

Table des matières

Résumé	iii
Summary	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux.....	xiii
Liste des figures.....	xiv
Liste des symboles et abréviations	xxi
Remerciements.....	xxxvii
Avant-propos	xliv
Chapitre 1	1
Introduction.....	1
1.1 Vision.....	1
1.1.1 Anatomie de l'œil	1
1.1.1.1 Rétine	2
1.1.1.2 Cellules photoréceptrices : cônes et bâtonnets	3
1.1.1.2.1 Bâtonnets rétiniens.....	8
1.1.2 Mécanisme de phototransduction visuelle	10
1.1.2.1 Photoactivation	10
1.1.2.2 Inactivation et retour à l'état basal.....	11
1.2 Neuroprotéines sensibles aux ions calcium.....	14
1.2.1 Concepts généraux sur la structure des protéines.....	14
1.2.2 Famille des protéines liant le calcium (<i>calcium-binding proteins</i>).....	18
1.2.3 Famille des protéines à motif <i>EF-hand</i>	19
1.2.4 N-myristoylation des protéines	23
1.2.5 Aspects généraux des neuroprotéines sensibles aux ions calcium.....	25
1.2.6 Recoverine	26
1.2.6.1 <i>Calcium-myristoyl switch</i> de la recoverine.....	26
1.2.6.2 Rôle biologique de la recoverine	29
1.3 Membranes biologiques	30
1.3.1 Phospholipides	31
1.3.2 Composition lipidique des segments externes des bâtonnets.....	33
1.3.3 Organisation lipidique et auto-assemblage	35
1.3.4 Dynamique membranaire	37
1.3.5 Systèmes modèles pour les membranes	38

1.3.5.1 Vésicule multilamellaire lipidique.....	39
1.3.5.2 Bicouches lipidiques orientées entre des plaques de verre	40
1.4 État des connaissances sur la structure de la recoverine et son interaction membranaire	42
1.4.1 Structure tridimensionnelle de la recoverine	42
1.4.2 Études en absence ou présence des ions calcium et du groupement myristoylé sur la recoverine.....	42
1.4.3 Lipides utilisés pour l'étude de la recoverine	43
1.4.4 Interaction membranaire de la recoverine.....	44
1.4.4.1 Liaison membranaire	44
1.4.4.2 Impact des lipides sur la structure secondaire de la recoverine.....	46
1.4.4.3 Impact de la recoverine sur les lipides	48
1.5 Objectifs du projet de recherche au doctorat.....	48
1.5.1 Stabilité thermique de la recoverine myristoylée et non myristoylée en présence et absence d'ions calcium	50
1.5.2 Effet de la liaison d'ions calcium sur le phosphatidylglycérol et sur l'interaction entre la recoverine et ce type de lipide	50
1.5.3 Immobilisation du groupement myristoylé de la recoverine selon la fluidité membranaire de lipides zwitterioniques.....	51
1.5.4 Interaction de la recoverine avec un lipide zwitterionique, la dioléoylphosphatidylcholine.....	52
Chapitre 2	54
Approche expérimentale	54
2.1 Surexpression et purification de la recoverine.....	54
2.1.1 Surexpression de la recoverine	54
2.1.2 Purification de la recoverine	57
2.1.2.1 Évaluation de la pureté de la recoverine par électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de potassium.....	58
2.1.2.2 Évaluation du taux de myristoylation de la recoverine par chromatographie liquide à haute pression.....	59
2.1.2.3 Dialyse et lyophilisation de la recoverine purifiée	61
2.1.2.4 Détermination de la concentration en recoverine par spectroscopie ultraviolet- visible	63
2.1.2.5 Détermination de la masse moléculaire de la recoverine par spectrométrie de masse.....	63
2.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	64
2.2.1 Étude par spectroscopie infrarouge de systèmes biologiques	65
2.2.1.1 Lipide	65

2.2.1.1.1	Vibration d'élongation symétrique du groupement CH ₂	66
2.2.1.1.2	Vibration d'élongation symétrique du groupement carbonyle	68
2.2.1.1.3	Vibration d'élongation du groupement phosphate	69
2.2.1.2	Protéine	70
2.2.1.2.1	Vibration du groupement amide	70
2.2.1.2.2	Vibration d'élongation antisymétrique du groupement carboxylate	72
2.3	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à l'état solide	73
2.3.1	Concepts fondamentaux	73
2.3.1.1	Moment angulaire de spin et aimantation nucléaire	73
2.3.1.2	Effet du champ magnétique et de la fréquence de Larmor	75
2.3.1.3	Impulsion de radiofréquence et relaxation	79
2.3.2	Interactions de spins nucléaires en spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à l'état solide	80
2.3.2.1	Interaction de Zeeman	81
2.3.2.2	Interaction de déplacement chimique	81
2.3.2.3	Interaction de couplage scalaire	82
2.3.2.4	Interaction de couplage dipolaire	82
2.3.2.5	Interaction quadrupolaire	82
2.4	Étude en spectroscopie de résonance magnétique nucléaire de systèmes biologiques	83
2.4.1	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à l'état solide du phosphore-31	83
2.4.1.1	Séquence d'impulsions « Écho de Hahn »	90
2.4.1.2	Séquence d'impulsions « <i>Centerband-only detection of exchange</i> »	91
2.4.2	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à l'état solide du deutérium .	94
2.4.2.1	Séquence d'impulsions « Écho quadrupolaire »	98
2.4.3	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du fluor-19	99
2.4.3.1	Séquence d'impulsions à découplage haute puissance	101
Chapitre 3	103
	The thermal stability of recoverin depends on calcium binding and its myristoyl moiety as revealed by infrared spectroscopy	103
3.1	Résumé	104
3.2	Abstract	104
3.3	Introduction	105
3.4	Material and methods	107
3.4.1	Material	107

3.4.2 Expression and purification of recoverin and removal of the salts	108
3.4.3 Transmission infrared spectroscopy	108
3.5 Results.....	110
3.5.1 Effect of calcium and myristoylation on the secondary structure of recoverin	110
3.5.2 Effect of calcium and myristoylation on the thermal stability of recoverin	113
3.6 Discussion	118
3.7 Conclusion	120
3.8 Acknowledgments.....	120
3.9 Funding.....	120
3.10 Supporting information	121
Chapitre 4	125
Discriminating lipid- from protein-calcium binding to understand the interaction between recoverin and phosphatidylglycerol model membranes.....	125
4.1 Résumé	126
4.2 Abstract	126
4.3 Introduction	127
4.4 Materials and methods.....	129
4.4.1 Materials.....	129
4.4.2 Expression and purification of recoverin	129
4.4.3 Sample preparation	129
4.4.4 Infrared (IR) spectroscopy	130
4.5 Results.....	131
4.5.1 DMPG forms two populations: fully hydrated or Ca ²⁺ -complexed.....	131
4.5.1.1 Evidence from the lipid acyl chain conformation.....	131
4.5.1.2 Evidence from the interfacial and polar head regions	132
4.5.1.3 Evidence from recoverin secondary structure	136
4.5.2 The absence of Ca ²⁺ -lipid complexes enhances recoverin-lipid interactions	139
4.5.3 Unsaturated and saturated lipids behave similarly and have an equivalent effect on recoverin	144
4.6 Discussion	145
4.6.1 Recoverin-DMPG interactions are modulated by the availability of calcium	145
4.6.2 Recoverin has a strong affinity for Ca ²⁺	145
4.6.3 Ca ²⁺ -bound recoverin acts a peripheral protein.....	146
4.6.4 Proportion of interacting phospholipids.....	147
4.6.5 Similar interactions are observed between recoverin and unsaturated or saturated lipids.....	148

4.7 Conclusion	149
4.8 Associated content.....	150
4.8.1 Supporting Information	150
4.9 Funding.....	150
4.10 Acknowledgements.....	150
4.11 Supporting information.....	151
Chapitre 5	160
Membrane fluidity is a driving force for recoverin myristoyl immobilization in zwitterionic lipids	160
5.1 Résumé	161
5.2 Abstract	161
5.3 Introduction.....	162
5.4 Materials and methods.....	164
5.4.1 Materials.....	164
5.4.2 Sample preparation.....	164
5.4.3 NMR spectroscopy.....	165
5.5 Results	166
5.6 Discussion	169
5.7 Conflict of interest statement.....	171
5.8 Acknowledgements.....	171
5.9 Funding.....	172
Chapitre 6	173
Novel approaches to probe the binding of recoverin to membranes.....	173
6.1 Résumé	174
6.2 Abstract	174
6.3 Introduction.....	175
6.4 Materials and methods.....	177
6.4.1 Materials.....	177
6.4.2 Sample preparation	177
6.4.3 Infrared (IR) spectroscopy	178
6.4.4 NMR spectroscopy	179
6.5 Results.....	180
6.5.1 Vesicle integrity	180
6.5.2 Acyl chain order and lipid hydration	181
6.5.3 Lipid lateral diffusion.....	183

6.5.4 Recoverin thermal stability.....	184
6.5.5 Myristoyl group environment.....	186
6.6 Discussion	190
6.6.1 ¹⁹ F NMR as a probe of myristoyl group location.....	190
6.6.2 Effect of myristoylation and calcium on recoverin membrane interactions and thermal stability	192
6.7 Conclusions	193
6.8 Acknowledgements.....	194
6.9 Conflict of interest statement.....	194
6.10 Supporting information	194
6.10.1 Determination of the molar absorption coefficient of recoverin by UV-visible spectroscopy	194
Chapitre 7	199
Conclusion et perspectives	199
7.1 Importance de la présence d'ions calcium	199
7.1.1 Influence sur la recoverine.....	199
7.1.2 Influence sur les lipides	200
7.2 Importance du groupement myristoylé de la recoverine	201
7.2.1 Influence sur la recoverine.....	201
7.2.2 Influence sur les lipides	201
7.3 Importance de la composition membranaire.....	202
7.3.1 Influence des lipides sur la recoverine	202
7.3.2 Influence de la recoverine sur les lipides	203
7.4 Perspectives des travaux de recherche	203
Bibliographie.....	208

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Composition en chaînes acyle des phospholipides des segments externes des bâtonnets.....	35
Tableau 2.1 : Nombres d'onde des bandes d'absorption associées aux différentes régions et groupements fonctionnels des phospholipides; ν_{as} et ν_s réfèrent aux vibrations d'élongations antisymétriques et symétriques, respectivement, et δ_s à une déformation symétrique.	66
Tableau 2.2 : Intervalles de nombre d'onde de la bande amide I (H_2O) et I' (D_2O) associées à chacun des éléments de structure secondaire.	71
Tableau 2.3 : Principales propriétés magnétiques des noyaux à l'étude pour cette thèse dans un champ magnétique de 9,4 Tesla.	78
Table S4.1 : Transition temperature as determined from the position of the $\nu(CH_2)$ and $\nu(C=O)$ bands for fully hydrated DMPG bilayers and DMPG- Ca^{2+} complexes in the absence and presence of Rec-Myr and Rec-nMyr. The values of pure DMPG vesicles in the absence of Ca^{2+} (0.5 mM EGTA) are also shown for comparison.....	151
Table 6.1 : Chemical shifts (δ) (in ppm) and full width at half maximum (FWHM) (in Hz) of Rec-Myr4F and Rec-Myr12F in the absence (EGTA) or presence (Ca) of Ca^{2+} and in the absence (Rec) or presence of DOPC (DOPC Rec) at 5°C.	187

Liste des figures

Figure 1.1 : Représentation schématique d'une coupe longitudinale de l'œil.....	2
Figure 1.2 : Schéma de la rétine humaine.....	3
Figure 1.3 : Schéma des photorécepteurs rétiniens : bâtonnet et cône.....	4
Figure 1.4 : Schéma de la région de la fovea et distribution des photorécepteurs dans la rétine.....	6
Figure 1.5 : Spectre d'absorption du bâtonnet et des cônes.....	7
Figure 1.6 : Structure de la rhodopsine et son organisation dans la membrane des disques des bâtonnets.....	9
Figure 1.7 : Mécanisme d'activation de la phototransduction.	10
Figure 1.8 : Mécanisme d'inactivation de la phototransduction.	12
Figure 1.9 : Formation d'un lien peptidique via la liaison amide entre deux acides aminés en formule générale.	15
Figure 1.10 : Représentation des angles dièdres ϕ et ψ de la liaison peptique (A) et diagramme de Ramachandran (B).	16
Figure 1.11 : Principales structures secondaires (hélice α , feuillet β et tour β).	17
Figure 1.12 : Représentation du motif <i>EF-hand</i> selon l'identification de la forme de la main avec la localisation de la liaison de l'ion calcium.....	19
Figure 1.13 : Le motif <i>EF-hand</i> canonique.	20
Figure 1.14 : Ouverture du motif <i>EF-hand</i>	21
Figure 1.15 : Domaine <i>EF-hand</i> canonique.....	22
Figure 1.16 : Réaction de N-myristoylation par la N-myristoyltransférase et la coenzyme A.	24
Figure 1.17 : Influence de la liaison d'ions calcium sur la structure de la recoverine myristoylée.	27
Figure 1.18 : Structure de la recoverine et extrusion du groupement myristoylé en fonction de la liaison de A) 0, B) 1 et C) 2 ions calcium.	28
Figure 1.19 : Illustration schématique d'une membrane lipidique et de ses principaux constituants.	31
Figure 1.20 : Structure chimique et nomenclature des principaux phospholipides.....	32
Figure 1.21 : Illustration de la géométrie des phospholipides, ainsi que leur courbure favorisée et leur polymorphisme.....	36
Figure 1.22 : Mouvements des phospholipides dans une membrane lipidique ainsi que les temps de corrélations approximatifs qui les caractérisent.....	38
Figure 1.23 : Principale classification des vésicules. Représentation d'une vésicule multilamellaire en A), d'une large vésicule unilamellaire en B) et d'une petite vésicule unilamellaire en C).....	40

Figure 1.24 : Représentation de bicouches lipidiques orientées entre des plaques de verre.	41
Figure 1.25 : Synthèse graphique des techniques d'analyse se rapportant aux différents segments du système étudié en différents états physiques (membranes modèles).	49
Figure 1.26 : Phospholipides utilisés pour le projet de doctorat.....	49
Figure 2.1 : Procédure de surexpression de protéines recombinantes dans des bactéries hôtes.	56
Figure 2.2 : Gel d'électrophorèse de quelques fractions de la purification de la recoverine.	59
Figure 2.3 : Gel d'électrophorèse avec deux concentrations différentes de recoverine myristoylée pour évaluer sa pureté.....	59
Figure 2.4 : Chromatogrammes liquides à haute pression de l'élution de la recoverine au (A) début et à la (B) fin du doctorat.....	61
Figure 2.5 : Vibrations possibles dans une molécule non-linéaire.....	64
Figure 2.6 : Région spectrale associée aux modes d'élongation antisymétriques et symétriques des phospholipides.....	67
Figure 2.7 : Illustration d'une membrane lipidique en phase gel et en phase fluide avec les projections de Newman illustrant un conformère <i>anti</i> et deux types de conformères <i>gauche</i>	67
Figure 2.8 : Exemple d'une courbe de thermotropisme de la bande d'élongation symétrique des CH ₂ pour la dimyristoylphosphatidylcholine ayant une température de transition de phase visible aux alentours de 25 °C et correspondant au point d'inflexion de la courbe.....	68
Figure 2.9 : Région spectrale associée au mode d'élongation symétrique du carbonyle de même que la valeur de nombre d'onde attribuée à chacune des composantes libre et hydratée de la bande en phase gel et fluide et exemple d'une courbe de thermotropisme de cette bande pour la dimyristoylphosphatidylcholine ayant une température de transition de phase visible aux alentours de 25 °C et correspondant au point d'inflexion de la courbe.....	69
Figure 2.10 : Bande amide I : structures impliquées au niveau de la protéine et spectre infrarouge de la région amide I' avec sa décomposition en plusieurs composantes.....	71
Figure 2.11 : Représentation de la projection sur l'axe z pour un noyau de spin ½ A) du vecteur moment angulaire <i>I</i> et B) du vecteur moment magnétique <i>μ</i>	75
Figure 2.12 : Représentation de la transition énergétique pour un noyau de spin ½ placé dans un champ magnétique stationnaire B ₀	76
Figure 2.13 : Représentation dans le modèle classique d'un noyau en précession dans un champ magnétique stationnaire B ₀	77
Figure 2.14 : Ensemble de noyaux en précession en A) et aimantation macroscopique résultante (M ₀) alignée dans la même direction que le champ magnétique stationnaire B ₀ en B).....	79

Figure 2.15 : Principaux axes du tenseur d'anisotropie de déplacement chimique pour l'atome de phosphore des lipides sur une structure schématique (A) et sur un spectre de poudre en résonance magnétique nucléaire à l'état solide en phosphore-31 (B).	84
Figure 2.16 : Spectres en résonance magnétique nucléaire à l'état solide en phosphore-31 de phospholipides sous forme de (A) poudre, (B) vésicules multilamellaires hydratées en phase gel, (C) vésicules multilamellaires hydratées en phase fluide, (D) micelles et (E) orientés uniquement parallèlement au champ magnétique.	86
Figure 2.17 : Dépendance entre le déplacement chimique δ et l'angle θ d'un lipide dans une vésicule multilamellaire par rapport à B_0 sur un spectre en résonance magnétique nucléaire à l'état solide en phosphore-31, ainsi que l'illustration de la valeur de l'anisotropie ($\Delta\sigma$) et des composantes du tenseur d'anisotropie parallèle (σ_{\parallel}) et perpendiculaire (σ_{\perp}) au champ magnétique. 87	87
Figure 2.18 : Impact de la distribution des lipides dans une vésicule multilamellaire (A) sur l'intensité des signaux relativement à un spectre en résonance magnétique nucléaire à l'état solide en phosphore-31 (B).....	88
Figure 2.19 : Effet de la déformabilité des vésicules multilamellaires dans le champ magnétique B_0 sur la forme des spectres en résonance magnétique nucléaire à l'état solide en phosphore-31.....	89
Figure 2.20 : Effet de la vitesse de rotation à l'angle magique sur un spectre de poudre en résonance magnétique nucléaire à l'état solide en phosphore-31.	90
Figure 2.21 : Séquence d'impulsions de l'écho de Hahn.	91
Figure 2.22 : Séquence d'impulsions du <i>Centerband-only detection of exchange</i>	92
Figure 2.23 : Diagramme des niveaux d'énergie pour le deutérium et des spectres en résonance magnétique nucléaire en deutérium montrant que l'interaction quadrupolaire dédouble la raie de Zeeman.	95
Figure 2.24 : Angles θ , β et γ reliant le vecteur C-D au système d'axes du laboratoire. ..	96
Figure 2.25 : Effet des mouvements de rotation et d'oscillation sur l'allure des spectres de poudre en résonance magnétique nucléaire à l'état solide du deutérium: (A) Chaîne acyle statique, (B) Chaîne acyle animée d'un mouvement de rotation, et (C) Chaîne acyle animée de mouvements de rotation et d'oscillation.	97
Figure 2.26 : Séquence d'impulsions de l'écho quadrupolaire.....	99
Figure 2.27 : Séquence d'impulsions à découplage haute puissance.	102
Figure 3.1 : Figure de <i>Table of content</i>	105
Figure 3.2 : Spectra of Rec-Myr and Rec-nMyr (1 mM in D ₂ O buffer) in the presence of Ca ²⁺ (10 mM Ca ²⁺) and in its absence (0.5 mM EGTA) at 25 °C, in the 1720-1520 cm ⁻¹ frequency range. Spectra are normalized with respect to the peak maximum of the amide I' band.	110
Figure 3.3 : Decomposition of the spectrum of Rec-nMyr (1 mM in D ₂ O buffer) in the presence of 10 mM Ca ²⁺ at 25 °C, in the 1720-1520 cm ⁻¹ frequency range.	112

Figure 3.4 : Spectra of (A and B) Rec-Myr and (C and D) Rec-nMyr (1 mM in D ₂ O buffer) as a function of temperature in the (A and C) presence (10 mM Ca ²⁺) and (B and D) absence of Ca ²⁺ (0.5 mM EGTA), in the 1720-1520 cm ⁻¹ frequency range.....	114
Figure 3.5 : Difference spectra of Rec-nMyr (1 mM in D ₂ O buffer) as a function of temperature from 42 to 65 °C in the absence of calcium (0.5 mM EGTA), in the 1700-1600 cm ⁻¹ frequency range. The difference spectra are obtained by subtracting the spectrum of the series preceding aggregation from all subsequent spectra	116
Figure 3.6 : Area at 1685 and 1615 cm ⁻¹ [A(1685 + 1615 cm ⁻¹)], corresponding to the formation of β-sheets, of Rec-Myr and Rec-nMyr (1 mM in D ₂ O buffer) as a function of temperature and calcium concentration. The uncertainty in A(1685 + 1615 cm ⁻¹) is ± 0.02.....	116
Figure 3.7 : A(1685 + 1615 cm ⁻¹) of Rec-Myr and Rec-nMyr (1 mM in D ₂ O buffer) at 65 °C as a function of calcium concentration. The uncertainty in A(1685 + 1615 cm ⁻¹) is ± 0.02.	118
Figure S3.1 : Difference spectra of Rec-Myr (1 mM in D ₂ O buffer) as a function of temperature from 51 to 65 °C in the absence of calcium (0.5 mM EGTA), in the 1700-1600 cm ⁻¹ frequency range. The difference spectra are obtained by subtracting the spectrum of the series preceding aggregation from all subsequent spectra. The absorbance scale is the same than in Fig 3.5.	121
Figure S3.2 :Difference spectra of Rec-nMyr (1 mM in D ₂ O buffer) as a function of temperature from 51 to 65 °C in the presence of 1 mM calcium, in the 1700-1600 cm ⁻¹ frequency range. The difference spectra are obtained by subtracting the spectrum of the series preceding aggregation from all subsequent spectra. The absorbance scale is the same than in Fig 3.5.	122
Figure S3.3 :Difference spectra of Rec-Myr (1 mM in D ₂ O buffer) as a function of temperature from 51 to 65 °C in the presence of 1 mM calcium, in the 1700-1600 cm ⁻¹ frequency range. The difference spectra are obtained by subtracting the spectrum of the series preceding aggregation from all subsequent spectra. The absorbance scale is the same than in Fig 3.5.	123
Figure S3.4 : Difference spectra of Rec-nMyr (1 mM in D ₂ O buffer) as a function of temperature from 51 to 65 °C in the presence of 2 mM calcium, in the 1700-1600 cm ⁻¹ frequency range. The difference spectra are obtained by subtracting the spectrum of the series preceding aggregation from all subsequent spectra. The absorbance scale is the same than in Fig 3.5.	124
Figure 4.1 : Figure de <i>Table of content</i>	127
Figure 4.2 : Temperature dependence of the (top) ν _s (CH ₂) and (bottom) ν(C=O) wavenumbers of DMPG vesicles in the presence of Ca ²⁺ (10 mM Ca ²⁺), in the absence and presence of Rec-Myr and Rec-nMyr at a 200:1 lipid:protein molar ratio. Samples were prepared according to the nMC protocol. The thermotropic curve of pure DMPG vesicles in the absence of Ca ²⁺ (0.5 mM EGTA) is also shown for comparison. Arrows indicate the threshold of the phase transition of the Ca ²⁺ -lipid complexes.....	132
Figure 4.3 : Infrared spectra of DMPG vesicles in the ν(C=O) region in the presence of Ca ²⁺ (10 mM), in the absence and presence of Rec-Myr and Rec-nMyr at a	

200:1 lipid:protein molar ratio at 16, 50 and 65 °C. Samples were prepared according to the nMC protocol. The spectrum of pure DMPG vesicles in the absence of Ca ²⁺ (0.5 mM EGTA) is also shown for comparison. Spectra are normalized with respect to the band maximum and shifted for the sake of clarity.....	133
Figure 4.4 : Infrared spectra of Rec-Myr and Rec-nMyr in the amide I region in the presence of Ca ²⁺ , in the absence or presence of DMPG at 16 and 65 °C. Samples were prepared according to the nMC protocol. Spectra are normalized with respect to the band maximum.....	138
Figure 4.5 : Temperature dependence of the (top) $\nu_s(\text{CH}_2)$ and (bottom) $\nu(\text{C=O})$ wavenumbers of DMPG vesicles in the presence of Ca ²⁺ (10 mM), in the absence and presence of Rec-Myr at a 200:1 lipid:protein molar ratio for samples prepared with the MC protocol. The results obtained for samples prepared with the nMC protocol are also shown for comparison.....	140
Figure 4.6 : Infrared spectra of DMPG vesicles in the $\nu(\text{C=O})$ region in the presence of Ca ²⁺ (10 mM), in the absence and presence of Rec-Myr at a 200:1 lipid:protein molar ratio at 16, 50, and 65 °C for samples prepared with the MC protocol. The results obtained for the nMC protocol are also shown for comparison. Spectra are normalized with respect to the band maximum and shifted for the sake of clarity.....	141
Figure 4.7 : Infrared spectra of Rec-Myr in the amide I region in the presence of Ca ²⁺ and of DMPG vesicles at 16 and 65 °C for samples prepared with the MC protocol. The results obtained for samples prepared with the nMC protocol are also shown for comparison. Spectra are normalized with respect to the band maximum.....	143
Figure 4.8 : Model of membrane insertion of recoverin (red). Recoverin is represented as an ellipsoid with a lateral semimajor axis <i>a</i> and a semiminor axis <i>b</i> . Purple lipids are those displaced upon protein binding and located beneath it, dark blue lipids form the first ring of molecules around the protein (in direct contact), and light blue lipids represent the second ring of molecules. Brown lipids represent unaffected lipids. Modified from ref ⁷⁵	148
Figure S4.1 : Deconvolved IR spectra of DMPG vesicles in the $\nu(\text{C=O})$ region in the presence of Ca ²⁺ (10 mM), in the absence and presence of Rec-Myr and Rec-nMyr, at 16, 50 and 65 °C. The spectrum of pure DMPG vesicles in the absence of Ca ²⁺ (0.5 mM EGTA) is also shown for comparison. Spectra are normalized with respect to the band maximum and shifted for the sake of clarity.....	152
Figure S4.2 : IR spectra of DMPG vesicles in the phosphate region at 16, 37, 50, and 65 °C in the absence (0.5 mM EGTA) and presence of Ca ²⁺ (10 mM Ca ²⁺). Spectra are normalized with respect to the band at 1068 cm ⁻¹	153
Figure S4.3 : Deconvolved IR spectra in the $\nu(\text{C=O})$ region of DMPG vesicles prepared with the MC protocol, in the presence of Ca ²⁺ (10 mM), in the absence and presence of Rec-Myr, at 16, 50 and 65 °C. Spectra are normalized with respect to the band maximum and shifted for the sake of clarity.....	154
Figure S4.4 : Temperature dependence of the $\nu_s(\text{CH}_2)$ (top) and $\nu(\text{C=O})$ (bottom) wavenumbers for POPG (left) and DOPG (right) vesicles, in the presence of	

Ca ²⁺ (10 mM Ca ²⁺), in the absence and presence of Rec-Myr and Rec-nMyr at a 200:1 lipid:Rec molar ratio. The thermotropic curve of pure POPG and DOPG vesicles in the absence of Ca ²⁺ (0.5 mM EGTA) is also shown for comparison.....	155
Figure S4.5 : IR spectra of POPG (left) and DOPG (right) vesicles in the $\nu(\text{C}=\text{O})$ region, in the presence of Ca ²⁺ (10 mM), in the absence and presence of Rec-Myr and Rec-nMyr, at 15 and 65 °C. The spectrum of pure POPG or DOPG vesicles in the absence of Ca ²⁺ (0.5 mM EGTA) is also shown for comparison. Spectra are normalized with respect to the band maximum and shifted for the sake of clarity.....	156
Figure S4.6 : IR spectra of POPG vesicles in the $\nu(\text{PO}_2^-)$ region, in the absence (0.5 mM EGTA) and presence of Ca ²⁺ (10 mM Ca ²⁺) at 12, 37, 50 and 65 °C. Spectra are normalized with respect to the band at 1069 cm ⁻¹	157
Figure S4.7 : IR spectra of Rec-Myr (left side) and Rec-nMyr (right side) in the presence of Ca ²⁺ in the amide I region, in the absence or presence of POPG vesicles, at 15 and 65 °C. Spectra are normalized with respect to the band maximum.	158
Figure S4.8 : IR spectra of Rec-Myr (left side) and Rec-nMyr (right side) in the presence of Ca ²⁺ in the amide I region in the absence or presence of DOPG vesicles, at 15 and 65 °C. Spectra are normalized with respect to the band maximum.	159
Figure 5.1 : Figure de <i>Table of content</i>	162
Figure 5.2 : Influence of calcium binding on the structure of myristoylated recoverin.	163
Figure 5.3 : ³¹ P static ssNMR spectra of DMPC mechanically oriented bilayers in the absence (black) and presence (red) of Rec-Myr-d ₂₇ and in the presence of Ca ²⁺ (10 mM) at 30 °C and a lipid:Rec molar ratio of 200:1.	167
Figure 5.4 : ² H ssNMR spectra of Rec-Myr-d ₂₇ in mechanically oriented bilayers of DMPC at 5 °C (top) and 30 °C (middle-top), DOPC at 5 °C (middle-bottom) and DDPC at 5 °C (bottom) in the absence (0.5 mM EGTA) (dotted line) and presence of Ca ²⁺ (10 mM Ca ²⁺) (full line) at a lipid:Rec molar ratio of 200:1.	168
Figure 6.1 : Three-dimensional structure of myristoylated recoverin with calcium ions (pink spheres) bound to its EF-Hands 2 (green) and 3 (yellow-orange) (left, PDB 1JSA) and myristoylated recoverin in absence of calcium (right, PDB 1IKU).	176
Figure 6.2 : ³¹ P static solid-state NMR spectra of DOPC vesicles in the absence (black) and presence of Rec-Myr (red) or Rec-nMyr (blue) and in the absence (0.5 mM EGTA) (dotted line) and presence of Ca ²⁺ (10 mM Ca ²⁺) (full line) at 37 °C and a lipid:Rec molar ratio of 200:1. Spectra were normalized with respect to the peak height maximum.....	181
Figure 6.3 : Temperature dependence of the $\nu_s(\text{CH}_2)$ (up) and the $\nu(\text{C}=\text{O})$ (down) wavenumbers of DOPC vesicles in the absence (black) and presence of Rec-Myr (red) and Rec-nMyr (blue) and in the absence (0.5 mM EGTA) (dotted line) and presence of Ca ²⁺ (10 mM Ca ²⁺) (full line) at a lipid:Rec molar ratio of 200:1. The error is estimated to be $\pm 0.1 \text{ cm}^{-1}$	182

- Figure 6.4 : ^{31}P CODEX decay at a spinning speed of 5.5 kHz with a dephasing/rephasing train of three 180° pulses of DOPC vesicles in the absence (black) or presence of Rec-Myr (red) or Rec-nMyr (blue) and in the absence (0.5 mM EGTA) (dotted line, square) and presence of Ca^{2+} (10 mM Ca^{2+}) (full line, circle) at 37°C and a lipid:Rec molar ratio of 200:1. 184
- Figure 6.5 : IR spectra of Rec-Myr (left side) (reddish color) and Rec-nMyr (right side) (bluish color) in the amide I' region in the absence (orange and light blue) or in the presence of DOPC (light red and dark blue) vesicles, in the absence (0.5 mM EGTA) (dash line) and presence of Ca^{2+} (10 mM Ca^{2+}) (full line) at 15 (up) and 65°C (down) and lipid:Rec molar ratio of 200:1 in D_2O buffer. Spectra were normalized with respect to the band maximum at 1646 cm^{-1} . 185
- Figure 6.6 : ^{19}F NMR spectra of (A,C) Rec-Myr4F and (B,D) Rec-Myr12F in the absence (A,B) or presence (C,D) of DOPC vesicles in the absence (0.5 mM EGTA) (dashed line) and presence of Ca^{2+} (10 mM Ca^{2+}) (full line) at 5°C and a lipid:Rec molar ratio of 200:1. Spectra were normalized with respect to the peak height maximum. 187
- Figure S6.1 : Absorbance at 280 nm as a function of recoverin concentration in the absence (Rec-nMyr) or presence (Rec-Myr) of the myristoyl group in the protonated (h_{27}) and perdeuterated (d_{27}) forms and in the absence (EGTA) and presence of calcium (Ca) with the curve of molar absorption coefficient at $22071 \pm 52\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ as guideline..... 196
- Figure S6.2 : ^{31}P static solid-state NMR spectra of DOPC vesicles in the absence (black) and presence of Rec-Myr4F (red) or Rec-Myr12F (blue) and in the absence (0.5 mM EGTA) (dotted line) and presence of Ca^{2+} (10 mM Ca^{2+}) (full line) at 25°C and a lipid:Rec molar ratio of 200:1. Spectra were normalized with respect to the peak height maximum. 197
- Figure S6.3 : ^{19}F NMR spectra of (A,C) Rec-Myr4F and (B,D) Rec-Myr 12F in the absence (A,B) or presence (C,D) of DOPC vesicles in the absence (0.5 mM EGTA) (dashed line) and presence of Ca^{2+} (10 mM Ca^{2+}) (full line) at 25°C and a lipid:Rec molar ratio of 200:1. Spectra were normalized with respect to the peak height maximum. 198

Liste des symboles et abréviations

$(0, \pi)$	élongation des carbonyles en phase
$(\pi, 0)$	élongation des carbonyles déphasé
Å	Angstrom
°	degré
°C	degré Celsius
\hbar	constante de Planck réduite
%	pour cent
%mol	pour cent molaire
^1H	atome d'hydrogène, proton
^2H	deutérium, <i>deuterium</i>
5'-GMP	5'-guanosine monophosphate
^{12}C	carbone-12
^{13}C	carbone-13
^{15}N	azote-15
^{19}F	fluor-19, <i>fluorine-19</i>
^{31}P	phosphore-31, <i>phosphorus-31</i>
$\vec{\mu}$	vecteur moment magnétique
$\vec{\mu}_z$	projection du moment magnétique sur l'axe z
\vec{I}	vecteur moment angulaire de spin
\vec{I}_x, \vec{I}_y ou \vec{I}_z	projection du moment de spin angulaire, \vec{I} , sur l'axe x, y ou z
\hat{H}	Hamiltonien
\hat{H}_{CS}	Hamiltonien associé aux interactions internes de déplacement chimique
\hat{H}_{D}	Hamiltonien associé aux interactions internes de couplage dipolaire

\hat{H}_J	Hamiltonien associé aux interactions internes de couplage scalaire
\hat{H}_Q	Hamiltonien associé aux interactions internes de couplage quadrupolaire
\hat{H}_{RF}	Hamiltonien associé aux interactions externes de radiofréquence
\hat{H}_{sys}	Hamiltonien total du système de spin
\hat{H}_Z	Hamiltonien associé aux interactions externes de Zeeman
$\bar{\nu}$	nombre d'onde (fréquence de vibration) en cm^{-1}
β	angle entre le lien C-D et l'axe de rotation la chaîne acyle n'
γ	angle entre l'axe de rotation de la chaîne acyle et la normale à la bicouche lipidique n pouvant immobiliser la chaîne acyle de la recoverine
γ	rapport gyromagnétique
γ_i et γ_j	rapports gyromagnétiques des noyaux i et j , respectivement
δ	déplacement chimique
$\Delta\sigma$	anisotropie
$\Delta\nu(\theta)$	fréquence réduite en ppm
$\Delta\chi$	anisotropie de susceptibilité magnétique
$\Delta\nu_Q$	écart quadrupolaire en Hertz
ΔE	différence d'énergie entre deux niveaux d'énergie
η	coefficient de viscosité
η	paramètre d'asymétrie du système
Θ	angle inter-hélice du motif EF-Hand entre l'axe z et la projection xy
θ	angle entre le vecteur internucléaire et le champ magnétique externe B_0
θ	angle entre l'axe principal du phospholipide et le champ magnétique B_0
θ	un des angles définissant l'orientation du tenseur EFG par rapport au champ magnétique B_0
θ	angle entre la normale à la bicouche lipidique n pouvant immobiliser la chaîne acyle de la recoverine et la direction du champ magnétique B_0
λ	longueur d'onde

μg	microgramme (10^{-6} g)
μm	micromètre (10^{-6} m)
μs	microseconde (10^{-6} s)
μM	micromolaire (10^{-6} M)
$\nu(\text{ppm})$	fréquence en ppm
ν_0	fréquence de la radiation électromagnétique
ν_0	fréquence de précession en Hz
$\nu(\text{C=O})$	vibration d'élongation du carbonyle, <i>carbonyl stretching vibration</i>
$\nu_s(\text{CH}_2)$	vibration d'élongation symétrique des CH_2 , <i>CH_2 symmetric stretching vibration</i>
$\nu_{as}(\text{COO}^-)$	bande d'élongation antisymétrique du groupement carboxylate, <i>antisymmetric COO^- stretching band</i>
$\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$	bande d'élongation antisymétrique des phosphates <i>asymmetric phosphate stretching band</i>
$\nu_s(\text{PO}_2^-)$	bande d'élongation symétrique des phosphates <i>symmetric phosphate stretching band</i>
σ	constante de blindage ou d'écrantage
σ_{ii}	composante du tenseur d'anisotropie pour un axe distinct ayant comme valeur de i 1, 2 ou 3
σ_{\parallel}	composante du tenseur d'anisotropie parallèle à l'axe de rotation du lipide
σ_{\perp}	composante du tenseur d'anisotropie perpendiculaire à l'axe de rotation du lipide
σ'_{\parallel}	composante du tenseur d'anisotropie parallèle au champ magnétique en phase fluide
σ'_{\perp}	composante du tenseur d'anisotropie perpendiculaire au champ magnétique en phase fluide
σ_{iso}	composante isotrope du tenseur
τ	temps entre impulsions ou entre impulsion et acquisition du signal RMN
$\tau_c(R_i, D_{\text{rot}})$	temps de corrélation rotationnel

ϕ	un des angles définissant l'orientation du tenseur EFG par rapport au champ magnétique B_0
ϕ	angle dièdre C_α -N du plan amide formé par deux C_α , le H du N et le O du $C'=O$
ϕ	angle horizontal plan du motif EF-Hand entre l'axe x et la projection xy
χ	susceptibilité magnétique
ψ	angle dièdre C_α -C' du plan amide formé par deux C_α , le H du N et le O du $C'=O$
Ψ	fonction d'onde décrivant le système de spins
ω	angle de rotation du motif EF-Hand défini par la rotation du vecteur correspondant à l'hélice C-terminale
ω	position de la double liaison dans une chaîne acyle à partir du dernier atome de carbone de la chaîne acyle, soit le CH_3
ω_0	fréquence angulaire de Larmor ou de résonance en rad/s
a	dimension du demi-grand axe d'une ellipse
A	absorbance
A_{600}	absorbance à 600 nm
A_q	constante de couplage quadrupolaire
Arr	arrestine
Asp	acide aspartique, <i>aspartic acid</i>
ADC	anisotropie de déplacement chimique
ADH	acide docosahexaénoïque
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
b	demi-petit axe d'une ellipse
B'	champ magnétique produit par le nuage électronique des noyaux voisins

B_0	champ magnétique externe
B_1	champ électromagnétique perpendiculaire au champ magnétique B_0
Ba^{2+}	ion barium
B_{eff}	champ magnétique effectif
B_{ind}	champ magnétique induit
c	vitesse de la lumière en cm/s
cm	centimètre (10^{-2} m)
cmc	concentration micellaire critique
C=O	carbonyle
C12:0	lauréoyole
C14:0	myristoyole
C16:0	palmitoyole
C18:1 ω 9	oléoyole
C22:6 ω 3	docosahexaénoyle
Ca^{2+}	ion calcium, <i>calcium ion</i>
CaBP	<i>calcium-binding proteins</i> , protéines liant le calcium
Cd^{2+}	ion cadmium
Chol	cholestérol
CoA	coenzyme A
Cys	cystéine
CD	<i>circular dichroism</i> , dichroïsme circulaire
CODEX	centerband-only detection of exchange
COO^-	carboxylate
CSA	<i>chemical shift anisotropy</i> , anisotropie de déplacement chimique

