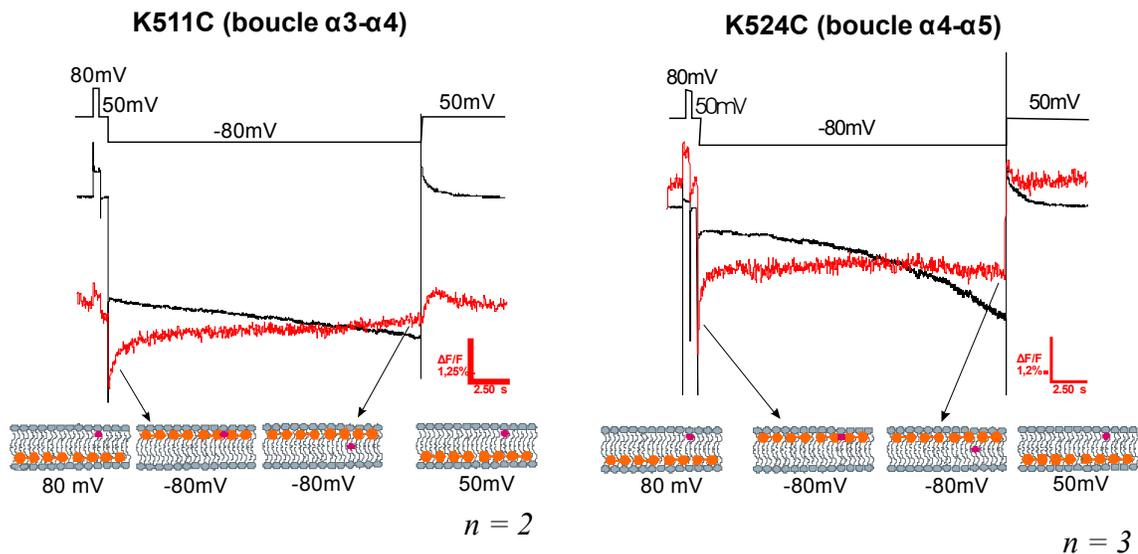


Figure 3.3. : tracés de courant (noir) et de fluorescence (rouge) caractérisant K511C et K524C dans des expériences de FRET.

Les traces de fluorescence (rouge) montrent que tant qu'il n'y a pas d'ouverture de canal, les deux positions se maintiennent du côté *cis*. Les plus longs changements de potentiel (-80 mV, 20 s) ont permis le développement du courant, soit environ 5 ± 1 nA pour K511C et environ 5 ± 1 nA pour K524C. La figure 3.3. permet l'observation des traces de fluorescence différentes entre ces deux mutants et celle produite par la

mutation S402C. Contrairement à ce qui a été observé à la figure 3.2., une situation de transition de fluorescence apparaît en début de l'ouverture des pores. Les mesures de fluorescence caractérisant l'ouverture et la fermeture des pores semblent suivre une cinétique exponentielle. Les constantes de temps de fluorescence caractérisant l'ouverture des canaux sont 192 ± 156 ms, 73 ± 43 ms pour la cinétique rapide et $1,65 \pm 0,07$ s, $2,5 \pm 1,5$ s pour la cinétique lente, respectivement pour K511C et K524C. La fermeture des canaux est caractérisée par des constantes de temps de 368 ms et de 140 ± 111 ms pour la cinétique rapide, et de 1,32 s, $0,44 \pm 0,52$ s pour la cinétique lente, respectivement pour K511C et K524C. Les changements surviennent surtout au début de l'augmentation du courant, alors les mêmes expériences ont été tentées avec des pulses plus courts (500 ms).

3.3.4. Court changement de potentiel membranaire

Les figures 3.2. et 3.3. montrent que les variations de fluorescence surviennent lors de l'ouverture des pores se produisent rapidement au début du pulse imposé aux extrémités de la bicouche lipidique. Les mêmes tests que précédemment furent reproduits, mais durant des périodes de pulsation plus courtes, pour ainsi éliminer la composante lente du courant et de la fluorescence pour améliorer la précision temporelle des mesures.

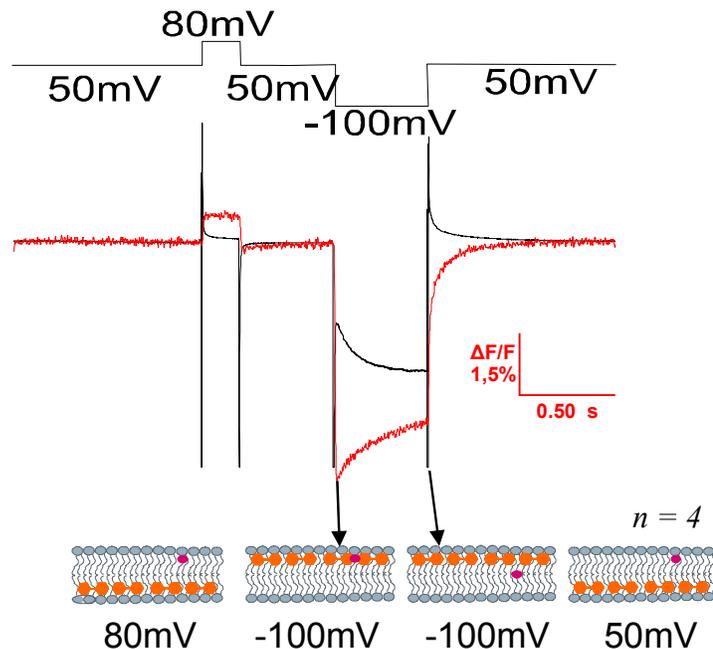


Figure 3.4. : tracés de courant (en noir) et de fluorescence (en rouge) mesurés par la mutation K511C lors d'un pulse de 500 ms durant les expériences de FRET.

Lors de pulses plus courts (500 ms), un comportement similaire fut observé à celui produit lors d'un temps plus long au début de l'augmentation du courant (voir figure 3.3.). Le courant produit par la colicine Ia augmente pour atteindre en moyenne 8 ± 7 nA pour des variations de fluorescence valant environ $4 \pm 3\%$, et indiquant que la fluorescence provient du côté *cis*.

	Ouverture		Fermeture	
	Fluorescence (ms)	Courant (ms)	Fluorescence (ms)	Courant (ms)
K511C	46 ± 7	33 ± 30	30 ± 8	30 ± 36

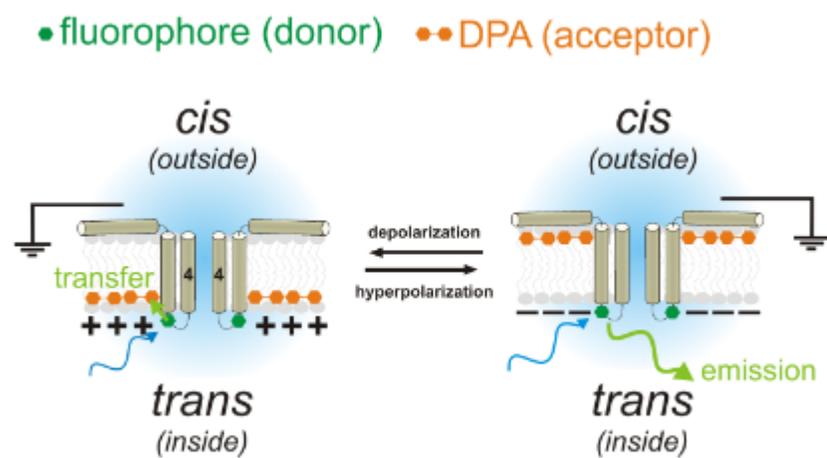
Tableau 3.1. : comparaison des constantes de temps de courant et de fluorescence durant l'ouverture et la fermeture des canaux pour un temps de 500 ms. Ce tableau est le résultat de 4 expériences similaires.

On peut remarquer que les valeurs de constantes de temps caractérisant la fluorescence et le courant sont assez semblables selon le tableau 3.1. Cela suggère que dans la phase rapide, où la grande majorité du mouvement peut être observé, l'ouverture du pore est très similaire à la fermeture.

Enfin, un déplacement partiel de la position a été observé. En effet, tout comme dans le cas des pulses plus longs, les variations de fluorescence ont permis d'observer que la position s'est déplacée vers le côté *trans*, sans toutefois l'atteindre. Il semble que ce processus se fasse en deux étapes, soit une étape rapide et une étape lente. L'étape rapide est représentée par une augmentation de courant qui se produit en même temps qu'un grand signal de fluorescence dans la bicouche lipidique, indiquant que ces positions bougent durant l'ouverture du pore. La fluorescence et le courant semblent également être en phase lors de la fermeture du pore. La phase lente semble apporter plus de désordre dans la phase rapide. On peut le voir avec les longues pulsations, où les ratios temporels des cinétiques rapides ne sont pas proches de l'unité. Le modèle du parapluie semble s'appliquer partiellement à la situation de l'ouverture en ce sens que les positions sont stables du côté *cis* quand le pore est fermé. Durant l'ouverture les positions K511C et K524C devraient atteindre l'extrémité opposé de la bicouche lipidique (Qiu *et al.*, 1996), mais nos résultats suggèrent que celles-ci bougent en direction du côté *trans*,

mais sans l'atteindre, ce qui ne correspond pas tout à fait au modèle du parapluie (Lahey *et al.*, 1991; Slatin *et al.*, 1994).

DISCUSSION



La dynamique de perméabilisation et d'oligomérisation des toxines à la surface des bicouches lipidiques sont des phénomènes difficilement observables. À cause des limitations qu'apportent les techniques d'études usuelles (voir section 1.4), une grande quantité d'informations sur la position des différentes régions de la toxine avant et après la formation du pore est perdue. La technique de double FRET apporte notamment des précisions importantes sur la localisation de différents segments de la toxine par rapport à l'épaisseur de la membrane, ce qui permet d'élaborer de nouvelles théories sur le comportement de la toxine (voir modèle du parapluie inversé, article 1). Les résultats sur la colicine 1a nous ont permis entre autre de visualiser la dynamique de « gating » des positions mobiles, ce qui n'a jamais été fait auparavant.

La technique de photoblanchiment utilisée dans l'article 2 permet entre autre de vérifier directement un comportement caractéristique de l'activité cytolitique de la toxine Cry1Aa : son oligomérisation se produit à la surface membranaire avant la formation du pore. Elle a aussi permis de visualiser comment l'oligomérisation s'organise en oligomère comprenant un maximum de 4 sous-unités, prouvant ainsi une hypothèse qui ne fait pas l'unanimité entre les groupes qui étudient cette toxine (voir section 1.2.4).

Cette discussion va commencer par revenir brièvement sur les résultats de chaque section importante étudiée dans cette thèse, soit la topologie du domaine formeur de pore de la Cry1Aa grâce aux techniques combinées de FRET/électrophysiologie; la dynamique d'oligomérisation de la Cry1Aa grâce au photoblanchiment et enfin la dynamique de « gating » de la colicine 1a grâce au FRET/électrophysiologie. Par la suite, ces résultats seront discutés dans le cadre des autres études comparables dans le domaine des toxines formeuses de pores. Enfin, une discussion plus détaillée sur les avantages et limitations des techniques sera proposée.

4.1. Discussion sur la Cry1Aa

4.1.1. Le simple FRET révèle une internalisation de la toxine

Afin de pouvoir étudier les mécanismes moléculaires de formation des pores produits par la toxine Cry1Aa du bacille de Thuringe, nous avons utilisé une technique de fluorescence par FRET avec un accepteur non fluorescent (DPA) localisé dans la

bicouche lipidique et un fluorophore donneur (TMRM) positionné sur les boucles reliant les hélices α composant le domaine formeur de pore (domaine I). Il a donc été possible de produire une topologie 2D, normale à la bicouche lipidique selon deux états de conformation : un premier, où la toxine est plus susceptible de se trouver dans un état inactif à pH 9, et un second où elle sera plus susceptible de se trouver dans un état prédisposant la formation des pores, à pH 7. Il est à noter que la toxine sauvage peut former des pores à pH alcalins. Les mutations cystéines ont pour effet de diminuer le taux de formation des pores à pH > 9 à cause de l'introduction d'une charge négative dans le groupement thiol de la cystéine, mais le passage à pH 7 renverse cet effet (Schwartz *et al.*, 1997b; Peyronnet *et al.*, 2001). Toutes les positions testées initialement à pH 9 ont été localisées du côté *trans* de la bicouche lipidique avant de pouvoir enregistrer une activité électrique. Ceci indique qu'avant la formation du pore, la toxine subit un changement de conformation permettant à tout le domaine formeur de pore de se retrouver du côté *trans* de la bicouche. Le passage à l'état actif (pH 7) a permis de constater que les hélices $\alpha 3$ - $\alpha 4$ traversaient la membrane lipidique du côté *trans* (interne) vers le côté *cis* (externe). De plus, la transition de la boucle $\alpha 3$ - $\alpha 4$ de l'intérieur vers l'extérieur de la bicouche se produit avant toute activité électrique, suggérant fortement que ces deux hélices sont nécessaires à la formation du pore et que leur translocation est un préalable à l'enregistrement de la conductance du pore. Comme la boucle $\alpha 4$ - $\alpha 5$ est demeurée en tout temps du côté interne de la bicouche, cela implique que $\alpha 4$ doit obligatoirement composer le canal formé par la toxine. Cela corrobore ce qui a déjà été suggéré dans le modèle du parapluie (Mattheyses *et al.*, 2010). Vachon *et al.* suggère que $\alpha 3$ pourrait jouer un rôle important dans la formation du pore (Vachon *et al.*, 2002), mais il a été impossible de produire un mutant fonctionnel de la boucle $\alpha 2$ - $\alpha 3$. Toutefois, la boucle $\alpha 1$ - $\alpha 2$ est demeurée interne quel que soit le potentiel membranaire imposé, ce qui nous permet de supposer fortement que $\alpha 3$ est probablement transmembranaire dans la forme active de la toxine. La structure cristalline des hélices $\alpha 3$ - $\alpha 4$ révèle qu'elles sont composées de 22 à 32 acides aminés, ce qui leur procure la longueur nécessaire pour traverser la membrane lipidique. Ceci est un indice physiologique supplémentaire qui appuie nos données.

4.1.1.1. Plusieurs modèles peuvent indiquer différentes conformations du pore

Plusieurs modèles existent pour décrire l'insertion des toxines dans la membrane. Bien qu'il n'en n'existe aucun qui décrive la dynamique de perméabilisation, il n'en demeure pas moins que de ces modèles décrivent différents états possibles de conformation du pore. Le modèle du parapluie suggère que le pore est formé des hélices $\alpha 4$ - $\alpha 5$, celui du canif suggère que ce serait plutôt $\alpha 5$ - $\alpha 6$, celui du dragon enfoui propose que le monomère puisse lui aussi former un pore et le nôtre suggère que le pore peut être initié de l'intérieur de la cellule par l'insertion à travers de la membrane des hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$ (voir section 1.2.3.3 et article 1). Autant de modèles peuvent être un indice que la toxine peut adopter plusieurs conformations différentes selon les conditions expérimentales. Nous avons même occasionnellement observé que la section N-terminale pouvait transiter du côté interne vers le côté externe (Groulx *et al.*, 2010). Ce comportement peut être le résultat d'un hasard, ou d'un artéfact, mais il pourrait aussi être un indicateur que certaines sections du domaine formeur de pore peuvent jouir d'un certain degré de liberté dans la bicouche. Cette liberté pourrait dépendre de certains facteurs inconnus, mais qui pourraient être liés, par exemple au niveau d'oligomérisation des toxines. D'ailleurs, il n'existe pas de consensus sur le nombre de monomères impliqués dans un oligomère capable de générer un courant ionique (voir section 1.2.4). Il se pourrait que différentes conformations soient envisageables pour la formation d'un pore de la Cry1Aa. Ces différentes conformations pourraient dépendre de l'oligomère formé et de la concentration de toxine présente dans la membrane.

Même s'il est impossible d'affirmer selon nos expériences que chaque oligomère peut avoir un mouvement dans la membrane qui lui est propre, il reste que ces assemblages protéiques sont tous présents, et qu'occasionnellement des mouvements tels que ceux enregistrés par la partie N-terminale sont observés. Si la partie N-terminale n'est pas supposée bouger quand la forme dominante du pore et le tétramère, peut-être qu'elle le peut si l'oligomère dominant est (par exemple) le trimère. Un mouvement du domaine formeur de pore pourrait donc être associé à la formation d'un oligomère autre que le tétramère sans pour autant former un pore.

4.1.1.2. Topologie des domaines II et III

Le comportement peu commun du domaine I provoque un questionnement quant à celui des autres domaines. Est-ce qu'une internalisation de ces domaines peut être également observée? Les domaines II et III sont impliqués dans la liaison de la toxine avec le récepteur et aussi dans la toxicité. Les expériences de simple FRET sur les acides aminés situés aux extrémités des deux domaines (M283, S373, N462, A606) ont révélé que la toxine en entier avait tendance à s'accumuler du côté *trans* (voir figure 4.1).

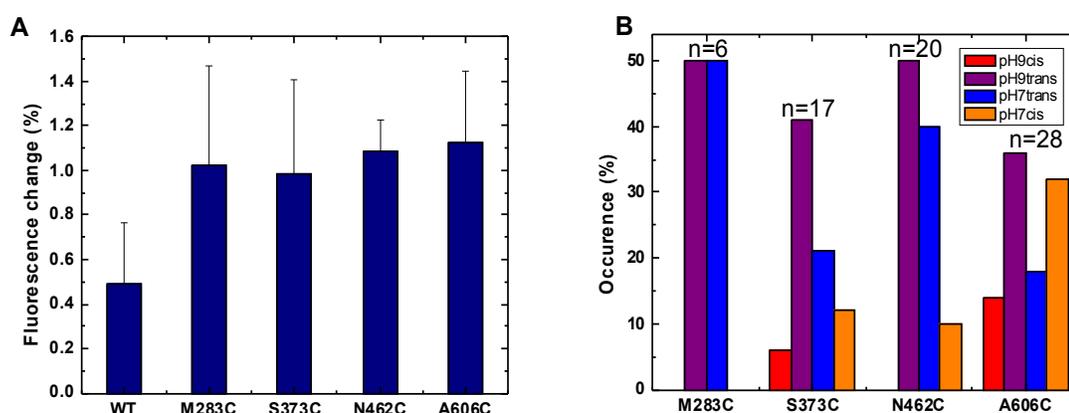


Figure 4.1. : (a) $\Delta F/F$ moyens observés pour les positions marquées au TMRM des domaines II et III; (b) Probabilité de positionnement (cis ou trans) des résidus marqués en fonction du pH de la solution.

La figure 4.1. (a) montre que les positions extrêmes des deux domaines offrent à peu près les mêmes valeurs de changement de fluorescence qu'observées pour le domaine I (environ 1.2%). Une certaine variation de fluorescence a été observée de la part du WT, mais elles sont au minimum environ deux fois moins importantes que les variations de fluorescence des mutants marqués. M283 et S373 sont des résidus positionnés aux extrémités du domaine II et N462 et A606 aux extrémités du domaine III. Les expériences de simple FRET avec du DPA et du TMRM ont révélé que M283C, qui suit S252 reste du côté *trans*, dans toutes les conditions expérimentales. Les autres positions s'accumulent du côté *trans* à pH 9 comme les mutants du domaine I (50% pour M283C, 41% pour S373C, 50% pour N462 et 36% pour A606C), mais semblent indiquer une certaine probabilité de présence du côté *cis* à pH 9 (6% pour S373C et 14% pour

A606C) ainsi qu'à pH 7 (12% pour S373C, 10% pour N462C et 32% pour A606C) (figure 4.1. b). Cela suggère que les positions plus éloignées du domaine I ont plus de liberté dans la membrane, en particulier l'extrémité A606 du domaine III qui semble très mobile. Si l'on considère que ces domaines sont impliqués dans la liaison de la toxine avec les récepteurs APN ou cadhérine (voir section 1.2.2), il se pourrait qu'en l'absence de récepteurs, le degré de liberté de ces acides aminés dans la bicouche soit plus grand. Dans ces conditions, les toxines en entier subissent de grands changements de conformation. Ces changements peuvent avoir lieu, par exemple, pour faciliter la diffusion de la protéine dans la bicouche lipidique.

Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait reproduire ces expériences avec des bicouches arborant des récepteurs et essayer de vérifier si le positionnement des fluorophores pourrait être plus stable à une extrémité ou une autre de la bicouche lipidique.

4.1.2. Le double FRET explique le faible $\Delta F/F$

L'étude du simple FRET a révélé que le domaine I de la toxine Cry1Aa pouvait s'internaliser complètement dans la membrane plasmique. De plus, une faible valeur du $\Delta F/F$ a été observée, soit 1.2% en moyenne (voir figure 2 de l'article). Or, on s'attendait à des valeurs autrement plus importantes qui se situeraient autour de 18%, par exemple. En effet, nous avons testé le $\Delta F/F$ de l'oxonol par rapport au DPA quand celui-ci se retrouve à une extrémité ou une autre de la bicouche lipidique dans le but de connaître les variations de fluorescence d'une sonde fluorescente localisée près des têtes polaires. À 100 mV, le $\Delta F/F$ était d'environ 18%. Dans les mêmes conditions, ces valeurs sont proches de celles enregistrées avec la sonde Di-8-ANEPPS (15%) qui se localise entre les têtes polaires des lipides.