D	di ou double
D	docosahexaénoyle
D1	délai d'équilibration
D_{lat}	coefficient de diffusion latérale des lipides
D_{rot}	coefficient de diffusion rotationnelle
D_{tum}	coefficient de diffusion rotationnelle de la vésicule sur elle-même
Da	dalton (1 Da = 1g/mol)
DDPC	1,2-didocosahexaénoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine, <i>1,2-didocosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>
DHP	<i>1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene</i> , 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène
DMPC	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine, <i>1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>
DMPG	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycérol) (sel de sodium), <i>1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt)</i>
DOPC	1,2-dioléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine, <i>1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>
DOPG	1,2-dioléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycérol) (sel de sodium), <i>1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt)</i>
DRM	<i>detergent-resistant membranes</i> , membranes résistantes aux détergents
e	charge élémentaire
e·q	expression habituelle pour la valeur principale du tenseur de gradient de champ électrique dépendante de la structure de la liaison
eQ	moment quadropolaire électrique
E	énergie inter niveau de spin
E	énergie du système de spins
E. coli	Escherichia coli
EFG	<i>electric field gradient</i> , gradient de champ électrique
EGTA	acide acétique éthylène-glycol-bis-((3-aminoéthyle éther) N, N'-tétra,

ethylene glycol bis(β -aminoethyl ether)-N,N' -tetraacetic acid

ESI	ionisation à électronébuliseur, <i>electrospray ionization</i>
f	constante de force de la liaison en dyne/cm
FID	<i>Free Induction Decay</i> , signal de précession libre
FT	<i>Fourier transform</i> , transformée de Fourier
FTIR ou FT-IR	<i>Fourier transform infrared</i> , infrarouge à transformée de Fournier
FWHM	<i>full width at half maximum</i> , pleine largeur à mi-hauteur
g	gravité, unité d'accélération
G α t	sous-unité alpha de la transducine
G $\alpha\beta\gamma$ t	transducine
G β 5	long splice isoform of the type 5 G protein β subunit
G $\beta\gamma$ t	sous-unités bêta et gamma de la transducine
Glu	acide glutamique, <i>glutamic acid</i>
Gly	glycine
GC	guanylate cyclase
GCAP(-)1	protéine activatrice de la guanylate cyclase 1, <i>guanylate cyclase activating protein-1</i>
GCAP(-)2	protéine activatrice de la guanylate cyclase 2, <i>guanylate cyclase activating protein-2</i>
GCAP3	protéine activatrice de la guanylate cyclase 3, <i>guanylate cyclase activating protein-3</i>
GDP	guanosine diphosphate
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
GTP	guanosine triphosphate
h	constante de Planck

hpdec	découplage haute puissance, <i>high power decoupling</i>
His	histidine
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthanesulfonique, <i>4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-1-ethanesulfonic acid</i>
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> , chromatographie liquide à haute performance
I	nombre quantique de spin
I	radiation absorbée par l'échantillon
I_0	radiation incidente
I_z	opérateurs de spin nucléaire du noyau i
IPTG	isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
IR	infrarouge, <i>infrared</i>
J_z	opérateurs de spin nucléaire du noyau j
k_B	constante de Boltzmann
K^+	ion potassium
kDa	kilodalton (10^3 Dalton = 10^3 g/mol)
l	fonction d'harmonique sphérique
L_α	phase fluide avec chaînes acyle désordonnées
L_β	phase gel avec chaînes acyle perpendiculaires au plan de la bicouche
L_β'	phase gel avec chaînes acyle partiellement inclinées au plan de la bicouche
Lys	lysine
LB	Luria-Bertani
LC	<i>liquid chromatography</i> , chromatographie liquide
LSK	laurylsulfate de potassium
m	nombre quantique magnétique

m	paire d'impulsions de 180° dans la séquence RMN CODEX
mm	millimètre (10^{-3} m)
ms	milliseconde (10^{-3} s)
mL	millilitre (10^{-3} L)
mM	millimolaire (10^{-3} M)
mV	millivolt (10^{-3} V)
M	myristoyle
M_0	aimantation résiduelle
M_1	aimantation sur l'axe x
M_x et M_y	masse de l'atome x et y respectivement en g
$M_{xy}(0)$	aimantation transversale à la suite de l'impulsion de 90° dans le plan xy
$M_{xy}(t)$	aimantation transversale à un temps donné dans le plan xy
M_z	aimantation sur l'axe z
$M_z(0)$	aimantation résiduelle à l'équilibre sur l'axe z
$M_z(t)$	aimantation longitudinale à un temps donné sur l'axe z
Met	méthionine
Mg^{2+}	ion magnésium
Mn^{2+}	ion manganèse
Myr-d ₂₇	groupement myristoyle perdeutééré
Myr-h ₂₇	groupement myristoyle protoné
Myr4F	groupement myristoyle monofluoré en position 4
Myr12F	groupement myristoyle monofluoré en position 12
MAS	<i>magic-angle spinning</i> , rotation à l'angle magique
MC	<i>melted complexes</i> , complexes fondus
MCT	<i>mercury cadmium telluric</i> , mercure cadmium tellure

MHz	mégahertz (10^6 Hz)
MLV	<i>multilamellar vesicle</i> , vésicule multilamellaire
MS	spectrométrie de masse, <i>mass spectrometry</i>
nm	nanomètre (10^{-9} m)
nM	nanomolaire (10^{-9} M)
nMC	<i>non-melted complexes</i> , complexes non-fondus
N_α et N_β	population de l'état de spin α et β respectivement
Na^+	ion sodium
NCS	<i>neuronal calcium sensor</i> , neuroprotéine sensible aux ions calcium
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , résonance magnétique nucléaire
NMT	N-myristoyl-transférase
NOE	effet nucléaire Overhauser <i>nuclear Overhauser effect</i>
O	oléoyle
P	palmitoyle
P	phosphatidyl
PC	phosphatidylcholine
PDE	phosphodiesterase 6
PE	phosphatidyléthanolamine, <i>phosphatidylethanolamine</i>
PG	phosphatidylglycérol, <i>phosphatidylglycerol</i>
PI	phosphatidylinositol
PO_2^-	phosphate
POPG	1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phospho-(1'-rac-glycérol) (sel de sodium)

	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt)
PS	phosphatidylsérine
Q	moment quadropolaire
r	distance séparant les noyaux i et j
R_i	rayon de la bicouche
R_1, R_2	chaîne latérale d'un acide amidé
R_1, R_2	chaîne acyle d'un lipide
R9AP	RGS9 anchor protein
Rad	radian
Rec	recoverine, <i>recoverin</i>
Rec-nMyr	recoverine non myristoylée, recoverin nonmyristoylated, nonmyristoylated recoverin
Rec-Myr	recoverine myristoylée, recoverin myristoylated, myristoylated recoverin
Rec-Myr- d_{27}	recoverine myristoylée perdeutérée, <i>perdeuterated (d_{27}) myristoylated recoverin</i>
Rec-Myr4F	recoverine avec un atome de fluor en position 4 sur le groupement myristoylé, <i>recoverin with a fluorine atom at position 4 in the myristoyl moiety</i>
Rec-Myr12F	recoverine avec un atome de fluor en position 12 sur le groupement myristoylé, <i>recoverin with a fluorine atom at position 12 in the myristoyl moiety</i>
Rho, R	rhodopsine
Rho*, R*	rhodopsine activée
RCT	<i>rotational correlation time</i> , temps de corrélation rotationnel
RGS9	regulator of G protein signaling
RK	rhodopsine kinase
RMN	résonance magnétique nucléaire
ROS	<i>rod outer segments</i> ,

	segments externes du bâtonnet
s	seconde
ssNMR	<i>solid-state nuclear magnetic resonance</i> , résonance magnétique nucléaire à l'état solide
$S(t_m, \delta Mt_r, R_i)$	aire ou intensité du signal de CODEX ayant une décroissance dépendante de t_m , du nombre d'impulsions de 180° (δMt_r) et du rayon (R_i)
$S_0(t_z, \delta Mt_r, R_i)$	aire ou intensité du signal de CODEX de référence dépendant de t_z , du nombre d'impulsions de 180° (δMt_r) et du rayon (R_i)
S_{CD}	paramètre d'ordre orientationnel
Ser	sérine
Sr^{2+}	ion strontium
SAXS	<i>small-angle X-ray scattering</i> , diffusion des rayons X aux petits angles
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de potassium
SEB	segment externe du bâtonnet
SPR	résonance de plasmon de surface, <i>surface plasmon resonance</i>
t	temps
t_r	temps d'une période de rotor (1/vitesse de MAS en Hz)
t_m	temps de mélange étant un multiple du temps d'une période de rotor
t_z	temps de filtration sur l'axe z d'une durée de t_r
T	transmittance
T	Tesla
T	température du système
T	température
T_1	temps de relaxation longitudinal
T_2	temps de relaxation transversal
T_c	<i>melting temperature of lipid-Ca²⁺ complexes</i> ,

	température de fusion des complexes lipide-Ca ²⁺
T _m	température de transition de la phase gel à fluide des bicouches lipidiques, gel-to-fluid phase transition temperature of lipid bilayers, chain melting phase transition temperature
Thr	thréonine
TF	transformée de Fourier
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i> , acide trifluoroacétique
TOF	temps de vol, <i>time of flight</i>
TPPM	<i>two-pulse phase-modulated</i> , phase modulée par deux impulsions
UV	ultraviolet
VML	vésicule multilamellaire
VUL	vésicule unilamellaire
Zn ²⁺	ion zinc

*À mes anges,
passés, présents, futurs,
de près ou de loin.*

*À mes parents Angèle et Luc.
À mes frères Pier-Luc et Guillaume.*

*En mémoire de Louna (2013-2017),
ma thérapeute et fidèle lapine de doctorat.*

Remerciements

Cette aventure tumultueuse et heureuse de près de six ans d'études aux cycles supérieurs ayant eu des hauts et des bas, des virages serrés et imprévus, prend aujourd'hui fin par l'achèvement de cette thèse. Ce parcours n'aurait pas été possible et le même sans bien des personnes que je désire remercier personnellement.

Tout débute par Michèle Auger et Christian Salessé, mes deux «parents» superviseurs de projet sans qui je n'aurais pas pu faire mes études graduées et réaliser mon projet de recherche. Merci pour votre patience et votre bienveillance envers moi. Merci de m'avoir écoutée dans les bons et moins bons moments. Merci d'avoir resserré la vis quand je me dissipais avec ma fougue d'idées de grandeur. Vous avez été humainement bon avec moi malgré mes travers d'anxieuse.

Michèle, merci de m'avoir acceptée pour un stage à l'été 2011 avec la possibilité de faire des horaires variés sans savoir que j'étais inquiète de rester seule longtemps à Québec. Tu venais de commencer à me faire grandir comme personne, puis sont venues au cours des études graduées la scientifique et la professionnelle. Merci de ta présence en personne et par courriel malgré les épreuves qui ont parsemé le temps. Merci de m'avoir permis de transmettre mon amour de la recherche biophysique avec des stagiaires. Il restera que ta vitesse de réponse aux courriels et de correction conservera toujours un caractère légendaire pour moi.

Christian, vous qui m'avez acceptée aux études graduées sans trop me connaître personnellement au départ, merci. Les nombreuses discussions que j'ai eues avec vous dans votre bureau m'ont permis de voir votre passion pour la science, ainsi que pour la transmettre avec la rigueur de l'importance des menus détails. Vos expressions uniques, ainsi que les rencontres d'équipe hors hôpital pour de la pétanque, de l'Arbraska, du curling, ainsi que les soupers chez vous qui s'y rattachaient resteront gravées dans ma mémoire longtemps.

Ces deux personnes m'ont permis d'assister, participer et vivre de nombreux congrès. Il y a eu de nombreux congrès provinciaux avec le premier au baccalauréat suite à mon stage d'été, soit le Colloque annuel des étudiantes et étudiants de 1^{er} cycle en chimie de l'Université de Sherbrooke. Puis ont suivi de nombreuses éditions aux études graduées de la Retraite et du Symposium de PROTÉO, du Colloque annuel du CQMF, du Colloque

étudiant du CERMA, de la Journée annuelle de recherche en ophtalmologie (JARO) et de la Réunion annuelle du Réseau de recherche en santé de la vision (RRSV). Il y a eu aussi les congrès nationaux ou interprovinciaux comme ceux des rencontres RMN MOOT à Québec et Montréal, puis les deux congrès de la Société canadienne de chimie (CSC) à Québec et Ottawa. Finalement, il y a eu les congrès internationaux m'ayant permis de voyager et d'avoir mon baptême de l'air avec la rencontre annuelle de la *Biophysical Society* des États-Unis à San Francisco en 2014, le congrès de l'*International Chemical Congress of Pacific Basin Societies* (Pacifichem) à Honolulu en 2015, le congrès de l'*International Council on Magnetic Resonance in Biological Systems* (ICMRBS) à Kyoto en 2016 et la rencontre de l'*International Society of Magnetic Resonance* (ISMAR) à Québec en 2017. La participation aux congrès internationaux fut permise par l'obtention d'une bourse de congrès de la part du Programme FONCER de Formation en Bionanomachines (CTPB) pour le Pacifichem et de la part de PROTEO, le regroupement québécois de recherche sur la fonction, l'ingénierie et les applications des protéines pour l'ICMRBS. Merci Michèle et Christian de m'avoir permis d'assister aux autres congrès.

De manière plus formelle, je tiens à remercier les organismes subventionnaires gouvernementaux que sont le Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie (CRSNG) du Canada pour une bourse de recherche de 1^{er} cycle m'ayant initiée à la recherche et pour une bourse d'études supérieures du Canada au niveau de la maîtrise, ainsi que le Fonds de recherche du Québec - Nature et technologie (FRQ-NT) pour la bourse de maîtrise et de doctorat en recherche. Merci Michèle et Christian de m'avoir aidée à rédiger les demandes de bourses et d'avoir comblé le temps "supplémentaire" de mes études graduées. Je veux remercier le Département de chimie de m'avoir permis d'être auxiliaire d'enseignement pour des tâches de corrections et une charge partielle de cours. Merci aussi à PROTEO et au Centre de recherche sur les matériaux avancés (CERMA) pour l'accès à plusieurs équipements scientifiques.

Je me dois de remercier le Pr Jean-François Paquin sans qui l'étude de la recoverine avec un groupement myristoylé monofluoré n'aurait pas pu voir le jour. Merci d'avoir permis à Marie-Claude Gagnon de me laisser un peu de vos précieux acides myristiques monofluorés pour mes travaux. Ce fut une collaboration entre trois chercheurs ayant permis l'obtention de résultats dont je suis fière.

Mes stagiaires Melanie Schneider, Audrey Picard-Lafond, Catherine Marcotte et Caroline

Dufresne... Audrey qui a été dans la course d'obtention des résultats pour le premier article et qui m'a eue un peu trop intense en ne lui laissant quasiment pas de temps de jour pour rédiger son rapport de stage vu mon apprentissage de «maître de stage». Catherine qui veut que je passe un bon week-end en omettant de me dire qu'il y a eu de la perte dans un lavage d'une purification de protéine par pure bonhomie et qui finalement a apprécié son été dans le monde de la recherche, bien qu'elle doutait aimer la recherche au départ. Caroline qui finit par me dire «C'est beau j'ai compris comment faire pour laver les cellules IR, tu peux t'en aller faire autres choses» (pas tannante du tout la boss qui veut que tout aille bien et qu'il n'y ait pas de questionnement...) et qui m'a aidée pour mon oral au CSC en anglais. Vous avez été des petits anges sur Terre pour moi. Merci d'avoir fait un stage dans le groupe Auger et d'avoir accepté et entré dans ma folie de recherche. Certaines d'entre vous par moment me permettaient de décider à venir à l'université et à continuer une journée après l'autre de faire de la recherche quand tout semblait vouloir prendre le bord personnellement ou dans mon projet de recherche. Vous avez été des ancres précieuses. Vous m'avez permis d'apprendre à transmettre mon amour de la recherche, ainsi que les connaissances s'y rapportant même si je n'étais pas toujours adéquate en tout temps, merci de votre patience pour cela. Je vous dois une fière chandelle pour tout le travail que vous avez accompli qu'il soit ou non inclus dans les résultats présentés dans cette thèse. Vous resterez des collègues ou des amies pour moi.

Chers professionnels de recherche qu'aurais-je fait sans vous! Vous m'avez montré et transmis votre amour et passion pour la surexpression et purification de protéine pour Line Cantin, pour les appareillages de la spectroscopie infrarouge pour Jean-François Dubé-Rioux et François Paquet-Mercier, pour l'analyse des spectres infrarouges pour Thierry Lefèvre, pour la spectroscopie RMN et la spectrométrie de masse pour Pierre Audet. Line, ou «maman» Line, à côté de «papa» Christian, merci de m'avoir aidée «mille» fois à refermer ma colonne de purification quand je la faisais sécher et que je ne comprenais pas comment faire pour ne pas qu'elle coule, d'avoir fait plein de petits gestes qui m'ont grandement simplifié la vie en cours de purification allant de changement de solution de dialyse, à venir changer une colonne sur le HPLC en pleine nuit, avant d'aller te coucher, pour que mes mesures se fassent et plein d'autres compte tenu que je n'étais vraiment pas toujours physiquement à l'«hôpital». Jeff sans qui certains spectromètres infrarouges n'auraient pas ressuscité suite au bris arrivant pendant que je les utilisais, qui nous permettait que Grams fonctionne sur nos ordinateurs vieux comme jeunes, mais que dire

de ton amour du sport et de ton langage coloré. François, timide François au premier abord, mais qui est pince-sans-rire et tellement professionnel, ne t'inquiète pas ce n'est pas toi (et pas moi quand même en cas où vous le penseriez...) qui a fait mourir tous les spectromètres IR un après l'autre après ton arrivée en poste et je me rappellerai qu'il faut essayer en en forme de «dauphin» les cristaux. Thierry, l'écolo, un des «papa» que Michèle m'a permis de côtoyer, merci de m'avoir montré la puissance et l'importance de l'analyse des spectres infrarouges, ta présence et ton écoute m'ont fait du bien à certains moments de ce doctorat. Pierre, un autre «papa» de l'équipe de Michèle, je n'oublierai pas tes «Bonjour Kim en premier SVP» quand j'arrivais et ne disais que ton nom ou simplement que j'avais un problème au début de mes études, tu as fini par m'éduquer et surtout à m'initier à toutes les connaissances se rapportant au gros jouet qu'est la RMN. Merci de ta patience, de ton écoute et de ta présence dans les bons et moins bons moments de ce cheminement doctoral. Je tiens aussi à remercier Victor Terskikh pour avoir fait l'analyse de tous mes échantillons sur le spectromètre RMN 900 MHz au Centre national de RMN à ultrahaut champ pour les solides, ainsi que le Centre d'exister et de m'avoir permis d'envoyer mes échantillons.

Toutes les personnes de ce paragraphe m'ont permis d'avoir des souvenirs de party d'Halloween, de Noël, de groupe, de milieu ou fin de congrès, ainsi que de nombreux Forum Provincial Carrière en Chimie (FPCC) mémorables. Ainsi, je tiens à remercier mes collègues ayant passé au fil du temps à travers l'équipe **Auger** (Matthieu Fillion, Justine Dionne (Cocktail festif!), Pierre-Dan Bourdon (Grande roue sur le gazon du Parlement en pleine nuit...), Alexandrine Huot (Potter!), François Paquet-Mercier, Jane Gagné, Marie-Claude Gagnon, Maud Auger, Benjamin Martial, Martin Gauthier, Jean-François Labbé, Quoc Chon Le, Émile Robert, Laurie Bédard, Geneviève Valois-Paillard, Ève Gagné, Maxime Goudreau, Mylène Brochu, Marie Leroy (tes dîpers!), Émilie Morin-Michaud, Émilie Bruneau, Philippe Bilodeau, Xavier Bertrand, Mathieu Lamarre, Paméla Ouellet, Bianka Turgeon, Rémi Nadeau, Jean-Daniel Doucet, Vicky Thériault), l'équipe **Salesse** (Sarah Roy, Mustapha Lhor, Phillippe Calvez, Élodie Boisselier, Habib Horchani, Audrey-Anne Prévèreau, Samuel Lemire, Sarah Bernier, Marie-Ève Gauthier, Charlotte Lemay-Lefebvre, Thais Schmidt, Andre Hadiesck, Isabella Silva-Moreira), ainsi que ceux croisés à l'**université** dans les groupes Pézolet, Voyer et Greener ayant une similitude de domaines de recherche et de l'**hôpital Saint-Sacrement du CUO-Recherche fondamentale** (Mathieu Ouellet, Xiaoling Yan, Mahmoud Omar, Cindy Weidman avec Bruno Hass par la

bande, Jade Pomerleau, Florence Massé, Corinne Zinflou, Aïcha Dédé Djigo, Peter Geges, Sébastien Méthot, Sébastien P. Gendron, Justin D. Mallet) avec ses chercheurs (Patrick J. Rochette, Sylvain Guérin, Stéphanie Proulx, Solange Landreville) et leurs professionnels de recherche (Julie Bérubé, Alicia Montoni, Patrick Carrier, Olivier Drouin-Rochette, Isabelle Savard, Johanne Dufour).

Matt! Je sais que tu as déjà un jumeau, mais je pense que je suis ta jumelle cosmique ou de recherche. Merci Matthieu Fillion d'avoir été là pour moi à l'université, mais aussi en dehors de ses murs. Ta présence a adouci ce parcours doctoral. Je me suis sentie moins seule avec mes idéaux qui semblaient bien utopiques pour d'autres. Tu m'as rendue meilleure comme personne, mais comme chercheuse aussi. Je t'en dois toute une mon cher ami! J'espère te conserver près de moi longtemps.

Je veux aussi remercier mes amis que je me suis fait au baccalauréat qui m'ont suivie pendant mes études graduées, ainsi que d'autres qui se sont greffés en cours d'études supérieures pour les activités sociales telles que des marches, des soupers et des parties de jeux de société que nous avons faits ensemble. Merci de m'avoir épaulée en le sachant clairement ou non. Merci Sébastien Lamarre, Charles-Olivier Normandeau, Benoît Richard, Marie-Pier Côté, Danny Lainé, Carole-Anne Fortin (Carousse), François Hudon, William-Olivier Caron, Ariel Duclos, Amélie Robitaille, Justine Veilleux, Ivan Rodriguez, Nicolas Guérin, Sébastien Leclerc, Benjamin Bergeron Marie-Ève Lecavalier, Marie-Pier Plante, Julie Tousignant.

À l'université, j'ai eu de nombreux problèmes avec mon ordinateur ayant de "grand" talent informatique, ainsi avec l'achèvement de cette thèse je mets fin à mon "abonnement" au support informatique du pavillon Vachon. Je vous libère messieurs!

Les dernières personnes universitaires que je tiens à remercier sont les évaluateurs de cette thèse, soit l'examineur externe Pr Michel Lafleur du département de chimie de l'Université de Montréal et les examinateurs internes Pr Normand Voyer du département de chimie et Pr Stéphane Gagné du département de biochimie, de microbiologie et de bio-informatique. Merci d'avoir pris le temps d'évaluer ma thèse malgré les délais qui furent courts finalement.

Je tiens à mentionner des personnes par initiales qui indirectement m'ont permis d'être la personne que je suis aujourd'hui qui a pu terminer ce doctorat. Merci à vous LR, ML, SG,

DG, CP, CS, JDG, MDF, VM, OL et PC.

Ma famille éloignée qui par sa présence à distance ou lors de rencontres familiales m'a permis de garder les deux pieds sur Terre et la tête froide quand elle voulait trop s'échauffer. Un merci plus spéciale pour avoir été là à Marie-Marthe Fournier (ma «matante», ma deuxième mère avec ses petits plats et ses activités beignes, ainsi que ses jassettes), Jean-Guy Beaucage, Mylène Beaucage (chère cousine bien qu'on se voit moins souvent tu resteras toujours comme dans notre jeunesse ma sœur d'«été») avec ton copain Stéphane Dextraze, Monique Chaput (merci pour tes mots d'encouragement et tes corrections, ainsi que tes visites chez maman et papa), Jules Potvin, Madeleine Fournier et Daniel Simard (merci d'être venus me visiter à Québec, ça m'a permis de discuter avec vous différemment), Jean Benjamin et Johanne Riel (mes deux fous qui sont venus peindre ma chambre comme cadeau de la part de ma mère et merci d'être là pour mes parents comme moi).

Enfin, ma garde rapprochée, mon noyau, mes parents Angèle Fournier et Luc Potvin, ainsi que mon frère Guillaume Potvin. Vous m'avez permis de garder le fort et de voir la lumière au bout du tunnel même quand il faisait tempête dans ma tête pour des raisons incompréhensibles. Votre seul but était que j'aie bien et que je continue si j'aimais cela même si vous ne compreniez rien à ce que je faisais comme travail. Votre support et votre amour valent tout l'or du ciel à mes yeux. Merci d'être là quand il le faut en mots, en pensée et en personne. Maman, tes petits plats m'ont sauvé bien du temps dans des périodes où les études prenaient toute la place. J'essayais de ne pas trop t'inquiéter à distance même si c'est impossible de ne pas finir par inquiéter notre mère! Papa, ces petites soirées sans mots ou avec peu de mot sur le divan pour comprendre le monde qui nous entoure et relaxer auront toujours une place privilégiée dans mon cœur. Tu finissais souvent par être mon homme de référence pour mon auto ou la maison quand je me posais des questions et ce même à distance. Guillaume, merci de m'avoir rendue autonome et sans crainte d'être seule à Québec pendant nos années de baccalauréat pour que je puisse faire un stage d'un été, puis toutes ces études et être maintenant comme adulte. Merci de m'avoir sortie de mes travaux pour bouger, aller au cinéma et même faire le ménage! Une dernière pensée pour toi Pier-Luc, j'espère que d'en haut tu es fier de ta petite sœur, tu as été à mes côtés tous les jours dans mon cœur.

À la maison familiale, les derniers mois de doctorat ont été difficile pour les animaux

malheureusement. En plus de la perte de Louna, il y a eu le départ de Roco, notre perroquet depuis près de 14 ans. Petit oiseau à femme, ayant une visée incroyable les dernières années, tout en ayant conservé son côté esthéticien arracheur de poils ou de cicatrice. Avant, il y a eu le départ de Maya aussi, une belle chienne noire bien domptée qui permettait de bouger et de donner de la vie au balcon. Ces petites bêtes ont empêché les parents de s'ennuyer suite au départ pour les études de leurs enfants. Néanmoins, finalement, il semble que c'est quasiment impossible d'avoir cette maison sans animaux, avec la nouvelle arrivée surprise et imprévue d'un lapin!

Louna, ma boule d'amour, ma thérapeute à poils, ma petite lapine dont les oreilles ont empêché que ce ne soit que celles des «murs» qui m'entendent parler seule souvent. Merci d'avoir été une présence réconfortante dans cette maison quand Guillaume a eu fini ses études. Merci d'avoir aidé la transition même si je t'aurais appréciée encore à mes côtés pour la prochaine transition, soit celle vers le marché du travail.

Rapport-Gratuit.com

Avant-propos

Les travaux de recherche de cette thèse portent sur la caractérisation spectroscopique de la structure et de l'interaction membranaire de la recoverine. Pour ce faire, la recoverine a d'abord été étudiée seule en solution et ensuite en présence de membranes modèles grâce à la spectroscopie infrarouge et de résonance magnétique nucléaire à l'état solide. Ainsi, le premier chapitre de cette thèse expose les éléments essentiels pour comprendre la problématique des travaux de recherche. Le deuxième chapitre présente les aspects théoriques de l'approche expérimentale. Les résultats expérimentaux obtenus dans le cadre de ces travaux vont du troisième au sixième chapitre. Le troisième et quatrième chapitre sont des articles scientifiques publiés. Le cinquième chapitre est une communication scientifique publiée. Le sixième chapitre est un manuscrit soumis. Le septième chapitre conclut et ouvre le projet sur de nouvelles perspectives. L'élaboration des articles scientifiques a été faite en étroite collaboration avec la directrice et le co-directeur de ce projet ainsi que des professionnel(le)s de recherche et auxiliaires de recherche de premier cycle. L'implication de chacun des auteurs de ces articles est brièvement expliquée ci-dessous.

Le Chapitre 3 comporte un article scientifique portant sur la structure secondaire de la recoverine myristoylée et non myristoylée en absence et présence de calcium, ainsi que sa stabilité thermique dans ces conditions. Il a pour titre « *The thermal stability of recoverin depends on calcium binding and its myristoyl moiety as revealed by infrared spectroscopy* » et fut publié dans la revue *Biochemistry* en janvier 2014, volume 53, pages 48-56. Les auteurs sont Kim Potvin-Fournier, Thierry Lefèvre, Audrey Picard-Lafond, Geneviève Valois-Paillard, Line Cantin, Christian Salesse et Michèle Auger. J'ai produit la protéine ainsi que réalisé la majeure partie des résultats et de leur analyse. Ensuite, j'ai rédigé le plan du manuscrit avec une partie de la recherche bibliographique, l'écriture de la section « *Material and Methods* » et la révision du manuscrit à toutes les étapes de rédaction et de publication. Thierry Lefèvre a analysé une partie des résultats, monté les figures, écrit la première version de l'article et révisé le manuscrit à toutes les étapes de rédaction et de publication. Audrey Picard-Lafond était une auxiliaire de recherche de premier cycle sous ma supervision sur le projet pendant l'obtention de ces résultats. Elle a fait plusieurs mesures de spectroscopie infrarouge, ainsi que leur analyse. Geneviève Valois-Paillard était l'étudiante à la maîtrise sur ce projet avant moi. J'avais été son auxiliaire de recherche de premier cycle pendant l'été précédent mon entrée aux études

supérieures. Elle m'avait montré comment faire la surexpression et la purification de la protéine, ainsi que l'utilisation des spectromètres infrarouges et l'analyse des résultats qui en découlent. Elle avait aussi obtenu les résultats préliminaires à cet article. Line Cantin est la professionnelle de recherche qui épaulé les étudiants du Pr Salesse pendant leurs manipulations de surexpression et purification. Christian Salesse est le co-directeur de ce projet et a participé activement à la rédaction de l'introduction et à la révision du manuscrit à toutes les étapes de rédaction et de publication. Michèle Auger est la directrice de ce projet et elle a participé à la révision du manuscrit à toutes les étapes de rédaction et de publication.

Le Chapitre 4 comporte un article scientifique portant sur l'interaction de la recoverine avec le phosphatidylglycérol en présence de calcium. Il a pour titre «*Discriminating lipid-from protein-calcium binding to understand the interaction between recoverin and phosphatidylglycerol model membranes*» et fut publié dans la revue *Biochemistry* en mai 2016, volume 55, pages 3481-3491. Les auteurs sont Kim Potvin-Fournier, Thierry Lefèvre, Audrey Picard-Lafond, Catherine Marcotte, Caroline Dufresne, Line Cantin, Christian Salesse et Michèle Auger. J'ai surexprimé et purifié la majorité de la protéine, réalisé une partie des résultats ainsi qu'une majeure partie de leur analyse. Ensuite, j'ai monté les figures, rédigé le plan du manuscrit, écrit la première version du manuscrit et participé activement à la révision du manuscrit à toutes les étapes de rédaction et de publication. Thierry Lefèvre était présent pour répondre à mes questions au cours de l'analyse des résultats et de leur rédaction, et il a révisé le manuscrit à toutes les étapes de rédaction et de publication. Audrey Picard-Lafond, Catherine Marcotte et Caroline Dufresne étaient des auxiliaires de recherche de premier cycle sur le projet pendant l'obtention de ces résultats. Elles ont fait différentes proportions de la surexpression et la purification de la protéine ainsi que certaines mesures en spectroscopie infrarouge et leur analyse préliminaire. Line Cantin est la professionnelle de recherche qui épaulé les étudiants du Pr Salesse pendant leurs manipulations de surexpression et purification. Christian Salesse est le co-directeur de ce projet et a participé à la révision du manuscrit à toutes les étapes de rédaction et de publication. Michèle Auger est la directrice de ce projet et elle a participé à la révision du manuscrit à toutes les étapes de rédaction et de publication.

Le Chapitre 5 comporte une communication scientifique portant sur l'impact de la fluidité membranaire pour l'immobilisation de la recoverine dans une bicouche lipidique

zwitterionique. Elle a pour titre «*Membrane fluidity is a driving force for recoverin myristoyl immobilization in zwitterionic lipids*» et fut publiée dans *Biochemical and Biophysical Research Communications* en 2017, volume 495, pages 1268-1273. Les auteurs sont Kim Potvin-Fournier, Geneviève Valois-Paillard, Thierry Lefèvre, Line Cantin, Christian Salesse et Michèle Auger. Les auxiliaires de recherche de premier cycle Audrey Picard-Lafond, Catherine Marcotte et Caroline Dufresne ont participé à la préparation du matériel (lavage de lamelles de verre) requis pour la préparation des échantillons. Aussi, certaines d'entre elles m'ont épaulée dans la surexpression et la purification de la protéine. J'ai surexprimé et purifié la protéine, soit seule ou avec l'aide des auxiliaires de recherche de premier cycle, réalisé toute la préparation des échantillons et effectué la mesure des échantillons en spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du phosphore-31 sur le spectromètre de résonance magnétique nucléaire à l'état solide de 400 MHz de l'Université Laval et l'analyse de tous les résultats. C'est Victor Terskikh, le professionnel de recherche responsable du spectromètre de résonance magnétique nucléaire 900 MHz au Centre national de RMN à ultrahaut champ pour les solides à Ottawa, qui a effectué les mesures des échantillons en spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du deutérium sur le spectromètre à Ottawa. Ensuite, j'ai monté les figures, rédigé le plan du manuscrit, écrit la première version du manuscrit et participé activement à la révision du manuscrit à toutes les étapes de rédaction et de publication. Geneviève Valois-Paillard était l'étudiante à la maîtrise sur ce projet avant moi. Elle m'avait montré comment faire la surexpression et la purification de la protéine, ainsi que la méthodologie de préparation des échantillons qui est spécifique à cette section du projet. Elle avait aussi obtenu certains résultats préliminaires à cet article. Thierry Lefèvre est le professionnel de recherche de la Pre Auger et il a révisé le manuscrit à toutes les étapes de rédaction et de publication. Line Cantin est la professionnelle de recherche qui épaula les étudiants du Pr Salesse pendant leurs manipulations de surexpression et purification. Christian Salesse est le co-directeur de ce projet et Michèle Auger est la directrice de ce projet; ces derniers ont participé à la révision du manuscrit à toutes les étapes de rédaction et de publication.

Le Chapitre 6 est un article scientifique portant sur l'interaction membranaire des lipides zwitterioniques avec la recoverine, l'effet de la recoverine et du calcium sur la diffusion latérale des lipides et l'analyse de la mobilité du groupement myristoyle de la recoverine en présence et en absence de lipides et de calcium en utilisant un groupement myristoyle monofluoré à deux positions. Il a pour titre «*Novel approaches to probe the binding of*

recoverin to membranes» et fut soumis à *European Biophysics Journal* le 7 février 2018 et a comme numéro de soumission EBJO-D-18-00025. Il a été accepté le 13 avril 2018 et est disponible en ligne au <https://doi.org/10.1007/s00249-018-1304-4>. Les auteurs sont Kim Potvin-Fournier, Geneviève Valois-Paillard, Marie-Claude Gagnon, Thierry Lefèvre, Pierre Audet, Line Cantin, Jean-François Paquin, Christian Salesse et Michèle Auger. J'ai effectué la surexpression et la purification de protéines. J'ai réanalysé les résultats de spectroscopie infrarouge et de résonance magnétique nucléaire à l'état solide du phosphore-31 en statique servant à déterminer l'intégrité des vésicules multilamellaires lipidiques. J'ai effectué toutes les mesures de spectroscopie de résonance magnétique nucléaire en fluor-19 et en phosphore-31 à l'état solide pour le *Centerband-only detection of exchange*. J'ai ensuite analysé ces résultats et écrit ce manuscrit sous la supervision de ma directrice et mon co-directeur de projet. Geneviève Valois-Paillard avait au cours de sa maîtrise effectuée les analyses de spectroscopie infrarouge et de résonance magnétique nucléaire à l'état solide du phosphore-31 en statique pour déterminer l'intégrité des vésicules multilamellaires lipidiques. J'avais été son auxiliaire de recherche de premier cycle pendant sa maîtrise; ainsi il est possible que j'aie effectué une partie de ces analyses sous sa supervision. Marie-Claude Gagnon, qui a récemment obtenu un doctorat sous la supervision du Pr Jean-François Paquin et de la Pre Michèle Auger, a synthétisé et purifié les acides myristiques monofluorés. Thierry Lefèvre est le professionnel de recherche de la Pre Auger, il a révisé le manuscrit à toutes les étapes de rédaction et de publication. Pierre Audet a mis au point la séquence d'impulsions du *Centerband-only detection of exchange* et fait les ajustements sur le spectromètre de résonance magnétique nucléaire à l'état solide pour les mesures en phosphore-31 et en fluor-19. Line Cantin est la professionnelle de recherche qui épaulé les étudiants du Pr Salesse pendant leurs manipulations de surexpression et de purification. Jean-François Paquin est le professeur nous ayant permis d'obtenir l'acide myristique monofluoré à différentes positions via son ancienne étudiante au doctorat Marie-Claude Gagnon. Christian Salesse est le co-directeur de ce projet et Michèle Auger est la directrice de ce projet; ces derniers ont participé à la révision du manuscrit à toutes les étapes de rédaction et de publication.

Chapitre 1

Introduction

L'être humain perçoit de multiples stimuli du monde extérieur par ses différents sens que sont la vision, l'odorat, le goûter, l'ouïe et le toucher. Toutefois, avec plus de 80 % de l'information sensorielle relayée au cerveau, la vision est de loin le sens le plus important.¹ Les êtres vivants modélisent leur environnement par la perception de la réflexion ou l'émission de lumière permettant ainsi de distinguer les formes, les textures, les couleurs, les reliefs, les mouvements et les distances. L'œil est l'organe relié au sens de la vision. L'espèce humaine perçoit la lumière correspondant à la région du visible du spectre électromagnétique, c'est-à-dire des longueurs d'onde comprises entre 400 et 700 nm.² Différents niveaux d'organisation permettent de capter et d'analyser l'information visuelle. L'information nécessaire pour la compréhension de la vision jusqu'au sujet d'intérêt de ce projet de doctorat, la recoverine (Rec), une protéine de la phototransduction visuelle, sera décrite de manière succincte d'un point de vue anatomique, cellulaire et moléculaire.

1.1 Vision

1.1.1 Anatomie de l'œil^{3, 4}

L'œil contient différentes structures spécifiques permettant la vision (Figure 1.1). Son diamètre pour un adulte est d'environ 2,5 cm. La vision est possible grâce à la présence de la lumière. Ainsi, la lumière entre d'abord dans l'œil par la cornée, une couche de cellules claires et translucides permettant le passage de la lumière dans l'œil. La translucidité de ce tissu est due à l'alignement des fibres de collagène.⁵ Ensuite, la lumière poursuit son chemin dans la chambre antérieure qui contient l'humeur aqueuse. La pupille, qui sert de diaphragme, varie en taille sous l'influence du muscle de l'iris et permet de contrôler la quantité de lumière entrant dans l'œil. Le cristallin réfracte la lumière par sa forme de lentille pouvant être plus ou moins convexe selon les tensions exercées par les muscles qui le soutiennent. À la suite de son passage dans le cristallin, la lumière poursuit son parcours dans l'humeur vitrée, un liquide gélatineux occupant la quasi-totalité du volume de l'œil et permettant à ce dernier de conserver sa forme. Finalement, la lumière arrive jusqu'à la rétine, soit le lieu d'absorption des photons par les cellules nerveuses.

Cette structure sera décrite plus en détails dans la Section 1.1.1.1. L'œil contient d'autres structures telles que la choroïde, la sclère et le nerf optique. La choroïde est une couche de cellules fortement vascularisée permettant d'alimenter en nutriment les cellules nerveuses de la rétine. La sclère, ou sclérotique, est une structure rigide permettant le soutien mécanique de l'œil. C'est un tissu similaire à la cornée à l'exception que la sclère n'est pas transparente et translucide, mais opaque et blanche. Finalement, le nerf optique est composé de cellules nerveuses servant de lien entre la rétine de l'œil et le cerveau pour relayer l'information visuelle perçue dans le but de l'analyser. Les différentes structures mentionnées précédemment sont illustrées à la Figure 1.1 représentant schématiquement une coupe longitudinale de l'œil.

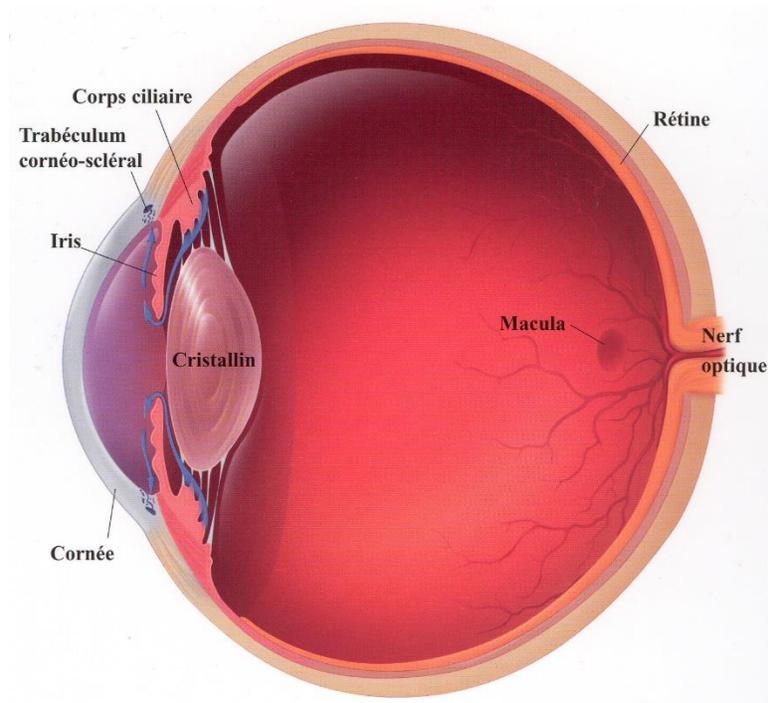


Figure 1.1 : Représentation schématique d'une coupe longitudinale de l'œil.