Il a été possible d'identifier la cause des faibles valeurs des $\Delta F/F$ mesurées pour les mutants qui ont été utilisés au cours de ces travaux. En effet, en premier lieu, nous avons étudié la possibilité qu'un bruit de fond important en soit la cause. Pour ce faire, nous avons mesuré les niveaux de fluorescence autour de la bicouche à des intervalles $\Delta d = 0,1 \mu\text{m}$. Nous avons ainsi montré que la majorité de la fluorescence provenait de la bicouche, et non du bain (figure 4, de l'article 1). La faible valeur du signal de

fluorescence ne peut donc être créée que par la toxine marquée elle-même après le changement de solution de la chambre interne. Ce phénomène peut avoir lieu si les positions étudiées sont localisées dans la bicouche lipidique de manière à diminuer l'interaction des fluorophores avec le DPA. Si une position étudiée est centrée uniformément durant une expérience, l'effet de FRET avec le DPA sera le même, que celui-ci soit du côté *cis* ou *trans* de la bicouche. Le transfert d'énergie ne sera jamais maximal, vu que le donneur ne se trouve jamais à proximité de l'accepteur. Cela résultera à une diminution du $\Delta F/F$. Comme on a montré que les positions étudiées de la toxine s'accumulaient du côté interne de la bicouche, il est logique de retrouver de la toxine des deux côtés de la membrane. Les complexes ne bougent pas forcément en phase et si certaines positions marquées n'ont pas encore bougé de leur état initial, alors des fluorophores se trouveraient des deux côtés de la bicouche lipidique. Une distribution des fluorophores d'une extrémité à l'autre de la bicouche lipidique impliquerait qu'une population de fluorophores serait toujours « quenchée », ce qui aura pour effet de diminuer le transfert énergétique entre la population de fluorophore situé à l'autre extrémité de la bicouche lipidique, diminuant ainsi la valeur du $\Delta F/F$.

En utilisant deux accepteurs ayant des propriétés semblables (voir section 2.1.3.1), le DPA et l'oxonol, localisés dans la membrane, un fluorophore donneur, la fluorescéine, qui transfère aux deux accepteurs, (voir figure 1C, de l'article 1), et en marquant les mêmes positions que précédemment, il a été possible de sonder la bicouche normalement à sa surface, en conditions de double FRET.

Le simple FRET avait pour but de donner la position de la majorité des oligomères de la toxine par rapport aux deux feuillets de la membrane. On a pu déterminer la localisation de toutes les boucles du même côté à pH 9 et celle de la boucle $\alpha 3$ - $\alpha 4$ qui a changé d'orientation à pH 7 (voir figure 4.2.(B)). Les expériences de double FRET ont pour but d'augmenter la précision sur la position entre les deux feuillets de la bicouche lipidique des différentes boucles. Les résultats suggèrent d'ailleurs fortement que les différentes positions sont distribuées (figure 4.2.(A)). Si l'on se réfère aux figures 5A et B de l'article 1 sur le signal de fluorescence généré par les positions marquées par la fluorescéine interagissant avec deux accepteurs, la majorité des positions testées dans

ces conditions génèrent des situations de fluorescences alternatives qui correspondent aux simulations suggérant une distribution de toxine sur les deux côtés de la bicouche.

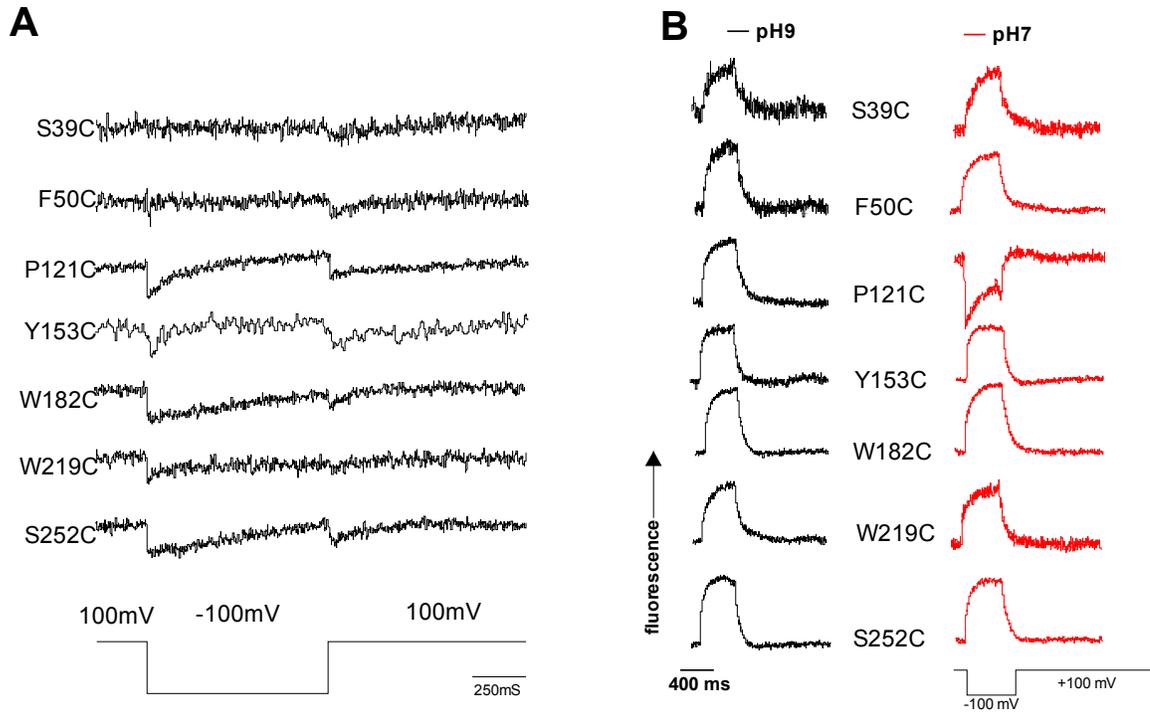


Figure 4.2. : Traces de fluorescence obtenue en BLMs sans récepteurs traitées avec la Cry1Aa (A) Les expériences de fluorescence en Double FRET indiquent que les positions étudiées sont distribuées entre les deux extrémités de la bicouche lipidique.(B) Les expériences de simple FRET indiquent que le domaine I en entier se trouve du côté trans à pH9 avant que les pores soient formés et actifs.

On peut remarquer aussi que certaines distributions de fluorescence ne sont pas évidentes à interpréter (position S39 et F50), et même le signal de double FRET ne revient pas forcément à son niveau de base à la fin de la dépolarisation (P121, figure 4.2 (A)). En fait, il serait tout à fait pertinent de se poser la question sur l'homogénéité de la distribution dans le temps. En effet, bien que le simple FRET suggère que les différentes positions se trouvent proches (positions 1,3) d'une extrémité d'un feuillet par rapport à l'autre, nous ne pouvons exclure la possibilité d'un certain niveau de mobilité entre le centre de la bicouche et l'extrémité du feuillet (figure 4.3.).

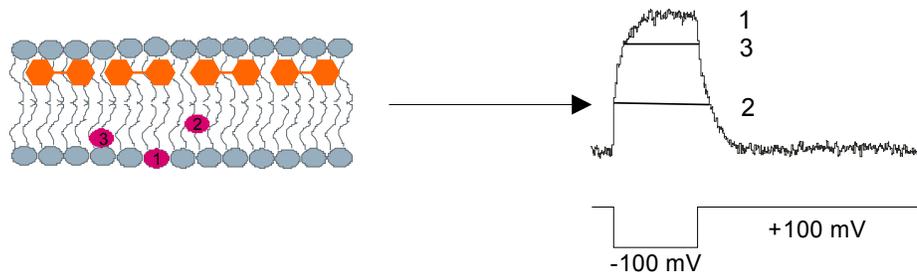


Figure 4.3. : Différentes positions pour lesquelles on obtiendrait un signal semblable. L'amplitude maximale du signal de fluorescence serait obtenue en position 1, le plus loin possible du DPA. Le TMRM situé en position 2 ou 3, on donnera une amplitude de fluorescence plus petite.

La figure 4.3. montre différentes positions pour lesquelles un signal de fluorescence similaire pourrait être observé. Par exemple, S39C fait partie de l'hélice $\alpha 1$ et il est possible que cette hélice contienne un site de digestion enzymatique qui pourrait participer à la formation de pores (Petosa *et al.*, 1997; Wolfe *et al.*, 2005; Katayama *et al.*, 2008). Les expériences de simple FRET ont montré que cette section était internalisée à pH 9, mais qu'elle pouvait se redresser vers le côté *cis* dans la forme active de la toxine (Groulx *et al.*, 2010). Les expériences de double FRET montrent que cette hélice se retrouve plus souvent du côté *cis*. De plus, la trace de fluorescence produite par deux pulses de -100 mV (voir figure 4.2 (A)) n'est pas homogène. Nous n'avons donc pas pu tirer de conclusions fermes quant à la localisation exacte de cette position pendant la formation du pore.

La position F50 reste toujours du côté *trans* selon le simple FRET (figure 4.2B). Le double FRET montre un faible signal de fluorescence au premier pulse (figure 4.2A), alors que la transition de fluorescence est plus nette au deuxième pulse. D'après ces observations, on peut penser qu'au premier pulse, la position se trouvait ainsi du côté interne de la bicouche et plus proche du centre, d'où la faible valeur du $\Delta F/F$. L'imposition du premier pulse peut avoir induit un mouvement de la toxine vers l'extrémité du feuillet pour augmenter la valeur du $\Delta F/F$ et ainsi mettre en évidence la distribution des positions marquées entre les deux côtés de la bicouche lipidique. Les résultats de double FRET suggèrent que certains petits mouvements (quelques Å)

peuvent avoir lieu, bien que les positions marquées sont confinées du côté *trans*. Toutefois, la faible amplitude de ces mouvements n'affecte pas le signal de simple FRET.

Du point de vue pratique, les résultats de simple FRET et de double FRET suggèrent un comportement à coût énergétique élevé de la Cry1Aa a priori : pourquoi faire traverser une structure contenant plus de 250 acides aminés de l'autre côté de la membrane, alors qu'une simple liaison à la surface cellulaire permettrait la formation de pores?

D'autres protéines (ou des sections de protéines) peuvent se faufiler à travers la bicouche pour se retrouver du côté *trans* de la membrane. Un comportement similaire est suggéré notamment en ce qui concerne la toxine de la diphtérie (voir section 1.4.3 et figure 4.4).

Le rôle du pore est encore mal compris. Sa formation accompagnerait la translocation de l'unité catalytique, sans y participer (Benson *et al.*, 1998). Ainsi, tout comme la Cry1Aa, toute une section de la protéine se serait faufilée à travers la bicouche sans passer à travers le pore. Il y a donc des similitudes entre le transport du domaine catalytique chez DT et la formation du pore de la Cry1Aa, ce qui montre qu'un tel comportement se retrouve ailleurs dans la nature que sur la toxine Cry.

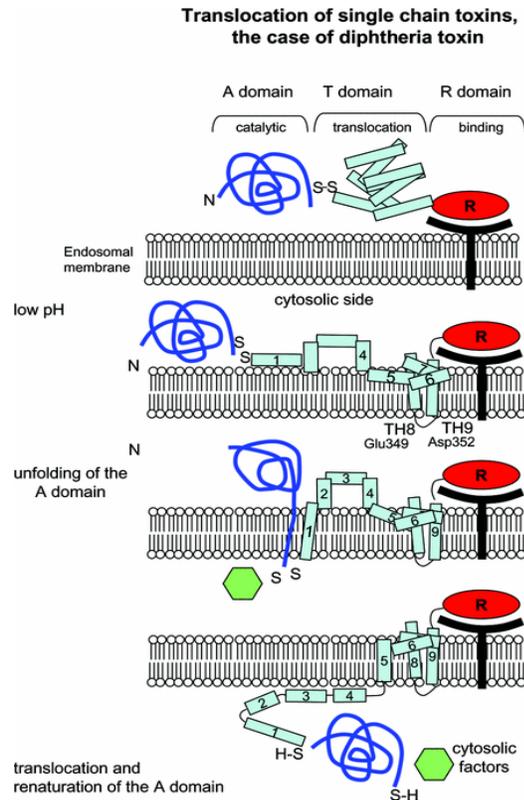


Figure 4.4. : étapes de formation du pore de la toxine de la diphtérie
(Alouf & Freer, 2006a)

Nous ne savons toujours pas si la toxine Cry1Aa possède un caractère cytolytique, c'est-à-dire qu'elle forme un pore par oligomérisation après s'être insérée dans la membrane (Ren *et al.*, 2004; Katayama *et al.*, 2008), ou un caractère cytotoxique, c'est-à-dire que la toxine va s'oligomériser en barillet avant de s'insérer à l'intérieur de la bicouche lipidique (Wolfe *et al.*, 2005).

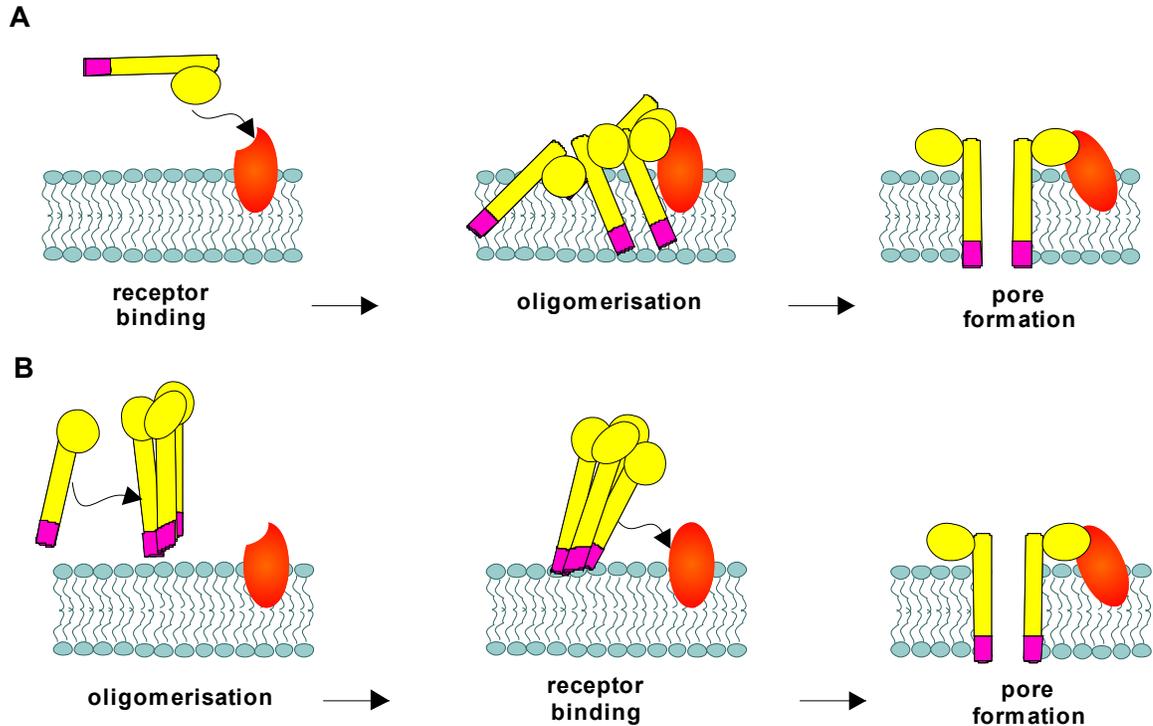


Figure 4.5. : *Différence entre les mécanismes de formation des pores en général: A. Activité cytolytique : le pore est formé après l'assemblage des monomères dans la membrane. B. Activité cytotoxique : un barillet se forme avant de s'insérer dans la membrane pour former des pores.*

La figure 4.5. illustre les deux modèles. Les expériences de FRET et de double FRET ont montré que les mouvements de translocation des hélices responsables de la formation du pore se font avec une plus grande probabilité lorsque le pH de la solution du bain est proche de 7. Comme la translocation a été observée avant l'apparition du courant électrique et que les expériences de photoblanchiment suggèrent une haute probabilité de présence de monomères et dimères dans la membrane lors des expériences (voir article 2), alors on peut suggérer que ces observations soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'oligomérisation vers un état tétramérique s'opère après l'insertion de la toxine dans la membrane.

4.1.3. Avantages et inconvénients

4.1.3.1. Dans le système de FRET

Le système de FRET utilisé dans cette étude propose l'utilisation d'accepteurs se distribuant uniformément à la surface des bicouches lipidiques selon le voltage imposé à leurs extrémités.

Le plus grand avantage de cette technique est de pouvoir étudier en temps continue une protéine qui a subi un minimum de modifications structurales. Cette méthode couple deux techniques qui nous permettent d'enregistrer le mouvement que produit un résidu en particulier au moment où le pore s'ouvre tout en étant informé sur la position de départ du résidu et de sa position finale. Le DPA est un accepteur non fluorescent, cela implique également qu'il n'y a pas à s'inquiéter de filtrer son émission et de connaître ses implications sur le signal de fluorescence provenant du donneur que l'on cherche à étudier.

Cette technique offre des possibilités avantageuses par rapports aux techniques usuelles utilisées (voir section 1.4). En effet, les techniques usuelles consistent à bloquer le pore dans un état ouvert ou fermé pour pouvoir étudier l'environnement dans lequel se retrouve la position étudiée (e.g. environnement aqueux ou lipidique) grâce à, par exemple, la technique de SCAM. Le système d'étude le plus utilisé est la vésicule lipidique, qui permet de recueillir des données d'un grand échantillon de toxines. La bicouche lipidique est également très utilisée, mais majoritairement pour des tests d'électrophysiologie. La limitation majeure de ces études est que l'on déduit le mouvement selon la fluorescence obtenue par différents mutants et que le mouvement n'est jamais étudié en continue par un seul mutant. Le couplage de la technique de FRET et d'électrophysiologie est probablement la plus grande ingéniosité de cette étude, car il n'y a que de cette manière que l'intégralité du mouvement a pu être observée à partir d'une position de départ bien définie d'un résidu du domaine formeur de pore par rapport à la bicouche lipidique.

Cette technique offre aussi, de par la géométrie du système, d'autres avantages intermédiaires par rapport aux montages usuels. Notre système est horizontal, cela

permet entre autre d'utiliser des chambres qui contiennent beaucoup moins de solutions (environ 300 μL , du côté *cis*) que dans les chambres à géométrie verticale (plusieurs mL du côté *cis*). Dans ces conditions, notre système permet une certaine optimisation de la présence de la toxine sur la bicouche lipidique. En effet, le système vertical nécessite une agitation continue de la solution pour permettre à la toxine d'accéder à la bicouche lipidique (sans agitation, il est peu probable d'obtenir une lecture de courant dans la membrane lipidique. Dans le système horizontal, la toxine s'accumule plus efficacement à la membrane lipidique (sans agitation, une lecture de courant peut être obtenue après une période d'incubation de 10 minutes). Pour la Cry1Aa, il a été déterminé dans un système de bicouche verticale sans récepteur que la concentration de toxine requise pour obtenir un courant ionique était d'environ 5 $\mu\text{g/mL}$, nos expériences furent produites avec des concentrations allant de 1,95 à 2,33 $\mu\text{g/ml}$, soit environ deux fois moins (Groulx et al., 2010).

Bien que cette technique offre plusieurs innovations, elle comporte un certain nombre de faiblesses. La plus importante concerne la technique de FRET, qui n'apporte pas de précision sur les mouvements horizontaux que pourraient produire certaines positions durant la formation du pore. Les informations tirées du phénomène de FRET ne peuvent apporter des précisions que sur un mouvement normal du fluorophore par rapport à la bicouche lipidique.

De plus, comme nous l'avons mentionné, le $\Delta F/F$ dans les expériences de FRET ne donne pas le degré d'enfouissement de la position étudiée par rapport à sa distance du DPA. Si le $\Delta F/F$ avait été proche de la valeur optimale dans le cas où il n'y a pas de distribution de toxine sur les deux feuillets de la bicouche et qu'il n'y a aucun bruit de fond, alors une diminution de cette valeur aurait pu être un indice sur la position du résidu marqué par rapport à l'accepteur. Toutefois, dans notre cas, il y a une distribution de la toxine par rapport à la bicouche lipidique et le $\Delta F/F$ est près de dix fois plus petit qu'escompté, donc il n'est pas possible de pouvoir faire de supposition sur la localisation à l'intérieur de la bicouche lipidique.

4.1.3.2. Dans le système de double FRET

Le système de double FRET introduit dans cette étude offre une véritable révolution dans l'étude de la topologie des protéines à la surface des bicouches lipidique. En effet, il n'existait aucune technique qui permettait d'établir la distribution d'un échantillonnage de protéines entre les deux côtés de la membrane. Cette technique permet également d'aller plus loin en permettant d'émettre des hypothèses sur des mouvements de faibles amplitudes que pourraient éventuellement produire des positions dont les traces de fluorescence sont moins claires (voir figure 4.2). Cette précision n'a pas pu être atteinte auparavant et son amélioration ne pourra qu'augmenter la compréhension du comportement des toxines telles la Cry.

Pour le moment, les expériences de double FRET ne permettent pas d'obtenir une bonne précision sur la distance d'enfouissement du résidu étudié dans la bicouche. Ces expériences permettent de connaître comment les segments étudiés peuvent se positionner globalement, sans toutefois apporter une précision supplémentaire. Il faudrait réussir à calibrer les mesures de FRET ou de double FRET avec le $\Delta F/F$ produit par des fluorophores fixés à des positions connues en profondeur dans la bicouche. Par exemple, utiliser des sondes comme la di-8-ANEPPS qui se fixe à la surface de la bicouche lipidique.