Schéma fourni gratuitement au Centre universitaire d'ophtalmologie de l'Université Laval par la compagnie Merck.

1.1.1.1 Rétine²

La rétine est la composante de l'œil permettant la transformation de l'information lumineuse en un signal électrique analysable par le cerveau. Elle est composée de plusieurs couches de cellules distinctes (Figure 1.2). La lumière doit traverser plusieurs

cellules avant d'être absorbée, i.e. les cellules ganglionnaires, amacrines, bipolaires, horizontales et de Müller avant d'atteindre les photorécepteurs rétiniens (Figure 1.2). Il existe deux types de photorécepteurs chez les mammifères, soit les cônes et les bâtonnets. Les cellules photoréceptrices sont entourées dans leur portion apicale par des prolongements de l'épithélium pigmentaire rétinien. Ces dernières cellules contiennent beaucoup de mélanine, un pigment foncé, permettant l'absorption des photons éparés qui ont traversé les photorécepteurs et évitant ainsi leur réflexion dans l'humeur vitrée causant des distorsions dans la vision.

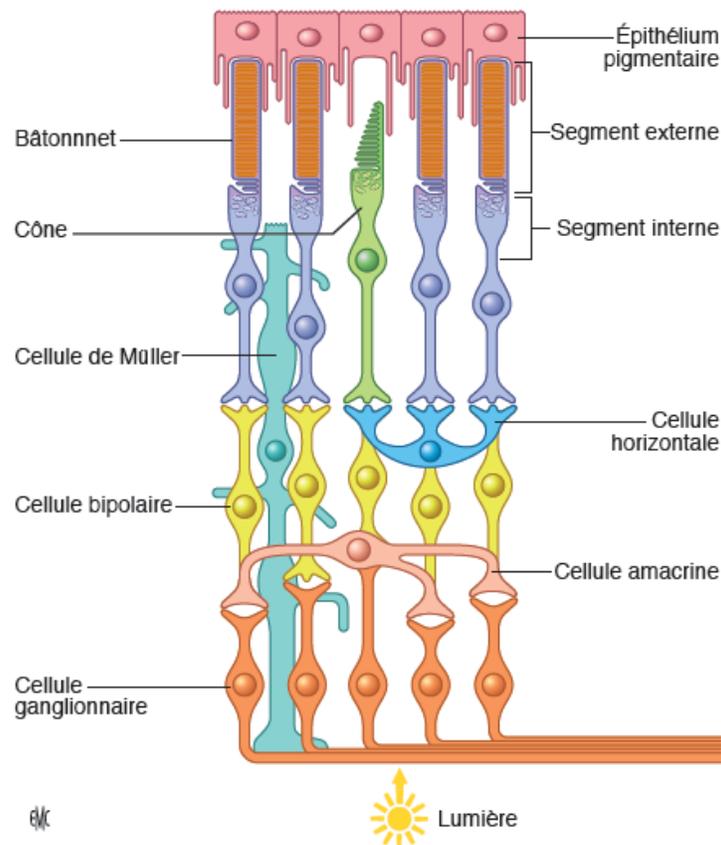


Figure 1.2 : Schéma de la rétine humaine.²

1.1.1.2 Cellules photoréceptrices : cônes et bâtonnets²

Les cellules photoréceptrices ont comme rôle d'absorber les photons pour les transformer en signal électrique, puis en signal nerveux. Elles sont divisées en deux catégories, soit les cônes et les bâtonnets. Leur nom provient de leur morphologie cellulaire. Les cônes ont une base plus large que leur côté apical alors que les bâtonnets ont la même largeur

de la base jusqu'à leur côté apicale tel que montré à la Figure 1.3. Ces cellules photoréceptrices comportent toutes les mêmes composantes structurales, soit une terminaison synaptique, un noyau, ainsi qu'un segment interne relié par un cil connecteur au segment externe. La machinerie métabolique nécessaire au fonctionnement de ces cellules est contenue dans le segment interne. Outre leur morphologie, d'autres caractéristiques les différencient. Dans un premier temps, il est bon de rappeler que la vision humaine a lieu par la détection des couleurs et contrastes, ce qui permet la vision de jour et de nuit. Ainsi, les cônes sont spécialisés dans la vision des couleurs et les bâtonnets, dans la vision des contrastes. La structure de leur terminaison synaptique, leur distribution dans la rétine, ainsi que la fréquence d'absorption de la lumière représentent d'autres différences majeures entre ces cellules.

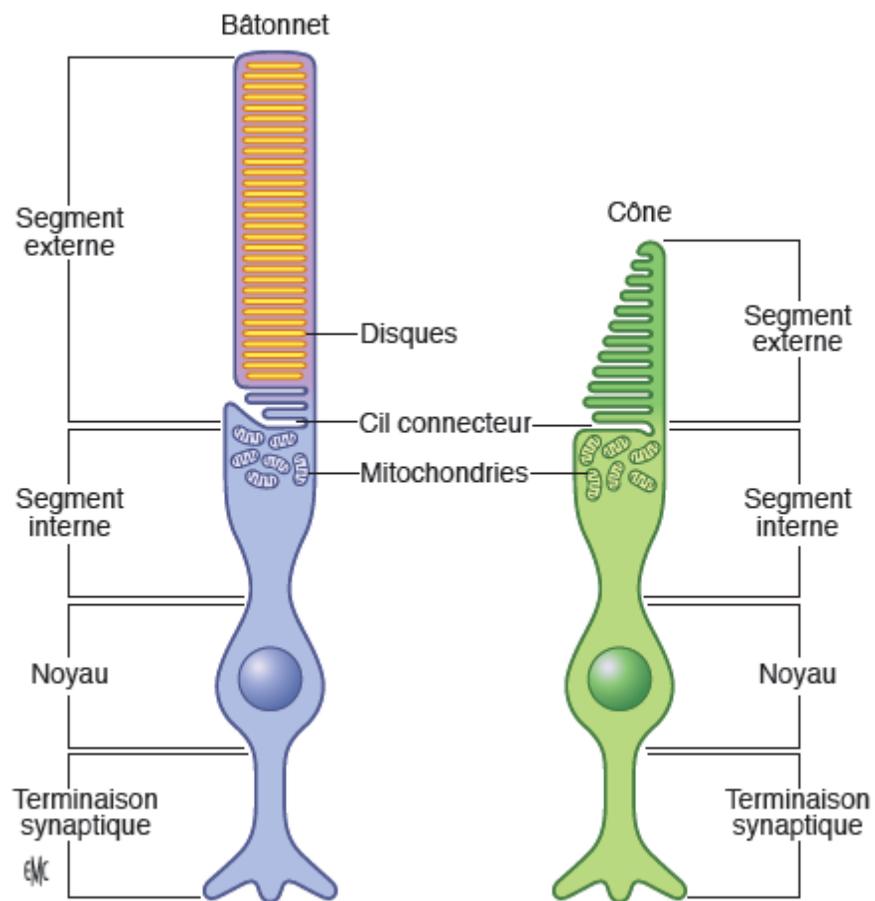


Figure 1.3 : Schéma des photorécepteurs rétiniens : bâtonnet et cône.²

Le segment externe des cônes contient des repliements de la membrane plasmique, tandis que celui des bâtonnets est constitué d'une multitude de disques membranaires empilés et entourés de la membrane plasmique tel qu'illustré à la Figure 1.3. Par ailleurs, les cellules réceptrices de l'influx nerveux des bâtonnets par leur terminaison synaptique forment un réseau de transmission, c'est-à-dire que plusieurs bâtonnets sont reliés à une même cellule avant de se rendre au nerf optique. Les cônes sont plutôt reliés de manière linéaire, soit une cellule après l'autre jusqu'au nerf optique.

De plus, la distribution des cônes et des bâtonnets dans la rétine n'est pas homogène tel que montré à la Figure 1.4. La région centrale de la vision où la majorité des faisceaux lumineux converge sur la rétine est nommée fovea et mesure environ 1 mm de diamètre. Cette région est non-vascularisée. De plus, les cônes se trouvent exclusivement dans la fovea et ceux-ci possèdent un plus petit diamètre qu'ailleurs dans la rétine. Cela permet d'avoir une bonne vision des couleurs et des détails en raison de la densité élevée des cônes. À l'extérieur de la fovea, les bâtonnets apparaissent en grand nombre; il faut dire qu'ils forment 95 % des 125 millions de cellules photoréceptrices dans la rétine.^{6, 7} La densité des bâtonnets augmente drastiquement au pourtour de la fovea, jusqu'à atteindre un maximum à plus ou moins 20° d'excentration rétinienne, puis leur nombre diminue doucement jusqu'au maximum d'excentration rétinienne. Les caractéristiques de sensibilité et résolution des cellules photoréceptrices aident à comprendre leur distribution spatiale. Ainsi, les cônes possèdent une bonne résolution et une faible sensibilité, ce qui est utile pour la vision diurne soit en conditions photopiques ou en présence de forte luminosité.⁸ À l'opposé, les bâtonnets possèdent une très grande sensibilité pour l'absorption des photons, un seul photon pouvant être détecté, mais ces cellules ont une mauvaise résolution, ce qui les prédispose à être utilisées en vision nocturne, soit en condition scotopique ou en présence de faible luminosité.⁸

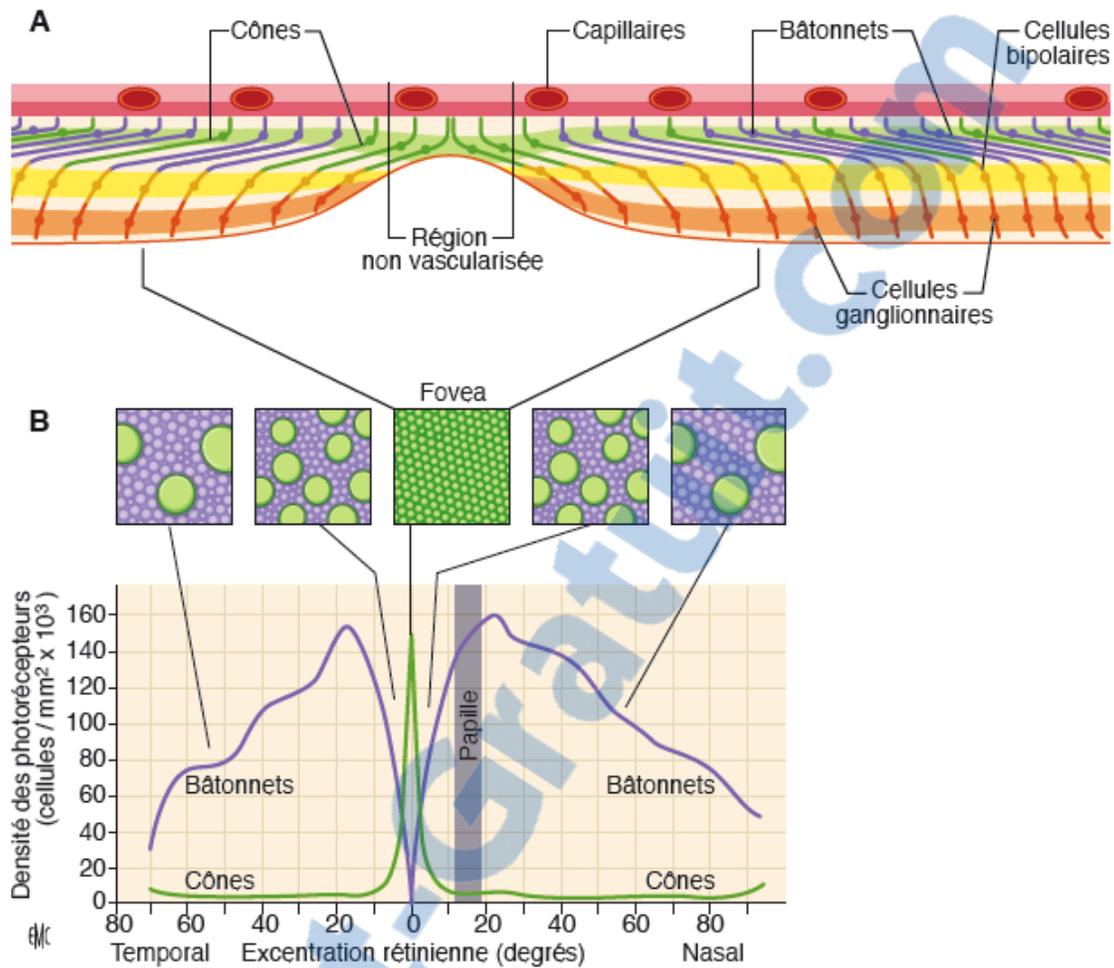


Figure 1.4 : Schéma de la région de la fovea et distribution des photorécepteurs dans la rétine.²

- La fovea contient une densité très élevée de cônes. Il n'y a aucun vaisseau sanguin dans la foveola.
- La concentration des cônes est très élevée dans la région de la fovea où le diamètre de leur segment externe est très petit alors qu'il augmente de façon importante plus on s'éloigne de cette région (les différents carrés au-dessus de la figures du bas montrent le diamètre des cônes et des bâtonnets à différentes positions de la rétine).

Enfin, la dernière différence majeure entre les cônes et les bâtonnets est la fréquence d'absorption de la lumière (Figure 1.5). Ceci vient de la nature des molécules qui absorbent les photons dans les cônes et les bâtonnets. Les cellules photoréceptrices possèdent des pigments visuels de la famille des opsines dans leur segment externe. Ces

pigments visuels sont constitués d'un chromophore, le 11-*cis* rétinol, qui est lié par une base de Schiff à une lysine (Lys) des opsines qui possèdent sept hélices α transmembranaires, un récepteur couplé aux protéines G. Ainsi, les bâtonnets absorbent à une longueur d'onde de 500 nm et l'opsine est nommée rhodopsine (Rho). Les trois types de cônes absorbent chacun à une longueur d'onde maximum spécifique, ce qui permet de couvrir le spectre de lumière visible. Chaque type de cône absorbe une portion particulière du spectre visible. Ils sont nommés selon leur niveau énergétique d'absorption de la lumière (*Low, Middle, Supra Frequency*) ou leur couleur caractéristique d'absorption (rouge, vert, bleu) reliée au maximum de leur longueur d'onde d'absorption à 575, 535 et 445 nm, respectivement (pour une revue, voir ²). Ces protéines se nomment photopsine. La Figure 1.5 montre le spectre d'absorption du bâtonnet et des trois types de cônes.

En raison de leur plus grande prépondérance dans l'œil de la majorité des mammifères, la structure et les mécanismes prenant place dans les bâtonnets sont plus étudiés que ceux des cônes. La protéine d'intérêt de ce projet de doctorat, la recoverine, se trouve dans les bâtonnets. Pour cette raison, des notions supplémentaires seront présentées uniquement sur les cellules photoréceptrices permettant la vision nocturne, les bâtonnets.

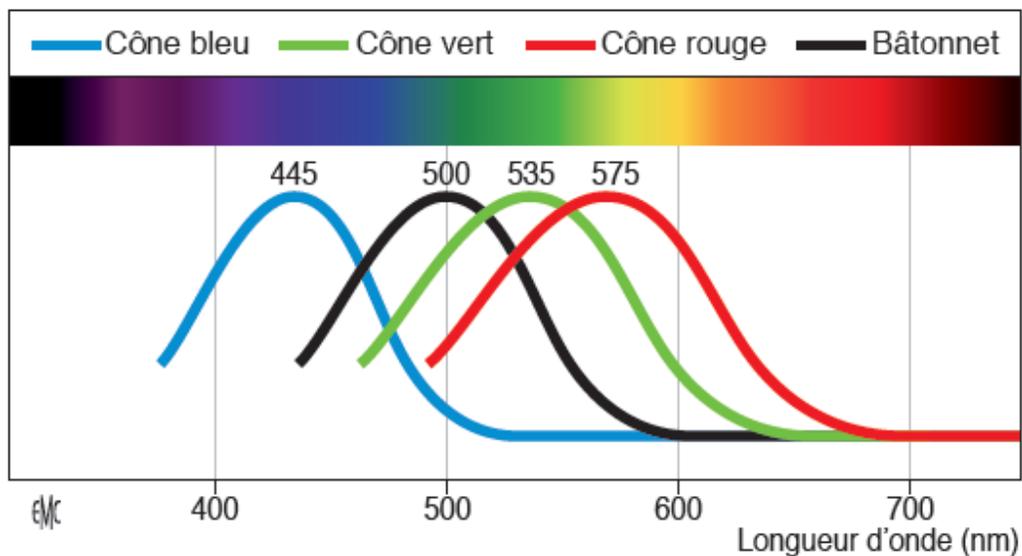


Figure 1.5 : Spectre d'absorption du bâtonnet et des cônes.²

1.1.1.2.1 Bâtonnets réiniens

Comme expliqué précédemment, les bâtonnets ont une forme cylindrique. Le segment externe des bâtonnets (SEB) contient 500 à 2000 disques membranaires⁹ d'environ 15 nm d'épaisseur avec un espace interdiscal d'environ 15 nm pour une longueur totale du SEB d'environ 60 μm et une largeur de 2 μm pour le crapaud buffle.¹⁰ C'est dans la partie basale du SEB que sont formés les disques membranaires. La durée de vie des disques qui migrent de la partie basale jusqu'à la terminaison apicale est d'environ 10 jours avant d'être recyclés dans l'épithélium pigmentaire rétinien.¹¹ C'est dans ces disques que se retrouve la Rho dont la Lys296 forme une base de Schiff avec le 11-*cis* rétinol permettant l'absorption des photons (Figure 1.6) (pour une revue, voir ¹²). La Rho a une surface moléculaire de 15 nm² ¹² et on retrouve environ 26 000 Rho par face des disques des bâtonnets,¹³ soit environ $10,4 \times 10^7$ Rho par bâtonnet chez les mammifères.² La Figure 1.6 situe les disques dans le bâtonnet, la Rho dans les disques membranaires ainsi que dans la membrane et, finalement, elle montre la structure de la Rho de côté et du dessus avec la structure et la position du 11-*cis* rétinol.

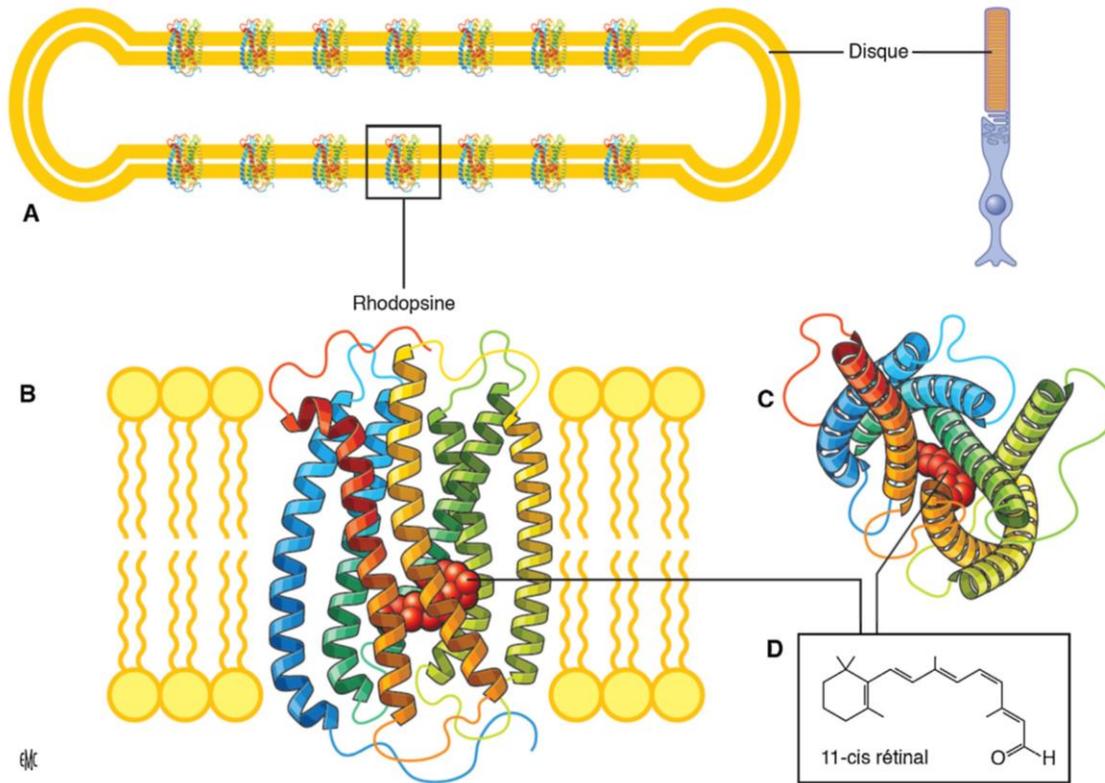


Figure 1.6 : Structure de la rhodopsine et son organisation dans la membrane des disques des bâtonnets.²

- A. Schéma d'un disque d'un bâtonnet montrant la rhodopsine incorporée dans la membrane (la rhodopsine compte pour 95 % des protéines membranaires des disques).
- B. Structure de la rhodopsine, obtenue à partir de ses coordonnées structurales (pdb :1F88), dans la membrane de phospholipides des disques des bâtonnets (rhodopsine vue de côté). On peut voir les sept hélices α transmembranaires de la rhodopsine et son chromophore, le 11-*cis* rétinol.
- C. Structure de la rhodopsine vue du dessus.
- D. Structure du 11-*cis* rétinol (les tirets montrent sa position dans la structure de la rhodopsine).

1.1.2 Mécanisme de phototransduction visuelle²

1.1.2.1 Photoactivation

Le mécanisme de phototransduction visuelle inclut une cascade de réactions enzymatiques dans les photorécepteurs menant à leur hyperpolarisation, ce qui induit un influx nerveux qui permettra de créer une image de notre environnement dans le cerveau. Ce processus est illustré à la Figure 1.7.

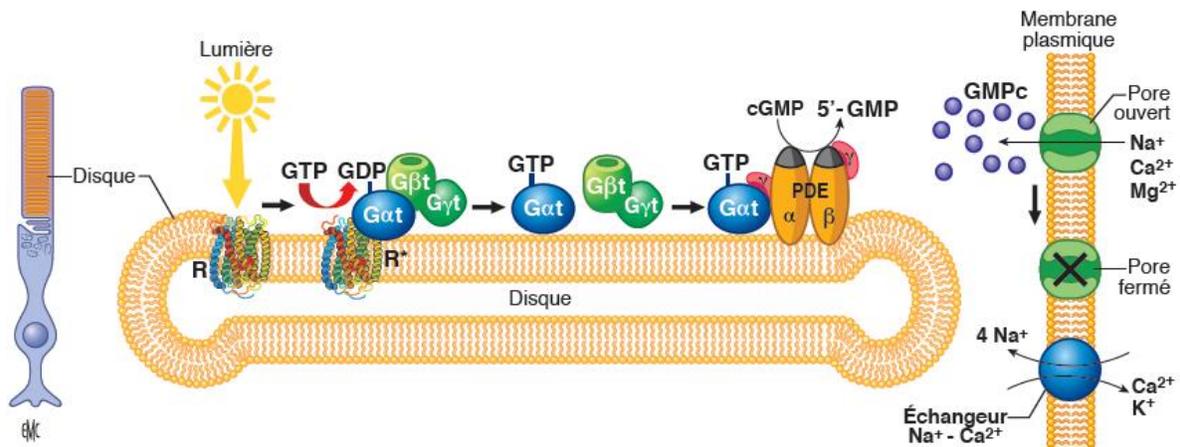


Figure 1.7 : Mécanisme d'activation de la phototransduction.²

L'absorption de la lumière active la rhodopsine (R^{*}) qui va ensuite catalyser l'échange du GDP pour le GTP par la sous-unité Gat de la transducine. Cette sous-unité va alors se dissocier de la R^{*} et de ses sous-unités Gβγt pour activer la phosphodiésterase (PDE) en se liant à ses sous-unité γ. La PDE ainsi activée va hydrolyser le GMPc en 5'-GMP, ce qui provoque la fermeture des pores à Na⁺-Ca²⁺ de la membrane plasmique. L'échangeur continue à pomper le Ca²⁺ à l'extérieur des photorécepteurs, ce qui mène à une chute importante de la concentration intracellulaire en Ca²⁺. La R^{*} va lier et activer de nombreuses transducines.

Tout commence par l'absorption d'un photon par le 11-*cis* rétinale de la Rho (R dans les Figures) qui s'isomérisse en tout-*trans* rétinale en une centaine de femtosecondes¹⁴⁻¹⁶ menant à un changement de conformation de la Rho en une forme activée (Rho^{*} et R^{*} dans les Figures)^{17, 18} en quelques millisecondes.¹⁹ La lumière induit l'excitation de 10⁶ à 10⁷ Rho par seconde.²⁰ Cette activation de la Rho va permettre sa liaison avec la sous-unité alpha (Gαt) de la transducine (Gαβγt).^{21, 22} La Rho^{*} va ainsi catalyser l'échange de la guanosine diphosphate (GDP) pour la guanosine triphosphate (GTP) au sein de la Gαt, ce qui mènera à l'activation de cette sous-unité.²²⁻²⁵ Une seule Rho^{*} peut activer jusqu'à 800

$G\alpha\beta\gamma t$ pendant la durée de la photoactivation ou plus de 1300 $G\alpha\beta\gamma t$ par seconde,²⁶ ce qui correspond à la première étape d'amplification de la phototransduction visuelle. La $G\alpha t$ -GTP va ensuite se libérer de la Rho* et des sous-unités bêta et gamma de la transducine ($G\beta\gamma t$). La $G\alpha t$ -GTP active ensuite la phosphodiesterase 6 (PDE) en levant l'inhibition des sous-unités inhibitrices gamma de la transducine ($G\gamma t$).²⁷⁻³¹ La PDE activée va hydrolyser la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) en 5'-guanosine monophosphate (5'-GMP) à une vitesse de 6 à 8 x 10³ molécules par seconde par PDE,^{31, 32} c'est la deuxième étape d'amplification de la phototransduction visuelle. Chaque sous-unité inhibitrice gamma de la PDE s'associe à une $G\alpha t$ -GTP; il faut donc deux $G\alpha t$ -GTP pour activer la PDE. Ainsi, une Rho peut activer jusqu'à 650 PDE qui hydrolysent chacune 8 000 GMPc pour un total de 5,2 x 10⁶ GMPc par seconde par Rho.² En tenant compte de la durée effective de l'activation de la phototransduction à des intensités lumineuses non saturantes d'environ 200 ms,³³ environ 1 x 10⁶ GMPc sont hydrolysés pendant la photoactivation. Les pores à Na⁺-Ca²⁺ (ion sodium et ion calcium) GMPc-dépendants de la membrane plasmique vont fermer en conséquence de la chute de la concentration en GMPc à l'intérieur du bâtonnet.³⁴ Ainsi, le Ca²⁺, le Na⁺ et l'ion magnésium (Mg²⁺) ne peuvent plus entrer dans le bâtonnet par ces pores. Cependant, l'échangeur Na⁺-Ca²⁺ va quand même permettre l'entrée de Na⁺ et la sortie de Ca²⁺ et de l'ion potassium (K⁺). En conséquence, la concentration intracellulaire en Ca²⁺ chute en présence de lumière de ~550 nM à ~50 nM.³⁵ Ainsi, la fermeture des pores ioniques cause l'hyperpolarisation de la membrane,²⁰ le courant membranaire passant de -40 mV (équilibre) à -70 mV^{6, 34, 36} et l'arrêt du relâchement du glutamate, un neurotransmetteur, au niveau des terminaisons synaptiques du bâtonnet,³⁷ ce qui permet la transmission d'un influx nerveux aux autres composantes cellulaires de la rétine. Le retour à l'état de noirceur des photorécepteurs nécessite de nombreuses autres protéines, comme décrit ci-dessous dans le mécanisme d'inactivation de la phototransduction.

1.1.2.2 Inactivation et retour à l'état basal²

Selon l'intensité de la lumière absorbée, le processus de retour à l'état de noirceur peut durer de 250 à 500 ms.³⁸ La première portion de l'inactivation de la phototransduction est montrée à la Figure 1.8A. Avant l'absorption d'un photon, le bâtonnet est dans un état de noirceur avec une haute concentration en Ca²⁺. Ainsi, la recoverine lie deux Ca²⁺ et est recrutée à l'interface membranaire par son groupement myristoylé.³⁹ Étant mobile dans le

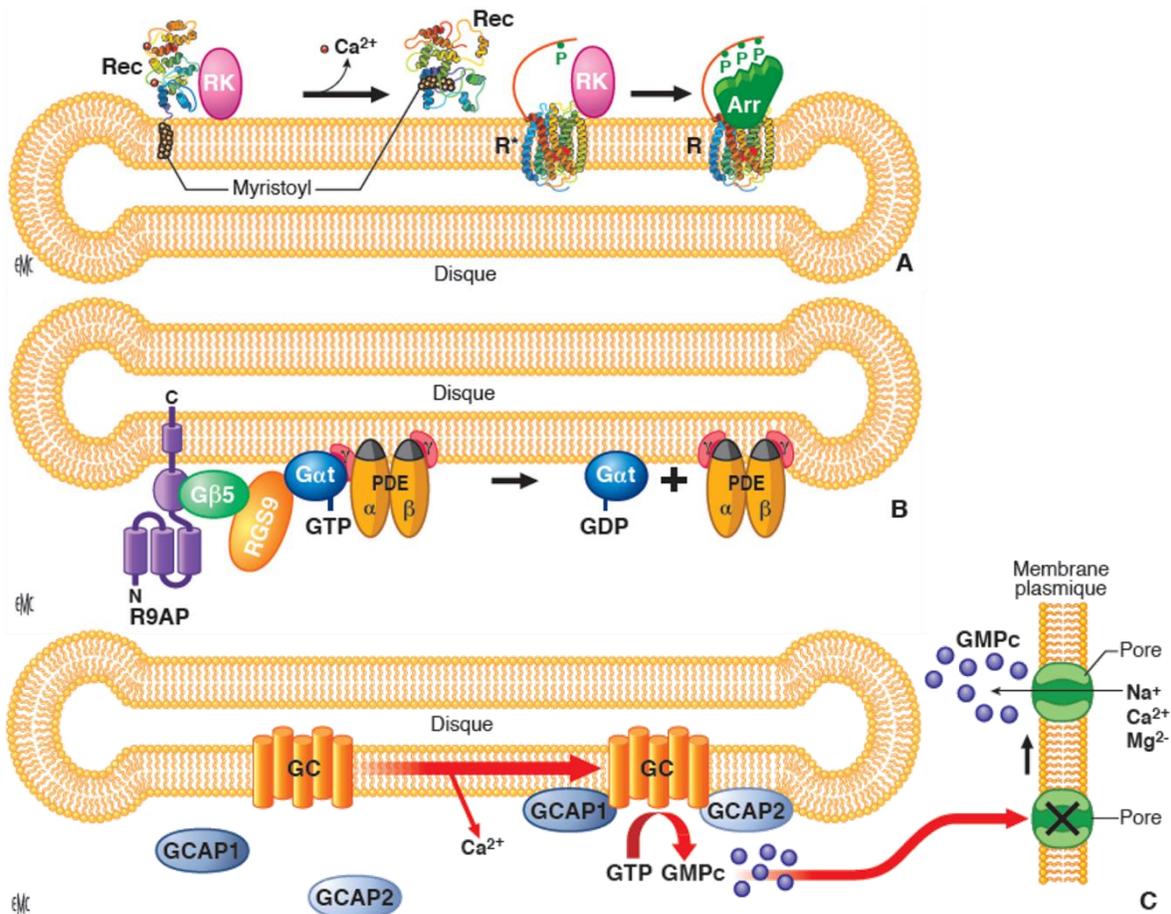


Figure 1.8 : Mécanisme d'inactivation de la phototransduction.²

- Inactivation de la rhodopsine. Aux concentrations de Ca^{2+} à la noirceur, le groupement myristoylé de la recoverine (Rec) lui permet de lier la membrane des disques et d'inactiver la rhodopsine kinase (RK). Cependant, la chute importante de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} faisant suite à la fermeture des pores à Na^+ - Ca^{2+} de la membrane plasmique résulte en un changement conformationnel de la Rec et sa dissociation de la RK qui va ensuite phosphoryler (P) la R^* qui est par la suite reconnue et liée par l'arrestine (Arr), ce qui met fin à l'activation de la transducine par la rhodopsine.
- Inactivation de la phosphodiesterase. La formation du complexe d'accélération de l'activité GTPase de la sous-unité Gat-GTP, composé des protéines R9AP, RGS9, Gβ5, Gat-GTP et PDE, permet d'accélérer la vitesse d'hydrolyse du GTP par la sous-unité Gat-GTP, ce qui mène à sa dissociation de la PDE et à la fin de l'hydrolyse du GMPc.
- Synthèse de GMPc par la guanylate cyclase. La chute importante de la concentration en Ca^{2+} provoque un changement conformationnel des GCAP1 et 2 (*guanylate cyclase activating protein*) qui activent ensuite la guanylate cyclase (GC). La GC va alors synthétiser du GMPc dont la liaison aux pores à Na^+ - Ca^{2+} de la membrane plasmique permet leur ouverture et le retour de la concentration cytosolique de Ca^{2+} à l'état de la noirceur.

plan de la membrane, la recoverine peut inhiber la rhodopsine kinase (RK).³⁹ Cependant comme mentionné précédemment, l'absorption de la lumière fait chuter la concentration en Ca^{2+} . De ce fait, la recoverine change de conformation pour se retrouver dans un état cytosolique, i.e. qu'elle ne lie plus de Ca^{2+} et que son groupement myristoylé est alors enfouie à l'intérieur d'une poche hydrophobe.⁴⁰ Ce changement de conformation mène à sa dissociation de la membrane. La RK est libérée et devient activée.⁴¹ Le rôle de la RK est de phosphoryler la Rho* avec 3 à 7 phosphates provenant de l'adénosine triphosphate (ATP) pour une inactivation jusqu'à 50%.⁴²⁻⁴⁴ Par la suite, l'arrestine reconnaît et lie la Rho phosphorylée, ce qui met fin à l'activation de la $G\alpha\beta\gamma$.^{45, 46} La Rho est ainsi inactivée et change de conformation, ce qui mène à la dissociation du tout-*trans* rétinale qui, en raison de son hydrophobicité, restera associé à la membrane des photorécepteurs. Le tout-*trans* rétinale subira ensuite une série de modifications enzymatiques dans le bâtonnet et l'épithélium pigmentaire rétinien selon le cycle des rétinoïdes.⁴⁷⁻⁵¹ Un nouveau 11-*cis* rétinale peut ainsi se lier à la Rho. La phosphatase A2 déphosphoryle la Rho pour la rendre prête à absorber de nouveau un photon.⁵² Par la suite, d'autres étapes sont nécessaires pour le retour à une haute concentration en Ca^{2+} avec l'hydrolyse du GTP de la $G\alpha$, l'inactivation de la PDE et la fin de l'hydrolyse du GMPc.

La concentration en Ca^{2+} va augmenter quand les pores à Na^+ - Ca^{2+} de la membrane plasmique seront ouverts pour rééquilibrer le Ca^{2+} . Pour y arriver, il faut inactiver la PDE et synthétiser du GMPc (Figure 1.8B). La PDE va être inactivée par l'amarrage d'un complexe protéique d'accélération de l'activité GTPase de la sous-unité $G\alpha$ -GTP. Ce complexe est formé des protéines *regulator of G protein signaling* (RGS9), *long splice isoform of the type 5 G protein β subunit* ($G\beta 5$), *RGS9 anchor protein* (R9AP), $G\alpha$ -GTP et PDE.⁵³⁻⁵⁶ L'hydrolyse du GTP en GDP sur la $G\alpha$ est accélérée par le complexe R9AP-RGS9- $G\beta 5$, ce qui permet l'inactivation plus rapide de la PDE. La $G\alpha$ -GDP se dissocie de la PDE et ainsi le GMPc n'est plus transformé en 5'-GMP. La section B de la Figure 1.8 illustre cette portion de la cascade de phototransduction. Il ne manque ainsi que la synthèse de GMPc pour permettre la réouverture des pores.

Dans l'état de noirceur, donc à haute concentration en Ca^{2+} , les protéines activatrices de la guanylate cyclase 1, 2 et 3 (GCAP1, GCAP2 et GCAP3) sont inactives et lient jusqu'à trois Ca^{2+} (Figure 1.8C).^{57, 58} À la suite de l'absorption d'un photon, la concentration en Ca^{2+} chute et les GCAP1 et 2 deviennent actives à la fois par le relargage de leurs Ca^{2+} et leur changement conformationnel. Ainsi, les GCAP 1 et 2 vont activer la guanylate cyclase

(GC) qui va synthétiser du GMPc à partir du GTP.⁵⁹ La concentration en GMPc va ainsi augmenter et permettre sa liaison aux pores Na⁺-Ca²⁺ GMPc-dépendants et leur ouverture.³⁴ La section C de la Figure 1.8 illustre cette portion de la cascade de phototransduction. La concentration en Ca²⁺ va donc revenir à l'état de noirceur, ce qui va permettre la réabsorption d'un photon par la Rho. Il se passe moins de 500 ms entre l'absorption d'un photon et le retour à l'état basal dans les bâtonnets.³³ Cette description de la phototransduction montre l'importance de la liaison du Ca²⁺ par plusieurs protéines impliquées dans ce processus. Pour cette raison, les neuroprotéines sensibles aux ions calcium seront décrites plus en détails dans la section suivante.

1.2 Neuroprotéines sensibles aux ions calcium

Tout d'abord, avant de parler spécifiquement des neuroprotéines sensibles aux ions calcium (NCS, *neuronal calcium sensor*), il faut traiter de certains concepts généraux sur la structure des protéines. Une fois que ces concepts généraux auront été exposés, des informations pertinentes à propos des NCS seront présentées. Ainsi, les NCS forment une famille de 14 protéines qui est incluse dans d'autres grandes familles de protéines soit celles des protéines liant le calcium (*calcium binding proteins*), des protéines à motif *EF-hand* et des protéines N-acylées.^{60, 61} Chacune de ces grandes familles sera présentée dans les sections suivantes avec leurs principales caractéristiques. Aussi, un bref retour sur les aspects généraux des NCS sera exposé après la présentation du phénomène de *calcium-myristoyl switch* et, finalement, la protéine d'intérêt de ce projet de doctorat, la recoverine.

1.2.1 Concepts généraux sur la structure des protéines⁶²⁻⁶⁶

Une protéine peut comporter jusqu'à quatre niveaux de structure. La structure primaire correspond à la séquence en acides aminés dans la chaîne polymère reliée par des liens peptidiques. La Figure 1.9 montre la formule générale d'un acide aminé et d'un lien peptidique. La chaîne latérale, nommée R₁ ou R₂ dans la Figure 1.9, des acides aminés varie et donne aux acides aminés leur caractère hydrophobe, hydrophile, polaire, aromatique ou chargé positivement ou négativement.

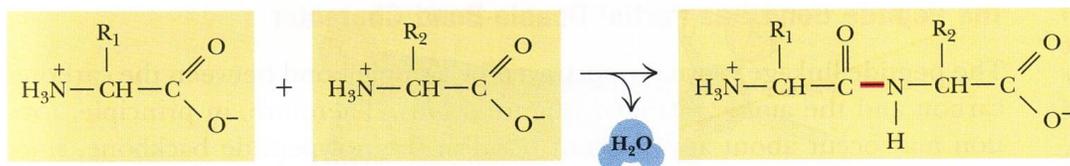


Figure 1.9 : Formation d'un lien peptidique via la liaison amide entre deux acides aminés en formule générale.⁶⁶

R₁ et R₂ : chaîne latérale

La structure secondaire est le repliement local de la chaîne principale. Les liaisons hydrogène entre le proton de l'amide et l'oxygène du carbonyle rendent certaines structures plus stables que d'autres selon la structure primaire. Les angles dièdres ϕ (C $_{\alpha}$ -N) et ψ (C $_{\alpha}$ -C') du plan amide (Figure 1.10A) aident à prévoir quelle structure sera la plus stable grâce au diagramme de Ramachandran (Figure 1.10B). Les trois principales structures stables énergiquement, que sont les feuillettes, les hélices et les tours, sont représentées à la Figure 1.11.