4.1.4. L'oligomérisation de la Cry1Aa en tétramère

4.1.4.1. Retour sur les résultats de photoblanchiment

Le thème de l'oligomérisation des molécules est un sujet essentiel à la compréhension de la formation des pores. Dans certains cas, l'oligomérisation peut jouer un rôle important dans la toxicité cellulaire, sans que cela soit lié au pore lui-même. Par exemple, l'étude de l'antigène de protection de l'anthrax (PA) a révélé que cette protéine s'assemble en heptamère ou en octamère avant de s'insérer à la membrane de l'endosome. Il est suggéré qu'il y a trois facteurs léthaux ou œdémateux qui peuvent se lier au pré-pore entre chaque sous-unité de PA. Dans ce cas-ci, se serait le nombre de sous-unité de PA qui serait le facteur limitant à la toxicité de l'anthrax (Nassi *et al.*, 2002; Janowiak *et al.*, 2009).

Dans le cas de la Cry1Aa, il a été proposé que la toxine s'assemble en tetramère à la membrane (Vie *et al.*, 2001; Cao & Klebba, 2002; Greig *et al.*, 2009; Groulx *et al.*, 2011). Toutefois, les premières suppositions sur le sujet furent basées sur des résultats d'image d'AFM dans lesquelles un complexe tetramérique était observé. Il n'y a toutefois aucune certitude quant au nombre final de sous-unité pouvant composer le pore. Sur les dites images, on peut aussi y observer une forme pentamérique. Le nombre d'hélices formant le pore doit être confirmé par d'autres études. Les expériences de photoblanchiment du deuxième article ont permis de confirmer le processus de tétramérisation et même d'observer la dynamique d'oligomérisation vers cet état. Malgré tous les travaux produits sur l'oligomérisation de la Cry1Aa, des questions restent en suspens. On ne sait toujours pas si les monomères s'assemblent en barillet avant de s'insérer dans la membrane (Gould & Cramer, 1977; Davidson *et al.*, 1984), ou si l'oligomérisation se produit par l'assemblage de monomères déjà insérés, qui diffusent dans la membrane jusqu'à ce qu'ils se lient entre eux pour former ultimement un pore (Cascales *et al.*, 2007).

Notre étude de spectroscopie de fluorescence basée sur le principe de photoblanchiment (Nogueira & Varanda, 1988) a permis d'apporter une réponse à ces questions (voir section 1.6.7.). Deux mutations de la Cry1Aa (F50C et P121C) ont été marquées avec le TMRM et fusionnées à des vésicules lipidique composées de POPE et de POPC dans un cas et de DPhPC dans l'autre. Ces vésicules ont ensuite été introduites sur une lamelle de verre pour produire des bicouches supportées. Ces bicouches ont été illuminées durant une période de temps suffisante pour que tous les fluorophores liés aux protéines soient photoblanchis. Le compte de sauts quantiques de fluorescence par « spot » de fluorescence dans la zone d'illumination nous a permis de savoir combien de sous-unités composaient chaque oligomère. Ces expériences ont été produites pour des concentrations croissantes de toxine dont la plus faible fut de 0.17 µg/mL. Les autres tests furent produits à plus fortes concentrations d'incubation (0.33, 0.573, 0.813, 1.205, 1.587 et 2.326 µg/mL), jusqu'à ce que les photodiodes du capteur photographique de la caméra EMCCD soient saturées et rendent l'analyse des traces de fluorescence impossible (voir figure 4.6 et 4.9.).

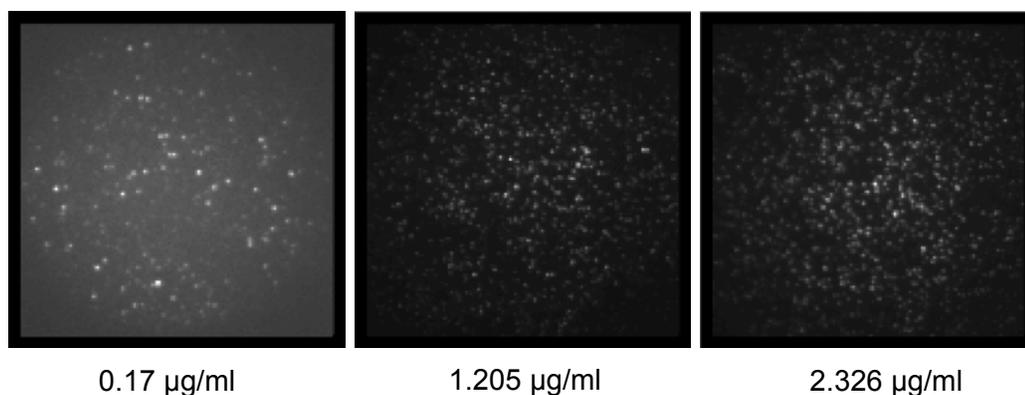


Figure 4.6. : saturation de la fluorescence en bicouche supportée quand on augmente la concentration de 0.170 $\mu\text{g/ml}$ à 2.326 $\mu\text{g/ml}$.

Les différentes distributions de sauts quantiques de fluorescence suggèrent un maximum de 4 sous-unités, quelle que soit la concentration de toxine utilisée. De plus, les plus grandes concentrations de toxine sont décrites par une distribution binomiale pour une stœchiométrie à 4 états (voir figure 4.7 et 4.8).

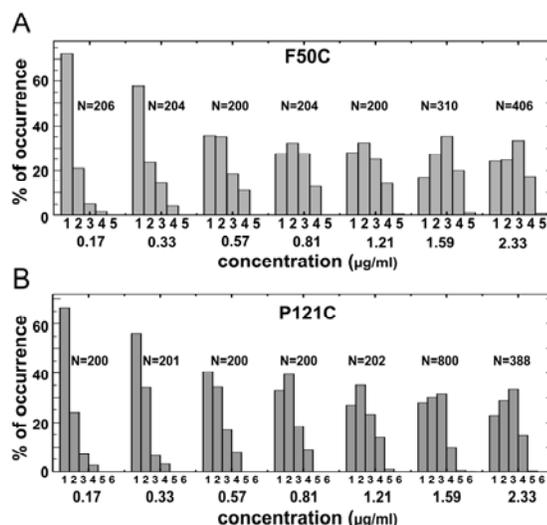


Figure 4.7 : distribution des états de photoblanchiment des oligomères de F50C (A) et de P121C (B) dans les lipides DPhPC en fonction des concentrations de toxines utilisées. Pour N traces de fluorescence analysées à chaque concentration de toxine utilisée, on peut obtenir le pourcentage sauts de fluorescence présents dans la distribution (Groulx et al., 2011).

La figure 4.7. montre l'évolution des distributions des états de photoblanchiment (distributions obtenues par le compte des sauts quantiques dans les traces de fluorescence) en fonction des concentrations de toxine dans les vésicules. L'étude statistique permet de déterminer comment elles évoluent et quel oligomère caractérise le plus chaque distribution.

Les résultats des tests de photoblanchiment révèlent ainsi qu'à concentration croissante de toxines, les états de photoblanchiment des fluorophores liés aux oligomères diminuent dans le cas des deux premiers états (1 et 2 sauts), tandis qu'ils augmentent dans le cas des deux derniers états (3 et 4 sauts) pour atteindre une saturation dans le cas des tétramères à la concentration de toxine la plus forte. Cela indique que les monomères diffusent dans la bicouche lipidique et que leur niveau d'association dépend de la concentration de toxine présente.

Par ailleurs, les tests effectués à 0,17 $\mu\text{g/mL}$, 0,330 $\mu\text{g/mL}$ et 0,573 $\mu\text{g/mL}$ sont le mieux décrits par une distribution de Poisson dont les niveaux d'oligomérisation moyens (λ) sont respectivement $1,07 \pm 0,04$, $1,19 \pm 0,03$ et $1,57 \pm 0,17$ sous unités par oligomère (voir figure 4.8 A). Un nombre de monomères insuffisant donnera une distribution des oligomères qui suivra la fonction de Poisson. Ces distributions sont comparables à une binomiale (qui, contrairement à la fonction de Poisson, est une distribution offrant une stœchiométrie définie) seulement dans la condition où la probabilité de voir une sous-unité marquée dans le cas du tétramère (p) est petite, ce qui ne peut arriver étant donné que l'efficacité de marquage des monomère est supérieure à 75% (voir figure 4.8 B). Cela indique donc qu'à ces concentrations, il n'y avait pas assez de monomères et de dimères pour permettre une oligomérisation organisée.

Les distributions caractérisant les expériences menées à plus hautes concentrations (0,813 $\mu\text{g/mL}$, 1,205 $\mu\text{g/mL}$, 1,587 $\mu\text{g/mL}$ et 2,326 $\mu\text{g/mL}$) ont quant à elles évoluées vers une organisation de type binomiale. La distribution de Poisson, à ce stade, n'est plus la meilleure description du phénomène (figure 4.8 C). Une distribution binomiale décrivant un tétramère s'est montrée capable de bien reproduire les résultats. En effet, on a pu constater qu'en optimisant la valeur de p (approximation des valeurs expérimentales; probabilité d'observer une sous-unité marquée), la distribution

binomiale décrivant un tétramère était la meilleure approximation à nos résultats expérimentaux (voir figure 4.8 D). En augmentant la concentration à 1,205 $\mu\text{g/mL}$, 1,587 $\mu\text{g/mL}$ et 2,326 $\mu\text{g/mL}$, on obtient des valeurs de p pour une binomiale décrivant un tétramère valant respectivement pour les deux positions $0,48 \pm 0,04$, $0,59 \pm 0,05$ et $0,57 \pm 0,03$.

Ces résultats ont été observés pour les vésicules composés de POPC et de POPE, ainsi que dans le cas des vésicules composés de DPhPC, ce qui suggère que l'environnement lipidique ne serait pas un facteur déterminant dans l'oligomérisation.

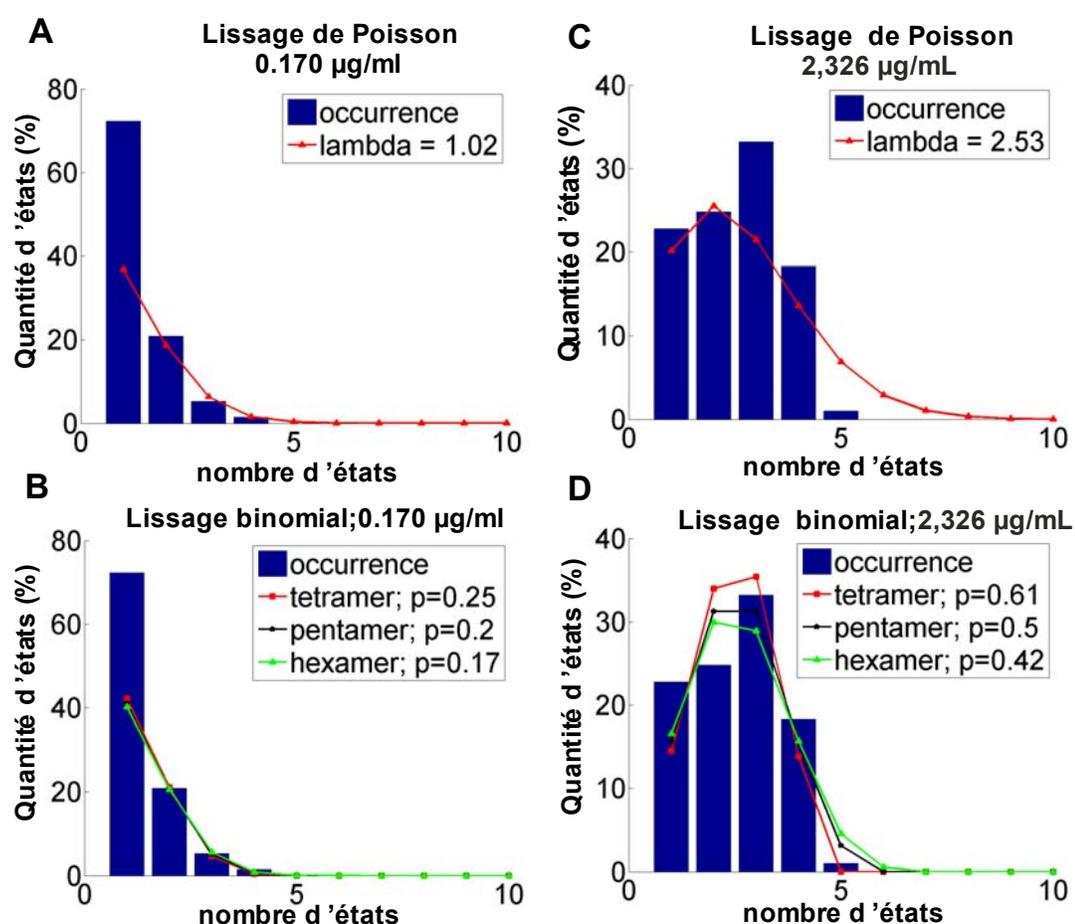


Figure 4.8. : distribution de F50C incorporé dans des vésicules de DPhPC

A. 0,170 $\mu\text{g/ml}$ de toxine, la fonction de Poisson est la meilleure approximation; B. 0,170 $\mu\text{g/mL}$ de toxine, l'approximation binomiale n'est pas la meilleure approximation, vu que le EOL des monomères est trop élevé C. 2,326 $\mu\text{g/ml}$, l'approximation de Poisson est inadéquate D. 2,326 $\mu\text{g/ml}$, l'approximation binomiale décrivant un tétramère est la meilleure approximation.

On peut remarquer qu'à partir d'une certaine concentration de toxine ($0,81 \mu\text{g/ml}$), les distributions ne se décrivent plus en tant qu'une distribution de Poisson (sans stœchiométrie distincte), mais par une distribution binomiale, qui s'applique dans le cas où l'oligomère contient un nombre spécifique de monomères. En effet, les valeurs de p à faibles concentrations se trouvaient toutes inférieures à $0,38 \pm 0,03$, valeur étant très différente de l'efficacité de marquage des monomères ($\text{EOL} = 0,755$). Les valeurs de p à plus hautes concentrations de toxine sont plus proches de la valeur du EOL ($0,755$), ce qui implique que dans ces conditions, l'oligomérisation suit une stœchiométrie bien définie (voir figure 4.8.). Tout ceci suggère que le taux de formation des pores s'accélère rapidement quand la concentration augmente légèrement et que l'oligomérisation devient plus organisée. Si l'on tient compte du fait que les fluorophores ont pu subir un photoblanchiment avant les expériences, on pouvait s'attendre à obtenir des valeurs de p (probabilité de voir une sous-unité marquée) plus basses. De temps à autre, un pentamère et un hexamère ont pu être observés. Leur présence fut de moins de 1% à haute concentration. En se fiant aux histogrammes, la différence marquée entre le nombre de tétramères et de pentamères (voir figure 4.7) écarte la possibilité de pouvoir obtenir une distribution pentamérique ou hexamérique. Mais encore, la valeur de p dans les deux cas est inférieure à 0,5, ce qui exclut cette possibilité.

Il se peut que ce phénomène soit le résultat du marquage non-spécifique. La protéine sauvage marquée dans les mêmes conditions que les mutants a obtenu dans le pire des cas un EOL significativement plus bas (soit $0,06 \pm 0,03$; voir article 2) que celui des deux mutants (soit 75,5% de marquage). Une présence de marquage non-spécifique à 9% (dans le pire des cas) peut éventuellement provoquer la présence de 1 ou même 2 fluorophores supplémentaires sur un éventuel tétramère, si l'on tient compte des probabilités de voir ce marquage non spécifique affecter le même monomère. Cela impliquerait une observation très occasionnelle de pentamères ou hexamères, ce que l'on peut observer dans les résultats.

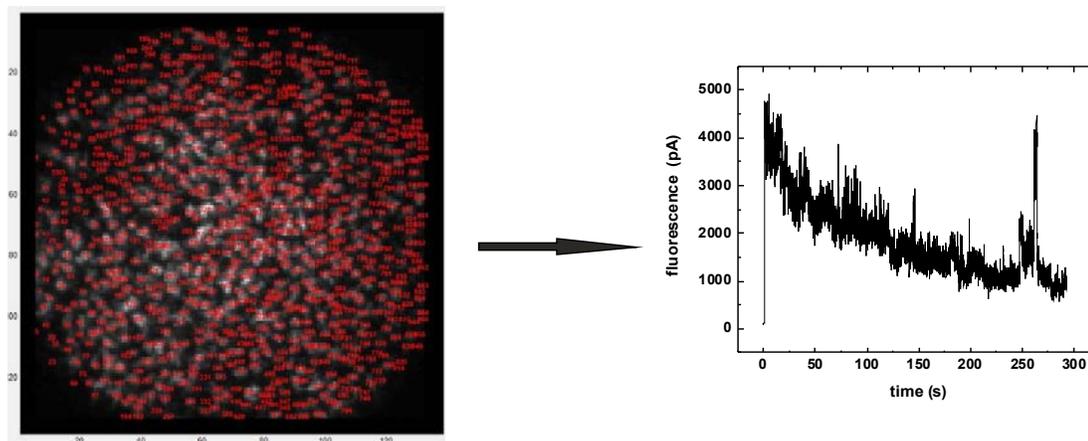


Figure 4.9. : *exemple de phénomène de saturation du système : les points lumineux ne sont plus assez éloignés pour distinguer les états stables.*

Il aurait été intéressant de pouvoir tester les sauts de fluorescence à plus hautes concentrations de toxines pour vérifier si de plus grands oligomères pouvaient être observés. Il n'a pas été possible d'augmenter davantage la concentration de toxine dans la bicouche lipidique, car on avait atteint un état de saturation (voir figure 4.9). Toutefois, les distributions des états de photoblanchiment ont tendance à demeurer stables au-delà de 15.9 $\mu\text{g/ml}$ de toxine. Les valeurs de p sont aussi similaires, soit de 0.6 ± 0.2 (voir tableau de l'article 2).

Finalement, l'évolution des distributions (voir figure 4.7) des états de photoblanchiment en fonction de la concentration de toxine présente dans les vésicules suggère fortement que la toxine s'est liée à la membrane et ensuite a poursuivi son processus d'oligomérisation. Il se pourrait que ces observations soient dues au fait que ces expériences ont été produites sans récepteurs à la membrane des vésicules. Le groupe de Schwartz et al. a d'ailleurs suggéré que l'oligomérisation en bicouche sans récepteur demandait environ 5 $\mu\text{g/mL}$ de toxine, alors que cette concentration diminuait à environ 80 ng/mL en présence de récepteurs (Kienker *et al.*, 2003). Nos expériences en bicouche lipidique sans récepteurs ont confirmé la formation de pores avec des concentrations de toxine de 1,95 à 2,60 $\mu\text{g/ml}$ (Groulx *et al.*, 2010). Les monomères de toxines sans récepteurs doivent diffuser dans la membrane et s'assembler pour former les pores. Une augmentation de la concentration de toxine augmente la probabilité de la formation du pore. On peut aussi se demander si le processus d'oligomérisation serait plus long sans

récepteurs. Si par contre en leur présence, le phénomène s'accélère, est-ce que ce serait dû à une augmentation de la vitesse d'oligomérisation des monomères diffusant dans la bicouche, ou si les monomères s'assemblent aux récepteurs en pré-pore et que ce processus est plus rapide, ou encore si les deux cas de figures sont possibles en présence des récepteurs.

Ainsi, selon les résultats des expériences de photoblanchiment des oligomères présents dans la membrane lipidique des vésicules traitées avec une concentration suffisante de toxine, un tétramère semble être l'état final du pore. De plus, l'évolution des distributions de Poisson à binomiale en fonction de la concentration croissante de toxine nous permet également de penser qu'en l'absence de récepteurs, la toxine pourrait diffuser dans la membrane pour rencontrer d'autres oligomères et s'assembler en pore. Ainsi, dans ces conditions, la toxine ne formerait pas de pré-pore, comme l'anthrax.

4.1.4.2. Modèle d'oligomérisation

Le nombre moyen d'états de photoblanchiments par oligomère présent dans la membrane lipidique dépend de la concentration de toxine introduite dans les vésicules (figure 5B). De plus, l'une des principales variables calculées afin d'évaluer la meilleure approximation aux résultats théoriques est le paramètre p , soit la probabilité qu'une sous-unité soit marquée. Le fait est que cette valeur calculée se trouve dans tous les cas bien en-dessous de la valeur d'EOL mesurée (au mieux 10% en dessous, voir tableau de l'article 2). Il est bien certain que l'on puisse attribuer une partie de ce phénomène au photoblanchiment des fluorophores exposés à la lumière avant l'expérimentation. Toutefois, d'autres facteurs peuvent contribuer à la différence entre p et le EOL. L'un d'eux découle de l'effet de la stœchiométrie de la toxine dans la membrane des vésicules. Plus la concentration de toxine augmente, plus l'allure de la distribution correspond à une distribution binomiale représentant un tétramère. Si le rapport monomères/vésicules est ≤ 1 , on ne voit plus l'effet de tétramérisation. Dans le cas du tétramère, la valeur du ratio monomères/vésicules est d'au moins 4 par vésicule. À la plus haute concentration de toxine utilisée, il y a près de 20 monomères de toxine par vésicule (voir article 2), ce qui est compatible avec les distributions binomiales indiquant la présence d'une stœchiométrie tétramérique. Ces assertions appuient grandement les

observations faites par Vie et par Laflamme qui, dans des expériences d'AFM, observaient que la Cry1Aa pouvait s'assembler en tétramères dans la membrane lipidique (Vie *et al.*, 2001). De plus, (Laflamme *et al.*, 2008) a montré qu'en l'absence des récepteurs et à forte concentration de toxines, des structures organisées pouvaient être distinguées. Ces mêmes structures pouvaient être observées en présence de récepteurs, ce qui suggère que la toxine adopterait probablement le même comportement dans les intestins des insectes, soit la formation de pores tétramériques.

4.1.4.3. Faiblesses du système de photoblanchiment

Le système de photoblanchiment utilisé permet de compter le nombre de fluorophores présents dans un oligomère observé par une camera EMCCD, dans laquelle chacun des 16384 pixels dans la puce de détection agit comme une photodiode. Cette caméra est refroidie à -70°C pour assurer un bruit de fond minimal et surtout pour minimiser le courant obscur et est conçue pour l'imagerie rapide avec une capacité d'enregistrer plus de 510 images par seconde. Sa capacité de détection est de l'ordre du photon, avec une efficacité quantique proche de 95% (www.andor.com). La plus grande limitation ne devrait donc pas être au niveau de la détection. Toutefois, il pourrait y avoir une limitation au niveau de la vitesse d'acquisition des images. Si la caméra n'est pas assez rapide, il n'est pas exclu que deux sauts de photoblanchiment soient enregistrés en même temps. Toutefois, notre d'exposition était de 50 ms, ce qui minimise la probabilité que deux événements surviennent en même temps (Blunck *et al.*, 2008; Groulx *et al.*, 2011).

Certaines traces montrent des transitions de fluorescence non prévues, c'est-à-dire qu'on ne peut observer une forme « en escalier » du photoblanchiment. Ces transitions peuvent apparaître sous la forme d'augmentations inopinées de fluorescence pendant le blanchiment, ou encore des clignements (ou « blinking ») d'intensité de longues durées qui suggèrent des états de la toxine non statiques dans la bicouche. Ce phénomène peut aussi être expliqué sans impliquer forcément un mouvement physique de la toxine par un déplacement du fluorophore entre les états singulet et triplet (Rasnik *et al.*, 2006).

Nous avons montré dans (Groulx *et al.*, 2010) que la toxine est très mobile dans la bicouche durant la formation des pores et peut-être même après la formation des pores. Le passage d'un environnement aqueux à un environnement lipidique va altérer la fluorescence (voir introduction). D'ailleurs, s'il est vrai que les monomères de toxines peuvent former des pores et que les complexes entiers de toxines peuvent s'insérer dans la bicouche (Qiu *et al.*, 1996), il est alors possible que des mouvements de la toxine altérant la fluorescence se produisent de façon continue dans le temps. Ce phénomène de variations de fluorescence durant les mesures de photoblanchiment est reconnu, mais peu de groupe ont essayé d'expliquer le phénomène (Ji *et al.*, 2008). En fait, notre étude est l'une des seules à proposer une explication. Parallèlement, notre laboratoire a observé le même phénomène dans une étude semblable du canal Kcsa. Une mutation ponctuelle dans le canal qui minimise les mouvements possibles du canal dans la membrane a été associée à une diminution du phénomène (Blunck *et al.*, 2008). C'est donc pourquoi seulement les traces de fluorescences contenant de clairs états de photoblanchiment ont été choisies.

Enfin, la plus grande limitation du système est de ne pas permettre l'enregistrement du courant ionique en canal unitaire. De cette manière, il serait possible de vérifier si des oligomères inférieurs au tétramères peuvent former des pores fonctionnels.

4.1.5. Développements futurs

4.1.5.1. Topologie de la Cry1Aa

Les études menées sur la topologie du domaine formeur de pore de la toxine Cry1Aa ont apporté beaucoup d'informations sur les mécanismes de formation des pores. Il a été possible d'établir un nouveau modèle ressemblant au « modèle du parapluie », mais inversé et les hélices $\alpha 3$ - $\alpha 4$ seraient celles responsables de la formation du pore (voir article 1). Il serait très intéressant de mener des études plus poussées sur les domaines II et III et vérifier si certaines sections se trouveraient de façon permanente du côté *cis*, afin de vérifier si la toxine en l'absence des récepteurs s'insère totalement ou partiellement entre les deux feuillettes de la bicouche lipidique.

Maintenant qu'un modèle a été établi grâce à la spectroscopie de fluorescence, la suite logique serait de refaire ces mêmes expériences avec des cellules d'insectes exprimant les récepteurs spécifiques de la toxine. De cette manière, il sera possible de vérifier si le domaine I subit une internalisation dans les mêmes conditions utilisées dans l'article I. Si la présence de récepteurs peut amener la toxine à s'oligomériser à la surface de la cellule avant de s'insérer dans la bicouche, il serait intéressant de vérifier le processus de formation des pores. Cela pourrait se faire en adaptant le montage de fluorescence de telle manière à pouvoir enregistrer les variations globales de fluorescence sur une cellule exprimant les récepteurs. Il faudra prendre la fluorescence de la cellule exprimant les récepteurs sans la présence de toxine, pour déterminer le niveau de bruit, et si les conditions le permettent, ajouter la toxine et déterminer si les variations de fluorescence suivent le même modèle que celui observé en bicouche lipidique plane.

4.1.5.2. Étude sur l'oligomérisation

Les expériences de photoblanchiment ont révélé qu'à concentration suffisante, la distribution des sous unités de toxines présentes dans la bicouche lipidique suivait une distribution binomiale décrivant un tétramère (voir article 2). Bien entendu, il serait intéressant de pouvoir refaire ces expériences en vésicules contenant les récepteurs spécifiques de la Cry1Aa. Pour ce faire il suffirait de cultiver les chenilles exprimant les bordures en brosse des cellules intestinales, isoler ces bordures en brosses et de les fusionner avec des vésicules contenant la toxine. S'il est vrai que la toxine s'oligomériser plus vite en présence des récepteurs (l'apparition de pores se fait à beaucoup plus faible concentration de toxine), alors on pourrait s'attendre à observer plus de tétramères dans les tests à plus faibles concentration de toxines et probablement que dans ces cas là, il serait possible d'observer des distributions binomiales pour toutes les concentrations. Si les récepteurs n'ont pas d'effets, on pourra affirmer que la distribution n'est pas affectée par la présence des récepteurs. La suite logique consisterait à reproduire ces expériences en TIRF (voir figure 4.10.) avec des cellules exprimant les récepteurs.

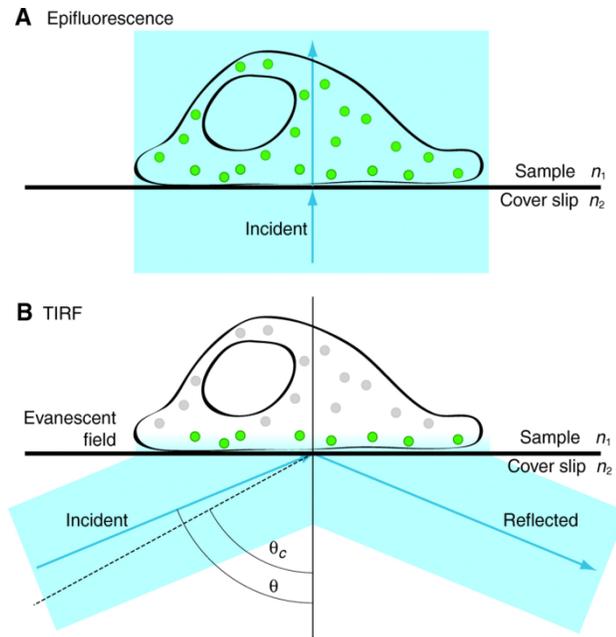


Figure 4.10. : a) la microscopie conventionnelle donne une information partagée par la cellule entière et b) le TIRF permet d'obtenir l'information sur une région plus restreinte

Comme le montre la figure 4.10, le TIRF va permettre d'étudier le nombre de sous unités composant les oligomères des membranes des cellules (Wendt, 1970; Bruggemann & Kayalar, 1986) exprimant le récepteurs, cela va permettre de pouvoir observer le même type d'image obtenues dans l'article 2, mais sans avoir à se soucier du bruit de fond créé par l'intérieur de la cellule. Dans l'article 1, nous avons vu que les variations de fluorescence en bicouche plane (environnement le plus vierge) était petites ($\Delta F/F = 1,2\%$). Si nous refaisons ces expériences avec des cellules, nous risquons d'avoir beaucoup plus d'artefacts causés par la fluorescence intrinsèque de la cellule, diminuant encore la valeur du signal. Le travail en TIRF a des chances de limiter ces effets en ne se concentrant que sur ce qui se passe à l'interface lamelle/cellule.

4.2. Discussion sur la colicine Ia

4.2.1. Effet des longues pulsations sur la corrélation de la fluorescence avec le courant

Des expériences de FRET, avec un donneur (TMRM) localisé sur l'hélice $\alpha 1$ (S402) et les boucles mobiles $\alpha 3$ - $\alpha 4$ et $\alpha 4$ - $\alpha 5$ du domaine formeur de pore (K511 et K524) et un

accepteur (DPA) localisé à l'un des deux feuillets de la membrane lipidique ont permis d'étudier les mouvements de certaines positions de la toxine lors de l'ouverture et de la fermeture du canal. Les premiers tests impliquent une longue hyperpolarisation membranaire (> 500 ms) de la bicouche lipidique : il fallait d'abord vérifier si la fluorescence permet d'observer un mouvement des supposées positions mobiles (Qiu *et al.*, 1996). Dans un premier temps, l'immobilité de la position S402 au côté *cis* de la bicouche a pu être confirmée (voir figure 3.2.). Dans un deuxième temps, un mouvement normal par rapport à la bicouche lipidique des mutations K511C et K524C a pu être observé, sans toutefois révéler une translocation totale des positions (voir figure 3.3.). En effet, un $\Delta F/F$ moyen d'environ $3.1 \pm 0,7$ % provenant du côté *cis*, montre qu'avant l'hyperpolarisation, les deux positions font face au côté *cis* de la bicouche. Une hyperpolarisation affecte donc la localisation membranaire de ces positions. Comme la variation de fluorescence demeure toujours négative par rapport au niveau de base de fluorescence, on peut supposer que les 2 positions n'ont pas traversé totalement la bicouche, au contraire de ce qui est suggéré par le modèle du parapluie. Toutefois, l'augmentation bi-exponentielle de la fluorescence semble concorder avec les observations électrophysiologiques proposant que l'ouverture du canal se fait en deux étapes. Nos résultats suggèrent qu'une hyperpolarisation plus longue que 500 ms de la bicouche favorise le mouvement des hélices $\alpha 3-4-5$. Ce mouvement n'est pas en phase avec l'ouverture du canal. Il est donc probable que ces boucles ne traversent pas totalement la bicouche lipidique, contrairement à ce que propose (Qiu *et al.*, 1996). Dans ce cas-ci, le $\Delta F/F$ aurait dû augmenter à près de +20% lors d'une hyperpolarisation de -100 mV de la bicouche lipidique (Groulx *et al.*, 2010).

Des études de biotinylation du domaine formeur de pore (voir section 1.3 pour plus de détails) ont permis de suggérer que les hélices $\alpha 2-\alpha 5$ peuvent traverser totalement la bicouche lipidique et que l'hélice $\alpha 1$ doit rester du côté *cis* (Katayama *et al.*, 2008). Alors que nous l'avons confirmé pour la position S402, nos résultats sont plus ambigus pour le mouvement des résidus K511 et K524. Il est possible que chacune de ces positions puissent se mouvoir partiellement entre les deux feuillets de la bicouche lipidique. Il reste néanmoins le problème de la mauvaise corrélation temporelle du mouvement des résidus avec l'ouverture du canal : les plus grandes variations de

fluorescence surviennent en moins de 500 ms (voir figure 3.4.). C'est pourquoi l'étude des variations de fluorescence et du courant fut par la suite focalisée pendant un temps plus court.

4.2.2. Le mouvement de K511 est mis en évidence pendant de plus courtes pulsations

Les pulsations de 500 ms ont montré une meilleure corrélation entre le mouvement de la position K511 et l'ouverture du canal. Le tableau 3.1 met en évidence les constantes de temps caractérisant le courant ionique et la fluorescence lorsque les traces sont lissées par des fonctions bi-exponentielles.

En diminuant le temps de pulsation à 500 ms, la phase rapide a été isolée. De cette manière, nous avons pu mettre en évidence la corrélation des décours temporels entre la fluorescence et le courant. Les plus grands $\Delta F/F$ (soit environ $4 \pm 3\%$ en moyenne, $n = 4$) sont apparents si $t < 500$ ms, ce qui suppose que les mouvements de la boucle $\alpha 3$ - $\alpha 4$ suivent bel et bien l'ouverture du canal. De plus, les résultats de fluorescence dans ces conditions ont confirmé, comme pour les longues pulsations, que la position K511 ne traversait pas totalement la bicouche lipidique. Une augmentation exponentielle de la fluorescence fut bien observée (voir tableau 3.1.), et celle-ci est toujours demeurée dans les valeurs négatives, indiquant que la position a bougé du côté *cis* en direction du côté *trans* sans traverser totalement la bicouche lipidique.

Ainsi, nos résultats suggèrent que l'ouverture du canal se produit en deux étapes. Il y a une étape rapide, durant laquelle la toxine subit un changement de conformation qui permet à la boucle entre l'hélice 3-4 de se déplacer entre les deux feuilletts de la bicouche. Il s'ensuit une augmentation plus lente du courant correspondant à un léger déplacement de la position K511, qui pourrait être expliqué par une augmentation du diamètre interne du pore (voir section 1.3.2).

Nos résultats n'appuient pas totalement le modèle du parapluie. Le modèle prédit que les hélices $\alpha 3$ à $\alpha 5$ du domaine formeur de pore devraient traverser complètement la bicouche lipidique, alors que nos mesures de variations de fluorescence lors de l'ouverture des canaux ne sont pas supérieures au niveau de base (figure 3.4). Les études

de biotinylation (avec la streptavidine) effectuées dans le but d'étudier la topologie 2D de ce domaine par rapport à la bicouche lipidique ne peuvent toutefois être sûres totalement (appendice 1.3.1). Le but de cette technique est de préparer un mutant marqué par une biotine à la position étudiée. Une fois la toxine incorporée à la bicouche lipidique, on rajoute la streptavidine du côté *cis* ou *trans* et on vérifie si un côté ou l'autre a lié la streptavidine, ceci indiquant de quel côté se trouve la position liée (Qiu *et al.*, 1996). Le problème vient du fait que même si une position lie la streptavidine du côté *cis* ou *trans*, cette dernière pourrait très bien se trouver enfouie de 8 à 16Å dans la bicouche lipidique (Katayama *et al.*, 2008). Si les bicouches ont été produites avec de l'hexadécane, il implique que l'épaisseur finale de la bicouche sera d'environ 25Å (voir section 1.1.1.1). Pour des bicouches lipidiques plus mince (formées avec l'hexadécane ou du squalane par exemple), il est probable que la position pourrait être enfouie plus profondément que prévu.

Il semble également que les dimensions du pore formé soient dépendantes du potentiel membranaire : la vitesse de translocation de molécules (ayant jusqu'à 26 Å de diamètre) à travers le pore augmente lorsque le potentiel membranaire devient plus négatif. Il est suggéré que des potentiels membranaires importants affectent la conformation du pore pour lui permettre de s'élargir (Kienker *et al.*, 2003). Si le potentiel membranaire a cet effet sur la grosseur des pores, alors il n'est pas faux de penser que toutes les positions régissant l'ouverture et la fermeture des pores sont assujetties à de plus grands degrés de liberté. Ainsi, selon le potentiel imposé, qu'il soit de 10 mV, 20 mV ou 50 mV, une section marquée en particulier peut avoir une fluorescence révélant une position de départ différente et un comportement différent lors de l'ouverture ou de la fermeture du canal, sans pour autant affecter le courant qui passe à travers le pore.

4.2.3. Perspectives

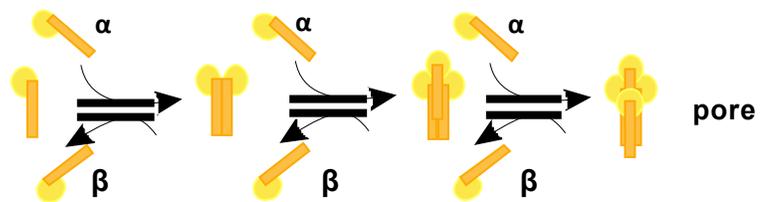
L'intérêt de la colicine Ia réside dans le fait qu'on peut contrôler le « gating » par le potentiel membranaire. Les travaux entrepris dans cette étude devraient être complétés en vérifiant si les résultats observés avec des courtes hyperpolarisations sur K511C sont reproductibles avec K524C. Il faudrait ensuite vérifier si les boucles voisines ($\alpha 5$ - $\alpha 6$, et $\alpha 2$ - $\alpha 3$) peuvent traverser totalement la bicouche lipidique. Il serait également important

d'utiliser une méthode de test par photoblanchiment couplée à la mesure du courant pour vérifier si différents niveaux d'oligomérisation peuvent former un pore fonctionnel. De cette manière, il sera possible de vérifier si les plus basses valeurs de variations de fluorescence ($\Delta F/F = 4 \pm 3\%$, au lieu de près de 20%) sont causées par des oligomères non-mobiles. Nous pourrions corrélérer la fluorescence avec la mesure du courant en trouvant un moyen de connecter électriquement le côté *trans*. Ceci n'est pas une réalisation facile, car le principe de la bicouche supportée est que l'un des côtés est isolé sur une lamelle de verre. On pourrait par exemple tenter d'introduire une chambre interne dans le montage (voir figure 2.2), tracer des canaux dans le verre de la lamelle avec une pointe de diamant pour permettre à la solution expérimentale de rejoindre les pores du côté *trans* et essayer d'enregistrer un courant ionique dans ces conditions. De cette manière, l'oligomérisation pourrait être étudiée en canal unitaire et nous pourrions aussi apprendre si différents niveaux d'oligomérisation permettent la formation d'un pore fonctionnel. Enfin, nous pourrions apprendre comment les distributions des états de photoblanchiment évoluent en fonction du potentiel membranaire. De cette manière, on pourra enregistrer l'effet du potentiel de membrane sur la dynamique d'oligomérisation, et vérifier si l'augmentation du potentiel de membrane permet d'accroître la capacité des toxines à s'assembler en de plus gros oligomères.

Il serait intéressant de vérifier si effectivement la toxine ne peut pas se distribuer entre les deux feuilletts de la bicouche par des expériences de double FRET. En effet, personne ne connaît la conformation du monomère et des autres oligomères fonctionnels (la colicine Ia peut former des hexamères) dans la membrane (Greig *et al.*, 2009). Si des résidus peuvent se localiser près du centre ou encore être distribués entre les deux feuilletts de la bicouche lipidique, cela pourrait augmenter le bruit de fonds des résultats de FRET comme pour la Cry1Aa (Groulx *et al.*, 2010). Il a d'ailleurs été établi que certaines colicines avaient un effet enzymatique dans le milieu intracellulaire. Par exemple, la colicine E3 inhibe la synthèse de protéines (Bowman *et al.*, 1971). Si la colicine Ia peut se distribuer entre les deux feuilletts de la bicouche, alors elle pourrait en plus de perméabiliser la membrane avoir un effet enzymatique sur la cellule (dans le cas d'un monomère non oligomérisé). Pendant que les pores adoptent la conformation selon le modèle du parapluie, certains monomères pourraient se positionner de manière à

permettre à des résidus normalement localisés du côté *cis* de se trouver dans ces conditions du côté *trans*. Cela pourra entre autre expliquer pourquoi nous n'observons qu'une translocation partielle des positions K511 et K524.

Conclusion



5. CONCLUSION

Bien des méthodes permettent d'étudier la structure des toxines comme la cristallographie, la microscopie électronique et confocale, la microscopie à force atomique. Celles-ci vont donner des informations partielles selon la résolution spatiale et temporelle de la technique. Les protéines peuvent être retirées de leur environnement natif pour permettre leur fixation avec un agent chimique lors de l'utilisation de l'une de ces techniques (microscopie électronique ou confocale), ou elles peuvent être endommagées suite au sondage d'un échantillon avec la pointe nanométrique du microscope à force atomique par exemple. La spectroscopie de fluorescence est une méthode biophysique de choix pour étudier *in vivo* le comportement des toxines, ou toute autre protéine membranaire dans leur environnement physiologique ou à tout le moins très voisin de leur environnement physiologique. En plus de permettre de recueillir des renseignements spatiaux précis sur leur conformation, cette méthode limite les dommages causés au matériel biologique. Nous avons adapté la technique de FRET pour pouvoir étudier les variations de fluorescence provenant d'une position en particulier d'une toxine formeuse de pores par rapport à l'un ou l'autre des feuilletts d'une bicouche lipidique planaire, dans le but d'en apprendre plus sur les mécanismes moléculaires dynamiques responsables de la formation des pores.