L'hélice est une structure hélicoïdale périodique, similaire à un ruban frisé (Figure 1.11). Il existe plusieurs formes d'hélices bien que seule l'hélice α sera approfondie. Dans l'hélice α , la liaison hydrogène se fait entre le groupement carbonyle du résidu i avec le lien N-H du résidu $i+4$. Un tour d'hélice α fait environ 3,6 résidus. Les chaînes latérales des résidus se trouvent en périphérie de l'hélice α , pointant vers l'extérieur. Le feuillet β est une structure étendue périodique (Figure 1.11). Un feuillet β est en réalité composé de deux brins β . Un brin β est composé de minimum deux résidus. Pour stabiliser cette structure, les liaisons hydrogène existent inter-brin et non intra-brin, donc à une certaine distance. Les chaînes latérales des résidus alternent en position entre au-dessus et en-dessous du plan du feuillet, ce dernier n'étant pas totalement lisse, mais forme plutôt un plissement. Les brins β peuvent s'organiser de deux manières, soit parallèle (avec la même orientation N-terminal vers C-terminal) ou antiparallèle (le bout de chaîne en N-terminal est face à un C-terminal). Les liaisons hydrogène d'un feuillet β antiparallèle sont plus directes (courtes et moins déformées) que celles d'un feuillet β parallèle. Les coudes sont des structures non périodiques de trois ou quatre résidus permettant de joindre les structures périodiques mentionnées ci-dessus (Figure 1.11 pour un tour). Il existe différents types de coudes avec des angles ϕ et ψ variés. Certaines zones des protéines n'ont pas de structure

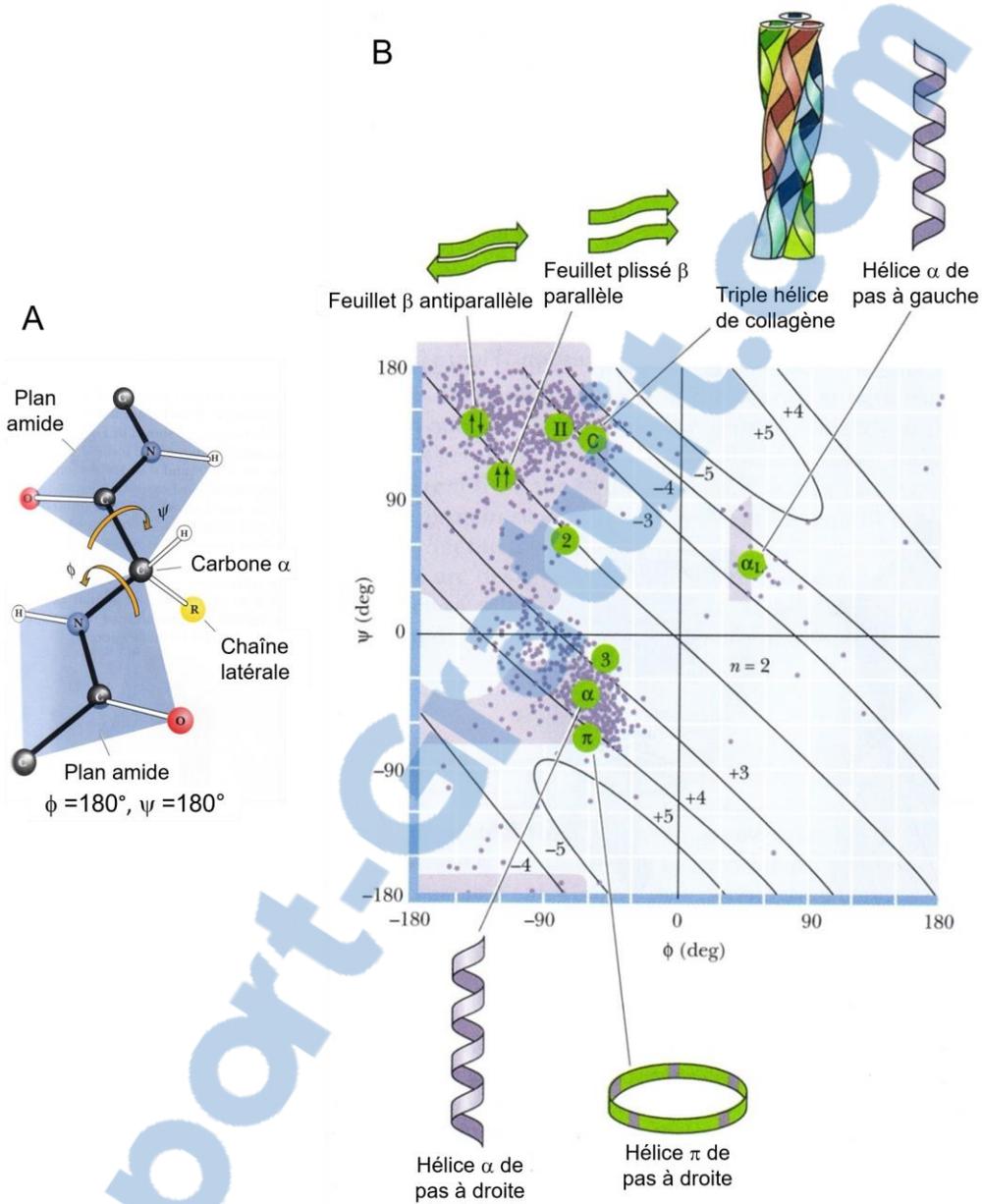


Figure 1.10 : Représentation des angles dièdres ϕ et ψ de la liaison peptique (A) et diagramme de Ramachandran (B).

Le diagramme de Ramachandran montre les valeurs d'angle ϕ et ψ raisonnables stériquement. Les régions ombragées indiquent les valeurs particulièrement favorables pour ces angles. Les points en violet indiquent les angles actuels mesurés pour 1 000 résidus (excluant la glycine, pour laquelle une plus grande variété d'angles est permise) de huit protéines. Les lignes superposées au diagramme (numérotée de +5 à 2 et -5 à -3) indiquent le nombre de résidus d'acides aminés par tour d'hélice; «+» identifie une hélice de pas à droite; «-» identifie une hélice de pas à gauche.

Images traduites de ⁶⁶ et selon cette référence, le diagramme de Ramachandran provient de ⁶⁷.

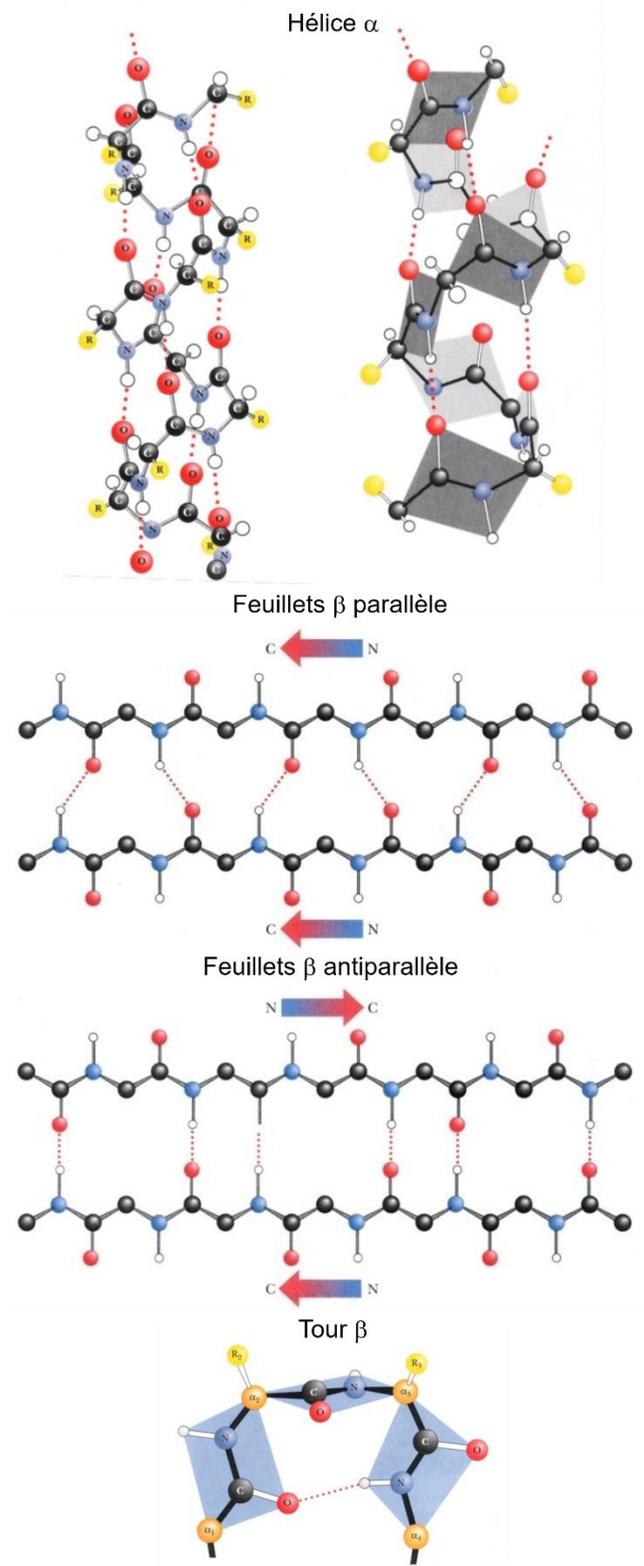


Figure 1.11 : Principales structures secondaires (hélice α , feuillet β et tour β).⁶⁶

périodique ou de jonction comme les coudes, mais sont quand même stables énergiquement. Souvent, elles sont associées aux boucles entre les différentes structures périodiques. Ce type de structure se nomme pelote statistique (*random coil*).

La structure tertiaire ou tridimensionnelle est l'arrangement spatial des structures secondaires entre elles selon la structure primaire de la protéine. La fonction d'une protéine est donnée par sa structure tertiaire. Quatre principales interactions permettent à la structure d'être conservée, soit les interactions covalentes, électrostatiques, de van der Waals et celles entre le solvant et l'environnement. Deux protéines peuvent avoir quasiment la même structure tertiaire, mais ne pas avoir la même structure primaire.

La structure quaternaire n'est pas toujours présente dans les protéines. C'est l'agencement de différentes chaînes polypeptides de structure tertiaire identique ou différente avec des liaisons non covalentes pour en faire une superstructure. Certaines protéines ont besoin de plusieurs chaînes polypeptidiques, appelées sous-unités, assemblées ensemble pour avoir une activité. L'hydrophobicité de certaines régions est très importante dans ces agencements.

1.2.2 Famille des protéines liant le calcium (*calcium-binding proteins*)

Dans un premier temps, le Ca^{2+} est impliqué dans de nombreuses fonctions comme il s'agit d'un messager intracellulaire. En effet, les cellules se servent du Ca^{2+} pour la contraction musculaire, la différenciation cellulaire, l'apoptose et la vision.⁶⁸ En réponse à la stimulation des cellules, la concentration intracellulaire de Ca^{2+} augmente et une grande variété de protéines permettant la liaison du Ca^{2+} entre en jeu pour ajuster le flux de Ca^{2+} excédentaire. Les protéines liant le Ca^{2+} forment deux classes : des protéines tamponnant le Ca^{2+} ou des protéines effectrices (pour revue, voir ^{69, 70}). Dans la première classe, les protéines vont lier le Ca^{2+} dans le but de stabiliser la concentration en Ca^{2+} et assurer son homéostasie pour éviter une surcharge de cet ion dans le milieu.⁷⁰ Dans la deuxième classe, les protéines vont changer de conformation selon la concentration en Ca^{2+} et cela leur permet de moduler leur activité ou celle d'une protéine cible.^{69, 71} Les NCS font partie des protéines effectrices. De plus, la majorité des protéines liant le Ca^{2+} possèdent un motif caractéristique nommé *EF-hand*. La présence de ce motif chez plusieurs protéines a été englobée au sein d'une famille protéique. Les caractéristiques de cette famille de protéines et du motif *EF-hand* seront énoncées dans la section suivante.



1.2.3 Famille des protéines à motif *EF-hand*

Globalement, cette famille s'articule autour de la présence du motif *EF-hand*. La structure du motif *EF-hand*, la coordination du Ca^{2+} , le changement de conformation suite à la liaison du Ca^{2+} et les domaines *EF-hand* seront abordés successivement dans cette section.

Dans un premier temps, un motif *EF-hand* est la combinaison d'une hélice α , une boucle et une autre hélice α (Figure 1.12). C'est la boucle qui permet la liaison du Ca^{2+} . Le nom *EF-hand* provient de la forme des hélices α E et F de la parvalbumine où ce motif a été aperçu la première fois.⁷² Cette combinaison forme aussi le même motif que l'index et le pouce écartés avec les autres doigts repliés où les doigts dépliés sont les hélices α , ceux repliés indiquent la position du Ca^{2+} et l'espace entre les doigts dépliés désignent la boucle interhélice α (voir Figure 1.12). En général, les trois sections du motif comptent un total de 29 acides aminés. De plus, la portion de la boucle contient souvent un brin β .

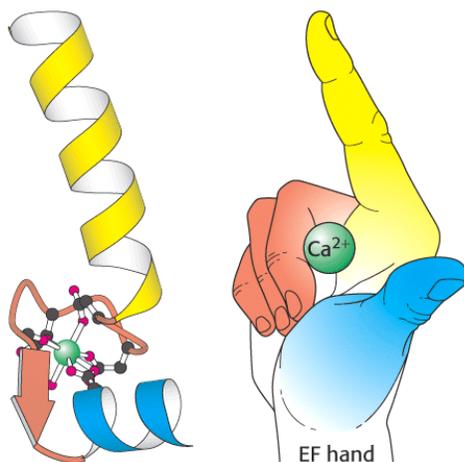


Figure 1.12 : Représentation du motif *EF-hand* selon l'identification de la forme de la main avec la localisation de la liaison de l'ion calcium.

Image prise sur Quora (<https://www.quora.com/What-is-the-difference-between-EF-Hand-and-helix-turn-helix-protein-motifs>) visité le 3 janvier 2018.

La liaison du Ca^{2+} est due à une séquence de douze acides aminés dans laquelle seulement sept ligands coordonnent le Ca^{2+} par des atomes d'oxygène et cinq autres par des liaisons hydrogène intra-chaînes pour stabiliser le tout (Figure 1.13).^{73, 74} La suite

d'acides aminés X, Y, Z, -Y, -X et -Z forme les sept ligands dont cinq viennent de la boucle et deux viennent généralement de la fonction carboxylique d'un acide glutamique (Glu) ou aspartique (Asp) (-Z) localisé au début de la deuxième hélice α . Les ligands X, Y et Z proviennent de chaînes latérales, -Y, du squelette peptidique, et -X, d'un atome d'oxygène d'une molécule d'eau libre stabilisé par sa chaîne latérale, tous étant situés dans la boucle. La Figure 1.13 présente le motif *EF-hand* et les ligands coordonnant un Ca^{2+} . La coordination se fait selon une géométrie de type pentagonal bipyramidal stabilisée par un réseau de liaisons hydrogène. Il existe une certaine flexibilité dans le motif comme certains acides aminés peuvent être substitués ou éliminés et la capacité de liaison du Ca^{2+} est maintenue grâce à de nouveaux ligands.⁷⁴

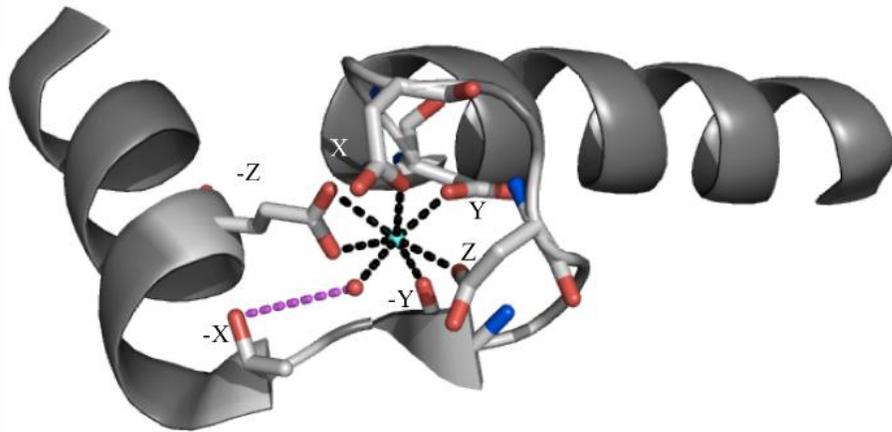


Figure 1.13 : Le motif *EF-hand* canonique.

L'ion calcium (sphère cyan) est coordonné par sept ligands oxygène dont cinq proviennent des chaînes latérales des acides aminés X, Y, Z et -Z. Un sixième oxygène provient de la chaîne latérale de l'acide aminé -Y. Le dernier ligand a pour origine un atome d'oxygène (sphère rouge) d'une molécule d'eau libre stabilisée par la chaîne latérale de l'acide aminé -X. Ce schéma a été réalisé à partir de la structure pdb 1EXR du premier motif *EF-hand* de la calmoduline.

Figure reproduite de la thèse de Phillipe Calvez.⁷⁵

La liaison du Ca^{2+} entraîne un changement de conformation du motif *EF-hand* (Figure 1.14) (pour revue, voir ^{73, 74}). Les ligands X, Y, Z et -Y du côté N-terminal de la boucle initient la liaison du Ca^{2+} comme cette portion du motif *EF-hand* est souvent plus flexible que celle en C-terminale, les deux hélices α peuvent ainsi se rapprocher. Le ligand -Z est ainsi repositionné plus près du Ca^{2+} pour intervenir dans sa coordination en le stabilisant. Le dernier ligand recruté est un atome d'oxygène libre d'une molécule d'eau stabilisé par

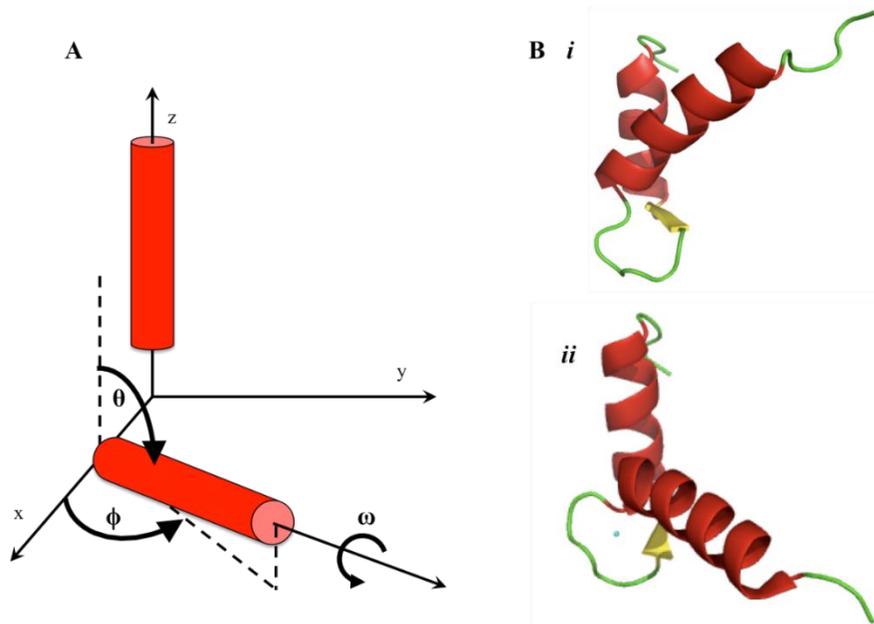


Figure 1.14 : Ouverture du motif *EF-hand*.

- A. Schématisation de la géométrie vectorielle des motifs *EF-hand* d'après Yap et al..⁷⁶
- B. Illustration structurale de l'ouverture du motif *EF-hand* 1 de la calmoduline par la structure du motif en absence de calcium (i) (pdb : 1CFD) et en présence de calcium (ii) (pdb : 1EXR).

Figure reproduite de la thèse de Philippe Calvez.⁷⁵

la chaîne latérale du -X. Les hélices α changent ainsi de position dans l'espace et ce dernier changement d'angle peut être mesuré en fixant certains éléments dans un plan cartésien ou vectoriel.⁷⁶ L'hélice N-terminale est fixée sur le vecteur représentant l'axe z. L'extrémité N-terminale de l'hélice C-terminale définit l'axe x. L'intersection des axes x et z définit l'origine et l'axe y est déduit à partir des vecteurs x et z. Ainsi, trois angles vont définir le mouvement de l'hélice C-terminale à partir de la position de son extrémité N-terminale. L'angle inter-hélice (θ) est mesuré entre l'axe z et la projection xy. L'angle horizontal plan (ϕ) est mesuré entre l'axe x et la projection xy. L'angle de rotation (ω) est défini par la rotation du vecteur correspondant à l'hélice C-terminale. La Figure 1.14A illustre les différents vecteurs, axes et angles du motif *EF-hand*. Deux conformations vont principalement être adoptées par ce motif. Dans la conformation fermée en absence de Ca^{2+} , les deux hélices α s'organisent de manière antiparallèle (Figure 1.14Bi). Dans la conformation ouverte en présence de Ca^{2+} , les hélices α sont quasi-perpendiculaires

(Figure 1.14Bii). Une augmentation de l'angle inter-hélice ($26^\circ < \Delta\theta < 60^\circ$), un possible déplacement horaire de l'angle horizontal plan ($-34^\circ < \Delta\phi < 0^\circ$) et une forte rotation horaire de l'hélice C-terminale sur elle-même ($-59^\circ < \Delta\omega < -40^\circ$) sont observés lors de l'ouverture du motif. Un état intermédiaire entre la conformation ouverte et fermée a aussi été observé et nommé conformation semi-ouverte.⁷⁶

La plupart des protéines liant du Ca^{2+} contiennent deux motifs *EF-hand* avec des Ca^{2+} séparés d'environ 11 Å (Figure 1.15).⁷⁷ Les motifs s'organisent pour être parallèles et stabilisés par des interactions hydrophobes entre les hélices amphiphiles et une organisation antiparallèle des brins β formant ainsi un feuillet β contenus dans les boucles (Figure 1.15). Même des peptides n'ayant qu'un motif *EF-hand* s'organisent en dimère avec cet arrangement.⁷⁸ L'organisation des domaines est maintenue même si un des deux motifs *EF-hand* n'est pas fonctionnel. L'activité des protéines avec des domaines *EF-hand* est permise grâce au changement de conformation de ces motifs suite à la liaison du Ca^{2+} selon la modification de la concentration de cet ion.⁷⁴ Pour certaines protéines, seulement leur intégrité est assurée par la liaison du Ca^{2+} .

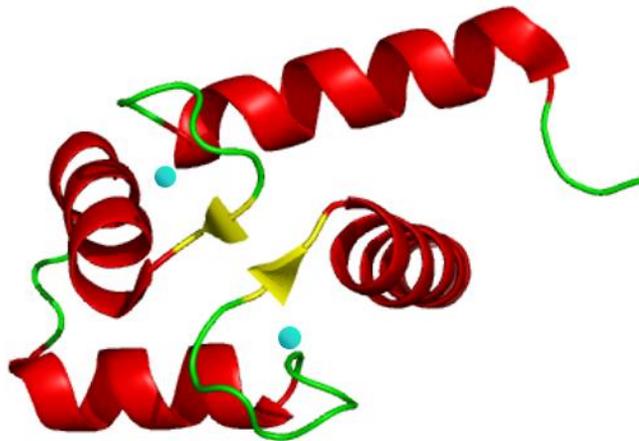


Figure 1.15 : Domaine *EF-hand* canonique.

Les motifs *EF-hand* 1 et 2 de la calmoduline (pdb 1EXR) sont stabilisés par deux brins β formant ainsi un feuillet β antiparallèle (en jaune) au niveau des deux boucles (en vert) de liaison d'ion calcium (en cyan). Ces deux motifs forment ainsi un domaine constitué de deux paires d'hélices α (en rouge).

Figure reproduite de la thèse de Philippe Calvez.⁷⁵

1.2.4 N-myristoylation des protéines

La N-myristoylation est un type d'acylation protéique. Dans un premier temps, le concept d'acylation sera brièvement introduit. Ensuite, la N-myristoylation sera discutée plus en détails comme elle est importante pour ce projet.

Tout d'abord, l'acylation d'une protéine consiste en la liaison covalente d'une molécule lipidique à un acide aminé d'une protéine. Cette acylation peut être faite de manière co-translationnelle (dans la cellule lors de la traduction des protéines) ou post-translationnelle (immédiatement après la synthèse de la protéine).^{9, 79} Les protéines acylées se trouvent partout dans les cellules (membrane plasmique, cytoplasme, noyau, cytosquelette, matrice extracellulaire).⁸⁰ Les molécules lipidiques se lient de plusieurs manières. Il y a l'isoprénylation (liaison thioéther stable entre un résidu cystéine (Cys) C-terminal et un isoprène [farnésyl ou géranylgeranyl]), la S-acylation (liaison thioester stable entre un résidu Cys et un acide gras [plutôt l'acide palmitique que l'acide myristique]), l'O-acylation (liaison oxyester simple entre un résidu sérine (Ser) et un acide gras) et la N-acylation (liaison amide entre un résidu glycine (Gly) N-terminal et un acide gras [exclusivement de l'acide myristique (excepté dans l'œil) d'où la N-myristoylation]).⁷⁹

L'acylation protéique la plus décrite dans la littérature est la N-myristoylation (Figure 1.16).^{81, 82} L'enzyme permettant la catalyse de cette réaction d'addition d'un groupement myristoyle à une protéine cible est la N-myristoyl-transférase (NMT).⁸³⁻⁸⁵ La séquence consensus Met-Gly-X-X-X-Ser/Thr (Met, méthionine; Thr, thréonine), où X peut être n'importe quel acide aminé, est nécessaire en N-terminal de la protéine cible pour que la liaison avec l'acide myristique se produise.⁸² La Met doit toutefois être enlevée par une méthionine amino peptidase avant la liaison du groupement myristoyle.⁸⁶⁻⁸⁸ L'acide myristique doit alors être activé grâce à une molécule de coenzyme A (CoA) par l'enzyme acyl-CoA synthétase dans le cytoplasme de la cellule pour créer le complexe myristoyl-CoA. La NMT va ainsi utiliser le complexe myristoyl-CoA pour myristoyler la protéine cible.^{9, 82, 85-89} Ce processus est illustré à la Figure 1.16. La N-myristoylation est considérée comme une modification irréversible vu la force du lien amide entre la protéine et le groupement myristoyle. En règle générale, cette modification va se retrouver presque exclusivement sur des protéines ne contenant pas de domaine transmembranaire.⁸⁰

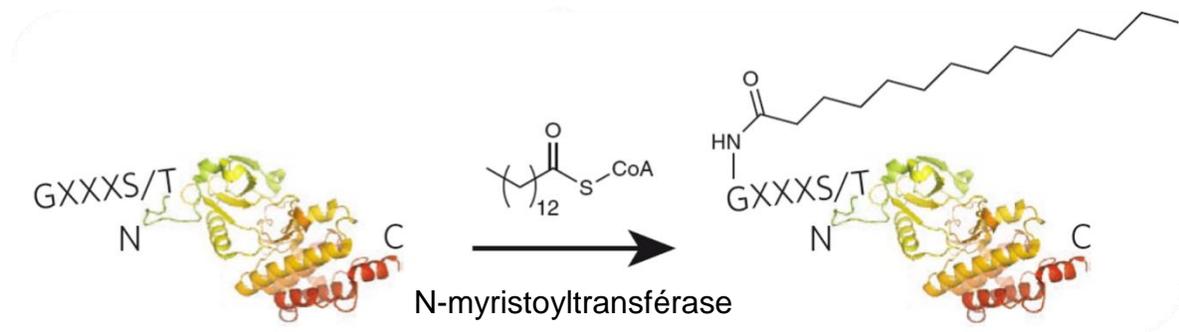


Figure 1.16 : Réaction de N-myristoylation par la N-myristoyltransférase et la coenzyme A.⁷⁹

Il existe une exception pour l'exclusivité de la NMT pour l'acide myristique et elle se trouve dans l'œil. Les protéines seront uniquement myristoylées sauf dans l'œil où elles vont être acylées de manière hétérogène.⁹ Les principaux types de chaînes acyle retrouvés dans la rétine sont le myristoyl (C14 :0), des acides gras insaturés (C14 :1 et C14 :2) et le lauréoyl (C12 :0).⁹ Les proportions de chaque type d'acylation des protéines de la rétine varient d'une espèce à l'autre.^{9, 90} Par exemple, la recoverine humaine (bovine) possède 4 % (0 %) de C12:0, 36 % (10 %) de C14:0, 21 % (48 %) de C14:1n-9, 39 % (43 %) de C14:2n-6.⁹ Il n'y a pas encore d'explication relative à l'hétérogénéité d'acylation des protéines rétinienne.

Le rôle de la myristoylation est variable tel que l'augmentation de la liaison membranaire, des interactions protéine/protéine, de l'activité catalytique et de la stabilité structurale.^{9, 82, 91, 92} En réduisant son mouvement dans le plan de la membrane, la protéine myristoylée peut par diffusion latérale atteindre plus facilement son effecteur si ce dernier est membranaire. La myristoylation peut aussi être nécessaire pour effectuer une liaison membranaire.⁹³⁻⁹⁵ Le groupement myristoyl étant toutefois à peine suffisant pour permettre une liaison membranaire,⁹¹ les acides aminés de la protéine peuvent aussi contribuer.⁹⁶⁻⁹⁸ Les lipides jouent aussi un rôle complexe et peu connu dans la liaison membranaire qui n'est pas facile à décrypter.⁹⁶

Le groupement myristoyl n'est pas toujours orienté de la même manière chez toutes les protéines et il peut changer d'orientation au sein de la même protéine. Ainsi, il existe deux principales conformations que les protéines peuvent prendre. Une conformation présente le groupement myristoyl enfoui dans la protéine. L'autre conformation présente le

groupement myristoylé exposé au solvant pouvant ainsi interagir avec les membranes.⁹⁹ Une phosphorylation peut toutefois contrer l'effet du groupement myristoylé en raison du changement de la charge de la protéine.^{82, 91} Le changement de conformation des protéines en présence du groupement myristoylé est dû à un mécanisme se nommant «*myristoyl switch*». Ce mécanisme peut être dû à trois éléments, soit un ligand, un facteur électrostatique ou un facteur protéolytique tel que mentionné et illustré précédemment.⁸² Ces changements de conformation des protéines permettent habituellement une liaison réversible aux membranes et de réguler ainsi la liaison de nombreuses protéines périphériques.

1.2.5 Aspects généraux des neuroprotéines sensibles aux ions calcium

Les NCS se retrouvent dans de nombreux organismes en passant de la levure à l'humain.^{60, 61} Chez les mammifères, elles sont exprimées exclusivement dans les photorécepteurs, les neurones et les cellules endocrines.^{60, 100} Leurs rôles vont de la régulation de canaux ioniques, au métabolisme des lipides, à la phototransduction visuelle, l'apprentissage, la régulation de la neurotransmission, l'endocytose, l'activation d'enzymes, la répression de la transcription et quelques autres fonctions.⁶⁰ Cette famille de protéines se divise en cinq classes selon l'alignement de leur séquence et provient d'un ancêtre commun, la calmoduline. L'identité de séquence des membres de cette famille varie de 31 à 91 %.¹⁰⁰ Ces protéines possèdent environ entre 190 à 208 acides aminés avec une masse molaire variant entre 22 et 24 kDa. Elles sont constituées de quatre motifs *EF-hand*.^{61, 100} Le motif N-terminal ne lie jamais de Ca^{2+} .^{60, 61, 100} Ainsi, les trois autres motifs *EF-hand* peuvent lier le Ca^{2+} .¹⁰⁰ Parfois, un motif *EF-hand* supplémentaire autre que celui en N-terminal ne lie pas aussi de Ca^{2+} à la suite de mutations ou délétions; il y a donc minimalement deux motifs *EF-hand* actifs.¹⁰⁰ L'affinité pour le Ca^{2+} est de l'ordre du micromolaire.^{60, 100, 101} Seulement quelques protéines de cette famille ne sont pas N-myristoylées.^{61, 100} La structure de nombreuses protéines de cette famille a été déterminée tant en présence qu'en absence d'un groupement myristoylé et de Ca^{2+} (Voir Tableau 1.2 de la thèse de Philippe Calvez⁷⁵ pour les numéros PBD). Le phénomène de *calcium-myristoyl switch* (*ligand-myristoyl switch* dû au Ca^{2+}) n'est pas présent et confirmé chez tous les membres de cette famille (pour une revue, voir la Section 1.3.3.2 de la thèse de Philippe Calvez⁷⁵). La section suivante décrira plus en détails la protéine d'intérêt de ce projet de doctorat qu'est la recoverine.

1.2.6 Recoverine

La recoverine a été la première protéine liant le Ca^{2+} à être isolée des photorécepteurs. Sa découverte a eu lieu de manière quasi simultanée par deux groupes réunissant des chercheurs de Russie, d'Allemagne et des États-Unis entre la fin des années 1980 et le début des années 1990.^{102, 103} Son nom, recoverine, lui fut attribué comme les premières recherches montraient que la recoverine agissait dans la restauration (*recovery*) du niveau de GMPc par l'activation de la GC.^{103, 104} Cependant, cette action était plutôt due à une contamination par la GCAP, mais son nom fut conservé.¹⁰⁴⁻¹⁰⁷

La recoverine est exprimée exclusivement dans la rétine, plus précisément dans les bâtonnets, les cônes et en faible quantité dans les cellules bipolaires reliées aux cônes.¹⁰⁴ Elle est l'unique représentante de la classe C des NCS. Elle a 202 acides aminés (201 sans la Met lorsque N-myristoylée), elle est acylée en N-terminal et elle a une masse moléculaire de 23 kDa chez le bovin.^{108, 109} L'acylation de la recoverine est hétérogène et varie selon les tissus étudiés (voir Section 1.2.4).^{9, 109-111} Aussi, cette protéine contient 11 hélices α et deux paires de courts feuillets β antiparallèles. Quatre paires d'hélices α forment les quatre motifs *EF-hand*. Les motifs *EF-hand* 1 et 2 forment le domaine N-terminal et les motifs *EF-hand* 3 et 4, le C-terminal.¹¹² Les motifs *EF-hand* 2 et 3 lient le Ca^{2+} .^{39, 112-114} L'affinité pour le Ca^{2+} de la forme acylée et non-acylée de la recoverine n'est pas la même. La forme myristoylée lie le Ca^{2+} de manière coopérative avec une constante de dissociation de 17 μM .¹¹⁵ La forme non-myristoylée lie le Ca^{2+} de manière séquentielle en débutant avec le motif *EF-hand* 3 qui a une constante de dissociation de 110 nM, puis le motif *EF-hand* 2 à 6,9 μM .¹¹⁵ Ces mesures sont faites en «*flow dialysis*», donc en absence de membranes.¹¹⁵ La chaîne acyle diminue l'affinité pour le Ca^{2+} . La combinaison de la N-myristoylation et de la capacité de la recoverine à lier le Ca^{2+} permettent de moduler sa liaison membranaire. La structure tridimensionnelle de la recoverine myristoylée (Rec-Myr) a été déterminée en présence et en absence de Ca^{2+} et elles ont mis en évidence le mécanisme de *calcium-myristoyl switch* grâce à un groupement 13-oxamyristoyl en présence de Ca^{2+} .^{39, 40} Ce dernier sera expliqué plus en détails dans la section suivante.

1.2.6.1 *Calcium-myristoyl switch* de la recoverine

Le mécanisme de *calcium-myristoyl switch* est lié à la combinaison de deux

caractéristiques qui incluent la liaison du Ca^{2+} et la N-myristoylation. Il est confirmé pour la recoverine, mais pas pour toutes les NCS. Grâce à ce mécanisme, les protéines changent de structure tertiaire selon la concentration en Ca^{2+} du milieu (Figure 1.17).¹¹⁶ Ainsi, à faible concentration en Ca^{2+} , plusieurs protéines ne lient pas le Ca^{2+} et leur groupement myristoyle est enfoui dans une poche hydrophobe à l'intérieur de la protéine. Ainsi, elles se trouvent dans une conformation cytosolique ou globulaire. À l'opposé, à une concentration en Ca^{2+} élevée, ces protéines vont lier entre 1 à 3 Ca^{2+} (2 pour la recoverine) et leur structure tertiaire va changer pour que le groupement myristoyle soit extrudé à l'extérieur de la protéine laissant ainsi des zones hydrophobes apparentes.³⁹ Donc, ces protéines peuvent être recrutées à l'interface membranaire.^{39, 116} Ces deux conformations sont illustrées à la Figure 1.17. Lorsqu'une protéine lie un seul Ca^{2+} , elle se trouve dans un état de transition de sa structure tertiaire.^{39, 112, 115-118}

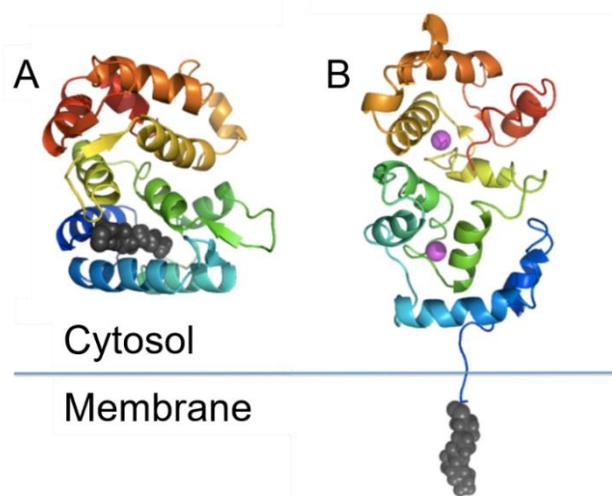


Figure 1.17 : Influence de la liaison d'ions calcium sur la structure de la recoverine myristoylée.

Représentation selon le modèle *cartoon* :

A. La recoverine en absence d'ion calcium (pdb 1IKU).

B. La recoverine avec un ion calcium (en rose) lié à son motif *EF-hand 2* (en vert) et un autre à son motif *EF-hand 3* (en jaune orangé) (pdb 1JSA).

Figure reproduite de la thèse de Philippe Calvez.⁷⁵

Plus en détails, voici comment la structure de la recoverine change selon la liaison du Ca^{2+} pour mener à l'extrusion du groupement myristoyle, tel qu'illustré à la Figure 1.18. La recoverine dans son état cytosolique en forme globulaire mesure environ 40 Å (Figure

1.18A). Le groupement myristoylé est enfoui dans la poche hydrophobe située en N-terminal où cinq hélices α le séquestrent.¹¹⁹ Dans sa conformation ouverte, en présence de deux Ca^{2+} , la recoverine mesure environ 60 Å de long et 35 Å de large (Figure 1.18C). Peu de changements structuraux sont présents au niveau des motifs *EF-hand* 2 et 3. Le motif *EF-hand* 2 s'ouvre légèrement à la suite de la liaison du Ca^{2+} , l'angle inter-hélice varie de 135° à 124°. Le motif *EF-hand* 3 se ferme légèrement en passant de 117° à 93° dû à la liaison du Ca^{2+} . Ces deux changements d'angle font bouger aussi légèrement le motif *EF-hand* 4, bien qu'il ne lie pas le Ca^{2+} , de 99° à 90°. C'est le motif *EF-hand* 1, bien qu'il ne lie pas lui aussi le Ca^{2+} , qui bouge le plus en passant de 170° à 116°. La première liaison d'un Ca^{2+} dans la boucle du motif *EF-hand* 3 induit une rotation de 45° de la Gly96 et une réorientation importante du domaine C-terminal par rapport au N-terminal (Figure 1.18B).¹²⁰ Une portion des résidus de la poche hydrophobe est exposée.^{121, 122} L'extrusion complète du groupement myristoylé est causée par la rotation de la Gly42 du motif *EF-hand* 1 à la suite de la liaison du deuxième Ca^{2+} dans le motif *EF-hand* 2 (Figure 1.18C).³⁹ Ainsi, le domaine N-terminal s'ouvre grandement et la poche hydrophobe est toute exposée. Le Glu (-Z) va rapprocher les deux hélices du motif *EF-hand* 2 et diminuer les interactions électrostatiques entre les boucles des motifs *EF-hand* 1 et 2. En conformation ouverte, huit acides aminés N-terminaux deviennent exposés au solvant et la séquence N-terminale se montre très flexible en étant possiblement le bras mobile permettant la libération du groupement myristoylé.

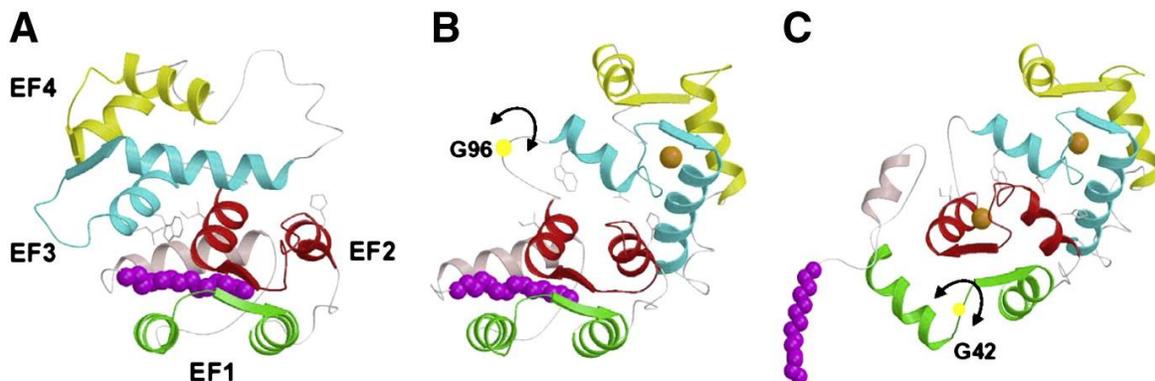


Figure 1.18 : Structure de la recoverine et extrusion du groupement myristoylé en fonction de la liaison de A) 0, B) 1 et C) 2 ions calcium.

La liaison d'un premier ion calcium par l'EF-3 entraîne la rotation autour de glycine 96 tandis que la liaison du second ion calcium entraîne la rotation autour de la glycine 42 et, de manière plus importante, l'extrusion du groupement myristoylé¹¹⁶ (pour plus de détails sur la dynamique et les différentes transitions conformationnelles de la recoverine, voir¹²³).



1.2.6.2 Rôle biologique de la recoverine

Le rôle de la recoverine dans la phototransduction a été brièvement introduit précédemment dans le mécanisme d'inactivation de la phototransduction (Section 1.1.2.2). Plus précisément, à l'état de noirceur, donc en présence de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}] = 500\text{-}800\text{ nM}$),^{35, 124} la recoverine inhibe la RK.^{41, 125-129} En conséquence du changement de conformation vers une forme plus ouverte de la recoverine, la région hydrophobe est ainsi exposée au solvant et la RK peut venir s'y insérer pour être inhibée tel que montré précédemment à l'aide d'un peptide représentant la portion fonctionnelle de la RK.¹³⁰ La poche hydrophobe joue donc un rôle tant en présence qu'en absence de Ca^{2+} , soit pour l'inhibition de la RK ou pour l'enfouissement de son groupement myristoylé. L'inhibition de la RK permet de prolonger la durée de vie de la Rho* comme cette dernière ne peut pas être phosphorylée.^{126, 129, 131, 132} Plusieurs mesures *in vivo* et *in vitro* ont été effectuées montrant ou non l'inhibition de la RK par la recoverine^{125, 131 41, 125-129, 131, 133-136} ce qui laisse planer des doutes sur le rôle de la recoverine. Cependant, des modèles de souris *knock-out* ont montré que la recoverine participe à l'adaptation de la réponse nerveuse de la rétine à la lumière et à la phase de rétrocontrôle de l'excitation lumineuse des photorécepteurs. Ainsi, la photoréponse des bâtonnets est réduite chez ces souris en absence de recoverine.^{137, 138} Par conséquent, le rôle de la recoverine est bel et bien celui d'inhiber la RK. À faible concentration en Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}] = 50\text{-}100\text{ nM}$),^{35, 124, 139} la recoverine est dans un état cytosolique et n'interagit pas avec la RK.

La myristoylation de la recoverine n'est pas nécessaire pour l'inhibition de la RK. Cependant, sa liaison au Ca^{2+} est très importante. Des études ont montré que la recoverine non myristoylée (Rec-nMyr) peut inhiber la phosphorylation de la Rho qu'en présence de Ca^{2+} .^{125, 126} La Rec-Myr inhibe plus abruptement la RK que la Rec-nMyr à forte concentration en Ca^{2+} . La Rec-nMyr peut inhiber à plus faible concentration en Ca^{2+} , soit qu'avec la liaison d'un seul Ca^{2+} , mais avec une moins grande efficacité. La liaison de deux Ca^{2+} par la Rec-nMyr la rend aussi efficace que la Rec-Myr. Il a été postulé que cette différence entre les deux formes de recoverine est due à la coopérativité de la Rec-Myr et la non-coopérativité de la Rec-nMyr pour la liaison du Ca^{2+} sur ces dernières.¹²⁸ De plus, la recoverine inhibe 50 % de la phosphorylation de la Rho par la RK à une concentration en Ca^{2+} entre 200 nM et 3 μM .^{125, 126, 128, 140-142} Ce dernier point suggère que la recoverine a

une plus grande affinité pour le Ca^{2+} en présence de membranes que les mesures en «*flow dialysis*» le laissaient percevoir.¹¹⁵

Aucune maladie directement liée à la structure ou à des mutations de la recoverine n'est connue à ce jour. Cependant, la recoverine est au centre de rétinopathies associées au cancer. Les rétinopathies sont des conséquences d'un cancer présent dans d'autres tissus dans le corps. Ainsi, des cellules cancéreuses peuvent alors exprimer la recoverine dans des tissus inattendus.¹⁴³ Le corps va ainsi produire des anticorps anti-recoverine pour combattre cette présence non désirée, mais aussi pour la protéine retrouvée dans l'œil. Les photorécepteurs vont ainsi dégénérer et la vision va être perdue. La présence de la recoverine a été principalement observée dans des tumeurs malignes des cancers gastriques, du col de l'utérus, de l'ovaire, du sein, de l'endomètre, du rectum, du côlon et du poumon, ainsi que dans le sarcome utérin et le thymome.^{143, 144}

Maintenant que la vision et son fonctionnement, ainsi que les caractéristiques générales de la famille des NCS et celles de la recoverine ont été exposés, il reste à décrire les membranes lipidiques avant de présenter l'état des connaissances sur la structure et l'interaction membranaire de la recoverine, ainsi que les objectifs.

1.3 Membranes biologiques

Les membranes biologiques ont une fonction de compartimentation des cellules en tant qu'élément de base fonctionnel et structural qui compose les tissus et les organes des êtres vivants.⁶⁴ La compartimentation permet de ségréguer l'extérieur de l'intérieur de la cellule. D'autres ségrégations ont lieu à l'intérieur de la cellule pour les diverses organelles. Les membranes biologiques sont un assemblage de multiples composantes, tels que des lipides et des protéines (Figure 1.19). Plus spécifiquement, la famille des lipides est composée de phospholipides, de glycolipides, de stérols et d'acides gras libres. La famille des protéines est composée de protéines intégrales, de protéines périphériques, de glycoprotéines et de protéines acylées. Les membranes biologiques ne sont pas statiques, mais dynamiques, tel qu'il sera discuté dans la Section 1.3.4. La Figure 1.19 illustre schématiquement une membrane lipidique avec ses principaux constituants. La composante protéique ayant déjà été abordée dans les sections précédentes, la composante lipidique sera présentée en détails. Seulement le constituant majoritaire, les phospholipides, sera présenté plus en détails dans la section suivante.

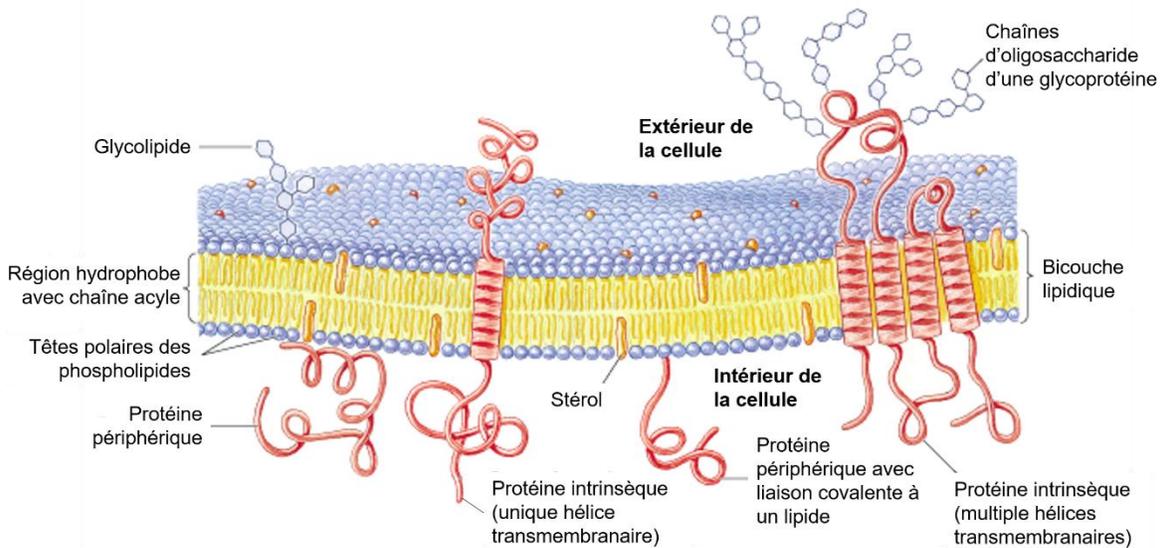


Figure 1.19 : Illustration schématique d'une membrane lipidique et de ses principaux constituants.

Figure adaptée et traduite de la référence ¹⁴⁵.

1.3.1 Phospholipides

Les phospholipides peuvent aussi être nommés phosphoglycérolipides. Ils se divisent en quatre parties soit une tête polaire, un groupement phosphate, un groupement glycérol et des chaînes acyle tel qu'illustré dans le haut de la Figure 1.20. Seulement la nature de la tête polaire et des chaînes acyle peuvent changer et ainsi modifier la nature et le nom des phospholipides. Ces molécules ont un caractère amphiphile, soit qu'une portion est hydrophile (tête polaire et groupement phosphate, ainsi que la zone interfaciale qu'est le groupement glycérol) et qu'une autre est hydrophobe (chaînes acyle).

La tête polaire des lipides dicte leur charge. Les lettres entre parenthèses sont celles utilisées pour l'abréviation du nom des phospholipides et elles font référence à leur tête polaire. Ainsi, la sérine (PS), l'inositol (PI) et le glycérol (PG) sont des têtes polaires neutres ou zwitterioniques (une charge positive et une charge négative sur la même molécule ce qui annule la charge), mais avec la charge négative du groupement phosphate, la charge globale de ces lipides est négative. L'éthanolamine (PE) et la choline (PC) sont chargées positivement, donc, avec le phosphate, ces lipides sont neutres/zwitterioniques. Le nom des phospholipides en fonction de la nature de leur tête

polaire et de leur structure chimique est indiqué à la Figure 1.20.

Nom du X-OH	Formule de -X	Nom du phospholipide
Éthanolamine		Phosphatidyléthanolamine
Choline		Phosphatidylcholine
Sérine		Phosphatidylsérine
Inositol		Phosphatidylinositol
Glycérol		Phosphatidylglycérol

Figure 1.20 : Structure chimique et nomenclature des principaux phospholipides.

R₁ et R₂ : chaîne acyle.

Structure de la formule des X prise du site internet de Avanti Polar Lipids, Inc. (<https://avantilipids.com/>) visité le 6 février 2018.

La nature des chaînes acyle fait aussi varier le nom des lipides. Ces chaînes peuvent être plus ou moins longues, saturées ou insaturées. La nomenclature des chaînes acyle peut se faire de trois manières, soit avec le nom systématique, le nom courant ou le symbole. Le nom systématique est celui recommandé par l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée. Toutefois, le nom courant rappelant son origine est plus couramment utilisé. Le symbole est une nomenclature numérique. Dans cette terminologie, C16:0 signifie que la chaîne acyle comprend 16 atomes de carbone et 0 double liaison, alors que C18:1 ω 9 correspond à 18 atomes de carbone et 1 double liaison. De plus, ω 9 spécifie que la double liaison est située au niveau de l'atome de carbone 9 à partir du dernier atome de carbone de la chaîne acyle, soit le CH₃. La position des doubles liaisons peut aussi être indiquée

entre parenthèses, mais en débutant par le groupement carbonyle. La conformation *cis* ou *trans* de la double liaison doit aussi être indiquée. En absence de cette information, on prend pour acquis qu'il s'agit de la conformation *cis* compte tenu de sa plus grande présence dans les organismes vivants. Brièvement, voici quelques exemples de nomenclature de chaînes acyle importantes pour ce projet de doctorat avec, entre parenthèse, la lettre servant d'abréviation pour cette chaîne acyle dans le nom des phospholipides: C14:0, myristoyle (M); C16:0, palmitoyle (P); C18:1 ω 9, oléoyle (O); C22:6 ω 3, docosahexaénoyle (D). Leurs structures sont illustrées à la Section 1.5 pour les objectifs du projet avec la Figure 1.25.

Le nom complet des phospholipides s'abrège en quatre lettres, les deux premières pour les chaînes acyle et les deux dernières pour la tête polaire. La première lettre pour les chaînes acyle peut être un D signifiant di ou double dans le sens que les deux chaînes sont identiques. Si les deux chaînes acyle diffèrent, la première lettre est pour la chaîne acyle en position 1 sur le glycérol et la deuxième lettre, pour la position 2. La position 3 sur le glycérol est occupée par le groupement phosphate liant la tête polaire. Par exemple, la DMPC est le dimyristoylphosphatidylcholine (diC14:0PC) et le POPG, palmitoyloléoylphosphatidylglycérol (C16:0 – C18 1PG).

Outre un caractère amphiphile, les phospholipides possèdent d'autres propriétés physiques dont la température de transition de phase (T_m), soit la température à laquelle les phospholipides passent de la phase gel (L_{β}') à la phase fluide (L_{α}).¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ La T_m est caractéristique à chaque phospholipide.¹⁴⁹ La nature de la tête polaire et celle des chaînes acyle fait varier la T_m . Plus la chaîne acyle augmente en longueur, plus la T_m augmente. Pour une même longueur de chaîne acyle, plus le nombre d'insaturations augmente, plus la T_m diminue. S'il y a une seule insaturation pour une même longueur de chaîne acyle, plus cette dernière sera vers le centre de la chaîne acyle, plus la T_m diminuera. La valeur de la T_m varie en fonction des interactions de van der Waals. Plus il y a d'interactions, plus la T_m est élevée et moins il y a d'interactions, plus la T_m est basse. Une insaturation *cis* entraîne une courbure d'environ 30° de la chaîne acyle, ainsi il y a diminution de la T_m en raison de la force des interactions de van der Waals qui sont moindres.

1.3.2 Composition lipidique des segments externes des bâtonnets

Les SEB sont composés d'une proportion équimolaire de protéines et de lipides.¹⁵⁰ Près

de 85 % du contenu protéique total est de la Rho.^{150, 151} Le contenu lipidique est majoritairement des phospholipides.^{150, 152} La portion lipidique est particulière comparativement au reste du corps. Le Tableau 1.1 montre la composition en phospholipides (têtes polaires) des disques des SEB ainsi que leur contenu en chaînes acyle. Trois principales têtes polaires sont présentes, deux sont zwitterioniques (la PC à 33 %mol et la PE à 38 %mol) et une est chargée négativement (la PS à 12 %mol). La composition lipidique des feuillet interne et externe de la membrane des disques des SEB est asymétrique.¹⁵³⁻¹⁵⁷ Le niveau d'insaturation des chaînes acyle est beaucoup plus élevé dans la rétine et le cerveau,¹⁵⁸ avec un contenu près de 60 %mol en chaînes acyle polyinsaturées.^{152, 159-162} Généralement, les membranes contiennent 10 %mol de lipides monoinsaturés.¹⁶³ L'acide docosahexaénoïque (22 :6), connu aussi sous l'abréviation ADH, est majoritaire avec près de 50 %mol.^{152, 164, 165} Les autres tissus du corps ne présentent guère plus de 5 %mol d'ADH.¹⁶⁴ La présence de cette chaîne acyle dans un phospholipide lui confère un caractère fluide,¹⁶⁶⁻¹⁷⁰ une épaisseur plus petite (comparativement à la chaîne acyle oléoyle) et une plus grande perméabilité membranaire.^{171, 172} La majorité des combinaisons de chaîne acyle des phospholipides contient une ou deux chaînes acyles insaturées.¹⁵⁹ Les principales chaînes acyle saturées sont le palmitoyle et le stéaroyle. Ces membranes possèdent aussi une plus faible quantité de cholestérol (Chol), d'acides gras libres, de sphingomyélines et de PI que les autres membranes cellulaires.¹⁵⁹ Le contenu en Chol des disques est d'environ 10 %mol et varie le long du SEB.¹⁷³ Ce pourcentage est beaucoup plus faible que la valeur près de 40 %mol rapportée pour les autres membranes plasmiques du corps.¹⁴⁵ La présence d'une grande quantité d'ADH et d'une faible quantité de Chol permet de proposer que ces membranes seraient les plus fluides du corps et comporteraient des radeaux lipidiques,^{170, 174, 175} la présence de 8 %mol de membranes résistantes aux détergents (DRM, *detergent-resistant membranes*) suggère l'existence de tels radeaux dans ces membranes.¹⁷⁶ Il a été prouvé qu'une membrane insaturée favorise l'activation de la Rho et augmente l'interaction entre la $G\alpha\beta\gamma$ et la Rho.^{177, 178} Le caractère fluide de ces membranes par leur grand nombre d'acides gras mobiles et désordonnés a été confirmé par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique et calorimétrie différentielle à balayage.^{179, 180} Ce caractère pourrait favoriser l'interaction des protéines acylées avec la membrane. Ces caractéristiques pourraient ainsi moduler la cascade de réactions biochimiques prenant place au cours de la phototransduction.¹⁷¹

Chaîne acyle	PC (43 %)	PE (41 %)	PS (16 %)
C16:0	19,6	10,7	1,2
C16:1	1,2	1,1	0,6
C18:0	17,3	22,3	18,2
C18:1 ω 9	3,7	3,9	1,6
C18:2 ω 6	1,5	1,3	0,4
C20:3 ω 6	0,7	0,8	0,6
C20:4 ω 6	3,4	2,4	1,0
C22:4 ω 6	1,1	0,9	4,0
C22:5 ω 6	0,8	1,2	2,1
C22:5 ω 3	1,7	1,5	3,1
C22:6 ω 3	41,9	50,6	49,2
C24:4	0,3	0,1	6,1
C24:5	1,0	0,9	9,4

Tableau 1.1 : Composition en chaînes acyle des phospholipides des segments externes des bâtonnets.

Le pourcentage de chaque type de phospholipide (PC : phosphatidylcholine, PE : phosphatidyléthanolamine, PS : phosphatidylsérine) est écrit entre parenthèses. La terminologie C16:0 signifie que cette chaîne acyle comprend 16 atomes de carbone et 0 double liaison et C18:1 ω 9 correspond à 18 atomes de carbone et 1 double liaison. De plus, ω 9 spécifie que la double liaison est située au niveau de l'atome de carbone 9 à partir de la fin de la chaîne acyle. Les pourcentages ont été recalculés à partir de Fliesler & Anderson.¹⁵²

1.3.3 Organisation lipidique et auto-assemblage

Les phospholipides s'auto-assemblent selon leur morphologie tel qu'illustré à la Figure 1.21.^{181, 182} Ainsi, les phospholipides ayant une tête polaire dont l'aire moléculaire est plus grande que celle à l'extrémité de ses chaînes acyle résulteront en une géométrie conique inverse et la courbure de la membrane sera positive, ce qui formera des structures micellaires (Figure 1.21). Un lipide dont l'aire moléculaire de la tête polaire est équivalente à celle à l'extrémité des chaînes acyle aura une géométrie cylindrique et formera une

bicouche (Figure 1.21). Lorsque la tête polaire a une aire moléculaire plus petite que celle à l'extrémité des chaînes acyle, la géométrie lipidique est conique et le rayon de courbure de la membrane est négatif; la structure formée sera de type hexagonal inverse (Figure 1.21). Il existe aussi deux types de phase, soit la normale et l'inverse.^{183, 184} En phase normale, les queues hydrophobes sont au cœur de la structure auto-assemblée et les têtes polaires à la surface. En phase inverse, ce sont les têtes polaires qui se retrouvent au cœur de la structure auto-assemblée et les queues hydrophobes sont en périphérie. Outre la morphologie, le niveau d'hydratation, la présence de sel, le pH et la température peuvent faire varier l'auto-assemblage lipidique.¹⁸³

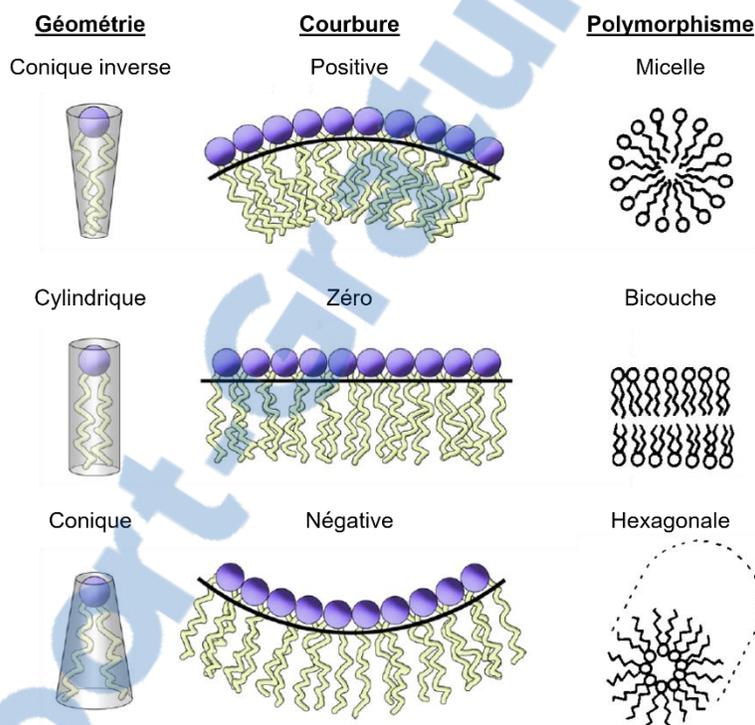


Figure 1.21 : Illustration de la géométrie des phospholipides, ainsi que leur courbure favorisée et leur polymorphisme.

Les phospholipides ayant une géométrie de forme conique inverse adoptent des structures ayant une courbure positive comme les micelles, les phospholipides ayant une géométrie cylindrique forment des phases lamellaires comme les bicouches et les phospholipides ayant une forme conique adoptent des structures ayant une courbure négative comme les phases hexagonales.

Figure conçue à partir des images des références de ¹⁸⁵ et ¹⁸².

1.3.4 Dynamique membranaire

La dynamique membranaire représente les mouvements prenant place dans la membrane. Il est maintenant bien connu que les membranes cellulaires sont dynamiques et complexes en composition. Le modèle membranaire de la mosaïque fluide proposé par Singer et Nicolson en 1972 est en partie révolu.¹⁸⁶ Dans ce modèle, les protéines baignent dans une mer de lipides qui forment une phase homogène. Ce modèle fut révisé par Nicolson près de 40 ans plus tard pour tenir compte des nouvelles connaissances sur les membranes.¹⁸⁷ Aujourd'hui, il est généralement accepté que les lipides et les protéines peuvent se ségréguer en domaines lipidiques hétérogènes.¹⁸⁸ Ces derniers portent le nom de radeau lipidique; ils sont composés d'une plus grande quantité de Chol, sphingolipides et de lipides contenant des chaînes acyle saturées.

Ces domaines devraient se former de manière sporadique.¹⁸⁹⁻¹⁹³ Aussi, les deux feuillettes d'une membrane ont souvent une composition asymétrique. De nombreux mouvements sont présents au sein de la membrane où une variation de 12 ordres de grandeur dans la vitesse des mouvements peut être observée, comme le montre la Figure 1.22.¹⁹⁴ Ces mouvements seront brièvement décrits selon Yeagle.¹⁹⁴ Des protéines permettent le maintien de la composition asymétrique hétérogène en modulant le flip-flop ou basculement des lipides d'un feuillet à l'autre, bien que les lipides seuls aussi le fassent, mais beaucoup plus lentement. En plus de ce mouvement, il existe aussi une diffusion latérale des lipides, soit la translation des lipides dans le plan d'un même feuillet de la membrane. Les lipides tournent aussi sur eux-mêmes dans leur axe selon la rotation diffusionnelle. La protrusion est le mouvement de translation des lipides perpendiculairement au plan de la membrane dans un même feuillet. Le plan de la membrane peut aussi onduler. De plus, les liaisons C-C et C-H des chaînes acyle des lipides entiers peuvent osciller, soit tourner au tour d'un axe situé à un certain angle. Les chaînes acyle peuvent aussi avoir un mouvement de balancier. Un autre mouvement existe au sein même des chaînes acyle des lipides soit la rotation ou isomérisation *anti-gauche* des liens C-C. Ce dernier est sensible à la température du système.¹⁴⁶ À basse température, les liens C-C des chaînes acyle sont en conformation *anti*, soit que les chaînes acyle sont étendues sur le long pour avoir un contact étroit entre elles permettant d'avoir l'énergie la plus stable. Cette conformation correspond à la phase gel des lipides. Leurs chaînes acyle peuvent être perpendiculaires au plan de la bicouche (phase L_{β}) ou partiellement inclinées (L_{β}'). Au-dessus de la T_m , il y a introduction de conformères *gauche*

au sein des liens C-C, ce qui permet une réorientation des chaînes acyle. La conformation des chaînes acyle est alors plus désordonnée (phase L_α) et change d'état physique de manière coopérative. Les chaînes acyle sont moins étendues, s'éloignent l'une de l'autre et oscillent autour d'une orientation moyenne perpendiculaire au plan de la bicouche. C'est la phase fluide. Ces mouvements vont varier selon la fluidité de la membrane. La fluidité varie selon la composition membranaire (type de lipide, tête polaire et chaîne acyle, et présence de protéines) et la température.

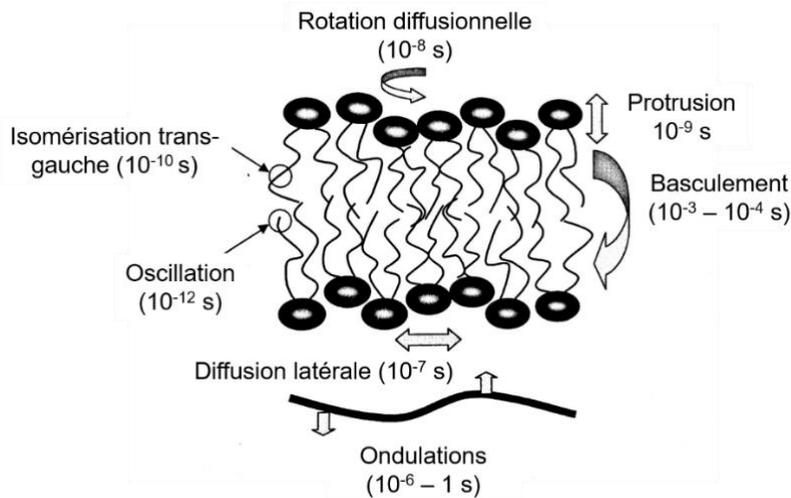


Figure 1.22 : Mouvements des phospholipides dans une membrane lipidique ainsi que les temps de corrélations approximatifs qui les caractérisent.

Figure reproduite de la thèse de Matthieu Fillion¹⁹⁵ selon l'adaptation et la traduction de la référence¹⁹⁴.

1.3.5 Systèmes modèles pour les membranes

Les membranes biologiques sont très complexes en composition. Leur utilisation empêche de comprendre l'impact de chaque composante de manière individuelle. L'usage de systèmes modèles pour les membranes permet de pallier ce problème. Dans les membranes modèles, la composition lipidique, la température, la teneur en sel et le pH peuvent être contrôlés. Aussi, les lipides mis dans un milieu aqueux au-dessus de leur concentration micellaire critique (cmc: concentration à laquelle les surfactants commencent à former des micelles) vont avoir une tendance à s'auto-organiser de manière à former des structures permettant de réduire leur énergie libre.^{181, 196} En



contrôlant certains paramètres, il est possible de former différents types de systèmes modèles pour les membranes tels que, par exemple, les monocouches lipidiques à l'interface air-eau, les micelles, les vésicules unilamellaires (VUL) (de différentes tailles), les vésicules multilamellaires (VML ou MLV pour *multilamellar vesicle*), les bicelles, les nanodisques et les bicouches lipidiques orientées mécaniquement sur différents supports solides.¹⁹⁷⁻¹⁹⁹ Le choix d'un système spécifique de membrane modèle varie selon le type d'analyse et d'information désirée.^{197, 199} Des systèmes de membranes modèles comme les monocouches lipidiques à l'interface air-eau, les bicelles et les bicouches orientées mécaniquement sont utiles pour l'obtention d'information sur la topologie membranaire dont l'orientation des lipides influence le signal dû aux interactions tel qu'en spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) (voir Sections 2.3.2 et 2.4).¹⁹⁹⁻²⁰³ Des systèmes modèles moins concentrés en lipide tels que les micelles, les bicelles isotropes et les VULs sont utiles comme ils sont plus translucides à certaines longueurs d'onde et moins visqueux, donc peuvent être utilisés comme un liquide. Dans le cadre de ce projet, deux types de membranes modèles ont été utilisés soit les VMLs et les bicouches lipidiques orientées entre des plaques de verre. Les deux prochaines sous-sections présentent plus en détails ces modèles membranaires.

1.3.5.1 Vésicule multilamellaire lipidique

Une VML est un arrangement supramoléculaire d'une multitude de bicouches lipidiques successives similaires à des pelures d'oignon (Figure 1.23). Elle se forme de manière spontanée lorsque des films de lipides secs sont hydratés à une température au-dessus de leur T_m et en présence d'agitation.²⁰⁴ Les chaînes acyle vont être attirées entre elles pour réduire leur énergie libre vu la présence d'eau. Les têtes polaires vont rester en contact avec l'eau. Ainsi, les chaînes acyle vont être pris en sandwich entre les deux séries de têtes polaires qui elles seront en contact avec l'eau et ce motif va se répéter pour former une multitude de bicouches. Les lipides à géométrie conique inverse ou cylindrique forment plus facilement des VMLs.^{181, 196} La taille des VMLs n'est pas nécessairement contrôlée directement et va se situer dans les environs de 1 μm .²⁰⁴ Cette taille et le rayon de courbure de la membrane qui s'y associe en font un bon modèle pour mimer les cellules. Si une taille spécifique de vésicules est désirée, il faut extruder les VMLs à travers un filtre dont la taille des pores est connue. L'extrusion peut ainsi permettre d'obtenir des VULs de différentes tailles selon la dimension des pores de la membrane d'extrusion.²⁰⁵ Pour des tailles de VULs plus faibles, la sonication est plus

adaptée. La Figure 1.23 montre une classification des différentes vésicules, ainsi que leur taille.

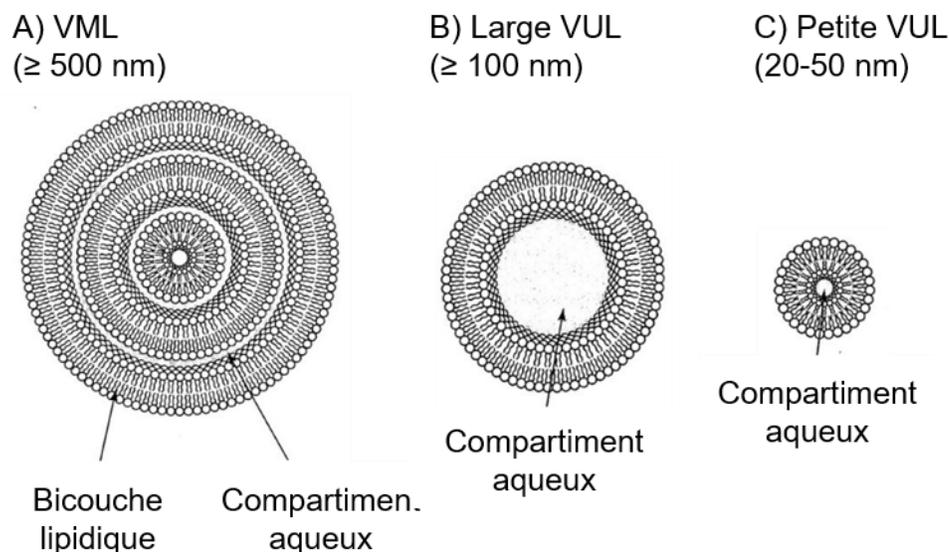


Figure 1.23 : Principale classification des vésicules. Représentation d'une vésicule multilamellaire en A), d'une large vésicule unilamellaire en B) et d'une petite vésicule unilamellaire en C).

Figure adaptée et traduite de la référence ²⁰⁶.

1.3.5.2 Bicouches lipidiques orientées entre des plaques de verre

Les bicouches lipidiques orientées entre des plaques de verre (Figure 1.24) sont principalement utilisées en spectroscopie RMN lorsque le système à étudier requiert une orientation donnée.²⁰² Le rayon de courbure de la membrane est nul. L'orientation des membranes se fait grâce à la présence de plaques de verre. Il est aussi possible d'utiliser d'autres matériaux hydrophiles pour arriver aux mêmes résultats. Ce caractère hydrophile du matériau permet aux têtes polaires de s'aligner à sa surface pour créer des bicouches lipidiques. La Figure 1.24 montre un schéma de bicouches lipidiques orientées entre des plaques de verre. Dans ce dernier, il n'y a que quatre bicouches lipidiques entre les plaques de verre, mais leur nombre réel entre chaque lamelle de verre est de l'ordre du millier et entre chaque bicouche lipidique se retrouve une couche d'eau interstitielle.²⁰⁷ Il faut favoriser l'utilisation de lipides à géométrie cylindrique pour ce type de membrane modèle.

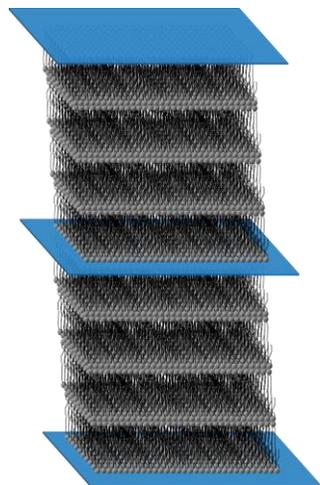


Figure 1.24 : Représentation de bicouches lipidiques orientées entre des plaques de verre.

Il existe plusieurs méthodes de préparation de modèle membranaire selon les caractéristiques de l'élément d'intérêt (protéine, peptide, glucide, médicament, molécule organique, etc...) à l'étude. Une première méthode est de simplement former des VMLs contenant ou non l'élément d'intérêt à l'étude, les badigeonner sur les lamelles de verre, faire sécher le tout, puis empiler les lamelles et les réhydrater.²⁰⁸ Les VMLs peuvent être remplacées par des VULs de grande taille. Ces structures lipidiques vont fusionner avec la plaque de verre pour réduire leur énergie libre et ainsi permettre l'orientation des membranes. Cette préparation permet de mélanger plusieurs constituants ensemble dans un milieu aqueux. Une deuxième méthode consiste, si les éléments d'intérêt à l'étude le permettent, à mélanger les différentes composantes ensemble dans un solvant organique, puis de les badigeonner sur les lamelles de verre qui seront ensuite séchées, empilées et réhydratées.²⁰⁹ Le principe de ces deux méthodologies peut être adapté selon la nature des éléments d'intérêt à l'étude. Ainsi, il peut y avoir étalement du lipide dans un solvant x en premier, puis, dans un deuxième temps, étalement des autres composantes du système dans un solvant y .²¹⁰ Cette méthode fut choisie dans le cadre de ce projet. Ces différentes méthodes de préparation ont chacune leurs avantages et inconvénients selon les éléments d'intérêt à l'étude. Des bicouches lipidiques orientées par cette approche permettent d'étudier la dépendance orientationnelle des interactions de spins nucléaires.^{200, 201, 203, 211} L'orientation des bicouches lipidiques varie selon la méthode de préparation et la nature des éléments d'intérêt à l'étude.²⁰⁷ Par ailleurs, il est important de

mentionner que ce système de membrane modèle est moins hydraté que les VMLs et que les premières bicouches de lipides peuvent interagir avec les lamelles de verre par des forces de van der Waals, électrostatique, stérique et d'hydratation.^{212, 213}

1.4 État des connaissances sur la structure de la recoverine et son interaction membranaire

1.4.1 Structure tridimensionnelle de la recoverine

La structure tridimensionnelle de la recoverine est déjà connue. La *Protein Data Bank* inclut plusieurs structures de la recoverine qui ont été résolues tant par spectroscopie RMN en solution^{39, 40, 120, 130} que par diffraction des rayons X^{112, 121, 214-216} (PDB 2D8N). Seulement la structure de la recoverine humaine n'a pas encore été publiée dans un article scientifique (PDB 2D8N), les autres proviennent du bœuf. De plus, la structure de la Rec-Myr^{39, 120} et la Rec-nMyr^{40, 112, 121, 130, 214-216} (PDB 2D8N) ont été déterminées, ainsi que l'impact de la présence de 0^{40, 1}^{120, 121, 215, 216} ou 2^{39, 130, 214}(PDB 2D8N) Ca²⁺, ainsi que d'un Ca²⁺ et avec un ion samarium¹¹² ou Na⁺.²¹⁴ Des structures de la recoverine mutée ou tronquée pour améliorer la compréhension de son repliement et de sa liaison du Ca²⁺^{120, 121, 214-216}(PDB 2D8N), ainsi que sa structure native^{39, 40, 112, 121, 130} furent étudiées. Certaines structures ont aussi été déterminées pour la recoverine liée à la RK.¹³⁰ Ainsi, seulement la Rec-Myr a été déterminée autant en absence qu'en présence de 2 Ca²⁺.^{39, 40} Ces structures permettent de comprendre l'agencement des structures secondaires de la protéine, ainsi que le phénomène de *calcium-myristoyl switch*.

1.4.2 Études en absence ou présence des ions calcium et du groupement myristoyle sur la recoverine

Les deux caractéristiques fondamentales de la recoverine, soit la myristoylation et la liaison du Ca²⁺, ont été étudiées tant sur la structure de la recoverine (Sections 1.4.1 et 1.4.4.2) que son interaction membranaire (Section 1.4.4). Ainsi, plusieurs articles montrent l'effet qu'ont la présence et l'absence du groupement myristoyle.^{117, 135, 140, 217-230} Toutefois, plusieurs articles n'étudient que la Rec-Myr.^{111, 118, 215, 218, 231-243} Il en va de même pour la liaison du Ca²⁺ avec plusieurs études se consacrant à la structure de la recoverine tant en présence qu'en absence de Ca²⁺^{111, 117, 118, 135, 140, 215, 217, 219-226, 228-232, 234, 237, 238, 241-244} ou

qu'en présence de Ca^{2+} .^{218, 227, 233, 235, 236, 239} Certaines études ajoutent aussi l'effet du Mg^{2+} ^{221, 225, 242}, de l'ion zinc (Zn^{2+}),^{221, 240} du K^+ ,²²¹ de l'ion strontium (Sr^{2+}),²⁴² de l'ion barium (Ba^{2+}),²⁴² de l'ion cadmium (Cd^{2+})²⁴² et de l'ion manganèse (Mn^{2+}).²⁴² La myristoylation et la présence de Ca^{2+} sur la recoverine influencent sa structure (Sections 1.2.6, 1.4.1 et 1.4.4.2) et son interaction membranaire (Section 1.4.4).

1.4.3 Lipides utilisés pour l'étude de la recoverine

L'étude de l'interaction entre des protéines et des membranes implique généralement l'utilisation de lipides pour mimer les membranes natives. Ainsi, il est nécessaire de choisir tant le type de lipides que le type de membranes modèles utilisés. Plusieurs études de l'interaction membranaire de la recoverine montrent des résultats avec qu'un type de membrane tel des lipides extraits du SEB,^{215, 217, 223, 231, 232, 240, 241, 244} un lipide unique^{219, 220, 233} ou un mélange complexe de chaînes acyle et têtes polaires en ratio unique connu.^{117, 223, 224, 235, 239, 241, 242} Aussi, bon nombre d'études ne font varier que la tête polaire en ne tenant pas compte des chaînes acyle en comparant des têtes polaires pures avec différents mélanges^{135, 140, 226, 227} ou varier les chaînes acyle pour une même tête polaire.^{218, 236} Des études font aussi des mélanges de lipides pour comprendre l'effet de la fluidité membrane (ou géométrie des lipides) et de la charge des têtes polaires tout en comparant avec les lipides purs variés en chaînes acyle et/ou tête polaire.^{230, 234} Tel que mentionné à la Section 1.3.5, il existe différents types de membranes modèles. Ainsi, la recoverine fut étudiée avec des membranes du SEB lavées à l'urée,^{135, 215, 217, 231, 232, 240, 244} des liposomes,^{135, 140, 215, 223, 224, 226, 230, 241, 242} des monocouches à l'interface air-eau,^{218, 220, 233, 234, 236} des lipides attachés à un senseur de spectroscopie de résonance de plasmon de surface (*surface plasmon resonance*, SPR),^{117, 135, 223, 226} des bicouches lipidiques supportées,^{219, 230, 235, 239} des DRM,^{117, 135} des micelles inverses formées de détergents²³⁷ et deux demi-feuillets de bicouches lipidiques par simulations de dynamique moléculaire.²²⁷ Chaque type de membranes modèles donne accès à différentes techniques d'analyse, donc à différentes informations sur le système. La présente revue montre qu'aucune étude n'avait utilisé des VMLs.