Dans un premier temps, nos recherches nous ont amené à étudier le pesticide biologique Cry1Aa. Nous voulions vérifier à l'aide du FRET un modèle populaire de formation des pores. Le modèle du parapluie prédit que les hélices $\alpha 4$ - $\alpha 5$ du domaine formeur de pores vont traverser la bicouche lipidique suite à l'association à la membrane du côté *cis* en tétramère de la toxine (Schwartz *et al.*, 1997a; Gazit *et al.*, 1998; Vie *et al.*, 2001). Selon nos résultats, la toxine semble avoir subi des changements de conformations majeures une fois insérée à la membrane pour permettre à tout le domaine formeur de pores de se positionner du côté *trans* dans sa forme non conductrice. La formation du pore provoque le transport de la boucle $\alpha 3$ - $\alpha 4$ du côté *cis* avant que toute forme de courant n'apparaisse. Ainsi, nous avons proposé un modèle de formation de pore qui s'apparenterait au modèle inverse du parapluie. L'hélice $\alpha 4$ est bel et bien partie intégrante du pore, mais par contre l'hélice $\alpha 5$ est moins susceptible de traverser la

bicouche lipidique. Par ailleurs, nos mesures de double FRET ont mis en évidence une population de toxine distribuée aux deux feuillets de la bicouche lipidique. Nos expériences de photoblanchiment en bicouche supportée ont permis de conclure que la toxine pouvait s'assembler en 4 sous unités à la membrane lipidique. Les populations d'oligomères ont évolué selon la concentration de toxines utilisée vers une distribution binomiale de degré 4, indiquant ainsi que le tétramère représente le niveau d'oligomérisation le plus probable. De plus, en nous basant sur l'évolution de l'oligomérisation de la toxine utilisée, nous avons pu fortement suggérer que la toxine s'assemblait après s'être liée à la membrane lipidique, et non avant comme le font généralement les toxines ayant une activité cytotoxique.

En dernier lieu, nous avons utilisé la technique de FRET dans le but d'étudier les mouvements produits lors du « gating » de la colicine Ia et ainsi valider le modèle du parapluie attribué à cette toxine. La toxine s'assemble en effet du côté *cis* comme le prédit le modèle. Des mouvements des positions K511C et K524C associés à l'ouverture et à la fermeture du canal ont également pu être observés et il s'avère que ceux-ci sont en toute vraisemblance en phase avec l'ouverture et la fermeture du canal. Des études électrophysiologiques de plus de 30 ans proposaient d'ailleurs qu'il était possible que l'ouverture du canal soit biphasique. Les mesures de fluorescence caractéristiques des boucles mobiles produites par ces tests corroborent ces hypothèses. Toutefois, les positions étudiées n'ont pas traversé totalement la bicouche lipidique tel que suggéré par Qui *et al.*, une étude plus approfondie des mouvements des boucles voisines sont nécessaires afin d'établir avec plus de précision ce qui se passe lors de l'ouverture et de la fermeture des pores.

Parce que les toxines ne conservent pas leur structure cristalline, elles sont des complexes protéiques très difficiles à étudier. Nous avons pu d'ailleurs nous rendre compte au cours de nos recherches que non seulement une conformation peut être attribuable à leur fonction, mais encore, différentes conformations à partir de là peuvent être envisageables selon leur environnement (présence de récepteurs, niveau d'oligomérisation, épaisseur de la bicouche lipidique...). Or, ces comportements ne peuvent être observés en électrophysiologie, ou en AFM et encore moins en microscopie

confocale, électronique ou conventionnelle. La spectroscopie de fluorescence est une approche complémentaire. Par exemple, certains groupes pensent que la toxine Cry1Aa agit selon le modèle du parapluie du côté externe pour former des pores. D'autres pensent que la toxine s'enfouit dans la bicouche et il serait possible qu'elle ait un effet enzymatique à l'intérieur de la cellule. Nous établissons grâce aux observations de la spectroscopie de fluorescence que la toxine suit le modèle du parapluie, inversé, pour permettre au domaine formeur de pore entier de s'enfouir dans la bicouche lipidique et ainsi avoir accès au côté intracellulaire. De cette manière, une population de toxine est présente des deux côtés de la membrane lipidique, ce qui suggère qu'elle joue un rôle aussi dans cette conformation (rôle qui reste à confirmer).

Beaucoup de travail reste cependant à faire tant dans l'étude de la compréhension des mécanismes de formation des pores que dans le raffinement de la technique de FRET utilisée. Le but recherché serait de pouvoir déterminer avec précision la localisation dans le temps de toute position marquée. Le double FRET offre des avenues intéressantes surtout en ce qui concerne les mouvements des toxines entre les deux feuilletts de la bicouche lipidique. Du point de vue biochimique, il faudrait penser aux développements de différents types d'accepteurs membranaires qui changeraient moins les propriétés de la membrane lipidique. Les sondes de type ANEP sont des composés lipidiques fluorescents qui se logent dans la membrane lipidique. Il serait très intéressant de pouvoir développer ce type de sonde, mais en tant qu'absorbeur. De cette manière la polarisation de la membrane ne serait plus un facteur pour imposer la position de l'absorbeur. De plus, il faudrait réussir à calibrer la technique du FRET avec le DPA de telle manière à pouvoir associer une position entre les deux bicouches et le potentiel membranaire étudié. Plusieurs protéines membranaires stables et statiques dans la membrane lipidique (le PA de l'anthrax, par exemple) peuvent être utilisées pour établir cette calibration. Il faudrait tout d'abord utiliser un canal ionique bien connu dont la structure cristalline dans la membrane a bien été étudiée (résolutions de moins de 2 Å, idéalement). Ensuite on marque différentes positions en fonction de la position extérieure du canal, et on étudie le signal de fluorescence d'un fluorophore qui serait à cette position et qui interagirait avec le DPA dans la membrane. En scannant le canal de cette

manière on peut établir une gamme de signaux stables qui nous renseigneraient sur l'amplitude du signal de fluorescence attendu pour différentes positions enfouies dans la bicouche. Bien sûr ce travail peut être fait également en marquant deux positions différentes du canal et voir en double FRET l'effet de la distribution des donneurs à différentes position dans la membrane sur le signal de fluorescence.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abrami, L., M. Fivaz, and F. G. van der Goot. 2000. Surface dynamics of aerolysin on the plasma membrane of living cells. *Int. J. Med. Microbiol.* 290:363-367.
2. Abrami, L., N. Reig, and F. G. van der Goot. 2005. Anthrax toxin: the long and winding road that leads to the kill. *Trends Microbiol.* 13:72-78.
3. Adkins, H. J., D. L. Miller, and A. E. Johnson. 1983. Changes in aminoacyl transfer ribonucleic acid conformation upon association with elongation factor Tu-guanosine 5'-triphosphate. fluorescence studies of ternary complex conformation and topology. *Biochemistry* 22:1208-1217.
4. Akiba, T., Y. Abe, S. Kitada, Y. Kusaka, A. Ito, T. Ichimatsu, H. Katayama, T. Akao, K. Higuchi, E. Mizuki, M. Ohba, R. Kanai, and K. Harata. 2009. Crystal structure of the parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* toxin that recognizes cancer cells. *J. Mol. Biol.* 386:121-133.
5. Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2011. *Biologie moléculaire de la cellule.*
6. Alouf, J. and J. Freer. 2006. *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins.* academic press, San Diego.
7. Alzate, O., C. F. Hemann, C. Osorio, R. Hille, and D. H. Dean. 2009. Ser170 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin becomes anchored in a hydrophobic moiety upon insertion of this protein into *Manduca sexta* brush border membranes. *BMC. Biochem.* 10:25.
8. Anderson, D. S. and R. O. Blaustein. 2008. Preventing voltage-dependent gating of anthrax toxin channels using engineered disulfides. *J. Gen. Physiol* 132:351-360.
9. Aronson, A. I., D. Wu, and C. Zhang. 1995. Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. *J. Bacteriol.* 177:4059-4065.
10. Aronson, A. I., C. Geng, and L. Wu. 1999. Aggregation of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins upon binding to target insect larval midgut vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2503-2507.

11. Aronson, A. I. and Y. Shai. 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol. Lett.* 195:1-8.
12. Bah, A., F. K. van, R. Brousseau, and L. Masson. 2004. The *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin: effects of trypsin and chymotrypsin site mutations on toxicity and stability. *J. Invertebr. Pathol.* 85:120-127.
13. Bayley, H., L. Jayasinghe, and M. Wallace. 2005. Preparing for a breakthrough. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12:385-386.
14. Bell, C. E., P. H. Poon, V. N. Schumaker, and D. Eisenberg. 1997. Oligomerization of a 45 kilodalton fragment of diphtheria toxin at pH 5.0 to a molecule of 20-24 subunits. *Biochemistry* 36:15201-15207.
15. Benson, E. L., P. D. Huynh, A. Finkelstein, and R. J. Collier. 1998. Identification of residues lining the anthrax protective antigen channel. *Biochemistry* 37:3941-3948.
16. Blaustein, R. O., T. M. Koehler, R. J. Collier, and A. Finkelstein. 1989. Anthrax toxin: channel-forming activity of protective antigen in planar phospholipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86:2209-2213.
17. Blunck, R., D. M. Starace, A. M. Correa, and F. Bezanilla. 2004. Detecting rearrangements of shaker and NaChBac in real-time with fluorescence spectroscopy in patch-clamped mammalian cells. *Biophys. J.* 86:3966-3980.
18. Blunck, R., J. F. Cordero-Morales, L. G. Cuello, E. Perozo, and F. Bezanilla. 2006. Detection of the opening of the bundle crossing in KcsA with fluorescence lifetime spectroscopy reveals the existence of two gates for ion conduction. *J. Gen. Physiol* 128:569-581.
19. Blunck, R., H. McGuire, H. C. Hyde, and F. Bezanilla. 2008. Fluorescence detection of the movement of single KcsA subunits reveals cooperativity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105:20263-20268.
20. Boonserm, P., P. Davis, D. J. Ellar, and J. Li. 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J. Mol. Biol.* 348:363-382.

21. Bowman, C. M., J. E. Dahlberg, T. Ikemura, J. Konisky, and M. Nomura. 1971. Specific inactivation of 16S ribosomal RNA induced by colicin E3 in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 68:964-968.
22. Bravo, A., S. S. Gill, and M. Soberon. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49:423-435.
23. Bravo, A., S. Likitvivatanavong, S. S. Gill, and M. Soberon. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41:423-431.
24. Bruggemann, E. P. and C. Kayalar. 1986. Determination of the molecularity of the colicin E1 channel by stopped-flow ion flux kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83:4273-4276.
25. Bulla, L. A., Jr., D. B. Bechtel, K. J. Kramer, Y. I. Shethna, A. I. Aronson, and P. C. Fitz-James. 1980. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *Crit Rev. Microbiol.* 8:147-204.
26. Bullen, A. and P. Saggau. 1999. High-speed, random-access fluorescence microscopy: II. Fast quantitative measurements with voltage-sensitive dyes. *Biophys. J.* 76:2272-2287.
27. Cao, Z. and P. E. Klebba. 2002. Mechanisms of colicin binding and transport through outer membrane porins. *Biochimie* 84:399-412.
28. Carroll, J. and D. J. Ellar. 1993. An analysis of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin action on insect-midgut-membrane permeability using a light-scattering assay. *Eur. J. Biochem.* 214:771-778.
29. Carroll, J. and D. J. Ellar. 1997. Analysis of the large aqueous pores produced by a *Bacillus thuringiensis* protein insecticide in *Manduca sexta* midgut-brush-border-membrane vesicles. *Eur. J. Biochem.* 245:797-804.
30. Cascales, E., S. K. Buchanan, D. Duche, C. Kleanthous, R. Lloubes, K. Postle, M. Riley, S. Slatin, and D. Cavard. 2007. Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71:158-229.
31. Cha, A. and F. Bezanilla. 1998. Structural implications of fluorescence quenching in the Shaker K⁺ channel. *J. Gen. Physiol* 112:391-408.

32. Chanda, B., O. K. Asamoah, R. Blunck, B. Roux, and F. Bezanilla. 2005. Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement. *Nature* 436:852-856.
33. Chanda, B., R. Blunck, L. C. Faria, F. E. Schweizer, I. Mody, and F. Bezanilla. 2005. A hybrid approach to measuring electrical activity in genetically specified neurons. *Nat. Neurosci.* 8:1619-1626.
34. Cohen, S., O. Dym, S. Albeck, E. Ben-Dov, R. Cahan, M. Firer, and A. Zaritsky. 2008. High-resolution crystal structure of activated Cyt2Ba monomer from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Mol. Biol.* 380:820-827.
35. Constantinescu, I. and M. Lafleur. 2004. Influence of the lipid composition on the kinetics of concerted insertion and folding of melittin in bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1667:26-37.
36. Cordero-Morales, J. F., L. G. Cuello, Y. Zhao, V. Jogini, D. M. Cortes, B. Roux, and E. Perozo. 2006. Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:311-318.
37. Coux, F., V. Vachon, C. Rang, K. Moozar, L. Masson, M. Royer, M. Bes, S. Rivest, R. Brousseau, J. L. Schwartz, R. Laprade, and R. Frutos. 2001. Role of interdomain salt bridges in the pore-forming ability of the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac. *J. Biol. Chem.* 276:35546-35551.
38. Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, R. J. Van, D. Lereclus, J. Baum, and D. H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813.
39. Crowley, K. S., G. D. Reinhart, and A. E. Johnson. 1993. The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a noncytoplasmic aqueous environment at the ER membrane early in translocation. *Cell* 73:1101-1115.
40. Cummings, C. E., G. Armstrong, T. C. Hodgman, and D. J. Ellar. 1994. Structural and functional studies of a synthetic peptide mimicking a proposed membrane inserting region of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Mol. Membr. Biol.* 11:87-92.
41. Cunningham, K., D. B. Lacy, J. Mogridge, and R. J. Collier. 2002. Mapping the lethal factor and edema factor binding sites on oligomeric anthrax protective antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:7049-7053.

42. Dal, M. F., F. Tonello, D. Ladant, I. Zornetta, I. Zamparo, B. G. Di, M. Zaccolo, and C. Montecucco. 2006. Cell entry and cAMP imaging of anthrax edema toxin. *EMBO J.* 25:5405-5413.
43. Davidson, V. L., K. R. Brunden, W. A. Cramer, and F. S. Cohen. 1984. Studies on the mechanism of action of channel-forming colicins using artificial membranes. *J. Membr. Biol.* 79:105-118.
44. de Maagd, R. A., K. H. van der, P. L. Bakker, W. J. Stiekema, and D. Bosch. 1996. Different domains of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins can bind to insect midgut membrane proteins on ligand blots. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2753-2757.
45. de Maagd, R. A., A. Bravo, and N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* 17:193-199.
46. Dennis, R. D., H. Wiegandt, D. Haustein, B. H. Knowles, and D. J. Ellar. 1986. Thin layer chromatography overlay technique in the analysis of the binding of the solubilized protoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* to an insect glycosphingolipid of known structure. *Biomed. Chromatogr.* 1:31-37.
47. Duche, D., M. W. Parker, J. M. Gonzalez-Manas, F. Pattus, and D. Baty. 1994. Uncoupled steps of the colicin A pore formation demonstrated by disulfide bond engineering. *J. Biol. Chem.* 269:6332-6339.
48. Duesbery, N. S., C. P. Webb, S. H. Leppla, V. M. Gordon, K. R. Klimpel, T. D. Copeland, N. G. Ahn, M. K. Oskarsson, K. Fukasawa, K. D. Paull, and G. F. Vande Woude. 1998. Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science* 280:734-737.
49. Eckert, R., D. Randall, and G. Augustine. 1988. *Animal Physiology*.
50. Eggeling, C., J. Widengren, R. Rigler, and C. A. M. Seidel. 1998. Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single-molecule detection: Evidence of two-step photolysis. *Analytical Chemistry* 70:2651-2659.
51. English, L., H. L. Robbins, M. A. Von Tersch, C. A. Kulesza, D. Ave, D. Coyle, C. S. Jany, and S. L. Slatin. 1994. Mode of action of CryIIA: a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 24:1025-1035.

52. Escherich, T. 1989. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. 1885. *Rev. Infect. Dis.* 11:352-356.
53. Fasanella, A., D. Galante, G. Garofolo, and M. H. Jones. 2010. Anthrax undervalued zoonosis. *Vet. Microbiol.* 140:318-331.
54. Feld, G. K., K. L. Thoren, A. F. Kintzer, H. J. Sterling, I. I. Tang, S. G. Greenberg, E. R. Williams, and B. A. Krantz. 2010. Structural basis for the unfolding of anthrax lethal factor by protective antigen oligomers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17:1383-1390.
55. Feng, Q. and W. J. Becktel. 1994. pH-induced conformational transitions of Cry IA(a), Cry IA(c), and Cry IIIA delta-endotoxins in *Bacillus thuringiensis*. *Biochemistry* 33:8521-8526.
56. Fernandez, J. M., R. E. Taylor, and F. Bezanilla. 1983. Induced capacitance in the squid giant axon. Lipophilic ion displacement currents. *J. Gen. Physiol* 82:331-346.
57. Finkelstein, A. 1985. The ubiquitous presence of channels with wide lumens and their gating by voltage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 456:26-32.
58. Finkelstein, A. 1990. Channels formed in phospholipid bilayer membranes by diphtheria, tetanus, botulinum and anthrax toxin. *J. Physiol (Paris)* 84:188-190.
59. Fluhler, E., V. G. Burnham, and L. M. Loew. 1985. Spectra, membrane binding, and potentiometric responses of new charge shift probes. *Biochemistry* 24:5749-5755.
60. Fredericq, P. and M. Levine. 1947. Antibiotic interrelationships among the enteric group of bacteria. *J. Bacteriol.* 54:785-792.
61. Gazit, E. and Y. Shai. 1995. The assembly and organization of the alpha 5 and alpha 7 helices from the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. Relevance to a functional model. *J. Biol. Chem.* 270:2571-2578.
62. Gazit, E., R. P. La, M. S. Sansom, and Y. Shai. 1998. The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin are consistent with an "umbrella-like" structure of the pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:12289-12294.

63. Geny, B. and M. R. Popoff. 2006. Bacterial protein toxins and lipids: pore formation or toxin entry into cells. *Biol. Cell* 98:667-678.
64. Gerber, D. and Y. Shai. 2000. Insertion and organization within membranes of the delta-endotoxin pore-forming domain, helix 4-loop-helix 5, and inhibition of its activity by a mutant helix 4 peptide. *J. Biol. Chem.* 275:23602-23607.
65. Gilbert, R. J. 2005. Inactivation and activity of cholesterol-dependent cytolysins: what structural studies tell us. *Structure.* 13:1097-1106.
66. Girard, F., V. Vachon, G. Prefontaine, L. Marceau, Y. Su, G. Larouche, C. Vincent, J. L. Schwartz, L. Masson, and R. Laprade. 2008. Cysteine scanning mutagenesis of alpha4, a putative pore-lining helix of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:2565-2572.
67. Girard, F., V. Vachon, G. Lebel, G. Prefontaine, J. L. Schwartz, L. Masson, and R. Laprade. 2009. Chemical modification of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin single-cysteine mutants reveals the importance of domain I structural elements in the mechanism of pore formation. *Biochim. Biophys. Acta* 1788:575-580.
68. Girard, F., V. Vachon, G. Prefontaine, L. Marceau, J. L. Schwartz, L. Masson, and R. Laprade. 2009. Helix alpha 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin plays a critical role in the postbinding steps of pore formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:359-365.
69. Gobley, T. 1874. Sur la lécithine et la cérébrine. *Journal de Pharmacie* t20:98-103.
70. Gomez, I., J. Sanchez, R. Miranda, A. Bravo, and M. Soberon. 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* 513:242-246.
71. Gonzalez, J. E. and R. Y. Tsien. 1995. Voltage sensing by fluorescence resonance energy transfer in single cells. *Biophys. J.* 69:1272-1280.
72. Gonzalez, M. R., M. Bischofberger, L. Pernot, F. G. van der Goot, and B. Freche. 2008. Bacterial pore-forming toxins: the (w)hole story? *Cell Mol. Life Sci.* 65:493-507.
73. Gould, J. M. and W. A. Cramer. 1977. Studies on the depolarization of the *Escherichia coli* cell membrane by colicin E1. *J. Biol. Chem.* 252:5491-5497.

74. Greig, S. L., M. Radjainia, and A. K. Mitra. 2009. Oligomeric structure of colicin ia channel in lipid bilayer membranes. *J. Biol. Chem.* 284:16126-16134.
75. Griffiths, D. J. 2004. Introduction to Quantum Mechanics.
76. Grochulski, P., L. Masson, S. Borisova, M. Pusztai-Carey, J. L. Schwartz, R. Brousseau, and M. Cygler. 1995. Bacillus thuringiensis CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* 254:447-464.
77. Groulx, N., M. Juteau, and R. Blunck. 2010. Rapid topology probing using fluorescence spectroscopy in planar lipid bilayer: the pore-forming mechanism of the toxin Cry1Aa of Bacillus thuringiensis. *J. Gen. Physiol* 136:497-513.
78. Groulx, N., H. McGuire, R. Laprade, J. L. Schwartz, and R. Blunck. 2011. Single molecule fluorescence study of the B. thuringiensis toxin Cry1Aa reveals tetramerization. *J. Biol. Chem.*
79. Guereca, L. and A. Bravo. 1999. The oligomeric state of Bacillus thuringiensis Cry toxins in solution. *Biochim. Biophys. Acta* 1429:342-350.
80. Hac-Wydro, K., A. Zajac, and P. Dynarowicz-Latka. 2011. The influence of plant stanol on phospholipids monolayers - The effect of phospholipid structure. *J. Colloid Interface Sci.* 360:681-689.
81. Haider, M. Z. and D. J. Ellar. 1989. Mechanism of action of Bacillus thuringiensis insecticidal delta-endotoxin: interaction with phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 978:216-222.
82. Hanai, T., D. A. Haydon, and J. Taylor. 1965. The variation of capacitance and conductance of bimolecular lipid membranes with area. *J. Theor. Biol.* 9:433-443.
83. Harkness, R. E. and V. Braun. 1990. In vitro peptidoglycan synthesis by envelopes from Escherichia coli tolM mutants is inhibited by colicin M. *J. Bacteriol.* 172:498-500.
84. Hayashibara, M. and E. London. 2005. Topography of diphtheria toxin A chain inserted into lipid vesicles. *Biochemistry* 44:2183-2196.
85. Henn, F. A. and T. E. Thompson. 1968. Properties of lipid bilayer membranes separating two aqueous phases: composition studies. *J. Mol. Biol.* 31:227-235.