1.4.4 Interaction membranaire de la recoverine

1.4.4.1 Liaison membranaire

Il est possible de postuler que la nature particulière des membranes des SEB pourrait jouer un rôle majeur dans la liaison membranaire de la recoverine. Différentes techniques de mesure ont été utilisées pour vérifier cette hypothèse et obtenir des informations sur différents paramètres de liaison membranaire de la recoverine avec différents types de membranes modèles. Les méthodes de centrifugation ont été utilisées pour déterminer la répartition de la recoverine entre la fraction membranaire et aqueuse.^{117, 135, 140, 215, 217, 226, 232, 240, 244} La spectroscopie SPR a permis d'estimer la vitesse et la force de l'interaction entre la recoverine et différents systèmes membranaires et de confirmer le phénomène de *calcium-myristoyl switch*.^{117, 135, 223, 226, 241, 242} Cependant, la cinétique d'association et de dissociation de la recoverine en SPR peut varier en fonction de la technique utilisée pour immobiliser les lipides à la surface d'un senseur.²⁴¹ Toutefois, des résultats similaires de cinétique de liaison de la recoverine sont obtenus si la recoverine ou les lipides sont liés au senseur en spectroscopie SPR.²²³ L'utilisation des monocouches de lipides à l'interface air-eau a permis de déterminer la vitesse d'adsorption de la recoverine par des mesures de pression de surface^{218, 220} et de pression d'insertion maximale.^{218, 233, 234, 236} La microscopie de fluorescence a permis d'observer la liaison de la recoverine à différents mélanges lipidiques ou différentes phases lipidiques.^{230, 234} La spectroscopie RMN du deutérium a permis de caractériser l'immobilisation membranaire du groupement myristoyle de la recoverine.²³⁹ La spectroscopie de force a permis de mesurer la force de la liaison de la recoverine à une bicouche lipidique en présence et en absence de Ca^{2+} .²¹⁹ Les simulations en dynamique moléculaire ont permis de suivre les différentes composantes du système (protéine, lipides, ion, etc.) en fonction du temps, permettant ainsi une meilleure compréhension des résultats expérimentaux.²²⁷

Les premières mesures de liaison membranaire de la recoverine ont été effectuées avec des lipides purs PC, un mélange équimolaire PC :PS et les membranes des SEB.¹⁴⁰ Ces premières mesures, ainsi que plusieurs autres par la suite, ont montré que la myristoylation de la recoverine et la présence de Ca^{2+} favorisent sa liaison et/ou augmente sa vitesse d'absorption.^{117, 135, 140, 219, 220, 223, 224, 226, 230} De plus, il a été observé que la modification de la composition membranaire mène à des variations significatives de la liaison membranaire de la recoverine. Ainsi, une affinité supérieure pour la recoverine a

été observée pour les membranes natives des SEB comparativement aux membranes des SEB lavées à l'urée ou à des liposomes dont la composition en lipides (PC :PE :PS :Chol, rapport molaire de 40 :40 :15 :5) est proche de celle des membranes des SEB.²²³ Le même comportement a été observé pour la recoverine tronquée en C-terminal.²²⁶ Par ailleurs, des mesures avec des membranes contenant des concentrations croissantes de PS jusqu'à 60 % dans un mélange équimolaire de PC :PE en présence de Ca²⁺ ont montré une augmentation de la liaison membranaire de la Rec-Myr, mais une liaison membranaire plus faible pour la PS pure que pour la PC ou la PE pure ou en mélange équimolaire.²²⁶ De plus, il a été montré que les PS permettent le *calcium-myristoyl switch* et l'insertion de la Rec-Myr en monocouche sur la base des valeurs de pression d'insertion maximale comparativement aux lipides zwitterioniques et d'autres lipides chargés négativement.²³⁴ D'autre part, la spectroscopie RMN à l'état solide du deutérium a été utilisée pour montrer que le groupement myristoyle de la recoverine est immobilisé dans une membrane de DOPC :DOPG (rapport molaire de 80 : 20) orientée mécaniquement par des lamelles de verre en présence de Ca²⁺. Ils ont observé que le groupement myristoyle se comporte comme une chaîne acyle hautement fluide et que son orientation est plus variable que celle de la bicouche lipidique.²³⁹ De plus, des mesures d'activité de la RK en présence de la recoverine et de Ca²⁺ ont montré une plus forte inhibition de la RK dans des DRM que dans les membranes des SEB.¹³⁵ Sur la base de données en présence de β -cyclodextrine, les auteurs proposent que la concentration plus élevée de Chol dans les DRM serait responsable de cette observation.¹³⁵ Cependant, la Rec-nMyr ne présente pas cette dépendance du contenu en Chol.¹³⁵ Comme mentionné ci-dessus, les mêmes auteurs ont aussi observé que la présence de Chol augmente plus la liaison membranaire de la recoverine qu'en présence de PS mais qu'une liaison encore plus importante est observée en présence à la fois de PS et de Chol dans un mélange équimolaire de PC :PE.²²⁶ Des résultats en spectroélectrochimie ont aussi montré l'insertion du groupement myristoyle de la recoverine dans des membranes constituées de DMPC et de Chol sans toutefois observer d'interaction avec les têtes polaires des lipides.²³⁵ De plus, l'insertion du groupement myristoyle dans la membrane se fait tant pour les lipides neutres que ceux chargés négativement,^{226, 227, 234} mais elle est plus rapide et/ou plus forte en présence de lipides chargés négativement^{226, 227, 234} ou plus forte en présence de lipides zwitterioniques polyinsaturés.^{218, 236} Ces différentes études, ainsi que d'autres, montrent que la liaison membranaire de la recoverine est favorisée en présence de lipides avec une courbure négative (en forme de cône, soit par exemple PE) et/ou en phase

désordonnée (avec une préférence pour les lipides polyinsaturés) par rapport à une courbure positive (en forme de cône inverse, par exemple un mélange de PC avec de la lysoPC) et/ou en phase ordonnée.^{218, 230, 236} De plus, l'oxydation des lipides polyinsaturés réduit la liaison membranaire de la recoverine.²³³ Aussi, la liaison de Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} et Mn^{2+} permet l'extrusion du groupement myristoyle de la recoverine et sa liaison à des membranes de PC :PE :PS :Chol (rapport molaire de 40 :40 :15 :5), ce qui n'est pas le cas du Mg^{2+} .²⁴² Par ailleurs, la Rec-Myr se lie en plus grand nombre aux membranes des SEB en présence de Zn^{2+} et ce en présence ou absence de Ca^{2+} .²⁴⁰

Les études précédentes ont aussi informé sur les paramètres de l'interaction membranaire entre la recoverine et les membranes, ainsi que sur l'orientation de la recoverine à l'interface membranaire. Il a été proposé que la force principale impliquée dans l'immobilisation de la recoverine à l'interface membranaire est médiée par son groupement myristoyle.²²⁶ Cependant, différentes données expérimentales de coefficients de partition de peptides et protéines myristoylés suggèrent fortement que le groupement myristoyle est tout juste suffisant pour permettre la liaison membranaire de la recoverine.⁹¹ Il a ainsi été proposé que la présence d'un groupement myristoyle, au lieu d'un palmitoyle, serait plus compatible avec une association réversible des protéines myristoylées avec les membranes.⁸⁸ L'utilisation de bicouches lipidiques orientées mécaniquement par des lamelles de verre avec la spectroscopie RMN à l'état solide avec de la recoverine marquée à l'azote-15 (^{15}N) a montré que le grand axe de la Rec-Myr en présence de Ca^{2+} est orienté à 45° de la normale de la bicouche.²³⁹ Une orientation similaire a été obtenue en monocouche par des mesures de spectroscopie infrarouge (IR) en modulation de polarisation.²²⁰ Finalement, des simulations en dynamique moléculaire suggèrent que la recoverine s'oriente dans l'espace d'une manière plus optimale en présence de lipides chargés négativement pour l'insertion du groupement myristoyle dans la membrane²²⁷ alors que des mesures en ellipsométrie suggèrent que le corps protéique de la recoverine pénètre à l'intérieur de la bicouche lipidique.²³⁴

1.4.4.2 Impact des lipides sur la structure secondaire de la recoverine

Les lipides influencent aussi la structure secondaire de la recoverine. Cependant, il est préférable d'étudier la structure secondaire d'une protéine pure avant d'ajouter des lipides. Ainsi, principalement le dichroïsme circulaire^{111, 118, 222, 224, 225, 232, 240, 243} et, en moindre mesure, la spectroscopie IR^{220, 235} furent utilisés pour l'étude de la structure secondaire de

la recoverine. Ces études ont montré que la recoverine comporte principalement de l'hélice α , mais aussi d'autres structures telles que des coudes et des feuillets β .^{111, 220, 232, 235, 240} La structure secondaire tant en présence qu'en absence du groupement myristoylé sur la recoverine reste globalement similaire.^{220, 222, 224} Le contenu en hélice α de la Rec-Myr augmente en présence de Ca^{2+} ^{111, 118, 222, 243} (à l'exception d'une étude qui montre l'inverse²³²) et encore plus avec l'ajout supplémentaire de Zn^{2+} .²⁴⁰ Différents cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} et Mn^{2+}) peuvent se lier à la recoverine tel qu'étudié par spectroscopie IR, plus spécifiquement par l'étude de la bande des carboxylates des chaînes latérales de certains acides aminés (Asp, Glu).²⁴² La présence de Ca^{2+} ordonne la structure secondaire en changeant la conformation de la Rec-Myr^{111, 118} et sa surface devient plus hydrophobe.^{222, 243} De plus, en présence de Ca^{2+} , la Rec-Myr a tendance à dimériser et la Rec-nMyr à être monomérique; l'absence de Ca^{2+} inverse cet effet.²²²

Il est important de connaître la stabilité thermique de la recoverine afin de choisir une gamme de températures appropriées lors de l'étude de l'impact de la recoverine sur les lipides. La stabilité thermique de la recoverine a surtout été évaluée par spectroscopie de fluorescence^{111, 118, 215, 243, 244} et/ou par calorimétrie différentielle à balayage.^{118, 240} La présence unique de Ca^{2+} augmente la stabilité thermique de la Rec-Myr^{111, 118, 215, 224, 225, 232, 243, 244} et Rec-nMyr^{224, 225} comparativement à l'absence de Ca^{2+} . Cependant, l'ajout de Mg^{2+} seul réduit la stabilité thermique²²⁵. Néanmoins, la présence de Ca^{2+} et de Mg^{2+} augmente la stabilité thermique de la Rec-nMyr, mais de moindre façon que la seule présence de Ca^{2+} pour la Rec-Myr.²²⁵ La liaison combinée de Ca^{2+} et Zn^{2+} réduit la stabilité thermique de la Rec-Myr.²⁴⁰ De plus, la myristoylation réduit la stabilité thermique de la recoverine en présence de Ca^{2+} .²²⁴ Au-dessus d'un certain nombre d'acides aminés coupés en C-terminal de la Rec-Myr, la stabilité thermique de la recoverine est réduite.²⁴⁴ Tant qu'à elle, la présence de lipides avec la même composition que les SEB,²²⁴ de DMPC²²⁰ et d'un mélange DMPC et Chol²³⁵ ne change pas de manière significative la structure secondaire de la Rec-Myr^{220, 224, 235} et la Rec-nMyr^{220, 224} et en absence²²⁴ et présence^{220, 224, 235} de Ca^{2+} à des températures physiologiques. En présence de lipides et de Ca^{2+} , la Rec-nMyr est plus désordonnée que la Rec-Myr tout en conservant une structure native.²²⁰ Ainsi, les lipides n'induisent pas de changements majeurs à la structure secondaire de la recoverine. Cependant, ce ne sont pas tous les lipides qui ont été étudiés et aucune étude n'a été réalisée avec des VMLs.

1.4.4.3 Impact de la recoverine sur les lipides

La seule étude ayant étudié l'influence de la recoverine sur le comportement des lipides a montré par la spectroscopie IR à réflexion-absorption à modulation de phase que la présence du groupement myristoylé sur la recoverine induit du désordre dans la région hydrophobe des membranes de DMPC et Chol.²³⁵ Clairement, ce ne sont pas tous les lipides qui ont été étudiés et cette étude n'a sondé que la région hydrophobe de la bicouche lipidique.

1.5 Objectifs du projet de recherche au doctorat

L'objectif général du projet est de mieux comprendre les paramètres qui influencent les interactions entre la recoverine et les membranes phospholipidiques et le phénomène de *calcium-myristoyl switch*. Cette étude permettra de mieux comprendre le processus de phototransduction impliquant la recoverine au niveau moléculaire (Sections 1.1.2 et 1.2.6.2) en fonction de la composition lipidique des membranes (Section 1.3.2). À la suite de la découverte de la recoverine (Section 1.2.6), les premières analyses portaient principalement sur son rôle dans la vision (Section 1.2.6.2), avant les études structurales (Section 1.4.1) ou d'interactions membranaires (Section 1.4.4).

L'équipe de mon codirecteur de recherche (Pr Christian Salesse) connaissait déjà la recoverine avant mon arrivée au doctorat. Cette équipe a publié une version améliorée de sa purification²⁴⁵ et un article dans lequel le caractère de *calcium-switch* de la recoverine était utilisé comme base pour créer une machinerie enzymatique,²⁴⁶ en plus des articles précédemment cités sur l'interaction membranaire de recoverine. Néanmoins, l'équipe du Pr Salesse et l'état des connaissances (Section 1.4) montrent que des informations sur le comportement de la recoverine seule en solution et en présence de systèmes lipidiques en multiples bicouches tel que des VMLs ou des bicouches lipidiques orientées sont encore manquantes. Ainsi, le projet de recherche est divisé en plusieurs volets utilisant la spectroscopie IR et RMN en solution et à l'état solide pour l'analyse de la recoverine et des lipides sur différents états physiques des échantillons (Figure 1.25). Les différents phospholipides étudiés sont montrés à la Figure 1.26. Finalement, quatre objectifs spécifiques ont été fixés pour ce projet de doctorat et seront exposés dans les Sections 1.5.1 à 1.5.4.

1.5.1 Stabilité thermique de la recoverine myristoylée et non myristoylée en présence et absence d'ions calcium

Le premier objectif spécifique est de déterminer la structure secondaire et la stabilité thermique de la Rec-Myr et la Rec-nMyr en présence et en absence de Ca^{2+} , ce qui résulte en différentes structures tertiaires (voir Section 1.2.6.1). En effet, l'absence de Ca^{2+} mène à une structure tridimensionnelle de la recoverine où son groupement myristoylé est enfoui dans une poche hydrophobe, alors que la présence de Ca^{2+} résulte en l'extrusion du groupement myristoylé. Ainsi, l'absence du groupement myristoylé à l'intérieur de la poche hydrophobe en absence de Ca^{2+} peut déstabiliser la recoverine. Les mesures de stabilité thermique permettent d'évaluer la force des liens hydrogène, des contributions hydrophobes et des liaisons de van der Waals qui jouent un rôle important pour le repliement adéquat d'une protéine qui permet de maintenir sa fonction biologique intacte. Pour la stabilité thermique, l'augmentation de la température augmente l'énergie du système qui peut changer le nombre et/ou l'emplacement des interactions favorables à une structure secondaire ou tertiaire donnée d'une protéine. De ce fait, la recoverine a été étudiée en absence et présence de Ca^{2+} , à différentes concentrations de cet ion, ainsi qu'en absence et présence de son groupement myristoylé. Les mesures ont été faites en solution aqueuse par spectroscopie IR à transmission. La technique utilisée sera décrite au Chapitre 2. Les résultats de cet objectif seront présentés au Chapitre 3 sous forme d'un article scientifique qui est publié. Une bonne connaissance de la stabilité thermique de la recoverine seule en solution a permis ensuite d'identifier les conditions optimales pour travailler adéquatement avec des lipides exigeant des traitements thermiques tout en s'assurant de conserver la structure native de la protéine.

1.5.2 Effet de la liaison d'ions calcium sur le phosphatidylglycérol et sur l'interaction entre la recoverine et ce type de lipide

Le second objectif spécifique consiste à déterminer l'interaction membranaire entre la recoverine et le PG en présence de Ca^{2+} . Tel que mentionné dans la Section 1.4.4.1, la charge négative de certains lipides semble avoir un impact sur l'interaction membranaire entre la recoverine et les lipides, bien qu'ils soient présents en moins grand nombre dans les photorécepteurs. Il est connu que le Ca^{2+} interagit avec les lipides chargés négativement.²⁴⁷⁻²⁵² Le Ca^{2+} est aussi nécessaire au changement conformationnel et pour

l'activité de la recoverine. De ce fait, les lipides chargés et la recoverine devraient être en compétition pour le Ca^{2+} dans le cytoplasme des SEB. Les lipides complexés avec le Ca^{2+} présentent des caractéristiques spectroscopiques différentes des lipides non complexés. Ainsi, la spectroscopie IR est une technique de choix pour l'analyse de ce type de système lipidique. De plus, la protéine peut aussi être analysée avec la même technique spectroscopique et le même échantillon de lipides. La structure secondaire et la stabilité thermique de la recoverine seule en solution étant connues suite aux mesures décrites dans le premier objectif spécifique (Section 1.5.1), ces données peuvent être comparées à celles obtenues avec la recoverine en présence de lipides chargés négativement et de Ca^{2+} . La PS, le lipide chargé négativement des membranes des SEB, cause des interférences spectrales en spectroscopie IR. Ainsi, le choix du lipide chargé s'est orienté vers un analogue bien connu portant aussi une charge négative, le PG même s'il n'est pas présent dans les membranes des SEB. Tel que mentionné dans le premier objectif spécifique (Section 1.5.1), la technique de spectroscopie IR reliée à l'analyse des protéines et des lipides sera décrite au Chapitre 2. Les résultats de cet objectif seront présentés au Chapitre 4 sous forme d'un article scientifique qui est publié.

1.5.3 Immobilisation du groupement myristoyle de la recoverine selon la fluidité membranaire de lipides zwitterioniques

Le troisième objectif spécifique est d'évaluer le rôle de la fluidité membranaire des lipides zwitterioniques des SEB sur l'immobilisation du groupement myristoyle de la recoverine dans des bicouches orientées entre des plaques de verre. Les membranes des SEB contiennent principalement des lipides zwitterioniques et les plus polyinsaturés du corps tel que décrit dans la Section 1.3.2. La polyinsaturation des chaînes lipidiques amène beaucoup de mouvement dans les chaînes lipidiques et dans les lipides en général. Le processus de phototransduction visuelle se fait très rapidement. Il est donc intéressant de tenter de faire un lien entre la spécificité de ces membranes et leur polyinsaturation par la mesure de la liaison de la recoverine à la membrane par le biais de son groupement myristoyle. Plusieurs techniques sont possibles pour mesurer la liaison et l'insertion du groupement myristoyle d'une protéine dans une membrane. Cependant, la spectroscopie RMN à l'état solide du deutérium permet une analyse de l'immobilisation membranaire du groupement myristoyle de la protéine en perdeutérant ce groupement. La technique de spectroscopie RMN à l'état solide sera exposée au Chapitre 2, ainsi que les

caractéristiques de l'atome de deutérium qui en font un noyau de choix pour ce type d'analyse. Les résultats de cet objectif seront présentés au Chapitre 5 sous forme d'une communication scientifique qui est publiée.

1.5.4 Interaction de la recoverine avec un lipide zwitterionique, la dioléoylphosphatidylcholine

Le quatrième objectif spécifique est d'étudier l'interaction de la recoverine avec des lipides zwitterioniques. Il existe principalement des lipides zwitterioniques et chargés négativement dans les SEB. Les lipides chargés négativement ont déjà été étudiés dans l'objectif spécifique de la Section 1.5.2 et l'aspect de l'immobilisation du groupement myristoylé de la recoverine à l'interface de lipides zwitterioniques a déjà été étudié dans l'objectif spécifique de la Section 1.5.3. L'interaction membranaire de la recoverine en présence de lipides zwitterioniques n'a toutefois pas encore été étudiée. Un seul lipide, soit la DOPC, fut choisi dans le cadre du présent objectif à cause de l'insertion membranaire maximale de la recoverine observée en présence de ce lipide (résultats présentés au Chapitre 5). La diffusion latérale des lipides peut varier en présence et en absence de Ca^{2+} et de protéine. L'étude de ce paramètre pourrait apporter de nouvelles informations sur l'effet de la myristoylation de la recoverine et de la présence du Ca^{2+} sur les lipides zwitterioniques. La diffusion latérale de la DOPC sera mesurée à l'aide d'une nouvelle application d'une séquence de spectroscopie RMN à l'état solide qui a déjà été développée pour l'étude de la mobilité à l'intérieur d'une molécule. De plus, pour comprendre la dynamique du groupement myristoylé, ce dernier sera monofluoré à deux positions différentes et son comportement sera étudié en présence et en absence de Ca^{2+} et de DOPC. Cette section de projet est faite en collaboration avec le laboratoire de chimie organique médicinale de l'Université Laval dirigé par le Pr Jean-François Paquin pour l'obtention de l'acide myristique monofluoré à différentes positions. Marie-Claude Gagnon, étudiante qui a récemment obtenu un doctorat sous la supervision du Pr Jean-François Paquin et de la Pr Michèle Auger, a synthétisé et purifié les acides myristiques monofluorés. La spectroscopie IR sera utilisée pour étudier l'ordre des chaînes acyle et l'hydratation de la région interfaciale membranaire de la DOPC en présence et en absence de recoverine. Cette méthode spectroscopique sera aussi utilisée pour déterminer l'effet de la DOPC sur la structure secondaire et la stabilité thermique de la recoverine. La spectroscopie RMN à l'état solide en phosphore-31 sera utilisée pour déterminer l'effet de

la recoverine sur la forme et l'intégrité des VMLs et la diffusion latérale de la DOPC. De plus, la spectroscopie RMN du fluor-19 sera utilisée pour sonder la dynamique du groupement myristoylé de la recoverine à différentes positions en présence et en absence de Ca^{2+} et de la DOPC. Les deux techniques seront décrites au Chapitre 2. Les résultats de cet objectif seront présentés au Chapitre 6 sous forme d'un manuscrit soumis.

Chapitre 2

Approche expérimentale

2.1 Surexpression et purification de la recoverine

De façon générale, il est difficile d'obtenir une quantité importante d'une protéine d'intérêt en procédant à son extraction à partir de son tissu original, surtout en considérant les quantités nécessaires pour faire des mesures en spectroscopie IR et RMN. De plus, la recoverine, la protéine d'intérêt, n'est pas disponible commercialement. Ainsi, cette protéine a été surexprimée dans un système cellulaire hôte en utilisant un vecteur d'expression procaryote dans lequel l'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) recombinant de la recoverine a été introduit. Ensuite, il faut procéder à la purification de cette protéine. Ces deux étapes ont été préalablement optimisées au sein du laboratoire du Pr Salesse par d'anciens étudiants gradués. Ainsi, seulement un résumé de la procédure pour obtenir la protéine d'intérêt sera décrit. La méthodologie est basée sur des articles publiés précédemment.^{108, 245}

2.1.1 Surexpression de la recoverine

La surexpression commence par le clonage de l'acide désoxyribonucléique (ADN) codant pour la protéine d'intérêt, ce qui a été fait précédemment.²⁴⁵ La myristoylation étant une modification post-traductionnelle accomplie par une enzyme, il est nécessaire de co-transformer les cellules hôtes, non seulement avec l'ADNc de la recoverine, mais aussi avec celui de la NMT afin d'obtenir la Rec-Myr. La cellule hôte choisie était la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) (souche BL21 (DE3) pLysS). Le vecteur d'expression bactérien, un plasmide, était le pET-11a pour la recoverine. Ce dernier contient un promoteur T7lac (promoteur T7 et gène lacI) permettant de réduire l'activité basale de transcription de la cellule hôte avant l'induction. L'induction ou l'initiation de la réplication se fait avec l'isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). L'IPTG élimine la répression du gène lacI par sa neutralisation, ce qui permet la surexpression de la protéine d'intérêt par l'activation de l'ADN polymérase de *E. coli* et de l'acide ribonucléique (ARN) T7 polymérase. Le plasmide pET11a contient un gène de résistance à l'antibiotique ampicilline. Un deuxième plasmide, le pBB131, est utilisé pour effectuer la myristoylation lorsque nécessaire

(gracieusement offert par James B. Hurley, University of Washington, Seattle, WA). Ce plasmide inclut l'ADNc codant pour la NMT. Ce dernier contient un gène de résistance à la kanamycine. Ces plasmides sont ajoutés aux cellules compétentes bactériennes par un choc thermique, appelé « transformation ». Les antibiotiques permettent uniquement la survie des bactéries qui incluent les gènes de résistance spécifique, i.e. les bactéries qui surexpriment les protéines désirées. La Figure 2.1 illustre la procédure pour surexprimer des protéines recombinantes dans des bactéries hôtes. Une fois qu'une petite quantité de bactéries compétentes est obtenue, il suffit de les faire diviser pour en avoir une plus grande quantité en vue de la surexpression. Des bactéries compétentes transformées avec les vecteurs pET11a et pBB131 sont conservées dans du glycérol à -80 °C pour les cultures subséquentes afin d'utiliser la même colonie de bactéries compétentes d'une surexpression à l'autre. Ces étapes de transformation des bactéries pour les rendre compétentes à la surexpression de la recoverine et de la NMT étaient déjà effectuées avant mon arrivée au laboratoire.

Le milieu de culture bactérien utilisé est le Luria-Bertani (LB) (1 % bactotryptone, 0,5 % bactoleuvre et 1 % NaCl). L'ampicilline est ajoutée à une concentration de 100 µg/mL et, lorsque nécessaire, la kanamycine à 30 µg/mL, les deux proviennent de Sigma-Aldrich (Oakville, ON). La culture est effectuée à 37 °C et à une vitesse d'agitation de 250 rotations par minute. Une pré-culture est effectuée pendant la nuit précédant la journée de la culture dans l'optique d'obtenir rapidement une plus grande population bactérienne. Le volume de milieu de culture utilisé dépend de la quantité de protéines purifiées désirées. La pré-culture est ajoutée au volume de milieu LB contenant les antibiotiques nécessaires. La croissance de la population bactérienne est mesurée par un spectromètre ultraviolet (UV) -visible à 600 nm. Ainsi, lorsque l'absorbance à 600 nm (A_{600}) atteint 0,3, si nécessaire, la source de groupement myristoylé est ajoutée au milieu de culture à une concentration finale de 0,15 mM. Le myristate de sodium utilisé est solubilisé à chaud, soit à environ 50 °C. Le myristate de sodium (Myr-h₂₇) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) et l'acide myristique perdeutééré (Myr-d₂₇) (Laboratoire MAT, Québec, QC) sont disponibles commercialement. L'acide myristique monofluoré en position 4 ou 12 (Myr4F et Myr12F) est une gracieuseté du Groupe de recherche en chimie organique et médicinale de l'Université Laval dirigé par le Pr Jean-François Paquin. Ils ont été synthétisés par Marie-Claude Gagnon, qui a récemment obtenu un doctorat sous la supervision du Pr Jean-François Paquin et de la Pre Michèle Auger. L'acide myristique est déprotoné grâce au

NaOH jusqu'à un pH d'environ 12,5. La culture est poursuivie jusqu'à A_{600} de 0,5 où l'IPTG (Fisher Scientific) est ajouté à une concentration finale de 1 mM pour induire la surexpression de la recoverine. La culture est poursuivie pendant quatre heures. Finalement, les bactéries sont récupérées par centrifugation à 4 000 g à 4 °C pendant 30 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot peut ainsi être conservé à -20 °C.

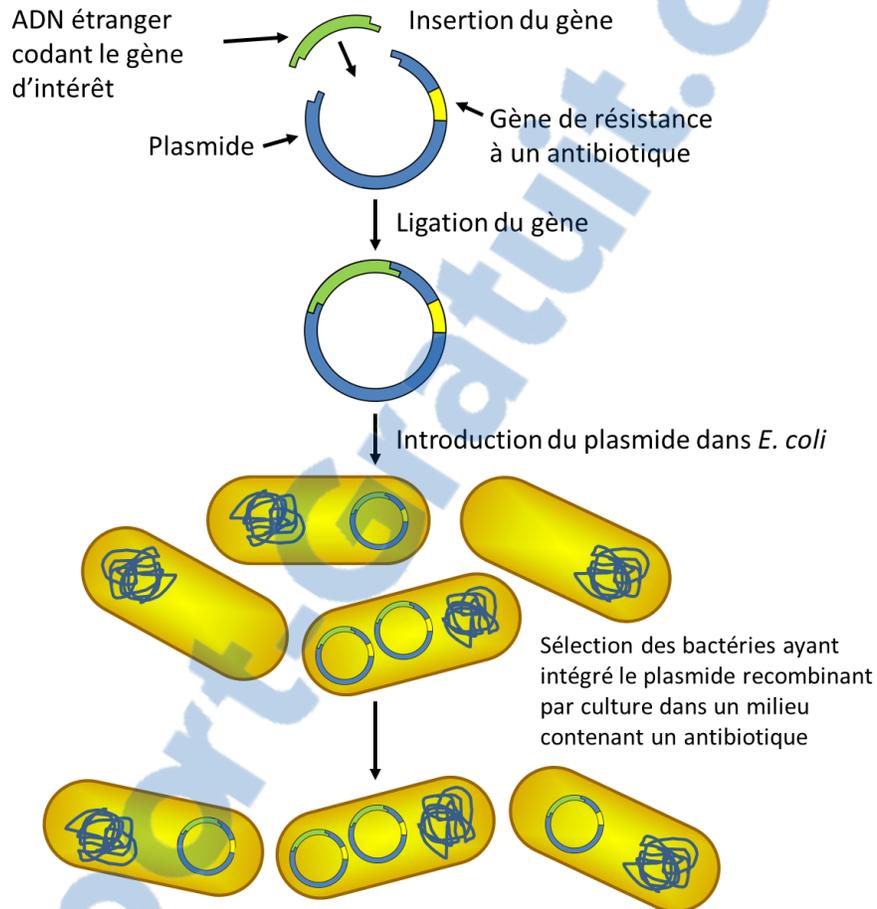


Figure 2.1 : Procédure de surexpression de protéines recombinantes dans des bactéries hôtes.

Figure reproduite du mémoire de Geneviève Valois-Paillard.²⁵³

2.1.2 Purification de la recoverine

La purification débute par la resuspension d'un culot bactérien avec un volume équivalent au dixième de son volume de culture. Le tampon de purification est composé de 1 mM CaCl_2 , 50 mM d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES), 100 mM NaCl et 5 mM β -mercaptoéthanol, pH 7,5, filtré à 0,22 μm . Au cours de ce doctorat, la concentration en CaCl_2 a été augmentée de 1 à 3 mM pour réduire la perte des protéines au cours des lavages. Le culot bactérien est bien solubilisé et homogénéisé au vortex et à la pipette automatique. Ensuite, avec des aliquots d'environ 8 mL, les bactéries sont lysées grâce à un cycle de sonication de 90 secondes (5 fois 5 secondes de sonication-repos, 1 fois 10 secondes de sonication-repos et 1 fois 20 secondes de sonication) sur glace. Cette étape libère les protéines solubles du cytosol bactérien. Ce lysat est centrifugé à 25 000 g à 4 °C pendant 30 minutes. Le surnageant contient les protéines solubles et le culot, les membranes cellulaires et les protéines non solubles. Le surnageant est déposé sur la colonne de purification d'environ 30 mL (phényl sépharose avec un faible degré de substitution de 20 μM de groupements phényl par mL de résine, GE Healthcare Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow (low sub) Label No 71-0390-00-EE, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suède) à un débit de 0,5 mL/min. Un volume supplémentaire de tampon de purification équivalent à celui de la colonne est ensuite passé dans la colonne. Toutes les fractions de lavage et d'élution sont conservées pour déterminer si la recoverine est bien retenue sur la colonne et qu'elle est éluée au bon moment. La recoverine est liée à la colonne par des interactions hydrophobes en raison de sa structure en présence de Ca^{2+} qui mène à l'exposition d'acides aminés hydrophobes en N-terminal (ainsi que son groupement myristoylé, le cas échéant, voir Figure 1.16B³⁹). La colonne est ensuite lavée avec un volume équivalent à dix fois celui de la colonne en utilisant le tampon de purification à un débit de 2 mL/min. Les protéines contaminantes devraient normalement être éluées à cette étape et il ne devrait rester que la recoverine liée à la résine. Finalement, la recoverine est éluée avec un tampon d'élution composé de 5 mM d'acide acétique éthylène-glycol-bis-(β -aminoéthyle éther) N, N'-tetra (EGTA), 5 mM HEPES, 100 mM NaCl et 5 mM β -mercaptoéthanol, pH 7,5, filtré à 0,22 μm à un débit de 1 mL/min. L'EGTA est un agent chélatant du Ca^{2+} . La recoverine change alors de conformation en absence de Ca^{2+} (Figure 1.16A)⁴⁰ où ses acides aminés hydrophobes en N-terminal (ainsi que son groupement myristoylé, le cas échéant) se retrouvent dans une poche hydrophobe en présence d'EGTA; la recoverine n'est donc plus retenue sur la

résine et est éluée de la colonne de purification. Le volume d'éluion varie selon la quantité de protéines adsorbées sur la colonne. Pour sélectionner les fractions contenant de la protéine, ces dernières sont testées avec le réactif de Bradford (*BioRad Protein Assay*, Bio-Rad, Mississauga, ON) où un changement de couleur de rouge-brun à bleu est observé en présence de protéines. La Rec-Myr est éluée de la colonne avant la Rec-nMyr. Comme la recoverine n'a pas un taux de myristoylation de 100 %, il faut fractionner son éluion en plusieurs volumes de 0,5 à 2 mL. Cette méthode permet de conserver seulement les fractions avec des taux de myristoylation au-dessus de 90 % pour les mettre en commun et obtenir un taux de myristoylation final près de 97 %. Ce fractionnement n'est pas nécessaire pour la Rec-nMyr.

2.1.2.1 Évaluation de la pureté de la recoverine par électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de potassium

La pureté de la protéine est analysée par l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de potassium (SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Le chauffage de l'échantillon en présence de laurylsulfate de potassium (LSK) mène à la dénaturation de la protéine. L'utilisation du détergent LSK chargé négativement permet d'éliminer l'effet des charges des protéines dans leur séparation par électrophorèse et de les analyser en fonction de leur taille. Les protéines migrent plus ou moins vite selon la grosseur des pores du gel de polyacrylamide. Les protéines plus grosses vont être plus retenues que les protéines plus petites pour une même grosseur de pores. La Figure 2.2 montre le résultat d'une purification typique au cours du chargement, du lavage et de l'éluion de la recoverine. Cette figure montre que la recoverine est en majorité retenue sur la colonne en présence de Ca^{2+} et éluée en absence de Ca^{2+} . La Figure 2.3 montre la pureté de la recoverine avec différentes quantités de protéine pour confirmer la masse moléculaire de la protéine purifiée et vérifier l'absence d'autres contaminants. La pureté de la protéine est ainsi estimée à au-dessus de 99 %. Le rendement de surexpression et purification est estimé à près de 40 mg par litre de culture pour la Rec-Myr et au-dessus de cela pour la Rec-nMyr. Ces rendements sont excellents.

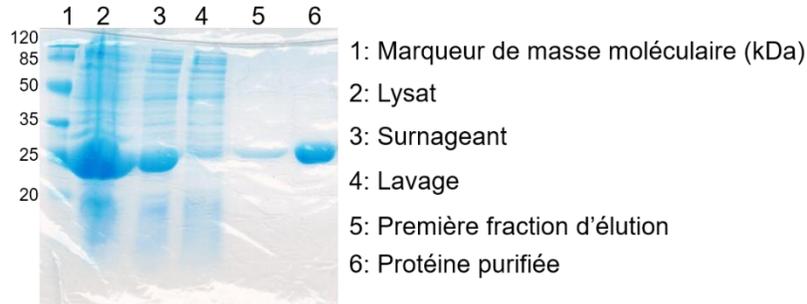


Figure 2.2 : Gel d'électrophorèse de quelques fractions de la purification de la recoverine.

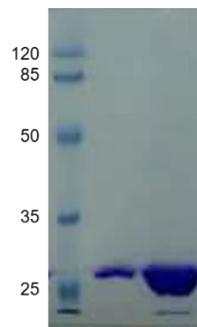


Figure 2.3 : Gel d'électrophorèse avec deux concentrations différentes de recoverine myristoylée pour évaluer sa pureté.

Le premier puits à gauche est le marqueur de masse moléculaire en kDa. Les deux puits suivants contiennent entre 1 et 20 μ L de protéine éluee.

2.1.2.2 Évaluation du taux de myristoylation de la recoverine par chromatographie liquide à haute pression

Comme mentionné précédemment, le taux de myristoylation est près de 97 %. Il est déterminé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC, *high-performance liquid chromatography*). L'appareil HPLC utilisé (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon) est équipé avec un dégazeur DGU-20A5, une pompe à gradient LC-20AD, un auto-échantillonneur SIL-20C HT, un chauffe colonne CTO-20AC et un détecteur à diode SPD-M20A. Une colonne en phase inverse de type Jupiter 5 μ m C4 300 Å (Phenomenex) a été utilisée à température ambiante (20-24 °C). Les solvants utilisés sont de l'eau nanopure et de l'acétonitrile (Fischer Scientific, Fair Lawn, New Jersey, États-Unis) à un débit de 1 mL/min. Il faut ajouter un faible pourcentage (0,1 à 2,5 %) d'un acide à la phase liquide

pour faciliter la chromatographie; le choix du type d'acide a été modifié au cours du doctorat. Au début du doctorat, l'acide utilisé était de l'acide trifluoroacétique (TFA, *trifluoroacetic acid*) (Laboratoire MAT, Québec, Qc) à 0,1 % et le gradient d'élution variait de 0 à 80 % d'acétonitrile pendant 90 minutes suivi d'un retour à 100 % d'eau pendant 5 minutes avant une nouvelle injection. Au cours du doctorat, le gradient et l'acide utilisés ont été changés pour être cohérents avec les mesures en spectrométrie de masse (*mass spectrometry*, MS). Ainsi, l'acide utilisé était de l'acide formique (Sigma-Aldrich, Allemagne) à 2,5 %. Le gradient d'élution commençait par un plateau de 3 minutes à 32 % d'acétonitrile, suivi d'un gradient de 32 à 55 % d'acétonitrile pendant 30 minutes et finalement un retour à 32 % d'acétonitrile pendant 4 minutes pour préparer la colonne à une nouvelle injection. Le changement d'acide résulte de la suppression d'ions par le TFA qui capte les charges positives (*ion-pairing*) au détriment des protéines présentes, et modifie la tension de surface lors de la formation de l'aérosol en ionisation à électrospray (*electrospray ionization*, ESI), ce qui rend le signal instable en MS.²⁵⁴ La concentration de l'acide a été changée pour maintenir le même pH. L'acide formique permet de résoudre ces problèmes de stabilité.^{255, 256} Le volume d'injection au début du doctorat était fixé à 40 µL et la concentration était changée au besoin. À la fin du doctorat, le volume d'injection et la concentration ont été modifiés afin de ne pas saturer la colonne. Le pourcentage d'acétonitrile permettant d'éluer la recoverine de la colonne était de ~45 %. La résolution des bandes des deux formes de recoverine (myristoylée et non myristoylée) était aussi bonne avec les deux approches en autant que la quantité de protéines utilisées ne dépassait pas 4 µg. Tous ces changements permettaient d'économiser des solvants et du temps et augmentaient donc la cadence analytique. Avec cette colonne hydrophobe, la Rec-nMyr est éluée avant la Rec-Myr. Au début du doctorat, la Rec-nMyr était éluée à ~51,5 minutes et la Rec-Myr à ~54 minutes. Avec le nouveau protocole en fin de doctorat, leur temps d'élution a été respectivement réduit à ~14 et ~17 minutes. La Figure 2.4 montre les chromatogrammes HPLC au début (A) et à la fin (B) du doctorat; ils permettent de comparer la séparation et les temps de rétention de chaque pic. Le pourcentage de myristoylation est calculé en faisant le ratio entre l'aire de la bande de la Rec-Myr et l'aire totale des deux formes de recoverine.