86. Henn, F. A. and T. E. Thompson. 1969. Synthetic lipid bilayer membranes. *Annu. Rev. Biochem.* 38:241-262.
87. Herman, B. 2002. Fluorescence microscopy. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 4:Unit.
88. Heuck, A. P. and A. E. Johnson. 2002. Pore-forming protein structure analysis in membranes using multiple independent fluorescence techniques. *Cell Biochem. Biophys.* 36:89-101.
89. Hodgkin, A. L., A. F. HUXLEY, and B. KATZ. 1952. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. *J. Physiol* 116:424-448.
90. Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol* 117:500-544.
91. Hofte, H. and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53:242-255.
92. Hossain, D. M., Y. Shitomi, K. Moriyama, M. Higuchi, T. Hayakawa, T. Mitsui, R. Sato, and H. Hori. 2004. Characterization of a novel plasma membrane protein, expressed in the midgut epithelia of *Bombyx mori*, that binds to CryIA toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4604-4612.
93. Housden, N. G., S. R. Loftus, G. R. Moore, R. James, and C. Kleanthous. 2005. Cell entry mechanism of enzymatic bacterial colicins: porin recruitment and the thermodynamics of receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102:13849-13854.
94. Hugh-Jones, M. E. and V. de, V. 2002. Anthrax and wildlife. *Rev. Sci. Tech.* 21:359-383.
95. Iacovache, I., P. Paumard, H. Scheib, C. Lesieur, N. Sakai, S. Matile, M. W. Parker, and F. G. van der Goot. 2006. A rivet model for channel formation by aerolysin-like pore-forming toxins. *EMBO J.* 25:457-466.
96. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). 1978. Nomenclature of lipids. *Biochem. J.* 171:21-35.

97. Jakes, K. S., P. K. Kienker, and A. Finkelstein. 1999. Channel-forming colicins: translocation (and other deviant behaviour) associated with colicin Ia channel gating. *Q. Rev. Biophys.* 32:189-205.
98. Janowiak, B. E., A. Finkelstein, and R. J. Collier. 2009. An approach to characterizing single-subunit mutations in multimeric prepores and pores of anthrax protective antigen. *Protein Sci.* 18:348-358.
99. Janowiak, B. E., A. Fischer, and R. J. Collier. 2010. Effects of introducing a single charged residue into the phenylalanine clamp of multimeric anthrax protective antigen. *J. Biol. Chem.* 285:8130-8137.
100. Ji, W., P. Xu, Z. Li, J. Lu, L. Liu, Y. Zhan, Y. Chen, B. Hille, T. Xu, and L. Chen. 2008. Functional stoichiometry of the unitary calcium-release-activated calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105:13668-13673.
101. Johnson, A. E. 2005. Fluorescence approaches for determining protein conformations, interactions and mechanisms at membranes. *Traffic.* 6:1078-1092.
102. Jurat-Fuentes, J. L. and M. J. Adang. 2004. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur. J. Biochem.* 271:3127-3135.
103. Kachel, K., J. Ren, R. J. Collier, and E. London. 1998. Identifying transmembrane states and defining the membrane insertion boundaries of hydrophobic helices in membrane-inserted diphtheria toxin T domain. *J. Biol. Chem.* 273:22950-22956.
104. Karen S.Jakes, Paul K.Kienker, and Alan Finkelstein. 1999. Channel-forming colicins : translocation (and other deviant behaviour) associated with colicin Ia channel gating). *Quarterly Reviews of Biophysics* 32:189-205.
105. Karlin, A. and M. H. Akabas. 1998. Substituted-cysteine accessibility method. *Methods Enzymol.* 293:123-145.
106. Katayama, H., B. E. Janowiak, M. Brzozowski, J. Juryck, S. Falke, E. P. Gogol, R. J. Collier, and M. T. Fisher. 2008. GroEL as a molecular scaffold for structural analysis of the anthrax toxin pore. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15:754-760.

107. Katayama, H., J. Wang, F. Tama, L. Chollet, E. P. Gogol, R. J. Collier, and M. T. Fisher. 2010. Three-dimensional structure of the anthrax toxin pore inserted into lipid nanodiscs and lipid vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107:3453-3457.
108. Kerr, I. D., R. Sankararamakrishnan, O. S. Smart, and M. S. Sansom. 1994. Parallel helix bundles and ion channels: molecular modeling via simulated annealing and restrained molecular dynamics. *Biophys. J.* 67:1501-1515.
109. Kienker, P. K., K. S. Jakes, R. O. Blaustein, C. Miller, and A. Finkelstein. 2003. Sizing the protein translocation pathway of colicin Ia channels. *J. Gen. Physiol* 122:161-176.
110. Kienker, P. K., K. S. Jakes, and A. Finkelstein. 2008. Identification of channel-lining amino acid residues in the hydrophobic segment of colicin Ia. *J. Gen. Physiol* 132:693-707.
111. Kintzer, A. F., K. L. Thoren, H. J. Sterling, K. C. Dong, G. K. Feld, I. I. Tang, T. T. Zhang, E. R. Williams, J. M. Berger, and B. A. Krantz. 2009. The protective antigen component of anthrax toxin forms functional octameric complexes. *J. Mol. Biol.* 392:614-629.
112. Kintzer, A. F., H. J. Sterling, I. I. Tang, E. R. Williams, and B. A. Krantz. 2010. Anthrax toxin receptor drives protective antigen oligomerization and stabilizes the heptameric and octameric oligomer by a similar mechanism. *PLoS. One.* 5:e13888.
113. Kleanthous, C. 2010. Swimming against the tide: progress and challenges in our understanding of colicin translocation. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:843-848.
114. Klimpel, K. R., S. S. Molloy, G. Thomas, and S. H. Leppla. 1992. Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:10277-10281.
115. Knight, P. J., N. Crickmore, and D. J. Ellar. 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* 11:429-436.
116. Knowles, B. H. and D. J. Ellar. 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins with different insect specificity. *Biochim. Biophys.* 924:509-518.

117. Knowles, B. H. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal d-endotoxin. *Adv. Insect Physiol.* 24:275-308.
118. Koch, R. 1876. In: Cohn, F. (Ed.), *Beitrage zur Biologie der Pflanzen*. Bresleau.
119. Krasilnikov, O. V., J. B. Da Cruz, L. N. Yuldasheva, W. A. Varanda, and R. A. Nogueira. 1998. A novel approach to study the geometry of the water lumen of ion channels: colicin Ia channels in planar lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* 161:83-92.
120. Kumar, P. A., R. P. Sharma, and V. S. Malik. 1996. The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Adv. Appl. Microbiol.* 42:1-43.
121. Kusumi, A. and K. Suzuki. 2005. Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1746:234-251.
122. Laflamme, E., A. Badia, M. Lafleur, J. L. Schwartz, and R. Laprade. 2008. Atomic force microscopy imaging of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins interacting with insect midgut apical membranes. *J. Membr. Biol.* 222:127-139.
123. Lakey, J. H., D. Baty, and F. Pattus. 1991. Fluorescence energy transfer distance measurements using site-directed single cysteine mutants. The membrane insertion of colicin A. *J. Mol. Biol.* 218:639-653.
124. Lakey, J. H., J. M. Gonzalez-Manas, F. G. van der Goot, and F. Pattus. 1992. The membrane insertion of colicins. *FEBS Lett.* 307:26-29.
125. Lakey, J. H., D. Duche, J. M. Gonzalez-Manas, D. Baty, and F. Pattus. 1993. Fluorescence energy transfer distance measurements. The hydrophobic helical hairpin of colicin A in the membrane bound state. *J. Mol. Biol.* 230:1055-1067.
126. Lakowicz, J. R. 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*.
127. Latorre, R., C. Vergara, and C. Hidalgo. 1982. Reconstitution in planar lipid bilayers of a Ca²⁺-dependent K⁺ channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 79:805-809.
128. Laurent Héliot. 2006. *Base de la microscopie confocale*. Institut de recherche interdisciplinaire, Bordeaux. 1-25.

129. Lebel, G., V. Vachon, G. Prefontaine, F. Girard, L. Masson, M. Juteau, A. Bah, G. Larouche, C. Vincent, R. Laprade, and J. L. Schwartz. 2009. Mutations in domain I interhelical loops affect the rate of pore formation by the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin in insect midgut brush border membrane vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:3842-3850.
130. Lee, M. K., R. E. Milne, A. Z. Ge, and D. H. Dean. 1992. Location of a *Bombyx mori* receptor binding region on a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *J. Biol. Chem.* 267:3115-3121.
131. Lee, M. K., B. A. Young, and D. H. Dean. 1995. Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216:306-312.
132. Leitmannova, A. O. 2003. Planar lipid bilayers (BLMs) and their applications.
133. LeMasurier, M., L. Heginbotham, and C. Miller. 2001. KcsA: it's a potassium channel. *J. Gen. Physiol.* 118:303-314.
134. Leppla, S. H. 1982. Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 79:3162-3166.
135. Leppla, S. H. 1984. *Bacillus anthracis* calmodulin-dependent adenylate cyclase: chemical and enzymatic properties and interactions with eucaryotic cells. *Adv. Cyclic. Nucleotide. Protein Phosphorylation. Res.* 17:189-198.
136. Li, J. D., J. Carroll, and D. J. Ellar. 1991. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353:815-821.
137. Likitvivanavong, S., G. Katzenmeier, and C. Angsuthanasombat. 2006. Asn183 in alpha5 is essential for oligomerisation and toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin. *Arch. Biochem. Biophys.* 445:46-55.
138. Lindeberg, M., S. D. Zakharov, and W. A. Cramer. 2000. Unfolding pathway of the colicin E1 channel protein on a membrane surface. *J. Mol. Biol.* 295:679-692.
139. Lipowsky, R. and E. Sackmann. 1995. Handbook of biological physics.
140. Liu, C. Q., S. D. Nuttall, H. Tran, M. Wilkins, V. A. Streltsov, and M. R. Alderton. 2008. Construction, crystal structure and application of a recombinant

- protein that lacks the collagen-like region of BclA from *Bacillus anthracis* spores. *Biotechnology and Bioengineering* 99:774-782.
141. Loew, L. M., L. B. Cohen, J. Dix, E. N. Fluhler, V. Montana, G. Salama, and J. Y. Wu. 1992. A naphthyl analog of the aminostyryl pyridinium class of potentiometric membrane dyes shows consistent sensitivity in a variety of tissue, cell, and model membrane preparations. *J. Membr. Biol.* 130:1-10.
 142. Lorence, A., A. Darszon, C. Diaz, A. Lievano, R. Quintero, and A. Bravo. 1995. Delta-endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* 360:217-222.
 143. Ludtke, S. J., K. He, W. T. Heller, T. A. Harroun, L. Yang, and H. W. Huang. 1996. Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry* 35:13723-13728.
 144. Lundbaek, J. A., S. A. Collingwood, H. I. Ingolfsson, R. Kapoor, and O. S. Andersen. 2010. Lipid bilayer regulation of membrane protein function: gramicidin channels as molecular force probes. *J. R. Soc. Interface* 7:373-395.
 145. Luo, W., X. Yao, and M. Hong. 2005. Large structure rearrangement of colicin ia channel domain after membrane binding from 2D ¹³C spin diffusion NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 127:6402-6408.
 146. Martin-Killias, P., N. Stefan, S. Rothschild, A. Pluckthun, and U. Zangemeister-Wittke. 2010. A Novel Fusion Toxin Derived from an EpCAM-specific Designed Ankyrin Repeat Protein has Potent Anti-tumor Activity. *Clin. Cancer Res.*
 147. Martin, F. G. and M. G. Wolfersberger. 1995. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and larval *Manduca sexta* midgut brush-border membrane vesicles act synergistically to cause very large increases in the conductance of planar lipid bilayers. *J. Exp. Biol.* 198:91-96.
 148. Masson, L., P. Marcotte, G. Prefontaine, and R. Brousseau. 1989. Nucleotide sequence of a gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subspecies *entomocidus* coding for an insecticidal protein toxic for *Bombyx mori*. *Nucleic Acids Res.* 17:446.
 149. Masson, L., G. Prefontaine, L. Peloquin, P. C. Lau, and R. Brousseau. 1990. Comparative analysis of the individual protoxin components in P1 crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* isolates NRD-12 and HD-1. *Biochem. J.* 269:507-512.

150. Masson, L., A. Mazza, L. Gringorten, D. Baines, V. Aneliunas, and R. Brousseau. 1994. Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins is highly dependent on the bioassay system. *Mol. Microbiol.* 14:851-860.
151. Masson, L., B. E. Tabashnik, Y. B. Liu, R. Brousseau, and J. L. Schwartz. 1999. Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin lines the lumen of the ion channel. *J. Biol. Chem.* 274:31996-32000.
152. Masson, L., A. Mazza, S. Sangadala, M. J. Adang, and R. Brousseau. 2002. Polydispersity of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins in solution and its effect on receptor binding kinetics. *Biochim. Biophys. Acta* 1594:266-275.
153. Mattheyses, A. L., S. M. Simon, and J. Z. Rappoport. 2010. Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist. *J. Cell Sci.* 123:3621-3628.
154. McGuire, H. and R. Blunck. 2009. [Single-channel fluorescence spectroscopy to study conformational changes of ion channels]. *Med. Sci. (Paris)* 25:951-954.
155. Mel, S. F. and R. M. Stroud. 1993. Colicin Ia inserts into negatively charged membranes at low pH with a tertiary but little secondary structural change. *Biochemistry* 32:2082-2089.
156. Mercola, D. A., J. W. Morris, and E. R. Arquilla. 1972. Use of resonance interaction in the study of the chain folding of insulin in solution. *Biochemistry* 11:3860-3874.
157. Miller, C. J., J. L. Elliott, and R. J. Collier. 1999. Anthrax protective antigen: prepore-to-pore conversion. *Biochemistry* 38:10432-10441.
158. Milne, J. C., D. Furlong, P. C. Hanna, J. S. Wall, and R. J. Collier. 1994. Anthrax protective antigen forms oligomers during intoxication of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 269:20607-20612.
159. Milne, R. and H. Kaplan. 1993. Purification and characterization of a trypsin-like digestive enzyme from spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) responsible for the activation of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23:663-673.
160. Mizusawa, N. and H. Wada. 2011. The role of lipids in photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta.*

161. Mogridge, J., K. Cunningham, D. B. Lacy, M. Mourez, and R. J. Collier. 2002. The lethal and edema factors of anthrax toxin bind only to oligomeric forms of the protective antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:7045-7048.
162. Molloy, S. S., P. A. Bresnahan, S. H. Leppla, K. R. Klimpel, and G. Thomas. 1992. Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J. Biol. Chem.* 267:16396-16402.
163. Molnard, D. M. and R. A. ALTENBERN. 1963. Alterations in the biological activity of protective antigen of bacillus anthracis toxin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 114:294-297.
164. Montecucco, C., F. Tonello, and G. Zanotti. 2004. Stop the killer: how to inhibit the anthrax lethal factor metalloprotease. *Trends Biochem. Sci.* 29:282-285.
165. Mourez, M., D. B. Lacy, K. Cunningham, R. Legmann, B. R. Sellman, J. Mogridge, and R. J. Collier. 2002. 2001: a year of major advances in anthrax toxin research. *Trends Microbiol.* 10:287-293.
166. Mozsolits, H., H. J. Wirth, J. Werkmeister, and M. I. Aguilar. 2001. Analysis of antimicrobial peptide interactions with hybrid bilayer membrane systems using surface plasmon resonance. *Biochim. Biophys. Acta* 1512:64-76.
167. Mueller, P., D. O. Rudin, H. T. Tien, and W. C. Wescott. 1962. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature* 194:979-980.
168. Mueller, P. and D. O. Rudin. 1963. Induced excitability in reconstituted cell membrane structure. *J. Theor. Biol.* 4:268-280.
169. Nair, M. S. and D. H. Dean. 2008. All domains of Cry1A toxins insert into insect brush border membranes. *J. Biol. Chem.* 283:26324-26331.
170. Nassi, S., R. J. Collier, and A. Finkelstein. 2002. PA63 channel of anthrax toxin: an extended beta-barrel. *Biochemistry* 41:1445-1450.
171. Nersesian, C. L., P. B. Banks, and C. McArthur. 2011. Titrating the cost of plant toxins against predators: determining the tipping point for foraging herbivores. *J. Anim Ecol.* 80:753-760.

172. Nestorovich, E. M., V. A. Karginov, A. M. Berezhkovskii, and S. M. Bezrukov. 2010. Blockage of anthrax PA63 pore by a multicharged high-affinity toxin inhibitor. *Biophys. J.* 99:134-143.
173. Nguyen, T. L. 2004. Three-dimensional model of the pore form of anthrax protective antigen. Structure and biological implications. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 22:253-265.
174. Nogueira, R. A. and W. A. Varanda. 1988. Gating properties of channels formed by Colicin Ia in planar lipid bilayer membranes. *J. Membr. Biol.* 105:143-153.
175. Nolting, B. 1999. Protein Folding Kinetics. Springer.
176. Nolting, B. 2003. Methods in modern biophysics. Springer.
177. Norgren, N. and B. L. G. Jonsson. 2009. The capacitance of the circular parallel plate capacitor obtained by solving the Love integral equation using an analytic expansion of the Kernel. *Progress In Electromagnetics Research* 97:357-372.
178. Ogawa, T., K. Tomita, T. Ueda, K. Watanabe, T. Uozumi, and H. Masaki. 1999. A cytotoxic ribonuclease targeting specific transfer RNA anticodons. *Science* 283:2097-2100.
179. Ogiwara, K., L. S. Indrasith, S. Asano, and H. Hori. 1992. Processing of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 60:121-126.
180. Ounjai, P., V. M. Unger, F. J. Sigworth, and C. Angsuthanasombat. 2007. Two conformational states of the membrane-associated *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba delta-endotoxin complex revealed by electron crystallography: implications for toxin-pore formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361:890-895.
181. Paddock, S. W. 2000. Principles and practices of laser scanning confocal microscopy. *Mol. Biotechnol.* 16:127-149.
182. Padmavathi, P. V. and H. J. Steinhoff. 2008. Conformation of the closed channel state of colicin A in proteoliposomes: an umbrella model. *J. Mol. Biol.* 378:204-214.
183. Pantoja, R., D. Sigg, R. Blunck, F. Bezanilla, and J. R. Heath. 2001. Bilayer reconstitution of voltage-dependent ion channels using a microfabricated silicon chip. *Biophys. J.* 81:2389-2394.

184. Parker, M. W. and F. Pattus. 1993. Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial protein toxins. *Trends Biochem. Sci.* 18:391-395.
185. Parker, M. W., J. T. Buckley, J. P. Postma, A. D. Tucker, K. Leonard, F. Pattus, and D. Tsernoglou. 1994. Structure of the *Aeromonas* toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane-channel states. *Nature* 367:292-295.
186. Parker, M. W. and S. C. Feil. 2005. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 88:91-142.
187. Petosa, C., R. J. Collier, K. R. Klimpel, S. H. Leppla, and R. C. Liddington. 1997. Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature* 385:833-838.
188. Peyronnet, O., V. Vachon, J. L. Schwartz, and R. Laprade. 2000. Ion channel activity from the midgut brush-border membrane of gypsy moth (*Lymantria dispar*) larvae. *J. Exp. Biol.* 203:1835-1844.
189. Peyronnet, O., V. Vachon, J. L. Schwartz, and R. Laprade. 2001. Ion channels induced in planar lipid bilayers by the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa in the presence of gypsy moth (*Lymantria dispar*) brush border membrane. *J. Membr. Biol.* 184:45-54.
190. Peyronnet, O., B. Nieman, F. Genereux, V. Vachon, R. Laprade, and J. L. Schwartz. 2002. Estimation of the radius of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* Cry1C delta-endotoxin in planar lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1567:113-122.
191. Philip R. Bevington and D. Keith Robinson. 1992. Data reduction and error analysis for the physical science. Boston.
192. Pigott, C. R. and D. J. Ellar. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71:255-281.
193. Potvin, L., R. Laprade, and J. L. Schwartz. 1998. Cry1Ac, a *Bacillus thuringiensis* toxin, triggers extracellular Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release from intracellular stores in Cfl cells. *J. Exp. Biol.* 201 (Pt 12):1851-1858.
194. Pozharski, E. V., L. McWilliams, and R. C. MacDonald. 2001. Relationship between turbidity of lipid vesicle suspensions and particle size. *Anal. Biochem.* 291:158-162.

195. Puntheeranurak, T., P. Uawithya, L. Potvin, C. Angsuthanasombat, and J. L. Schwartz. 2004. Ion channels formed in planar lipid bilayers by the dipteran-specific Cry4B *Bacillus thuringiensis* toxin and its alpha1-alpha5 fragment. *Mol. Membr. Biol.* 21:67-74.
196. Puntheeranurak, T., C. Stroh, R. Zhu, C. Angsuthanasombat, and P. Hinterdorfer. 2005. Structure and distribution of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin in lipid membranes. *Ultramicroscopy* 105:115-124.
197. Qa'dan, M., K. A. Christensen, L. Zhang, T. M. Roberts, and R. J. Collier. 2005. Membrane insertion by anthrax protective antigen in cultured cells. *Mol. Cell Biol.* 25:5492-5498.
198. Qiu, X. Q., K. S. Jakes, P. K. Kienker, A. Finkelstein, and S. L. Slatin. 1996. Major transmembrane movement associated with colicin Ia channel gating. *J. Gen. Physiol* 107:313-328.
199. Ramachandran, R., R. K. Tweten, and A. E. Johnson. 2005. The domains of a cholesterol-dependent cytolysin undergo a major FRET-detected rearrangement during pore formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102:7139-7144.
200. Rappolt, M., M. F. Vidal, M. Kriechbaum, M. Steinhart, H. Amenitsch, S. Bernstorff, and P. Laggner. 2003. Structural, dynamic and mechanical properties of POPC at low cholesterol concentration studied in pressure/temperature space. *Eur. Biophys. J.* 31:575-585.
201. Rasnik, I., S. A. McKinney, and T. Ha. 2006. Nonblinking and long-lasting single-molecule fluorescence imaging. *Nat. Methods* 3:891-893.
202. Rausell, C., C. Munoz-Garay, R. Miranda-CassoLuengo, I. Gomez, E. Rudino-Pinera, M. Soberon, and A. Bravo. 2004. Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane-insertion intermediate. *Biochemistry* 43:166-174.
203. Raymond, B., D. Leduc, L. Ravaux, G. R. Le, T. Candela, M. Raymondjean, P. L. Goossens, and L. Touqui. 2007. Edema toxin impairs anthracidal phospholipase A2 expression by alveolar macrophages. *PLoS. Pathog.* 3:e187.
204. Redwood, W. R., F. R. Pfeiffer, J. A. Weisbach, and T. E. Thompson. 1971. Physical properties of bilayer membranes formed from a synthetic saturated phospholipid in n-decane. *Biochim. Biophys. Acta* 233:1-6.

205. Ren, G., J. Quispe, S. H. Leppla, and A. K. Mitra. 2004. Large-scale structural changes accompany binding of lethal factor to anthrax protective antigen: a cryo-electron microscopic study. *Structure*. 12:2059-2066.
206. Ries, R. S., H. Choi, R. Blunck, F. Bezanilla, and J. R. Heath. 2004. Black lipid membranes: visualizing the structure, dynamics, and substrate dependence of membranes. *Journal of Physical Chemistry B* 108:16040-16049.
207. Rosconi, M. P. and E. London. 2002. Topography of helices 5-7 in membrane-inserted diphtheria toxin T domain: identification and insertion boundaries of two hydrophobic sequences that do not form a stable transmembrane hairpin. *J. Biol. Chem.* 277:16517-16527.
208. Rossjohn, J., S. C. Feil, W. J. McKinstry, R. K. Tweten, and M. W. Parker. 1997. Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell* 89:685-692.
209. Rossjohn, J., S. M. Raja, K. L. Nelson, S. C. Feil, F. G. van der Goot, M. W. Parker, and J. T. Buckley. 1998. Movement of a loop in domain 3 of aerolysin is required for channel formation. *Biochemistry* 37:741-746.
210. Sanahuja, G., R. Banakar, R. M. Twyman, T. Capell, and P. Christou. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol. J.* 9:283-300.
211. Sansom, M. S. 1993. Structure and function of channel-forming peptaibols. *Q. Rev. Biophys.* 26:365-421.
212. Santelli, E., L. A. Bankston, S. H. Leppla, and R. C. Liddington. 2004. Crystal structure of a complex between anthrax toxin and its host cell receptor. *Nature* 430:905-908.
213. Schaller, K., J. V. Holtje, and V. Braun. 1982. Colicin M is an inhibitor of murein biosynthesis. *J. Bacteriol.* 152:994-1000.
214. Schmidt, D., Q. X. Jiang, and R. MacKinnon. 2006. Phospholipids and the origin of cationic gating charges in voltage sensors. *Nature* 444:775-779.
215. Schnepf, E., N. Crickmore, R. J. Van, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, and D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.

216. Schwartz, J. L., L. Garneau, D. Savaria, L. Masson, R. Brousseau, and E. Rousseau. 1993. Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* 132:53-62.
217. Schwartz, J. L., M. Juteau, P. Grochulski, M. Cygler, G. Prefontaine, R. Brousseau, and L. Masson. 1997. Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering. *FEBS Lett.* 410:397-402.
218. Schwartz, J. L., Y. J. Lu, P. Sohnlein, R. Brousseau, R. Laprade, L. Masson, and M. J. Adang. 1997. Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. *FEBS Lett.* 412:270-276.
219. Schwartz, J. L. and R. Laprade. 2000. Membrane permeabilisation by *Bacillus thuringiensis* toxins: protein insertion and pore formation. *In Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application.* J.-F. Charles et al., editor. 2000 Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 199-217.
220. Schwartz, M. 2009. Dr. Jekyll and Mr. Hyde: a short history of anthrax. *Mol. Aspects Med.* 30:347-355.
221. Schwarz, W. and J. Rettinger. 2000. Foundations of electrophysiology. Shaker.
222. Sharp, K., N. A., F. A., and R.F. & Honig. 1991. Reconciling the magnitude of the microscopic and macroscopic hydrophobic effects. *Science* 252:106-109.
223. Simonson, P. D., H. A. Deberg, P. Ge, J. K. Alexander, O. Jeyifous, W. N. Green, and P. R. Selvin. 2010. Counting bungarotoxin binding sites of nicotinic acetylcholine receptors in mammalian cells with high signal/noise ratios. *Biophys. J.* 99:L81-L83.
224. Singer, S. J. and G. L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-731.
225. Slatin, S. L., C. K. Abrams, and L. English. 1990. Delta-endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169:765-772.

226. Slatin, S. L., X. Q. Qiu, K. S. Jakes, and A. Finkelstein. 1994. Identification of a translocated protein segment in a voltage-dependent channel. *Nature* 371:158-161.
227. Smedley, D. P., G. Armstrong, and D. J. Ellar. 1997. Channel activity caused by a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin preparation depends on the method of activation. *Mol. Membr. Biol.* 14:13-18.
228. Smith, H., J. Keppie, J. L. STANLEY, and P. W. HARRIS-SMITH. 1955. The chemical basis of the virulence of *Bacillus anthracis*. IV. Secondary shock as the major factor in death of guinea-pigs from anthrax. *Br. J. Exp. Pathol.* 36:323-335.
229. Sobko, A. A., E. A. Kotova, Y. N. Antonenko, S. D. Zakharov, and W. A. Cramer. 2004. Effect of lipids with different spontaneous curvature on the channel activity of colicin E1: evidence in favor of a toroidal pore. *FEBS Lett.* 576:205-210.
230. Song, L., M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, and J. E. Gouaux. 1996. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 274:1859-1866.
231. Souza, D. H., H. S. Selistre-de-Araujo, and R. C. Garratt. 2000. Determination of the three-dimensional structure of toxins by protein crystallography. *Toxicon* 38:1307-1353.
232. Steinlechner, S., C. Klein, A. Moser, R. Lencer, and J. Hagenah. 2010. Botulinum toxin B as an effective and safe treatment for neuroleptic-induced sialorrhea. *Psychopharmacology (Berl)* 207:593-597.
233. Tigue, N. J., J. Jacoby, and D. J. Ellar. 2001. The alpha-helix 4 residue, Asn135, is involved in the oligomerization of Cry1Ac1 and Cry1Ab5 *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5715-5720.
234. Tilley, S. J., E. V. Orlova, R. J. Gilbert, P. W. Andrew, and H. R. Saibil. 2005. Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell* 121:247-256.
235. Tojo, A. and K. Aizawa. 1983. Dissolution and Degradation of *Bacillus thuringiensis* delta-Endotoxin by Gut Juice Protease of the Silkworm *Bombyx mori*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:576-580.

236. Tokuda, H. and J. Konisky. 1978. In vitro depolarization of Escherichia coli membrane vesicles by colicin Ia. *J. Biol. Chem.* 253:7731-7737.
237. Tokuda, H. and J. Konisky. 1978. Mode of action of colicin Ia: effect of colicin on the Escherichia coli proton electrochemical gradient. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 75:2579-2583.
238. Tombola, F., M. H. Ulbrich, and E. Y. Isacoff. 2008. The voltage-gated proton channel Hv1 has two pores, each controlled by one voltage sensor. *Neuron* 58:546-556.
239. Tomimoto, K., T. Hayakawa, and H. Hori. 2006. Pronase digestion of brush border membrane-bound Cry1Aa shows that almost the whole activated Cry1Aa molecule penetrates into the membrane. *Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.* 144:413-422.
240. Torres, J., X. Lin, and P. Boonserm. 2008. A trimeric building block model for Cry toxins in vitro ion channel formation. *Biochim. Biophys. Acta* 1778:392-397.
241. Tran, L. B., V. Vachon, J. L. Schwartz, and R. Laprade. 2001. Differential effects of pH on the pore-forming properties of Bacillus thuringiensis insecticidal crystal toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4488-4494.
242. Tsitrin, Y., C. J. Morton, C. el-Bez, P. Paumard, M. C. Velluz, M. Adrian, J. Dubochet, M. W. Parker, S. Lanzavecchia, and F. G. van der Goot. 2002. Conversion of a transmembrane to a water-soluble protein complex by a single point mutation. *Nat. Struct. Biol.* 9:729-733.
243. Turro NJ. 1978. Modern Molecular Photochemistry. The Benjamin/Cummings Publishing Compagny, Inc., Menlo Park.
244. Ulbrich, M. H. and E. Y. Isacoff. 2007. Subunit counting in membrane-bound proteins. *Nat. Methods* 4:319-321.
245. Vachon, V., G. Prefontaine, F. Coux, C. Rang, L. Marceau, L. Masson, R. Brousseau, R. Frutos, J. L. Schwartz, and R. Laprade. 2002. Role of helix 3 in pore formation by the Bacillus thuringiensis insecticidal toxin Cry1Aa. *Biochemistry* 41:6178-6184.
246. Vachon, V., G. Prefontaine, C. Rang, F. Coux, M. Juteau, J. L. Schwartz, R. Brousseau, R. Frutos, R. Laprade, and L. Masson. 2004. Helix 4 mutants of the

- Bacillus thuringiensis insecticidal toxin Cry1Aa display altered pore-forming abilities. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6123-6130.
247. Vadlamudi, R. K., E. Weber, I. Ji, T. H. Ji, and L. A. Bulla, Jr. 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of Bacillus thuringiensis. *J. Biol. Chem.* 270:5490-5494.
248. Valaitis, A. P., J. L. Jenkins, M. K. Lee, D. H. Dean, and K. J. Garner. 2001. Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds Bacillus thuringiensis Cry1A toxins with high affinity. *Arch. Insect Biochem. Physiol* 46:186-200.
249. Vie, V., M. N. Van, P. Pomarede, C. Dance, J. L. Schwartz, R. Laprade, R. Frutos, C. Rang, L. Masson, F. Heitz, and G. C. Le. 2001. Lipid-induced pore formation of the Bacillus thuringiensis Cry1Aa insecticidal toxin. *J. Membr. Biol.* 180:195-203.
250. Villalon, M., V. Vachon, R. Brousseau, J. L. Schwartz, and R. Laprade. 1998. Video imaging analysis of the plasma membrane permeabilizing effects of Bacillus thuringiensis insecticidal toxins in Sf9 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1368:27-34.
251. Von Tersch, M. A., S. L. Slatin, C. A. Kulesza, and L. H. English. 1994. Membrane-permeabilizing activities of Bacillus thuringiensis coleopteran-active toxin CryIIIB2 and CryIIIB2 domain I peptide. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3711-3717.
252. Walker, B. and H. Bayley. 1995. Key residues for membrane binding, oligomerization, and pore forming activity of staphylococcal alpha-hemolysin identified by cysteine scanning mutagenesis and targeted chemical modification. *J. Biol. Chem.* 270:23065-23071.
253. Walker, B. and H. Bayley. 1995. Restoration of pore-forming activity in staphylococcal alpha-hemolysin by targeted covalent modification. *Protein Eng* 8:491-495.
254. Walters, F. S., S. L. Slatin, C. A. Kulesza, and L. H. English. 1993. Ion channel activity of N-terminal fragments from CryIA(c) delta-endotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:921-926.

255. Walters, F. S., C. A. Kulesza, A. T. Phillips, and L. H. English. 1994. A stable oligomer of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin, CryIII_A. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 24:963-968.
256. Wang, J., M. P. Rosconi, and E. London. 2006. Topography of the hydrophilic helices of membrane-inserted diphtheria toxin T domain: TH1-TH3 as a hydrophilic tether. *Biochemistry* 45:8124-8134.
257. Wang, J. and E. London. 2009. The membrane topography of the diphtheria toxin T domain linked to the a chain reveals a transient transmembrane hairpin and potential translocation mechanisms. *Biochemistry* 48:10446-10456.
258. Watson, B. S., T. L. Hazlett, J. F. Eccleston, C. Davis, D. M. Jameson, and A. E. Johnson. 1995. Macromolecular arrangement in the aminoacyl-tRNA elongation factor Tu.GTP ternary complex. A fluorescence energy transfer study. *Biochemistry* 34:7904-7912.
259. Weber, G. 1951. Polarization of the fluorescence of macromolecules. *Biochemistry* 51:167.
260. Welkos, S. L., J. R. Lowe, F. Eden-McCutchan, M. Vodkin, S. H. Leppla, and J. J. Schmidt. 1988. Sequence and analysis of the DNA encoding protective antigen of *Bacillus anthracis*. *Gene* 69:287-300.
261. Wendt, L. 1970. Mechanism of colicin action: early events. *J. Bacteriol.* 104:1236-1241.
262. Westphal, D., G. Dewson, P. E. Czabotar, and R. M. Kluck. 2011. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim. Biophys. Acta* 1813:521-531.
263. Wickliffe, K. E., S. H. Leppla, and M. Moayeri. 2008. Killing of macrophages by anthrax lethal toxin: involvement of the N-end rule pathway. *Cell Microbiol.* 10:1352-1362.
264. Wiener, M., D. Freymann, P. Ghosh, and R. M. Stroud. 1997. Crystal structure of colicin Ia. *Nature* 385:461-464.
265. Wilmsen, H. U., F. Pattus, and J. T. Buckley. 1990. Aerolysin, a hemolysin from *Aeromonas hydrophila*, forms voltage-gated channels in planar lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* 115:71-81.

266. Wolfe, J. T., B. A. Krantz, G. J. Rainey, J. A. Young, and R. J. Collier. 2005. Whole-cell voltage clamp measurements of anthrax toxin pore current. *J. Biol. Chem.* 280:39417-39422.
267. Yang, L., T. A. Harroun, T. M. Weiss, L. Ding, and H. W. Huang. 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.* 81:1475-1485.
268. Young, J. A. and R. J. Collier. 2007. Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation. *Annu. Rev. Biochem.* 76:243-265.
269. Zakharov, S. D., E. A. Kotova, Y. N. Antonenko, and W. A. Cramer. 2004. On the role of lipid in colicin pore formation. *Biochim. Biophys. Acta* 1666:239-249.
270. Zalman, L. S. and B. J. Wisnieski. 1984. Mechanism of insertion of diphtheria toxin: peptide entry and pore size determinations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81:3341-3345.
271. Zavala, L. E., L. Pardo-Lopez, P. E. Canton, I. Gomez, M. Soberon, and A. Bravo. 2011. Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin Remain Exposed to the Solvent after Insertion of Part of Domain I into the Membrane. *J. Biol. Chem.* 286:19109-19117.
272. Zhang, J., R. M. Davidson, M. D. Wei, and L. M. Loew. 1998. Membrane electric properties by combined patch clamp and fluorescence ratio imaging in single neurons. *Biophys. J.* 74:48-53.
273. Zhang, J. C., L. Sun, and Q. H. Nie. 2010. Botulism, where are we now? *Clin. Toxicol. (Phila)* 48:867-879.

APPENDICE

1. La topologie et l'oligomérisation en pratique

1.1. Étude de l'insertion de la Cry1Aa

1.1.1. La mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée est une méthode de biologie moléculaire consistant à introduire une mutation ponctuelle dans la structure primaire d'une protéine. Le résidu cystéine est idéal pour étudier les caractéristiques de cette toxine, car elle n'en contient aucune. De plus, le groupement thiol (-SH) qui apparaît dans la structure de cet acide aminé lui confère la possibilité de créer un lien covalent, par exemple avec un groupement maléimide, ou un pont disulfure, par exemple avec un groupement methanethiosulfonate (MTS). Une telle approche fournit un outil qui permet d'étudier la structure et la fonction d'une protéine formeuse de pore. Un composé appelé n-biotinylaminoethyl methanethiosulfonate (MTSEA-biotine) peut, par exemple, être lié à cet acide aminé. La biotine a une très forte affinité avec la streptavidine, une molécule imposante d'environ 50 kDa. Si une région jouant un rôle important dans la formation du pore est marquée avec une biotine et que cette dernière se lie avec une streptavidine, alors la formation du pore sera altérée.

La création de deux mutations cystéines à l'intérieur du domaine formeur de pore pour provoquer un pont disulfure entre les deux cystéines et ainsi restreindre les mouvements de deux hélices (par exemple) lors de la formation des pores aura pour effet de diminuer l'activité canal de la toxine dans le cas où la restriction touche une hélice impliquée directement dans ce processus. De cette manière, le groupe de Schwartz a pu suggérer que fort probablement $\alpha 4$ - $\alpha 5$ ou $\alpha 5$ - $\alpha 6$ étaient impliquées dans la formation des pores, selon le modèle du parapluie ou encore celui du canif, sans toutefois pouvoir confirmer l'un ou l'autre (Schwartz *et al.*, 1997a).

1.1.2. Les variations de volume des vésicules

Les variations de volume des vésicules lipidiques mélangées avec une concentration donnée de toxine est une méthode utilisée pour étudier, lors d'un choc osmotique, comment une modification de la structure primaire de la toxine peut affecter la formation des pores comparativement à la toxine sauvage. Les variations de volume des vésicules en solution dans une cuvette de verre sont détectées en mesurant les variations d'intensité de la lumière diffractée à un angle de 90° par rapport à la lumière incidente.

En traitant des mutants cystéines de la Cry1Aa avec la n-biotinylaminoethyl methanethiosulfonate (MTSEA-biotine), le groupe de Schwartz a pu identifier les régions impliquées dans la formation des pores. Ils ont marqué toutes les boucles reliant les hélices du domaine formeur de pore avec la biotine (sauf la boucle reliant les hélices $\alpha 2$ - $\alpha 3$, dont la mutation n'a pu être exprimée). Après avoir fait réagir la biotine avec la streptavidine, ils ont déterminé grossièrement que les régions entourant l'hélice $\alpha 4$ (les épingles $\alpha 3$ - $\alpha 4$ et $\alpha 5$ - $\alpha 6$) étaient impliquée dans la formation des pores, car les variations de volume des vésicules traitées avec la toxine étaient très petites comparativement à celles provoquées par la toxine sauvage (Girard *et al.*, 2009a). Un SCAM –cystéine (ou « Scanning Mutagenesis ») de l'hélice $\alpha 4$ a ensuite été réalisé, ce qui veut dire que tous les résidus de l'hélice ont été ciblé en mutagénèse dirigée l'un à la suite de l'autre afin de les remplacer par une cystéine. La formation des pores par chaque mutant a été étudiée par la méthode de changement de volume et presque toutes les mutations ont provoqué une diminution importante de la fonction du pore, suggérant que l'hélice $\alpha 4$ est transmembranaire (Girard *et al.*, 2008; Girard *et al.*, 2009b). Une approche similaire a été utilisée sur l'hélice 3 afin de vérifier si elle jouait un rôle dans le mécanisme de formation des pores. En effet, l'hélice 3 est la deuxième plus grande hélice du domaine formeur de pore (30 acides aminés) et peut aussi être susceptible de traverser la membrane. Différentes mutations sur cette hélice ont provoqué une diminution de l'activité des pores, ainsi que de la toxicité de la toxine. Ces observations suggèrent également que l'hélice $\alpha 3$ est impliquée dans les mécanismes de formation des pores (Vachon *et al.*, 2002).

1.1.3. Les mesures de fluorescence

La fluorescence du NBD est sensible à son environnement. Quand cette sonde passe d'un environnement aqueux vers un environnement lipidique, les spectres d'émission subissent un déplacement vers les courtes longueurs d'onde (vers le bleu). Les variations d'intensité maximale des pics d'émission indiquent si un déplacement de l'hélice à l'intérieur de la bicouche a eu lieu. Cette caractéristique a été appliquée pour étudier l'insertion des hélices $\alpha 5$ et $\alpha 7$ lors de l'interaction de la toxine avec des BBMV. Dans ces conditions, les deux extrémités de l'hélice $\alpha 7$ sont demeurées en surface tandis que la partie N-terminale de $\alpha 5$ subit un déplacement vers l'intérieur de la membrane lipidique (Gazit & Shai, 1995). Ces expériences apportent un support au modèle du parapluie, mais elles ne précisent pas quelles sont les positions initiales des régions marquées : une toxine qui subit un changement de conformation lui permettant de se réorienter de la phase aqueuse vers un environnement lipidique présentera les mêmes variations spectrales peu importe si l'hélice se trouve au départ à une extrémité ou une autre de la bicouche lipidique. De plus, ces expériences ne révèlent pas d'information sur la profondeur d'insertion de l'hélice étudiée.