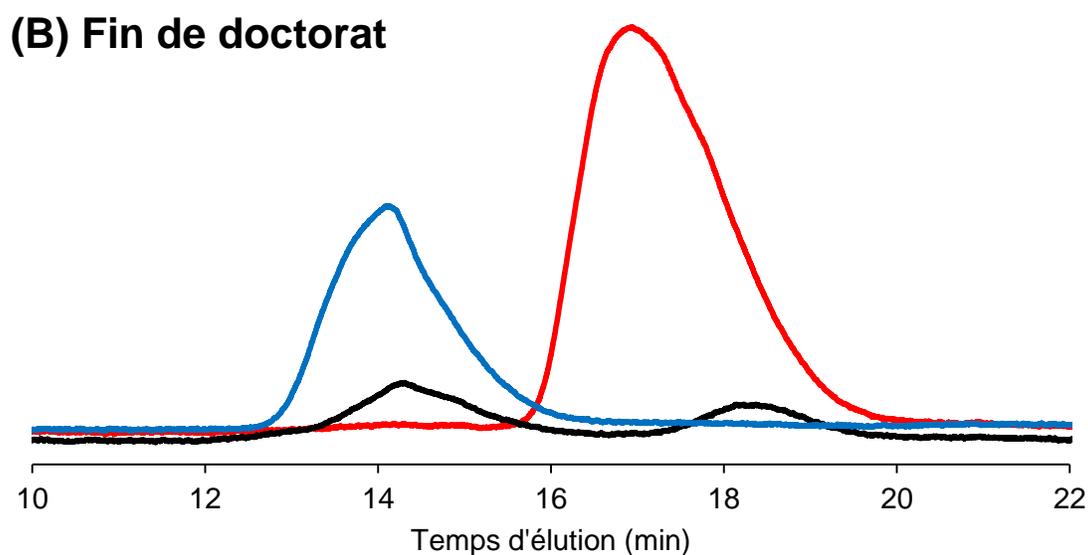
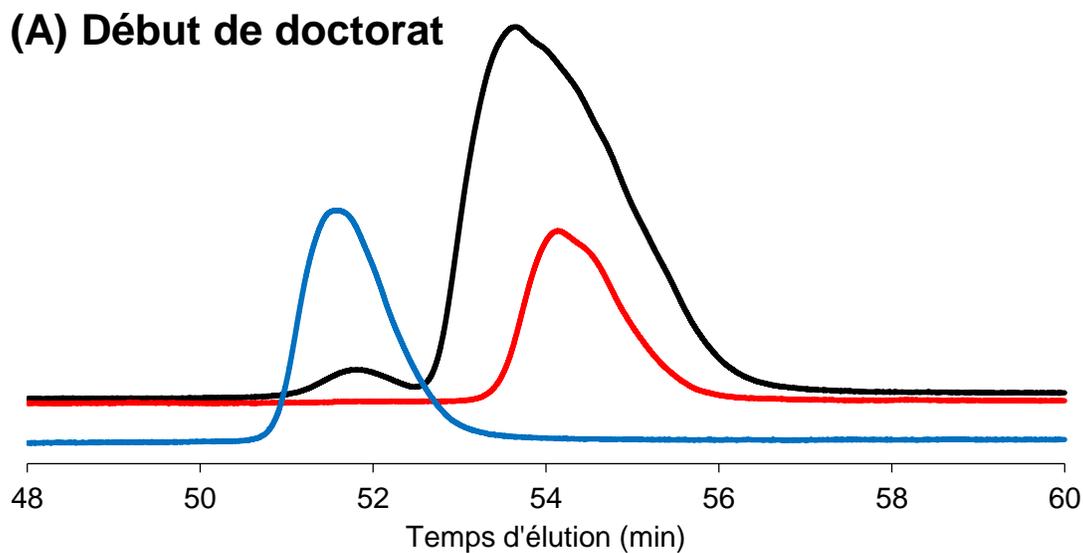


Figure 2.4 : Chromatogrammes liquides à haute pression de l'élution de la recoverine au (A) début et à la (B) fin du doctorat.

La recoverine myristoylée est en rouge, la recoverine non myristoylée est en bleu et le mélange des deux formes de la recoverine est en noir.

2.1.2.3 Dialyse et lyophilisation de la recoverine purifiée

Une fois, la recoverine obtenue avec une pureté et un taux de myristoylation élevés, il faut éliminer les sels utilisés au cours de la purification afin de connaître leur concentration

précise lors des analyses subséquentes. Pour ce faire, la recoverine doit être dialysée. Le volume de recoverine purifiée est souvent trop grand pour être dialysé directement. La recoverine est alors concentrée avant la dialyse à l'aide d'un filtre Amicon 10 kDa (Merck Millipore, Ireland) par centrifugation à 4 000 g et 4 °C. La dialyse est effectuée à une concentration approximative de 2 mg/mL de protéines. Les mêmes résultats ont été obtenus avec deux membranes à dialyse différentes, soit la *Spectra/Por molecularporous membrane tubing* (Spectrum Laboratories, Inc, Rancho Dominguez, Californie, États-Unis) ou la *SnakeSkin Dialysis Tubing 10K MWCO* (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, États-Unis). Les pores de ces membranes empêchent les composés de plus de 10 kDa de passer. Un volume minimalement 100 fois plus grand que celui de l'échantillon de protéine a été utilisé pour la dialyse. Le contenu de la solution de dialyse est modifié en fonction de la conformation de la protéine désirée pour les analyses subséquentes. La dialyse comportait quatre changements de solution aqueuse. Ainsi, pour obtenir un échantillon de recoverine en absence de Ca^{2+} , la première solution de dialyse était composée de 50 mM NH_4HCO_3 et 50 μM EGTA pour éliminer tout le Ca^{2+} résiduel, les trois autres solutions contenaient seulement 50 mM NH_4HCO_3 . Pour obtenir un échantillon de recoverine en présence de Ca^{2+} , les quatre solutions étaient composées de 50 mM NH_4HCO_3 et 50 μM CaCl_2 . Le changement de chaque solution est fait après 1,5-2 h de dialyse; le dernier changement a un volume de solution deux fois plus grand. Le NH_4HCO_3 est un sel qui permet de conserver la force ionique dans le milieu, mais il s'élimine lors de la lyophilisation.²⁵⁷ Ce dernier se transforme en H_2O , NH_3 et CO_2 qui sont soit sous forme gazeuse ou liquide et sont donc éliminés dans les conditions de la lyophilisation à basse pression et basse température. Les concentrations de NH_4HCO_3 sont basées sur un protocole décrit précédemment²²³ avec les ajustements proposés dans le mémoire de Geneviève Valois-Paillard.²⁵³ Au début du projet, des fractions contenant des quantités importantes de protéine ont été utilisées pour les études subséquentes en connaissant leur concentration. Ainsi, à la suite de la dialyse, la concentration de la protéine était calculée pour connaître le volume à prélever. À la fin du projet, la protéine était plutôt pesée, donc tout le volume de solution dialysée était lyophilisé en utilisant des fractions individuelles avec un volume maximum de 15 mL. La durée de la lyophilisation variait en fonction du volume. Ainsi, la lyophilisation des fractions de plus faible volume prenait une nuit, soit 12 à 18 h, tandis que celle des fractions d'un volume maximum de 15 mL pouvait prendre près de 90 h. Une fois lyophilisée, la protéine ne contenait aucun sel ou uniquement 5 μM CaCl_2 pour une concentration de protéines de 1 mM. La protéine avait

ainsi l'aspect d'une poudre solide ouateuse prête à usage pour les analyses subséquentes.

2.1.2.4 Détermination de la concentration en recoverine par spectroscopie ultraviolet-visible

La valeur du coefficient d'absorption molaire de la recoverine provenait de la littérature au début du doctorat et a ensuite été déterminée expérimentalement. Au début du doctorat, la valeur de $23\,950\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ²⁵⁸ était utilisée pour être cohérente avec l'étudiante à la maîtrise m'ayant précédée sur le projet.²⁵³ Le *Supplementary Information* du manuscrit du Chapitre 6 (Section 6.10) fait état des raisons justifiant la détermination expérimentale du coefficient d'absorption molaire de la recoverine et de la méthodologie utilisée pour l'obtenir.

2.1.2.5 Détermination de la masse moléculaire de la recoverine par spectrométrie de masse

La masse moléculaire de la recoverine est déterminée dans un premier temps approximativement par électrophorèse SDS-PAGE, ce qui permet aussi d'estimer la pureté de la purification. Pour avoir une idée plus précise de la masse moléculaire et s'assurer que la protéine est myristoylée, il faut utiliser la MS couplée avec un HPLC. Les conditions HPLC énoncées pour la détermination du taux de myristoylation ont été d'abord mises au point pour l'usage de la MS. Le spectromètre de masse utilisé était celui à temps de vol (*time of flight*, TOF) et avec une source ESI, soit le Agilent 6210 TOF LC/MS (Agilent, Mississauga, On). Le logiciel d'analyse des résultats était le *MassHunter* (Agilent, Mississauga, On). Le volume d'injection était $\sim 20\ \mu\text{L}$ et pouvait varier selon la concentration de l'échantillon. Un diviseur de volume devait être mis entre la colonne de HPLC et l'entrée du MS pour éviter une surcharge. Les masses moléculaires obtenues arrondies à l'unité sont de 23 202 et 23 278 Da pour la Rec-nMyr sans la Met initiale, 23 412 et 23 488 Da pour la Rec-Myr protonée et 23 430 et 23 506 Da pour les recoverines myristoylées monofluorées en position 4 ou 12 (Rec-Myr4F et Rec-Myr12F). La différence de 76 Da entre chaque type de protéine est la masse du β -mercaptoéthanol qui se lie à la recoverine par sa Cys. Les masses mesurées correspondent bien à celles attendues selon la séquence primaire de la recoverine et la présence ou l'absence d'un groupement myristoylé et d'un atome de fluor.

2.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La spectroscopie IR à transformée de Fourier (TF) est une technique basée sur l'étude des vibrations moléculaires.^{147, 259} Trois éléments caractérisent une bande associée à une vibration active sur un spectre, soit sa position, son intensité et sa largeur.^{147, 259} Les bandes se retrouveront entre une longueur d'onde (λ) de 2,5 et 25 μm (4000 à 400 cm^{-1} de nombre d'onde ($\bar{\nu}$), $\bar{\nu}=1/\lambda$), soit dans la portion du proche et moyen IR du spectre électromagnétique.^{259, 260} L'intensité se mesure soit en transmittance (T) ou en absorbance (A). Une portion de la radiation incidente (I_0) est absorbée par l'échantillon (I). La transmittance est le ratio I/I_0 et l'absorbance se calcule à partir de la transmittance selon $A=\log_{10} (1/T)$.^{259, 260} La largeur de la bande est reliée au mouvement des molécules. Deux principaux types de vibration existent, soit l'élongation (variation dans la longueur des liens) et la déformation angulaire (variation dans les angles des liens) qui se subdivisent en des mouvements symétriques et antisymétriques.²⁵⁹ Les déformations angulaires peuvent aussi se nommer cisaillement, rotation plane, balancement ou torsion. La Figure 2.5 illustre les mouvements de vibration possibles pour une molécule non-linéaire.

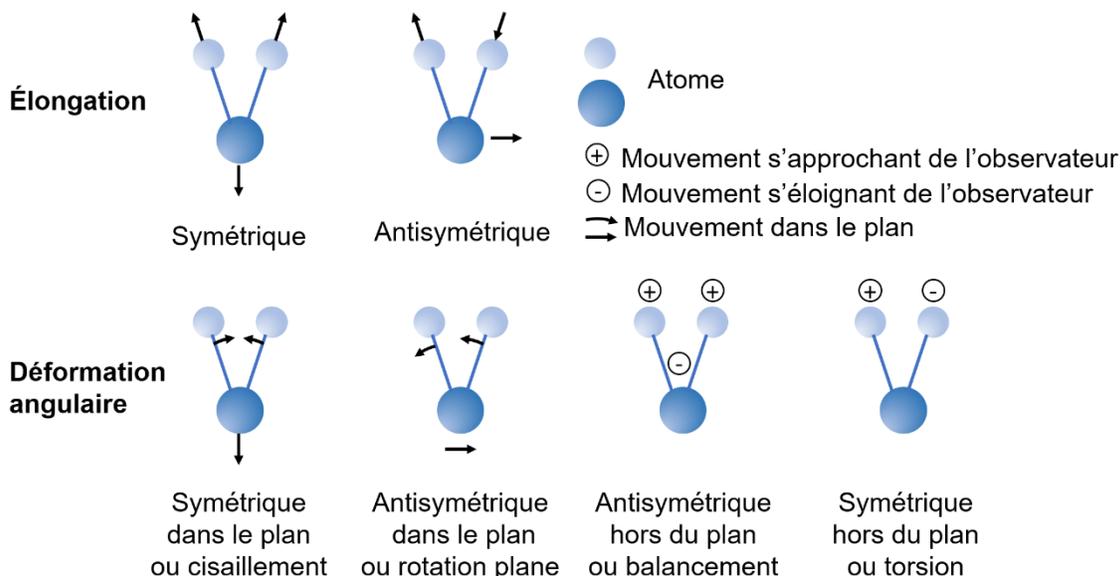


Figure 2.5 : Vibrations possibles dans une molécule non-linéaire.

Pour que la vibration soit active en spectroscopie IR, il faut que cette dernière induise un changement de moment dipolaire.²⁵⁹ La liaison entre deux atomes peut être traitée comme

un oscillateur harmonique simple similaire à deux masses avec un ressort. La loi de Hooke (Équation 2.1) est utile pour évaluer les fréquences d'élongation en mettant en relation la fréquence d'oscillation, les masses atomiques et la constance de force de la liaison.²⁵⁹

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \left[\frac{f}{\left(\frac{M_x \times M_y}{M_x + M_y} \right)} \right]^{1/2} \quad \text{Équation 2.1}$$

$\bar{\nu}$ = nombre d'onde (fréquence de vibration), cm^{-1}
 c = vitesse de la lumière, cm/s
 f = constante de force de la liaison, dyne/cm
 M_x et M_y = masse de l'atome x et y respectivement, g

Le dénominateur de la fraction de la racine carrée correspond à la masse réduite. Ceci démontre aussi l'effet d'un changement isotopique sur la fréquence de vibration en assumant que la constante de force de la liaison est la même. Ainsi, un isotope plus lourd va résulter en une diminution de la fréquence de vibration de la bande selon sa masse.

La spectroscopie IR permet d'étudier plusieurs états de la matière (solide, liquide, gazeux), avec de petites masses et volumes (0,1-1 mg, 10-50 μL) et avec de faibles concentrations 1-5 % en poids.^{260, 261} Ce type de spectroscopie permet de sonder l'échantillon entier, donc d'avoir accès à tous ses constituants.¹⁴⁷ Elle est aussi très utile dans les études des interactions protéines-lipides et peptides-lipides.^{261, 262}

2.2.1 Étude par spectroscopie infrarouge de systèmes biologiques

Les échantillons de cette étude sont principalement constitués de protéines et lipides en plus du solvant aqueux. Les constituants du mélange peuvent interagir entre eux et modifier la position, la largeur et l'intensité des bandes.^{261, 262} L'eau légère (H_2O) cause des problèmes d'interférence pour l'analyse de certaines des bandes d'intérêt exposées ci-dessous. Pour résoudre cette situation, l'eau lourde (D_2O) est utilisée.²⁶³⁻²⁶⁵ Ainsi, la bande de déformation -OH à $\sim 1645 \text{ cm}^{-1}$ se déplace à $\sim 1215 \text{ cm}^{-1}$ compte tenu du changement de masse réduite.^{264, 265}

2.2.1.1 Lipide

Tel que montré aux Figures 1.20 et 1.26 dans l'introduction, un lipide est composé de

plusieurs groupements fonctionnels pouvant produire un signal en spectroscopie IR sur un même spectre. Le Tableau 2.1 indique les différentes régions du lipide avec ses groupements fonctionnels et leur nombre d'onde respectif.

Tableau 2.1 : Nombres d'onde des bandes d'absorption associées aux différentes régions et groupements fonctionnels des phospholipides; ν_{as} et ν_s réfèrent aux vibrations d'élongations antisymétriques et symétriques, respectivement, et δ_s à une déformation symétrique.

Regroupé des références suivantes : 146, 249, 262, 266-268.

Régions	Groupements fonctionnels	Nombre d'onde (cm ⁻¹)
Tête polaire choline	ν_{as} (CH ₃) ₃ N ⁺	3050
Tête polaire sérine	ν_{as} (CO ₂)	1620-1626
Groupement phosphate	ν_{as} (PO ₂ ⁻)	1220-1250
	ν_s (PO ₂ ⁻)	1090
Région interfaciale	ν_s (C=O) ester	1727-1740
Région hydrophobe	ν (HC=CH)	3010
	ν_{as} (CH ₃)	2956
	ν_{as} (CH ₂)	2920
	ν_s (CH ₃)	2870
	ν_s (CH ₂)	2850
	δ_s	1300-1400

Trois bandes ont été étudiées plus en profondeur dans le cadre de ce projet, soit la bande d'élongation symétrique des CH₂ [ν_s (CH₂)] associée à la région hydrophobe de la bicouche lipidique, la bande d'élongation symétrique des carbonyles (C=O) [ν_s (C=O)] associée à la région interfaciale et la bande d'élongation antisymétrique des phosphates (PO₂⁻) [ν_{as} (PO₂⁻)] associée à la tête polaire. Ces dernières seront exposées plus en détails dans les sous-sections suivantes.

2.2.1.1.1 Vibration d'élongation symétrique du groupement CH₂^{146, 266}

Les vibrations d'élongations symétriques et antisymétriques des groupements CH₂ ou CH₃ des phospholipides sont illustrées à la Figure 2.6.

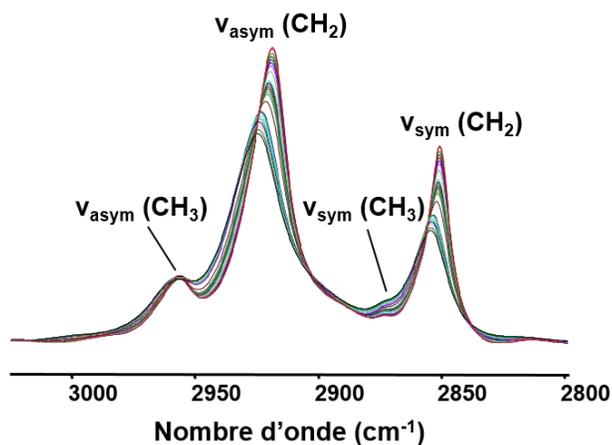


Figure 2.6 : Région spectrale associée aux modes d'élongation antisymétriques et symétriques des phospholipides.

Figure reproduite de la thèse de Matthieu Fillion.¹⁹⁵

La bande choisie dans le cadre de nos études est l'élongation symétrique des CH₂ [$v_s(\text{CH}_2)$] située à 2850 cm⁻¹. Cette bande comporte moins d'interférence avec d'autres composantes du mélange telles que les chaînes latérales des protéines.¹⁴⁷ De façon générale, les lipides sont plus ordonnés en phase gel et plus désordonnés en phase fluide. Le changement de phase a lieu avec l'introduction de conformères *gauche* parmi les chaînes en conformation *anti*, tel qu'illustré à la Figure 2.7.

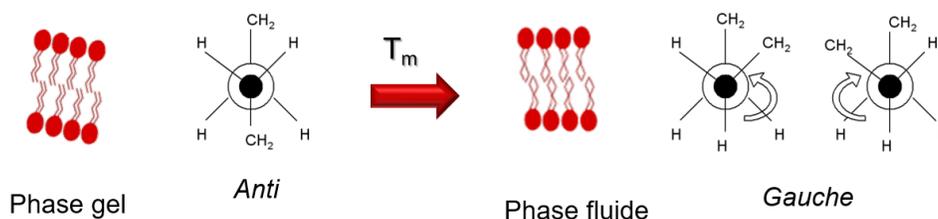


Figure 2.7 : Illustration d'une membrane lipidique en phase gel et en phase fluide avec les projections de Newman illustrant un conformère *anti* et deux types de conformères *gauche*.

La position de la $v_s(\text{CH}_2)$ se déplace de 2-3 cm⁻¹ vers les plus hauts nombres d'onde et la largeur de la bande s'accroît avec l'introduction de conformères *gauche* lors du passage de l'état gel à l'état fluide de la bicouche lipidique à la T_m .^{269, 270} La transition d'une phase à

une autre peut être suivie en reportant la fréquence de la bande en fonction de la température telle qu'illustrée à la Figure 2.8. Cette fréquence est reliée à l'ordre du système lipidique.^{146, 271} L'ajout de certains composés au mélange lipidique peut faire varier l'ordre (voir par exemple^{249, 265, 268}). De plus, l'étude du thermotropisme des lipides dans l'eau lourde peut faire légèrement augmenter la T_m de 0,2 à 0,4 °C des lipides.¹⁴⁶

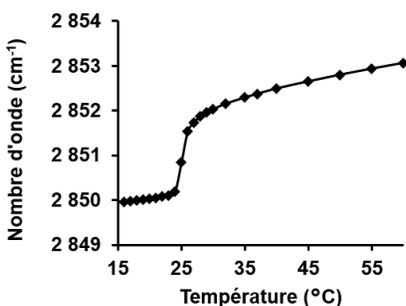


Figure 2.8 : Exemple d'une courbe de thermotropisme de la bande d'élongation symétrique des CH₂ pour la dimyristoylphosphatidylcholine ayant une température de transition de phase visible aux alentours de 25 °C et correspondant au point d'inflexion de la courbe.

Figure reproduite de la thèse de Matthieu Fillion.¹⁹⁵

2.2.1.1.2 Vibration d'élongation symétrique du groupement carbonyle^{146, 261, 267, 272}

La région interfaciale des lipides comprend le groupement glycérol qui lie les chaînes acyle (acide gras) de la région hydrophobe avec la tête polaire de la région hydrophile. La liaison d'un acide gras sur le glycérol mène à la formation d'un lien ester. Le groupement carbonyle absorbe en spectroscopie IR avec une bande centrée à 1735 cm⁻¹. Des expériences antérieures de la littérature avec les isotopes 13 et 12 de l'atome de carbone (¹³C et ¹²C) en positions *sn*-1 et *sn*-2 des chaînes acyle des lipides ont démontré que les deux composantes de la bande carbonyle ne viennent pas de la présence de deux groupements carbonyle par phospholipide, mais de l'hydratation du groupement par des liaisons/ponts hydrogène.^{267, 272} Ainsi, la composante à haut nombre d'onde, soit près de 1740 cm⁻¹ est celle pour les carbonyles libres, soit quand le système est plutôt déshydraté. La composante à faible nombre d'onde, soit près de 1727 cm⁻¹, est celle pour les carbonyles liés ou formant des ponts hydrogène, soit quand le système est hydraté.^{266, 273} Les deux composantes sont plus facilement visibles lorsqu'il y a déconvolution de la bande²⁷⁴⁻²⁷⁶ tel qu'illustré à la Figure 2.9. Le thermotropisme des lipides est aussi visible



sur cette bande des lipides en spectroscopie IR. Cependant, il y a une baisse rapide de la valeur de nombre d'onde de la position de la bande à la T_m comparativement à la hausse pour la $\nu_s(\text{CH}_2)$. La Figure 2.9 illustre les deux composantes de la bande carbonyle selon l'état physique du lipide et l'impact de la température sur la position de la bande.

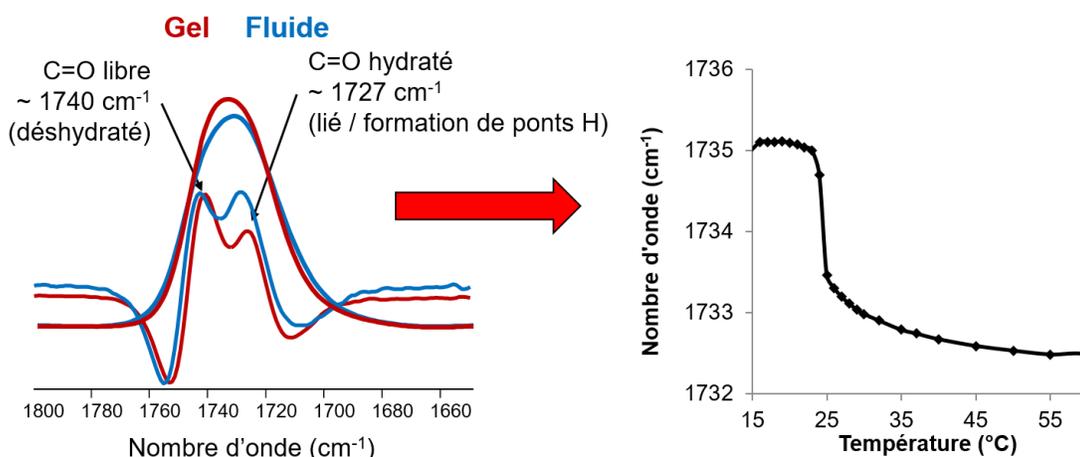


Figure 2.9 : Région spectrale associée au mode d'élongation symétrique du carbonyle de même que la valeur de nombre d'onde attribuée à chacune des composantes libre et hydratée de la bande en phase gel et fluide et exemple d'une courbe de thermotropisme de cette bande pour la dimyristoylphosphatidylcholine ayant une température de transition de phase visible aux alentours de 25 °C et correspondant au point d'inflexion de la courbe.

2.2.1.1.3 Vibration d'élongation du groupement phosphate

La région des bandes du groupement PO_2^- informe sur l'hydratation et la liaison du groupement phosphate avec des cations. La bande d'élongation symétrique des phosphates [$\nu_s(\text{PO}_2^-)$] se situe à 1091 cm^{-1} et celle antisymétrique [$\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$] à 1214 cm^{-1} . De plus, deux bandes d'élongations C-O-P du phosphodiester se présentent à 1068 cm^{-1} et un épaulement à 1046 cm^{-1} .^{247, 277, 278} Ces bandes doivent être étudiées dans le H_2O pour ne pas être masquées par une bande de déformation du D_2O telles qu'illustrées avec le Tableau 2.1 et la Section 2.2.1. De plus, la même région d'intérêt correspond aussi à celle des cisaillements des CH_2 (1380 à 1150 cm^{-1}) qui sont toujours présents dans les phospholipides.²⁷⁷

Les cisaillements sont plus présents sous la T_m et proviennent des chaînes acyle

ordonnées en conformation *anti*.²⁷⁷ La bande de $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ augmente de valeur de nombre d'onde pour les lipides pouvant former un réseau de liaisons hydrogène tels que les PG ou PE.²⁴⁷ Ainsi, la $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ pour un lipide sec va être à 1240-1250 cm^{-1} et à 1220-1225 cm^{-1} pour un lipide hydraté.^{247, 273} Cependant, pour les PG, la bande large de $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ passe de 1205 cm^{-1} en phase gel à 1215 cm^{-1} en phase fluide, suggérant un environnement plus polaire et/ou des liaisons hydrogène plus fortes que celles d'autres systèmes lipidiques communs.²⁷⁹ De plus, les bandes de $\nu_s(\text{PO}_2^-)$ larges à 1090 et 1068 cm^{-1} se dégènèrent en six bandes étroites et caractéristiques à 1122, 1105, 1080, 1060, 1035 et 985 cm^{-1} par la liaison du Ca^{2+} , tel que vu pour la PS et le PG.²⁴⁷

2.2.1.2 Protéine

Les protéines possèdent différents groupements chimiques actifs en spectroscopie IR. Mon projet s'est penché principalement sur deux régions des protéines, soit la liaison peptidique ou lien amide présent entre deux résidus et certains groupements sur les chaînes latérales des acides aminés. Le type d'information pouvant être soutiré des bandes associées à ces régions des protéines sera brièvement exposé ci-dessous.

2.2.1.2.1 Vibration du groupement amide

La liaison amide possède neuf modes de vibration nommés A, B et I à VII, selon l'ordre décroissant de la fréquence.^{62, 262} Tous absorbent à différentes fréquences dans le spectre IR. La bande amide I est toutefois d'un plus grand intérêt pour la structure des protéines.²⁶⁵ Elle se situe entre ~1610 et 1690 cm^{-1} et est composée à ~80 % de l'élongation symétrique du groupement carbonyle, ~10 % de la déformation du lien N-H et ~10 % de l'élongation antisymétrique C-N (Figure 2.10).^{62, 263} Cette composition rend la bande amide I sensible au changement d'angles dièdres variant selon les structures secondaires (Figure 2.10).⁶² Ainsi, chaque structure secondaire correspond à une fréquence distincte (Figure 2.10 et Tableau 2.2).^{62, 263, 265} La force des liens hydrogène affecte cette bande.²⁶⁰

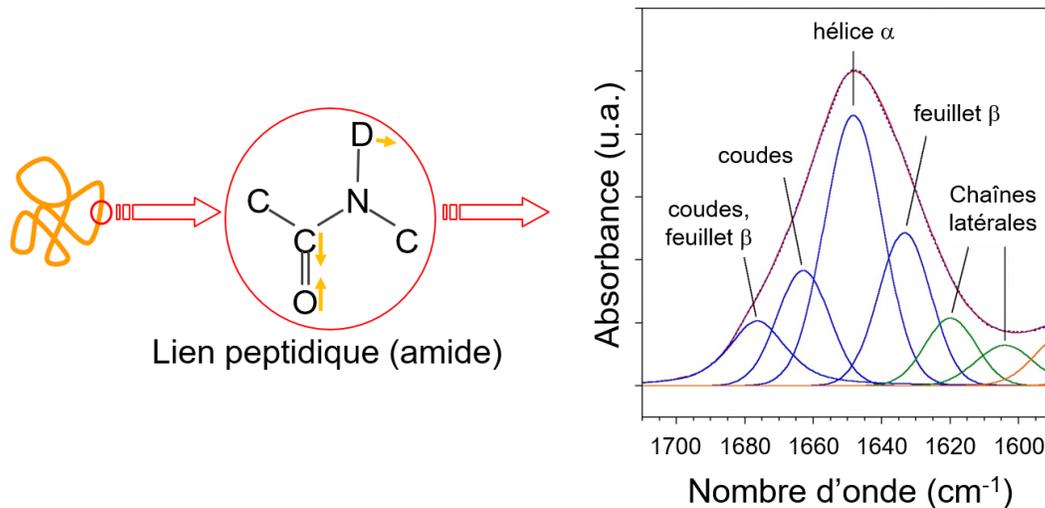


Figure 2.10 : Bande amide I : structures impliquées au niveau de la protéine et spectre infrarouge de la région amide I' avec sa décomposition en plusieurs composantes.

Tableau 2.2 : Intervalles de nombre d'onde de la bande amide I (H₂O) et I' (D₂O) associées à chacun des éléments de structure secondaire.^{265, 280}

Conformation	Mode	Solution H ₂ O (cm ⁻¹)	Solution D ₂ O (cm ⁻¹)
Hélice α	$\nu(0)_\alpha$	1658-1650	1655-1646
Feuillets β antiparallèles	$\nu(\pi,0)_A$	1638-1632	1636-1630
	$\nu(0,\pi)_A$	1695-1675	1680-1670
Feuillets β parallèles	$\nu(\pi,0)_P$	1630	1632
	$\nu(0,\pi)_P$	1645	1648
Feuillets β intermoléculaires	$\nu(\mu)$	1625-1615	1625-1615
Coude	$\nu(\mu)$	1685-1655	1675-1650
Structure désordonnée	$\nu(\mu)$	1660-1652	1648-1640

L'utilisation d'eau légère (H₂O) cause principalement un problème dans l'analyse de cette bande parce que la bande de déformation O-H est plus intense que la bande amide I.^{280, 281} Pour résoudre ce problème, la bande amide I est en général étudiée dans l'eau lourde (D₂O) et ainsi se fait renommer amide I'.²⁸¹ Les protons labiles de la protéine sont échangés pour des atomes de deutérium avec l'utilisation de D₂O. Ceci résulte en un

déplacement de la bande amide I vers les plus bas nombres d'onde comme le changement de N-H pour N-D augmente la masse réduite.²⁸¹ Ce changement de solvant permet aussi de mieux discriminer les structures d'hélice α par rapport aux structures désordonnées.²⁸¹ Le Tableau 2.2 montre les changements de fréquences reliées aux différentes structures variant selon l'usage de H₂O ou D₂O.

Chacune des structures secondaires différentes comprend une composante dans la bande amide I finale (Figure 2.10).^{62, 282} Ainsi, la bande amide I' est souvent large. La décomposition de cette bande en ses différentes composantes permet de quantifier chacune d'elle et de comparer les différentes structures de protéines entre elles.^{62, 282} En règle générale, chaque structure secondaire génère une contribution à l'exception du feuillet β . Deux brins β contenant deux groupements carbonyles sur chaque brin β forment une maille.²⁸³ À l'intérieur d'un brin, il peut y avoir deux modes normaux de vibration en considérant que l'élongation des carbonyles peut être en phase (0, π) ou déphasé (π , 0).²⁸³ De plus, les deux brins peuvent vibrer de manière synchrone ou asynchrone.²⁸³ Ainsi, il y a un total de quatre modes normaux de vibration. Cependant, le signal des feuilletts β parallèles se dégenère seulement en deux bandes étant donné que les modes normaux de vibration inter-brin ne font pas de variation du moment dipolaire; ils sont donc inactifs en spectroscopie IR.²⁸³ De plus, le signal des feuilletts β antiparallèles se dégenère en trois bandes compte tenu que le mode normal de vibration en phase et synchrone ne résulte pas en une variation du moment dipolaire.^{263, 283} Finalement, il est à noter que dans le cas de la recoverine, la bande de l'hélice α est située à 1647-1648 cm⁻¹,²⁴² alors que les bandes des feuilletts β antiparallèles intermoléculaires, résultant de l'agrégation, sont localisées à 1615 et 1684 cm⁻¹.²⁶⁵

2.2.1.2.2 Vibration d'élongation antisymétrique du groupement carboxylate

La bande d'élongation antisymétrique du groupement carboxylate [$\nu_{as}(\text{COO}^-)$] possède un maximum entre 1560 et 1570 cm⁻¹ pour les acides aminés d'intérêt.²⁸⁴ Compte tenu de sa position, son analyse se fait dans le D₂O. L'utilisation du D₂O permet aussi de faire déplacer la bande amide II qui se situe dans la même zone de fréquence.²⁸⁵ Les chaînes latérales de Asp et Glu contribuent à cette bande avec des nombres d'onde respectivement à 1558 et 1585 cm⁻¹.^{284, 286} Un doublet dû à deux tautomères protonnés de l'histidine (His) est présent à 1575 et 1569 cm⁻¹, soit dans la même région que les carboxylates de Asp et Glu.²⁸⁴ L'intensité des bandes est toutefois relative à la

concentration et/ou au nombre de groupements pouvant absorber.²⁸⁶ Les groupements carboxylates sont sensibles à la liaison de cations divalents.²⁸⁷ La liaison du Ca^{2+} change la longueur et l'angle des liens C=O (C-O) selon la chélation par un ou deux des liens C=O (C-O).^{284, 287} La baisse de fréquence de 1565 cm^{-1} à $1555\text{-}1540\text{ cm}^{-1}$ de la $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ est communément observée pour la liaison du Ca^{2+} par un motif *EF-hand*.²⁸⁵ Rappelons que ce sont les fonctions carboxyliques des Glu et Asp, ainsi que les chaînes latérales des acides aminés de la boucle des motifs *EF-hand*, qui lient le Ca^{2+} . La vibration des carboxylates est aussi affectée par son environnement et spécialement par la formation de ponts hydrogène avec l'eau.²⁸⁴

2.3 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à l'état solide

2.3.1 Concepts fondamentaux

2.3.1.1 Moment angulaire de spin et aimantation nucléaire^{259, 288}

La spectroscopie RMN est l'absorption de radiation électromagnétique dans les fréquences des ondes radio pour certains noyaux d'une molécule dans un champ magnétique. Les noyaux chargés tournent autour de l'axe nucléaire et créent un dipôle magnétique, $\vec{\mu}$. Le nombre quantique de spin (I) décrit le moment angulaire (\vec{I}) de ces noyaux chargés en rotation. Les noyaux ayant une masse atomique impaire ont une valeur de I de demi-entier, ceux avec une masse atomique paire et un nombre atomique impair ont un I entier et ceux avec une masse atomique et un nombre atomique pairs ont un I égal à 0 et ne sont pas actifs en spectroscopie RMN. Le moment angulaire (\vec{I}) ne peut prendre que les valeurs permises par l'Équation 2.2.

$$\vec{I} = \hbar\sqrt{I(I+1)} \quad \text{Équation 2.2}$$

\vec{I} = moment angulaire
 I = nombre quantique de spin
 \hbar = constante de Planck réduite

\vec{I} se décrit par le module au carré de son vecteur et la valeur d'une de ces trois composantes dans un plan cartésien (\vec{I}_x , \vec{I}_y ou \vec{I}_z). Par convention, le champ magnétique est aligné sur l'axe z positif et c'est cette composante qui sera utilisée pour décrire \vec{I} . En

termes de mécanique quantique, le nombre d'orientations par rapport à l'axe z que peut prendre le vecteur moment magnétique, $\vec{\mu}$, dans un champ magnétique externe uniforme est déterminé par I et dépend de la formule $2I + 1$. La projection de la composante z de \vec{I} est utilisée et se mesure par l'Équation 2.3 (Figure 2.11).

$$\vec{I}_z = m\hbar \quad \text{Équation 2.3}$$

$\vec{I}_z =$ projection du moment angulaire sur l'axe z
 $m =$ nombre quantique magnétique possédant $2I + 1$ valeurs possibles

Ainsi, un spin de $\frac{1}{2}$ a 2 orientations possibles avec $m = \pm 1/2$ alors qu'un spin de 1 a 3 orientations possibles avec $m = 0$ et ± 1 . Chaque dipôle magnétique généré a une grandeur intrinsèque propre qui s'exprime en $\vec{\mu}$. La charge se distribue de manière sphérique et uniformément pour les I de $\frac{1}{2}$ et de manière non sphérique pour les I égaux ou supérieurs à 1. Le moment quadrupolaire électrique décrit cette asymétrie et sera expliqué dans les Sections 2.3.2.4 et 2.4.2. Le rapport gyromagnétique relie de manière proportionnelle \vec{I} et $\vec{\mu}$. L'Équation 2.4 donne la relation vectorielle.

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \quad \text{Équation 2.4}$$

$\vec{\mu} =$ vecteur moment magnétique
 $\gamma =$ rapport gyromagnétique
 $\vec{I} =$ vecteur moment angulaire de spin

L'Équation 2.5 donne la projection de $\vec{\mu}$ le long de l'axe z et est illustrée à la Figure 2.11.

$$\vec{\mu}_z = \gamma \vec{I}_z = \gamma m \hbar \quad \text{Équation 2.5}$$

$\vec{\mu}_z =$ projection du moment magnétique sur l'axe z
 $\vec{I}_z =$ projection du moment de spin angulaire sur l'axe z

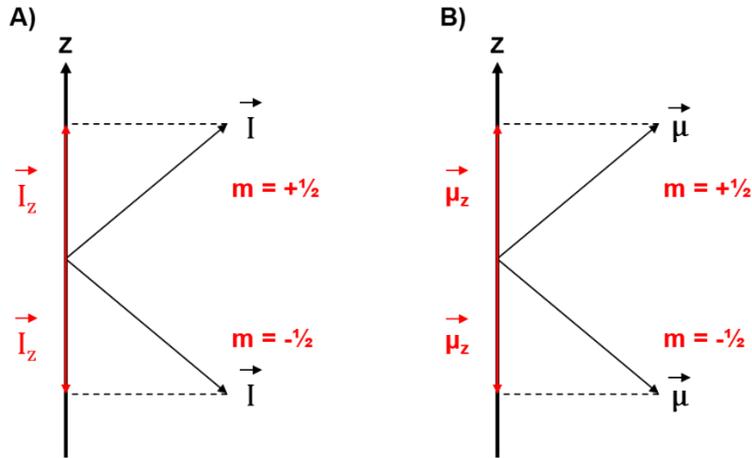


Figure 2.11 : Représentation de la projection sur l'axe z pour un noyau de spin $\frac{1}{2}$ A) du vecteur moment angulaire \vec{I} et B) du vecteur moment magnétique $\vec{\mu}$.

Figure reproduite de la thèse de Matthieu Fillion.¹⁹⁵

2.3.1.2 Effet du champ magnétique et de la fréquence de Larmor^{259, 288, 289}

Sans champ magnétique externe B_0 , tous les spins ont la même énergie. À l'opposé, dans un champ magnétique externe B_0 , il y a une levée de dégénérescence et l'Équation 2.6 donne l'énergie associée à chaque état de spin.

$$E = -\mu_z B_0 = -\gamma m \hbar B_0 \quad \text{Équation 2.6}$$

$E =$ énergie entre niveau de spin
 $-\mu_z =$ composante orientée selon l'axe z du moment magnétique m
 $B_0 =$ champ magnétique externe

L'application de l'Équation 2.6 montre que le niveau d'énergie le plus faible est celui avec le m positif. Chaque orientation est associée à un niveau d'énergie possible. Le niveau de plus faible énergie est toujours légèrement plus peuplé. Seules les transitions où $\Delta m = \pm 1$ sont permises en spectroscopie RMN. Selon cette règle de sélection, l'énergie de la radiation électromagnétique doit correspondre à la différence d'énergie entre deux niveaux d'énergie (ΔE) tel que montré à l'Équation 2.7.