Des études de fluorescence sur des mutations cystéines de la toxine Cry1A reconstituées dans des BBMV ont aussi suggéré que la toxine subissait de grands changements de conformation durant la formation des pores. Plusieurs positions du domaine formeur de pore, ainsi que celles de deux autres domaines, ont été marquées soit avec la sonde IAEDANS (qui est « quenchée » dans un environnement lipidique) ou par la sonde acrylodane qui, une fois excitée à 360 nm, va émettre à des longueurs d'ondes de grande énergie (460 nm) si elle se trouve dans un environnement lipidique. Les expériences de spectroscopies produites ont révélé que la majorité des positions étudiées se sont déplacés à l'intérieur de la bicouche lipidique (toutes sauf l'hélice 1 du domaine formeur de pore). Ces observations vont à l'encontre des modèles du parapluie et du canif, mais supportent le modèle du dragon enfoui pour des pores monomériques (Nair & Dean, 2008).

Une étude similaire portant sur la Cry1Ab va à l'encontre de ces résultats, suggérant plutôt que dans ces conditions, les domaines 2 et 3 devraient rester à la surface de la bicouche lipidique tandis que certaines sections discrètes dont la boucle reliant les hélices α_3 et α_4 du domaine I se retrouvent insérées entre les deux feuillets lipidiques (Zavala *et al.*, 2011).

Malgré les observations obtenues sur la topographie des différentes hélices du domaine formeur de pore, ces expériences ne donnent aucun renseignement sur les positions étudiées relativement à la bicouche avant et après la formation des pores. De plus, la profondeur d'insertion des résidus marqués ne peut pas être étudiée.

1.1.4. Spectrométrie infrarouge avec réflexion totale atténuée (ATR)

Cette technique de spectroscopie infrarouge permet d'obtenir des renseignements sur les structures secondaires des échantillons étudiés. Un échantillon solide, liquide ou gazeux est mis en contact étroit avec un cristal possédant un grand indice de réfraction. Un faisceau infrarouge est dirigé à un certain angle pour permettre une réflexion totale interne. Cette réflexion totale interne va créer une onde évanescente qui va se propager le long du cristal et dans une profondeur équivalente à 0.5 à 2 μm dans l'échantillon. L'échantillon en contact avec l'onde évanescente va absorber son énergie et celle-ci s'atténuera. À la fin du parcours de l'onde évanescente, son énergie atténuée sera absorbée par le faisceau infrarouge en réflexion totale interne qui quitte le cristal pour être analysé par le détecteur du spectromètre infrarouge (voir figure A1). Un spectre produit en fonction de l'intervalle des longueurs d'onde infrarouge utilisées va décrire les niveaux de transition d'énergies rotationnelles et vibrationnelles des structures de l'échantillon étudié. Gazit *et al.* a étudié la déconvolution spectrale de la bande amide I (qui se révèle entre 1600 et 1700 cm^{-1}) de chacune des hélices exprimée séparément et introduite dans une bicouche de phospholipide soumise à l'ATR. L'analyse spectrale de ces peptides a pu confirmer que ces régions étaient des hélices et que ces hélices pouvaient adopter des orientations préférentielles par rapport à la membrane lipidique.

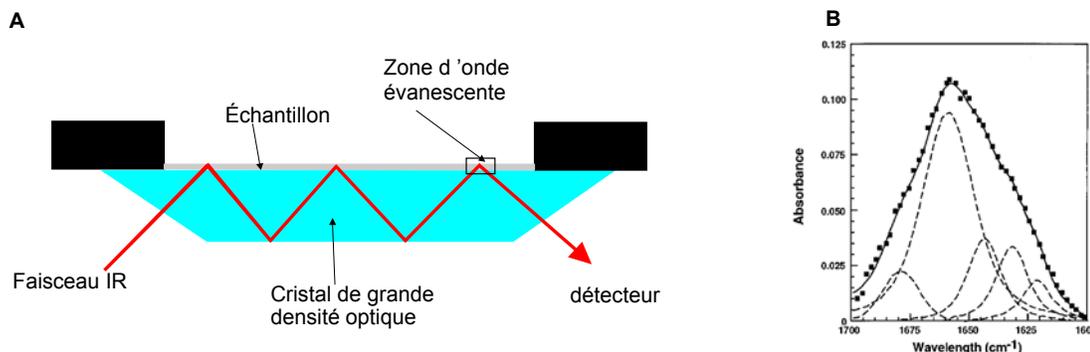


Figure A1 : A. Schémas décrivant le principe de la spectroscopie ATR. B. Description du spectre IR de la bande amide I, ainsi que de sa déconvolution spectrale, de l'hélice $\alpha 2$ du domaine formeur de pore de la Cry1Aa survenant entre 1600 et 1700 cm^{-1} (Gazit *et al.*, 1998),

Toutes les hélices semblent adopter des orientations parallèles à la membrane lipidique, sauf $\alpha 4$ - $\alpha 5$ qui semblaient s'orienter à 90° (Gazit *et al.*, 1998). Ces expériences supportent le modèle du parapluie, mais n'ont été menées qu'avec les hélices seules. Elles ne révèlent pas le comportement de chacune d'elles soumise à l'interaction de toute la protéine réunie. De plus ces études ne précisent pas par rapport à quel feuillet de la bicouche ces peptides s'orienteraient.

1.1.5. Simulation Monte Carlo (MC)

Une simulation numérique de type Monte Carlo est un outil couramment utilisé pour étudier l'orientation des peptides dans la membrane lipidique. Elle est basée sur le calcul d'une valeur numérique en utilisant des procédés aléatoires. Dans le cas d'un peptide orienté dans une bicouche lipidique, cette méthode va calculer l'énergie libre associée au transfert des liens hydrogènes de la phase aqueuse vers un environnement lipidique, plus particulièrement l'orientation qui lui accorde la plus petite énergie libre. En appliquant ce protocole numérique à chacune des hélices seules interagissant avec une bicouche lipidique, leur orientation et l'énergie d'interaction de la membrane lipidique avec le peptide a pu être calculé. L'énergie d'interaction varie de -20 kcal/mol ($\alpha 2$ et $\alpha 7$) à

environ -9 kcal/mol pour les autres hélices. Ce qui indique que l'interaction avec la membrane est faible pour $\alpha 2$ et $\alpha 7$ et que les autres ne semblent pas s'insérer du tout, contrairement à ce que les mesures expérimentales suggèrent (Gazit *et al.*, 1998; Kerr *et al.*, 1994). Gazit *et al.*, ont d'ailleurs suggéré qu'une association d'hélices étaient sûrement nécessaire pour obtenir des résultats en accord avec leurs expérimentations. La création de peptides à partir des hélices elles-mêmes du domaine I de la toxine Cry1Ac, une toxine homologue à la Cry1Aa, a permis de raffiner ce résultat en constatant que la translocation avait lieu si $\alpha 4$ - $\alpha 5$ se retrouvaient seules dans la membrane plasmique (Gerber & Shai, 2000).

1.1.6. Digestion par la Pronase

Plusieurs positions de la protéine pourraient s'introduire à l'intérieur même de la bicouche lipidique, comme le suggère le modèle du dragon enfoui. Ce sont majoritairement les expériences de digestion ciblée qui ont permis de mettre au point ce modèle. Celles-ci suggèrent que les boucles reliant les hélices $\alpha 2$ - $\alpha 3$, $\alpha 4$ - $\alpha 5$ et $\alpha 6$ - $\alpha 7$ (figure 1.8 (C)) sont susceptibles de pouvoir traverser la membrane. Un complexe BBMV/toxine est exposé à la Pronase (une protéase non spécifique) afin de provoquer la digestion des fragments protéiques exposés au solvant. Par la suite, ce complexe est traité afin d'isoler la toxine des BBMVs et étudié en «western blot» pour déterminer quelles sections de la toxine ont été protégées lors de la digestion. C'est de cette manière que le modèle du dragon enfoui a été suggéré pour le pore monomérique (figure 1.8 (C)) (Tomimoto *et al.*, 2006). Toutefois, il est assumé que toutes les BBMVs ont pu être totalement éliminées, sans contrôle pour le prouver. Si le complexe analysé en «western blot» contenait encore une certaine quantité de protéines toujours associées aux BBMVs, cela fausserait les résultats.

1.1.7. L'électrophysiologie

L'électrophysiologie en bicouche lipidique plane est une excellente méthode pour caractériser les pores, une fois que la toxine est insérée dans la membrane. La toxine

Cry1Aa a la capacité de former des pores avec ou sans récepteurs. En imposant une différence de potentiel aux extrémités de la bicouche lipidique, et en exposant la bicouche lipidique avec une certaine quantité de toxine (entre 0.6 et 500 nM), des sauts de courants peuvent être enregistrés dans le courant capacitif de la membrane lipidique.

En l'absence de récepteurs, et en conditions asymétrique de solution 450/150 mM NMDG/KCL (*cis/trans*) la conductance des canaux unitaires peut aller de 10 à 100 pS. Le potentiel de Nernst pour le Cl⁻ dans ces conditions fut de 28.2 mV. En conditions de macro-courants, aisément atteignables avec des bicouches lipidiques contenant des récepteurs, les conductances pouvaient atteindre jusqu'à 420 pS. Une dépendance au voltage de ces pores peut également être observée, car leur probabilité d'ouverture augmente pour des voltages supérieurs à ± 60 mV. Enfin, les mesures électrophysiologiques ont permis de découvrir que ces pores sont sélectifs aux cations, et que cette sélectivité aux cations dépend aussi de leur taille (Schwartz *et al.*, 1993; Peyronnet *et al.*, 2001).

Toutes les techniques proposées peuvent donner de l'information sur l'insertion, ou la taille des pores de la toxine dans la bicouche lipidique et peuvent suggérer des orientations possibles des hélices du domaine formeur de pore lorsque celui-ci entre en contact avec la bicouche lipidique. Différents modèles décrivent d'ailleurs ce phénomène. Toutefois, les travaux réalisés ne donnent pas d'information sur la dynamique de formation des pores. Même si les expériences sur les peptides de Shai *et al.* ont permis d'étudier l'orientation des hélices dans la membranes, cette orientation peut être différente lorsque ces hélices sont liées entre elles dans la protéine.

La limitation principale des études proposées est qu'elles ont été appliquées seules, ce qui ne permet d'étudier qu'un seul phénomène à la fois. La combinaison de plusieurs techniques est un moyen de pouvoir étudier plusieurs phénomènes simultanément. Par exemple, la combinaison des mesures de fluorescence provenant de la toxine marquée et d'électrophysiologie est un moyen d'observer les mouvements de la toxine (fluorescence) au moment où les pores se forment (électrophysiologie). Cette approche

n'a pas été utilisée jusqu'à maintenant, et c'est pour ça qu'il y a beaucoup d'information sur l'insertion de la toxine dans la membrane, mais qu'il n'y aucune information sur la dynamique du phénomène de perméabilisation.

1.2. Études de la dynamique d'oligomérisation de la Cry1Aa

Deux modèles existent pour décrire l'oligomérisation de la Cry1A à la surface des membranes lipidiques, le premier, et le plus populaire propose l'insertion, la diffusion des monomères dans la bicouche et finalement l'oligomérisation en tétramère. Le second propose que la toxine s'assemble en pré-pore avant de s'insérer dans la membrane lipidique.

1.2.1. Électrophysiologie

Des mesures d'électrophysiologie en bicouche lipidique plane ont révélé plusieurs niveaux de sous-conductances. Les plus importantes pouvant s'élever à plusieurs centaines de picosiemens. D'autres niveaux de sous-conductances moins importants allant de quelques dizaines de picosiemens à quelques siemens étaient également présents. Ces mesures sont des indices pouvant indiquer soit la présence de sous-états de conduction, ou de pore de plus petite taille formés par des complexes comprenant différents niveaux d'oligomérisation (Slatin *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1993; Lorence *et al.*, 1995; Peyronnet *et al.*, 2001).

1.2.2. Technique de chromatographie

La protoxine de Cry1Ab a été incubée avec un anticorps spécifique, le scFv73, qui imite également les récepteurs ressemblant à la cadhérine. Après la période d'incubation en solution, une digestion avec la trypsine permet d'éliminer les récepteurs. Un western blot utilisant un anticorps anti-mic tag a été utilisé pour montrer que dans ces conditions, un dimère et un tétramère pouvaient être produits et qu'une fois isolés par chromatographie, ils ne contenaient pas le récepteur. Par après, l'activité du dimère et du tétramère ont été testée sur des BBMV. Seuls les tétramères étaient actifs (Gomez *et al.*, 2002). D'après ces expériences, Gomez *et al.* ont conclu que la liaison à un récepteur spécifique et l'oligomérisation des monomères de Cry1A était une étape qui précédait

l'insertion dans la membrane. Toutefois, il n'est pas surprenant que les monomères puissent se lier entre eux plus rapidement en présence du récepteur, vu que cela a déjà été prouvé (Peyronnet *et al.*, 2001). Ces expériences suggèrent que la Cry1Ab peut former des tétramères qui sont des pores fonctionnels et que ces complexes sont très stables.

Une analyse de gels d'acrylamide a été utilisée pour étudier l'oligomérisation de la Cry4Ba sur des liposomes. Les gels de SDS-PAGE ont révélé que les monomères, dimères et trimères étaient présents dans les liposomes, avec une prédominance des trimères après 2h d'incubation. Ces expériences suggèrent que la toxine Cry peut s'oligomériser une fois liée à la bicouche lipidique et que le niveau d'oligomérisation des complexes protéiques est dépendant du temps (Likitvivatanavong *et al.*, 2006). La forme trimérique de la toxine a aussi été observée en microscopie électronique (Ounjai *et al.*, 2007).

1.2.3. Microscopie à force atomique (AFM)

La Cry1Aa insérée dans une monocouche lipidique a été étudiée en AFM. Des structures tétramériques sont observables avec des orifices d'environ 15 Å de diamètres entourées par 4 autres structures de grandeur équivalentes. Ces observations supportent la proposition selon laquelle la formation du pore suivrait stœchiométrie tétramérique sans préciser si l'oligomérisation survient avant ou après la liaison de la toxine à la membrane (Vie *et al.*, 2001).

Aucune de ces expériences ne peut préciser la dynamique d'oligomérisation de la Cry1Aa. La limitation majeure est que les prises de mesures sont faites une fois que les pores sont formés et qu'aucune technique utilisée ne permet de d'étudier le phénomène pendant la période d'incubation.

1.3. Étude du « gating » de la colicine 1a

Les mesures d'électrophysiologie ont permis d'étudier le phénomène d'ouverture et de fermeture du canal formé par la colicine 1a. En tenant à la masse le côté *trans* de la bicouche et en imposant un voltage au côté *cis*, il a été déterminé que le canal s'ouvrait à

des voltage supérieurs à +50 mV et se fermaient quand celui-ci était maintenu à moins de -50mV (Jakes *et al.*, 1999).

1.3.1. Études de biotine/streptavidine

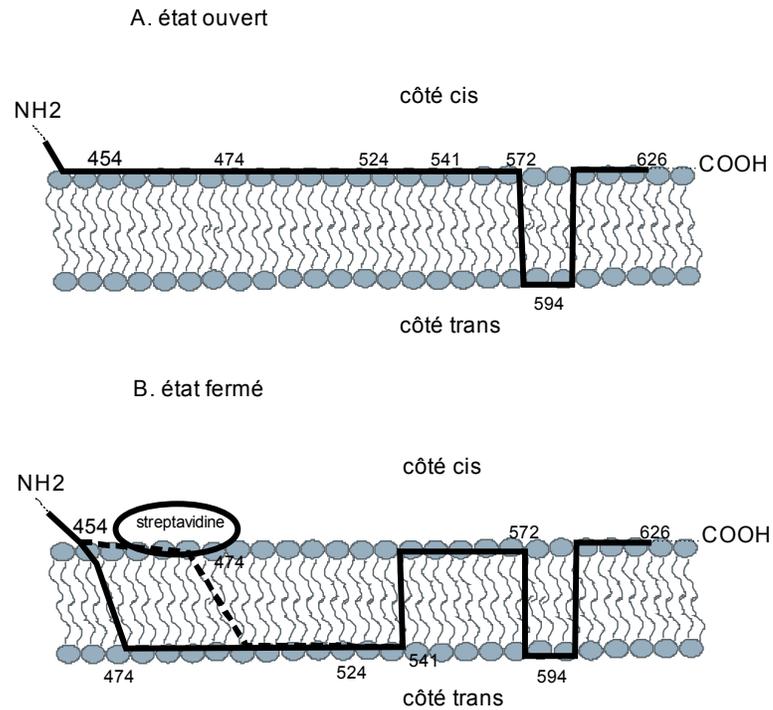


Figure A2. : a) description de l'état fermé et b) de l'état ouvert de la colicine 1a selon les expériences de biotinylation

De la même manière que pour la Cry1Aa, la structure primaire de la colicine 1a fut modifiée pour permettre la mutation ponctuelle d'un acide aminé avec un résidu cystéine. À cette cystéine fut liée une biotine. La toxine liée à la biotine à différentes positions fut par après étudiée en bicouche lipidique plane avec incubation soit du côté *cis* ou du côté *trans* de la streptavidine afin, dans un premier temps, d'étudier la topologie de la toxine par rapport à la membrane et ensuite déterminer quelles régions bougent d'une extrémité à l'autre de la bicouche lipidique quand le pore s'ouvre et se ferme (Slatin *et al.*, 1994; Qiu *et al.*, 1996). La streptavidine fut incubée du côté *trans* pour qu'elle réagisse avec la biotine liée aux résidus 474 à 541 du domaine formeur de pore. La région marquée est demeurée bloquée à l'état ouvert. Les résidus 544 à 572 ont

réagis avec la streptavidine incubée du côté *cis*, laissant le pore bloqué dans l'état fermé. L'épingle comprenant le résidu 594 demeure transmembranaire dans les deux états. De cette manière, une topologie 2D de la colicine 1a a pu être établie (voir figure A2), avec une mobilité des régions étudiées qui leur permettrait de se déplacer d'une extrémité à l'autre de la bicouche lipidique selon l'état ouvert ou fermé du pore (Qiu *et al.*, 1996). Il y a une limitation importante de la méthode sur la position de la région liée à la streptavidine, qui peut se lier avec une position se trouvant enfouie d'environ 10 Å à l'intérieur de la bicouche lipidique (Katayama *et al.*, 2008).

1.3.2. SCAM-cystéine

Un SCAM –cystéine (ou « Scanning Mutagenesis ») de 40 résidus (573-612) a été produit pour déterminer quels acides aminés des hélices hydrophobes $\alpha 8$ - $\alpha 9$ font face au lumen du pore. Les mutations cystéines qui font face à la solution aqueuse vont se lier avec une molécule formant des ponts disulfures avec la cystéine (le MTSET, ou [2-(triméthylammonium) éthyl] MTS bromide) et bloquer la conductance du canal (Kienker *et al.*, 2008).

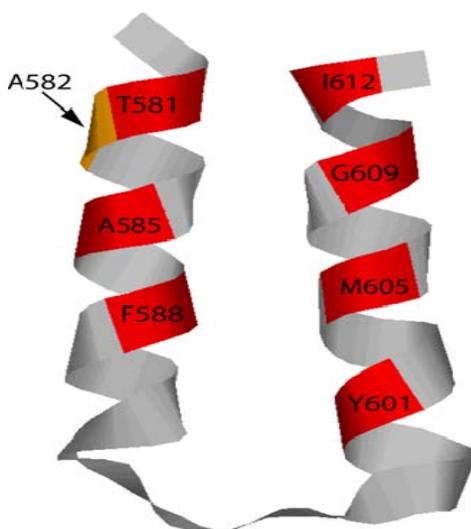


Figure A3: Résidus des hélices $\alpha 8$ - $\alpha 9$ qui font face au lumen du pore grâce à la technique du SCAM (Kienker *et al.*, 2008)

Ces études présentent les mêmes limitations que celles produites dans les études topologiques de la Cry1Aa, car elles sont limitées à la topologie de la toxine en un seul

état. Toutefois les expériences de biotine/streptavidine sont innovatrices, car elles permettent de bloquer le canal dans un état et de préciser l'importance de la région marquée par la biotine dans la formation des pores. Cependant, la toxine subit une restriction de mouvement, par conséquent il est impossible d'étudier la dynamique de « gating ».

1.3.3. Mesures de FRET inter-hélices

Des mesures de fluorescences impliquant la technique de FRET (voir section 1.1.2.7) entre la sonde fluorescente acceptrice IEDANS (liée à une cystéine sur le hélice $\alpha 1$, la boucle liant $\alpha 4$ et $\alpha 5$ et les hélices $\alpha 7$ à 9) et l'acide aminé fluorescent tryptophane (donneur) situé localement dans les hélices 5 à 7 ont permis de déterminer quelles hélices se rapprochent et s'éloignent par rapport aux hélices $\alpha 8$ et $\alpha 9$ contenant le tryptophane. Il a été observé que lors de l'insertion de la toxine dans la membrane, les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ s'éloignent de l'épingle hydrophobe $\alpha 8$ et $\alpha 9$, qui demeure statique. C'est d'ailleurs grâce à ces expériences que furent élaborés les modèles du parapluie (Lakey *et al.*, 1991) et du canif (Lakey *et al.*, 1993) pour caractériser l'état fermé. Ces expériences ont été produite sur la colicine A, une toxine homologue à la colicine 1a et qui agit de manière similaire (perméabiliser les membranes internes des bactéries à gram négatif et causer la mort cellulaire par perte de K^+) (Lakey *et al.*, 1992). De plus ces changements de conformation ont été vérifiés sur la colicine 1a par RMN (Luo *et al.*, 2005).