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 \quad \text{Équation 2.7}$$

La différence d'énergie entre deux niveaux de transition pour un spin $\frac{1}{2}$ augmente de manière proportionnelle à la force du champ magnétique B_0 (Figure 2.12). La différence d'énergie entre les niveaux d'énergie peut aussi être égale à celle des quanta d'énergie (Équation 2.8). La fréquence de la radiation électromagnétique en fonction du champ magnétique B_0 est obtenue lorsque l'Équation 2.8 est réarrangée (Équation 2.9). L'Équation 2.9 représente l'équation fondamentale en spectroscopie RMN comme elle relie le rapport gyromagnétique et le champ magnétique à une fréquence.

$$\Delta E = h\nu_0 \quad \text{Équation 2.8}$$

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad \text{Équation 2.9}$$

$\Delta E =$ différence d'énergie entre deux niveaux d'énergie
 $h =$ constante de Planck
 $\nu_0 =$ fréquence de la radiation électromagnétique, fréquence de précession, Hz

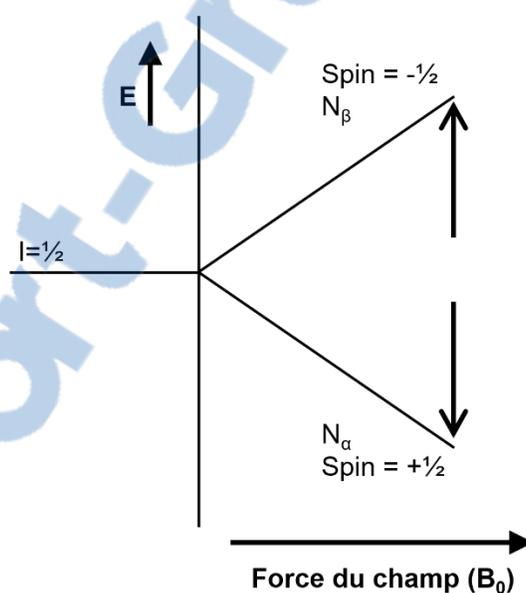


Figure 2.12 : Représentation de la transition énergétique pour un noyau de spin $\frac{1}{2}$ placé dans un champ magnétique stationnaire B_0 .

L'énergie de la transition correspond à la différence d'énergie entre le niveau supérieur, qui est associé à l'état de spin $m = -\frac{1}{2}$, et le niveau inférieur, qui est associé à l'état de spin $m = +\frac{1}{2}$. N représente la population du niveau d'énergie.

La présence d'un champ magnétique externe B_0 sur des noyaux ayant un moment magnétique provoque un mouvement de rotation décrivant la forme d'un cône autour de l'axe du champ magnétique du moment magnétique (Figure 2.13). Ce mouvement se nomme plus précisément précession.

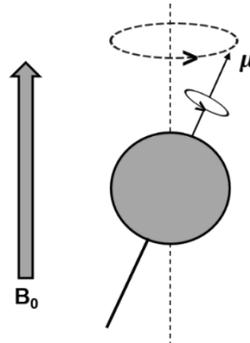


Figure 2.13 : Représentation dans le modèle classique d'un noyau en précession dans un champ magnétique stationnaire B_0 .

Figure reproduite de la thèse de Matthieu Fillion.¹⁹⁵

La précession est définie par une fréquence (angulaire) nommée « de résonance » ou « de Larmor », abrégée par ω_0 , qui correspond ici au produit du rapport gyromagnétique et de l'intensité du champ magnétique B_0 (Équation 2.10).

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad \text{Équation 2.10}$$

$\omega_0 =$ fréquence angulaire de Larmor ou de résonance, rad/sec

En égalant les Équations 2.9 et 2.10, la relation entre les fréquences de précession (« de résonance » ou « de Larmor ») en Hz (s^{-1}) et en rad/s pour la différence d'énergie entre les niveaux d'énergie est exposée (Équation 2.11).

$$\omega_0 = 2\pi\nu_0 \quad \text{Équation 2.11}$$

Le spin I , la fréquence de Larmor ν_0 et le rapport gyromagnétique γ sont des caractéristiques spécifiques à chaque noyau. Ces propriétés magnétiques pour les noyaux étudiés dans le cadre de ce projet de doctorat sont exposées au Tableau 2.3. Le proton est décrit dans le Tableau 2.3 puisqu'il est le noyau ayant le plus grand rapport

gyromagnétique et servant souvent de référence. L'abondance naturelle et la sensibilité relative au proton de chaque noyau sont aussi mentionnées dans le Tableau 2.3.

Tableau 2.3 : Principales propriétés magnétiques des noyaux à l'étude pour cette thèse dans un champ magnétique de 9,4 Tesla.²⁹⁰

Noyau	Spin I	Rapport gyromagnétique γ ($10^7 \text{ rad}\cdot\text{T}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	Fréquence de Larmor (MHz)	Abondance naturelle (%)	Sensibilité relative au proton (%)
¹ H	1/2	26,75	400,0	99,9885	100
² H	1	4,11	61,4	0,0115	$1,11 \times 10^{-4}$
³¹ P	1/2	10,84	161,9	100	6,65
¹⁹ F	1/2	25,18	376,4	100	83,4

L'état de spin ayant l'énergie la plus faible dépend autant du nombre quantique magnétique que du rapport gyromagnétique. La distribution de Boltzmann décrit la différence de population entre deux niveaux énergétiques (Équation 2.12).

$$\frac{N_{\beta}}{N_{\alpha}} = e^{\left(\frac{-\Delta E}{k_B T}\right)} \quad \text{Équation 2.12}$$

N_{α} et N_{β} = population de l'état de spin α et β respectivement
 ΔE = différence d'énergie entre les deux niveaux d'énergie
 k_B = constante de Boltzmann
 T = température du système

Le niveau de plus faible énergie est légèrement plus peuplé. Pour les rapports gyromagnétiques positifs et de nombre quantique magnétique positif donnant le niveau de plus faible énergie, l'aimantation résiduelle (M_0) s'aligne sur l'axe du champ magnétique z positif (Figure 2.14). L'aimantation résiduelle vient de la différence de population entre les niveaux d'énergie et de la variation de l'état de spin entre les niveaux d'énergie (Figure 2.14). Cette aimantation ne varie que lors d'une perturbation.

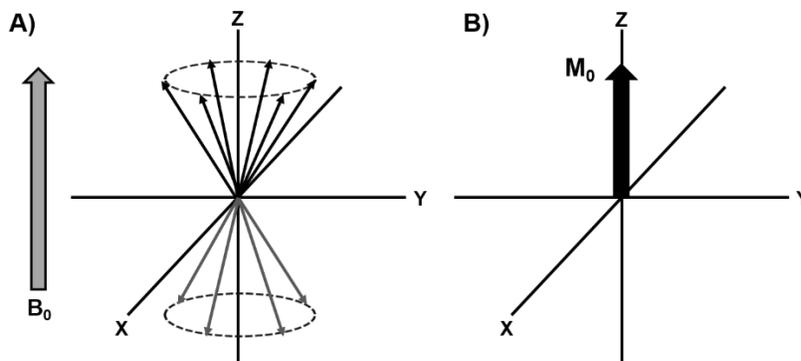


Figure 2.14 : Ensemble de noyaux en précession en A) et aimantation macroscopique résultante (M_0) alignée dans la même direction que le champ magnétique stationnaire B_0 en B).

Figure reproduite de la thèse de Matthieu Fillion.¹⁹⁵

2.3.1.3 Impulsion de radiofréquence et relaxation^{259, 288, 291-293}

En spectroscopie RMN, une perturbation utile est l'application d'une radiofréquence pour créer un nouveau champ électromagnétique perpendiculaire, B_1 . Pour qu'il y ait basculement de l'aimantation sur l'axe x (M_1), la fréquence doit correspondre à la fréquence de précession. La radiofréquence est appliquée sous forme d'une impulsion de courte durée (μs) par une bobine émettrice sur l'axe x et réceptrice sur l'axe y . La durée de l'impulsion fait varier l'angle résultant de l'aimantation M_1 . L'application de B_1 égalise les populations entre les différents niveaux d'énergie. L'arrêt de B_1 permet le retour de l'aimantation sur l'axe z . Le signal perçu sur l'axe y décroît graduellement en fonction du temps et est appelé signal de précession libre (FID, *Free Induction Decay*). La TF est utilisée pour passer du domaine temps au domaine fréquence. Le retour de l'aimantation sur z passe simultanément par la relaxation longitudinale et la relaxation transversale. Un temps caractéristique est relié à chaque mécanisme. Ces deux types de relaxation ont pour but de ramener le système à l'état d'équilibre par des interactions magnétiques et des mouvements moléculaires.

La relaxation longitudinale ou spin-réseau fait appel au retour à l'état d'équilibre de l'aimantation sur l'axe z par le transfert de l'énergie du noyau excité aux noyaux près de lui et à son environnement (Équation 2.13). Son temps ou constante T_1 est relié au temps nécessaire pour que l'aimantation sur l'axe z , M_z , atteigne 63 % de sa valeur initiale. La relaxation transversale ou spin-spin fait appel au déphasage des spins dans le plan xy

entraînant une réduction du signal mesuré (Équation 2.14). Son temps ou constante T_2 est relié au temps nécessaire pour que M_1 du plan xy perde 37 % de sa valeur suite à l'impulsion. De plus, le champ magnétique comporte des inhomogénéités induisant une perte additionnelle de cohérence des spins dans le plan xy . Ces deux mécanismes de relaxation ont un profil exponentiel qui est croissant pour la relaxation longitudinale (Équation 2.13) et décroissant pour celle qui est transversale (Équation 2.14).

$$\mathbf{M}_z(t) = \mathbf{M}_z(0) \left[1 - 2 \cdot e^{\left(\frac{-t}{T_1}\right)} \right] \quad \text{Équation 2.13}$$

$$\mathbf{M}_{xy}(t) = \mathbf{M}_{xy}(0) \left[e^{\left(\frac{-t}{T_2}\right)} \right] \quad \text{Équation 2.14}$$

$M_z(t) =$	aimantation longitudinale à un temps donné sur l'axe z
$M_z(0) =$	aimantation résiduelle à l'équilibre sur l'axe z
$t =$	temps
$T_1 =$	temps de relaxation longitudinal
$M_{xy}(t) =$	aimantation transversale à un temps donné dans le plan xy
$M_{xy}(0) =$	aimantation transversale à la suite de l'impulsion de 90° dans le plan xy
$T_2 =$	temps de relaxation transversal

2.3.2 Interactions de spins nucléaires en spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à l'état solide^{288, 294, 295}

L'équation de Schrödinger indépendante du temps décrit l'énergie (E) du système de spins par un Hamiltonien (\hat{H}) (Équation 2.15).

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad \text{Équation 2.15}$$

$\hat{H} =$	Hamiltonien
$\Psi =$	fonction d'onde décrivant le système de spins
$E =$	énergie du système de spins

L'Hamiltonien du système de spins de l'Équation 2.15 se divise entre les interactions de spin nucléaire internes et externes tel que décrit dans l'Équation 2.16 pour l'Hamiltonien total du système de spin \hat{H}_{sys} .

$$\hat{H}_{sys} = \hat{H}_Z + \hat{H}_{RF} + \hat{H}_{CS} + \hat{H}_J + \hat{H}_D + \hat{H}_Q \quad \text{Équation 2.16}$$

$\hat{H}_{sys} =$	Hamiltonien total du système de spin
$\hat{H}_Z =$	Hamiltonien associé aux interactions externes de Zeeman
$\hat{H}_{RF} =$	Hamiltonien associé aux interactions externes de radiofréquence

\hat{H}_{CS} =	Hamiltonien associé aux interactions internes de déplacement chimique
\hat{H}_J =	Hamiltonien associé aux interactions internes de couplage scalaire
\hat{H}_D =	Hamiltonien associé aux interactions internes de couplage dipolaire
\hat{H}_Q =	Hamiltonien associé aux interactions internes de couplage quadrupolaire

2.3.2.1 Interaction de Zeeman

\hat{H}_Z représente l'interaction de Zeeman qui est la plus importante et très faiblement perturbée par les autres noyaux. Cette interaction définit l'interaction d'un spin nucléaire (moment magnétique) avec le champ magnétique et résulte en la levée de dégénérescence des niveaux d'énergie. La sensibilité sera meilleure plus les niveaux d'énergie seront éloignés compte tenu de l'effet de l'intensité de B_0 sur la différence d'énergie des niveaux.

2.3.2.2 Interaction de déplacement chimique

\hat{H}_{CS} représente la dépendance du déplacement chimique avec le champ magnétique. Le champ magnétique perçu par les noyaux d'un système ne correspond pas réellement au B_0 . Chaque noyau du système crée de petits champs magnétiques locaux (B') qui influencent les noyaux voisins, et ce, par le mouvement de leurs électrons. La différence de champ magnétique ressentie par un noyau est proportionnelle à celle du champ B_0 et informe sur le blindage ou l'écrantage (Équation 2.17).

$$\mathbf{B}_{\text{eff}} = \mathbf{B}_0 - \mathbf{B}' = \mathbf{B}_0(1 - \sigma) \quad \text{Équation 2.17}$$

B_{eff} =	champ magnétique effectif
B' =	champ magnétique produit par le nuage électronique des noyaux voisins
σ =	constante de blindage ou d'écrantage

Ainsi, la fréquence de résonance, déterminée par la relation fondamentale de la spectroscopie RMN (Équation 2.9), pour chaque noyau va être légèrement plus faible selon le champ magnétique réel qu'il perçoit (Équation 2.18)

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0(1-\sigma)}{2\pi} \quad \text{Équation 2.18}$$

En spectroscopie RMN en solution, les molécules ont des mouvements rapides, ce qui moyennent dans l'espace l'écrantage électronique et il en résulte ainsi des raies de

déplacement chimique isotrope. Cependant en spectroscopie RMN à l'état solide, les mouvements sont plus lents et l'écrantage électronique montre une dépendance à l'orientation nommée anisotropie de déplacement chimique (ADC ou CSA, *chemical shift anisotropy*). Ce dernier concept va être plus approfondi dans la section sur la spectroscopie RMN du phosphore-31 à la Section 2.4.1.

2.3.2.3 Interaction de couplage scalaire

\hat{H}_J est l'interaction de couplage scalaire qui fait référence aux interactions homonucléaire et hétéronucléaire à travers les liaisons chimiques d'une même molécule. L'interaction nucléaire spin-spin est transmise à travers le nuage électronique joignant les deux spins nucléaires. Cette interaction crée un éclatement de la raie en plusieurs pics compte tenu de la multiplication du nombre de niveaux d'énergie. Le couplage scalaire est indépendant de la grandeur du champ magnétique. Le couplage scalaire diminue plus que le nombre de liens augmente entre les spins.

2.3.2.4 Interaction de couplage dipolaire

\hat{H}_D est l'interaction dipolaire faisant référence aux interactions homonucléaire et hétéronucléaire à travers l'espace. \hat{H}_D hétéronucléaire est décrit par l'Équation 2.19.

$$\hat{H}_D(ij) = \frac{\gamma_i \gamma_j \hbar^2}{r^3} (3 \cos^2 \theta - 1) I_z \cdot J_z \quad \text{Équation 2.19}$$

γ_i et γ_j = rapports gyromagnétiques des noyaux i et j, respectivement,
 r = distance séparant les noyaux i et j
 θ = angle entre le vecteur internucléaire et le champ magnétique externe B_0
 I_z et J_z = opérateurs de spin nucléaire des noyaux i et j, respectivement

Ainsi, chaque noyau « magnétique » induit un champ magnétique local sur son voisin spatial. L'équation 2.19 montre aussi une dépendance orientationnelle par rapport au champ magnétique B_0 . Le couplage dipolaire est ainsi anisotrope. De plus, le r^3 au dénominateur indique que la valeur du champ magnétique induit, B_{ind} , est très sensible à la distance entre les deux noyaux.

2.3.2.5 Interaction quadrupolaire^{296, 297}

\hat{H}_Q est l'interaction quadrupolaire qui n'est présente que pour les noyaux de spin égal ou

supérieur à 1 qui sont dit quadrupolaires. Ces noyaux possèdent un moment quadrupolaire électrique eQ provenant de la répartition non sphérique de la charge nucléaire et électronique. Ainsi, il y aura une interaction entre les noyaux quadrupolaires et les gradients de champ électrique (EFG, *electric field gradient*) présents dans leur environnement qui est représentée par la constante de couplage quadrupolaire, A_q (Équation 2.20).

$$A_q = \frac{e^2qQ}{h} \quad \text{Équation 2.20}$$

A_q = constante de couplage quadrupolaire
 e = charge élémentaire
 $e \cdot q$ = expression habituelle pour la valeur principale du tenseur de gradient de champ électrique dépendante de la structure de la liaison
 Q = moment quadrupolaire

La valeur d' A_q est d'environ 167 kHz pour un groupement aliphatique C-D.^{296, 298} L'interaction quadrupolaire, lorsque présente, est plus importante que les autres interactions possibles; ainsi, elle dominera le spectre.²⁸⁸ Certains points supplémentaires plus spécifiques à ce projet sur l'interaction quadrupolaire seront abordés dans la Section 2.4.2 sur la spectroscopie RMN du deutérium.

2.4 Étude en spectroscopie de résonance magnétique nucléaire de systèmes biologiques

Les systèmes biologiques comportent plusieurs noyaux actifs en spectroscopie RMN. Dans le cadre de cette thèse, trois noyaux ont été étudiés. L'atome de phosphore-31 est utilisé pour l'étude de l'intégrité membranaire et la diffusion latérale des lipides. Les atomes de deutérium et fluor sont utilisés pour l'étude de l'immobilisation du groupement myristoylé de la recoverine. Ces noyaux avec leurs interactions d'intérêt seront exposés dans les trois sections suivantes (Sections 2.4.1, 2.4.2 et 2.4.3) avec les quatre séquences d'impulsions utilisées (Sections 2.4.1.1, 2.4.1.2, 2.4.2.1 et 2.4.3.1).

2.4.1 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à l'état solide du phosphore-31²⁹⁹⁻³⁰¹

L'atome de phosphore-31 possède un spin de $\frac{1}{2}$ et est donc actif en spectroscopie RMN. La tête polaire de chaque phospholipide possède un atome de phosphore (Figure 1.20).

L'abondance naturelle du phosphore-31 est de 100 %. Ainsi, aucun marquage isotopique n'est nécessaire pour l'étude de ce noyau. Les principales interactions pour ce noyau à l'état solide, autre que celle de Zeeman, sont les couplages hétéronucléaires entre le proton et les atomes de phosphore, homonucléaires entre les atomes de phosphore et l'ADC. Le couplage homonucléaire est beaucoup plus faible que celui hétéronucléaire, le couplage homonucléaire peut donc être négligé. Quant à lui, le couplage hétéronucléaire entre les protons et les atomes de phosphore est éliminé par l'irradiation à haute puissance des protons, appelée découplage. Ainsi, la principale interaction présente dans les spectres de phosphore-31 à l'état solide est l'ADC et cette dernière explique la largeur des spectres obtenus.

L'ADC montre la dépendance orientationnelle de l'écrantage. Elle peut être représentée par un tenseur avec trois éléments ayant chacun un déplacement chimique distinct. La Figure 2.15 illustre les axes du tenseur avec une structure schématique pour l'atome de phosphore de la tête polaire d'un lipide en (A) définissant la forme d'un spectre dit « spectre de poudre » pour des cristaux de lipides secs en (B). L'élément du tenseur σ_{11} a la plus grande valeur de déplacement chimique.

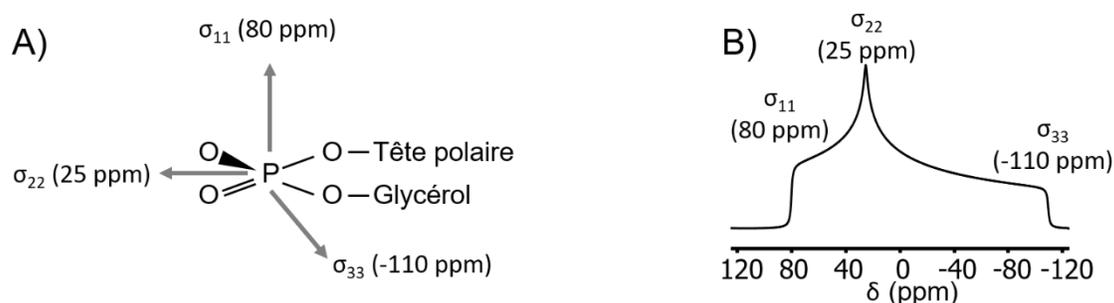


Figure 2.15 : Principaux axes du tenseur d'anisotropie de déplacement chimique pour l'atome de phosphore des lipides sur une structure schématique (A) et sur un spectre de poudre en résonance magnétique nucléaire à l'état solide en phosphore-31 (B).

Les valeurs de déplacement chimique associées aux principaux éléments σ_{11} , σ_{22} et σ_{33} sont celles pour un groupement phosphodiester statique.

L'hydratation des lipides résulte en la formation de structures lipidiques organisées permettant des mouvements rotationnels à symétrie axiale. Ces mouvements réduisent la largeur du spectre. Si l'axe de rotation du lipide est parallèle à σ_{11} , cet élément est

renommé σ_{\parallel} (Équation 2.21), et les deux autres éléments du tenseur d'anisotropie sont moyennés en un seul, σ_{\perp} (Équation 2.22) (Figure 2.16B).

$$\sigma_{\parallel} = \sigma_{11} \quad \text{Équation 2.21}$$

$$\sigma_{\perp} = \frac{(\sigma_{22} + \sigma_{33})}{2} \quad \text{Équation 2.22}$$

σ_{ii} = composante du tenseur d'anisotropie pour un axe distinct ayant comme valeur de i 1, 2 ou 3
 σ_{\parallel} = composante du tenseur d'anisotropie parallèle à l'axe de rotation du lipide
 σ_{\perp} = composante du tenseur d'anisotropie perpendiculaire à l'axe de rotation du lipide

Le passage de la phase gel à fluide augmente la dynamique par l'ajout de mouvements d'oscillation et réduit la différence de déplacement chimique entre l'élément du tenseur parallèle, σ'_{\parallel} , et perpendiculaire, σ'_{\perp} (Figure 2.16C). La largeur des spectres est ainsi une indication de la phase des lipides et/ou leur dynamique. Le déplacement chimique isotrope du tenseur, σ_{iso} , tel que mesuré en spectroscopie RMN en solution, est la moyenne des trois composantes du tenseur d'ADC (Équation 2.23) (Figure 2.16D). Le déplacement chimique isotrope est aussi celui adopté par de petites structures lipidiques qui tournent rapidement telles que des micelles.

$$\sigma_{\text{iso}} = \left(\frac{\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33}}{3} \right) = \frac{(\sigma_{\parallel} + 2\sigma_{\perp})}{3} \quad \text{Équation 2.23}$$

σ_{iso} = composante isotrope du tenseur

Un lipide n'ayant qu'une orientation ne présentera qu'une seule raie au déplacement chimique relié à son orientation (exemple pour un lipide uniquement orienté parallèlement au champ magnétique à la Figure 2.16E). Différents spectres typiques obtenus selon les mouvements impliqués dans différentes phases lipidiques sont résumés à la Figure 2.16.

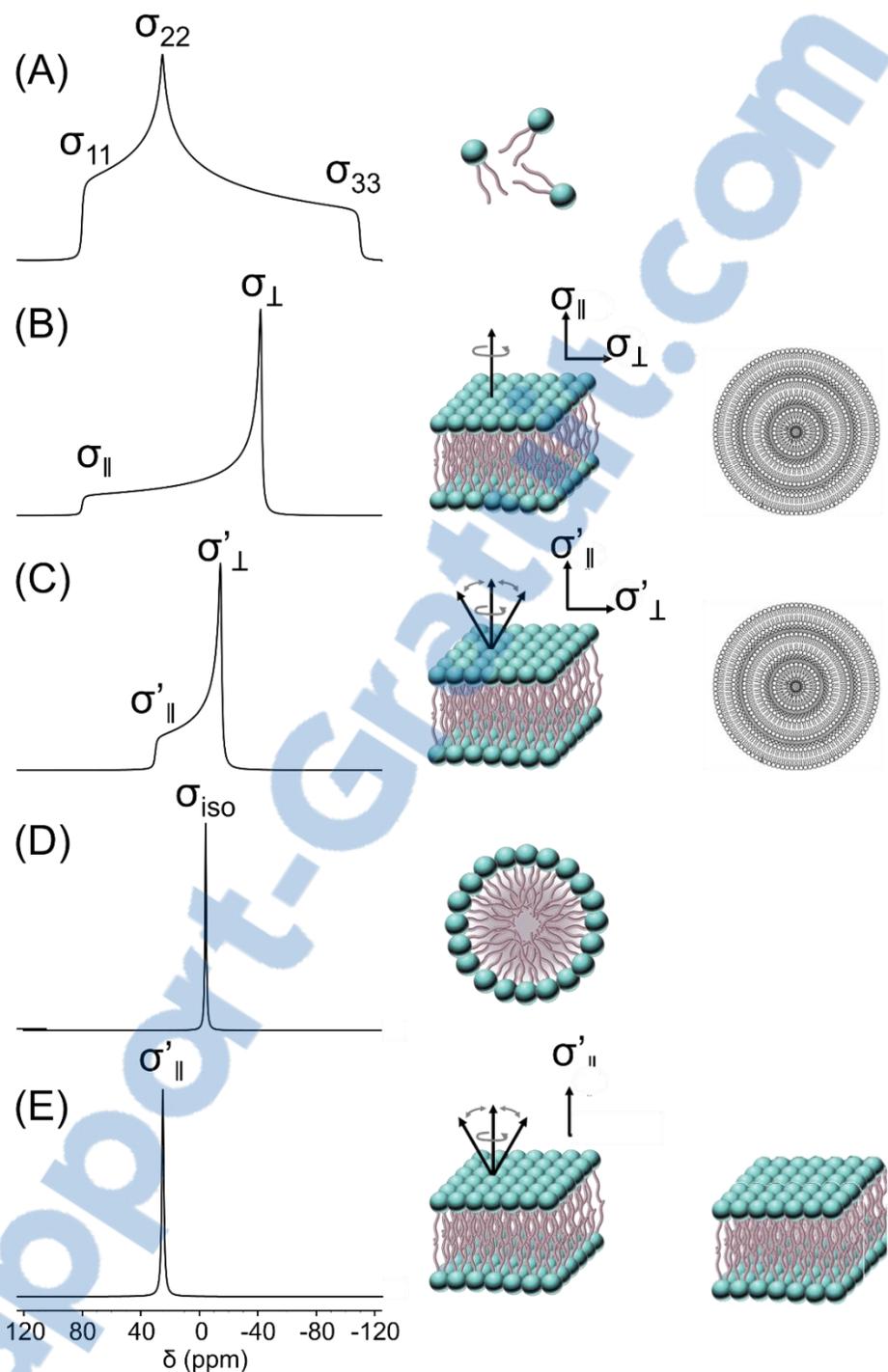


Figure 2.16 : Spectres en résonance magnétique nucléaire à l'état solide en phosphore-31 de phospholipides sous forme de (A) poudre, (B) vésicules multilamellaires hydratées en phase gel, (C) vésicules multilamellaires hydratées en phase fluide, (D) micelles et (E) orientés uniquement parallèlement au champ magnétique.

L'ensemble des mouvements d'un système à symétrie axiale peut être quantifié par la valeur de l'anisotropie, $\Delta\sigma$, qui est calculée par l'Équation 2.24 et illustrée à la Figure 2.17.

$$\Delta\sigma = \sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp} = \frac{3(\sigma_{\parallel} - \sigma_{\text{iso}})}{2} \quad \text{Équation 2.24}$$

$\Delta\sigma =$ anisotropie

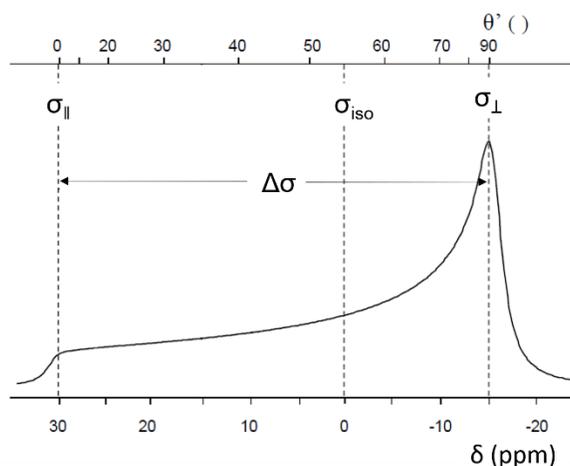


Figure 2.17 : Dépendance entre le déplacement chimique δ et l'angle θ d'un lipide dans une vésicule multilamellaire par rapport à B_0 sur un spectre en résonance magnétique nucléaire à l'état solide en phosphore-31, ainsi que l'illustration de la valeur de l'anisotropie ($\Delta\sigma$) et des composantes du tenseur d'anisotropie parallèle (σ_{\parallel}) et perpendiculaire (σ_{\perp}) au champ magnétique.

Figure modifiée du mémoire de Geneviève Valois-Paillard.²⁵³

La Figure 2.17 montre aussi que le déplacement chimique dépend de l'orientation de la molécule dans le champ magnétique B_0 , ou ADC, et l'Équation 2.25 le montre mathématiquement.

$$\Delta\nu(\theta) = \frac{2\Delta\sigma}{3} \left(\frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right) \quad \text{Équation 2.25}$$

$\Delta\nu(\theta) =$ fréquence réduite en ppm
 $\theta =$ angle entre l'axe principal du phospholipide et le champ magnétique B_0

La forme globale d'un spectre est due à la superposition de la multitude d'orientations présentes dans les lipides causant chacune une fréquence différente. Ainsi, l'intensité du spectre à un déplacement chimique spécifique est proportionnelle à la population de lipides à une orientation donnée (Figure 2.18).

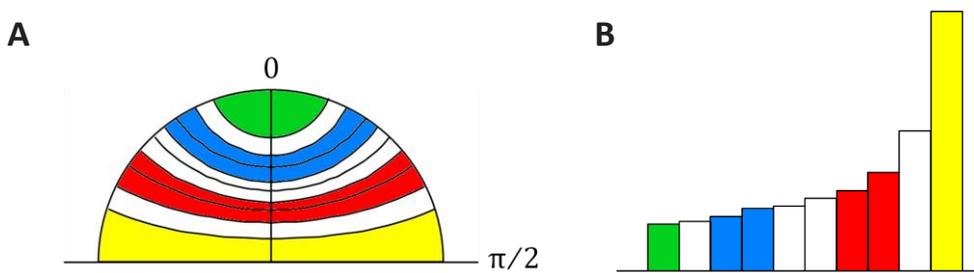


Figure 2.18 : Impact de la distribution des lipides dans une vésicule multilamellaire (A) sur l'intensité des signaux relativement à un spectre en résonance magnétique nucléaire à l'état solide en phosphore-31 (B).

Adaptation de Jelinski et Melchior.²⁹⁵

De plus, l'enveloppe spectrale informe aussi sur la forme et déformabilité des VMLs dans le champ magnétique (Figure 2.19). La forme d'une VML peut se définir par un ratio ellipsoïde (dimension du grand axe de l'ellipsoïde divisée par celle du petit axe de l'ellipsoïde) (Figure 2.19). Ce dernier est égal à 1 pour une sphère (voir l'exemple d'intensité du spectre avec un ratio de 1 à la Figure 2.19). Plus ce ratio est faible, plus l'élément du tenseur parallèle sera intense comparativement à l'élément du tenseur perpendiculaire (voir l'exemple avec un ratio de 0,8 à la Figure 2.19). À l'opposé, plus le ratio est élevé, moins l'élément du tenseur parallèle sera intense comparativement à l'élément du tenseur perpendiculaire (voir l'exemple avec un ratio de 1,3 à la Figure 2.19). La déformabilité des VMLs dans un champ magnétique est principalement due à la susceptibilité magnétique des lipides,³⁰²⁻³⁰⁴ une caractéristique intrinsèque à chaque lipide, et, de moindre impact, aux interactions entre les composantes formant la VML (lipide, sel, protéine, hydratation, etc).³⁰²⁻³⁰⁵ La susceptibilité magnétique χ est une caractéristique anisotrope de manière analogue au déplacement chimique (il faut remplacer σ par χ dans l'Équation 2.24 pour le calcul de l'anisotropie de la susceptibilité magnétique $\Delta\chi$). Ainsi, quand $\Delta\chi$ est positif, les molécules s'alignent parallèlement au champ magnétique et quand $\Delta\chi$ est négatif, les molécules s'alignent perpendiculairement au champ magnétique. Les chaînes acyle des lipides ont une $\Delta\chi$ négative et le groupement carbonyle, qui est perpendiculaire aux chaînes acyle, a une $\Delta\chi$ positive. Donc, de manière générale, les lipides ont tendance à s'orienter perpendiculairement dans un champ magnétique. Ainsi, les VMLs vont s'allonger parallèlement au champ magnétique et les ratios ellipsoïdes des VMLs sont plus élevés.

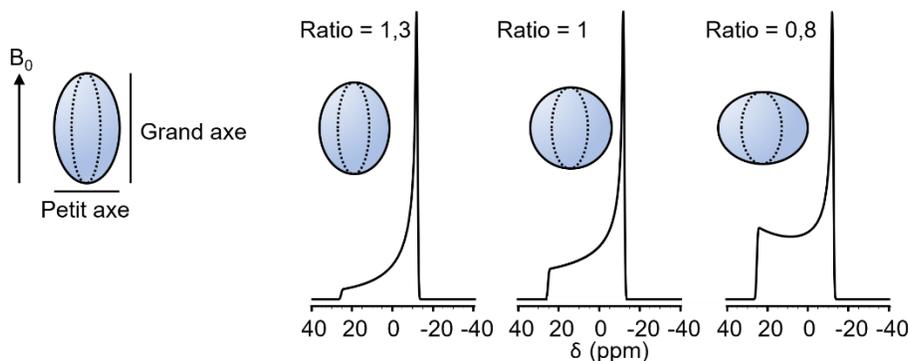


Figure 2.19 : Effet de la déformabilité des vésicules multilamellaires dans le champ magnétique B_0 sur la forme des spectres en résonance magnétique nucléaire à l'état solide en phosphore-31.

L'utilisation de la rotation à l'angle magique (*magic-angle spinning*, abrégé dans les deux langues en MAS) élimine les contributions liées à l'anisotropie du système présent dans l'ADC et le couplage dipolaire (Sections 2.3.2.2 et 2.3.2.4).³⁰⁶ La MAS permet ainsi un gain important en résolution et en rapport signal-sur-bruit. L'angle magique est de $54,7^\circ$ et fait égaliser à zéro la portion $3\cos^2\theta - 1$ pour les Équations 2.19 et 2.25. Ainsi, sur le spectre du phosphore-31, il ne restera que le terme du déplacement chimique isotrope tel que montré dans l'Équation 2.26.

$$\nu(\text{ppm}) = \Delta\sigma \frac{3\cos^2\theta - 1}{2} + \sigma_{\text{iso}} = \Delta\sigma \frac{3\cos^2 54,7^\circ - 1}{2} + \sigma_{\text{iso}} = \sigma_{\text{iso}} \quad \text{Équation 2.26}$$

$\nu(\text{ppm}) =$ fréquence en ppm

L'échantillon doit donc être orienté à l'angle magique par rapport au champ magnétique B_0 . De plus, la rotation doit être à une fréquence supérieure à la largeur du spectre de poudre. Si cette condition n'est pas atteinte, la forme de l'enveloppe spectrale reste présente sous forme de raies séparées au multiple de la fréquence de rotation, nommées bandes de rotation (*spinning side bands*) (Figure 2.20).³⁰⁶

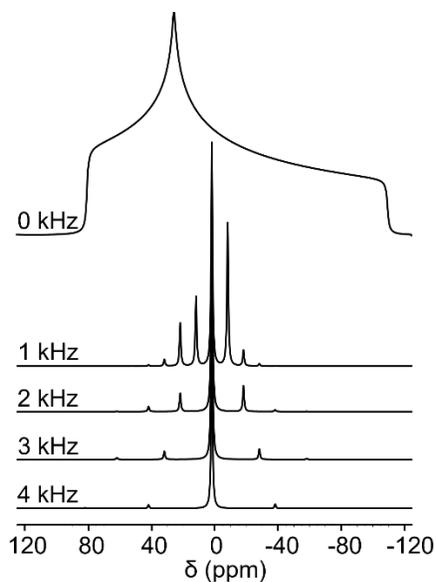


Figure 2.20 : Effet de la vitesse de rotation à l'angle magique sur un spectre de poudre en résonance magnétique nucléaire à l'état solide en phosphore-31.

Deux séquences d'impulsions ont été utilisées avec l'atome de phosphore-31. La première séquence d'impulsions est l'écho de Hahn (Section 2.4.1.1) pour connaître l'orientation des lipides (VMLs et bicouches lipidiques orientées mécaniquement). La seconde séquence est la *Centerband-only detection of exchange* (CODEX) (Section 2.4.1.2) pour la diffusion latérale des lipides.

2.4.1.1 Séquence d'impulsions « Écho de Hahn »^{307, 308}

L'écho de Hahn est une séquence d'impulsions permettant d'éliminer le déphasage des spins dû à l'inhomogénéité du champ magnétique. Elle peut aussi servir à mesurer les T_2 . C'est une séquence d'impulsions couramment utilisée en spectroscopie RMN à l'état solide. Dans le cadre de cette thèse, elle est jumelée au découplage du proton pour ne conserver que l'interaction d'ADC. La Figure 2.21 montre la séquence d'impulsions de l'écho de Hahn.

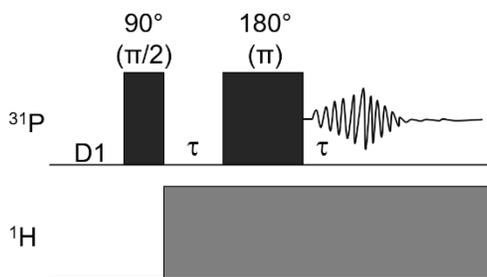


Figure 2.21 : Séquence d'impulsions de l'écho de Hahn.

La séquence d'impulsions commence par un délai d'équilibration $D1$ permettant le retour des spins à l'état initial avant une nouvelle perturbation. La première impulsion est de 90° sur l'axe x d'une durée suffisante pour faire basculer l'aimantation de l'axe z à y . Les spins subissent un déphasage dans le plan xy pendant le premier temps τ ce qui réduit le signal. Pour retrouver le maximum de signal, une seconde impulsion de 180° est appliquée sur l'axe y pour refocaliser les spins déphasés. Le signal maximal est observé et acquis après le deuxième temps τ .

2.4.1.2 Séquence d'impulsions « *Centerband-only detection of exchange* »³⁰⁹⁻³¹¹

Le CODEX est une séquence d'impulsions permettant d'observer et de caractériser les réorientations lentes de certaines sections de molécules avec la plus haute sensibilité disponible en spectroscopie RMN et de résolution de signal sans bande de rotation. La technique demande deux courtes séries de spectres en MAS à une dimension. La MAS permet d'éliminer la dépendance à l'orientation du signal tel que montré à la fin de la Section 2.4.1 et d'augmenter la sensibilité et la résolution des bandes. La dépendance à l'orientation est réintroduite (recouplée) par l'utilisation d'impulsions de radiofréquence adéquatement synchronisées sur la période de rotation du rotor, t_r . Suit une période d'« échange » où la réorientation du noyau par rapport au champ magnétique B_0 a lieu. Finalement, la nouvelle orientation est observée par une seconde vague d'impulsions permettant le recouplage. La différence d'orientation est perçue par la perte de signal entre les deux vagues d'impulsions. La séquence d'impulsions du CODEX est représentée à la Figure 2.22.

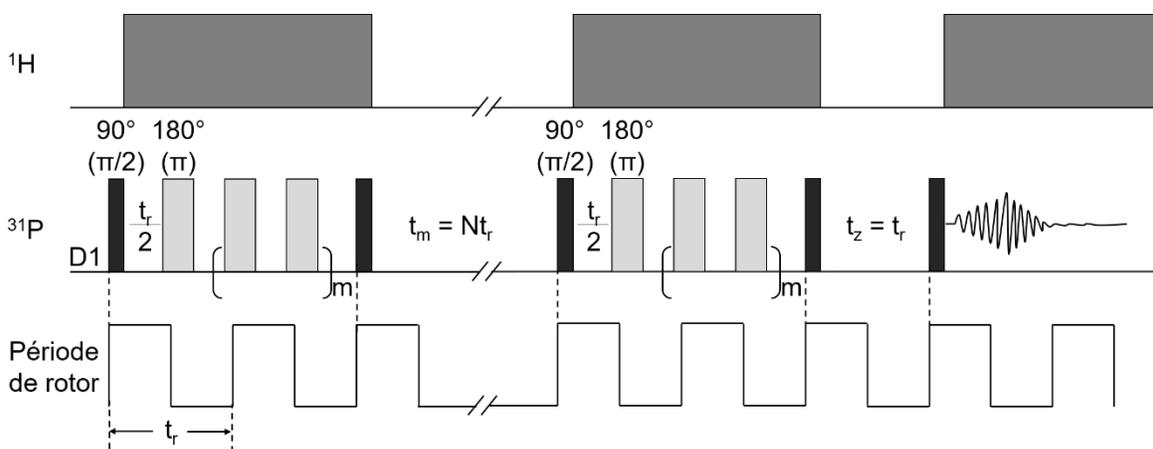


Figure 2.22 : Séquence d'impulsions du *Centerband-only detection of exchange*.

La première impulsion de 90° excite le système en basculant l'aimantation dans le plan xy . Les vagues d'impulsions de 180° à chaque demi période de rotor permettent le recouplage de l'ADC qui est éliminé par la MAS. Chaque paire d'impulsions de 180° (m) augmente la phase acquise dans le plan xy en fonction de l'orientation du tenseur de l'ADC. La deuxième impulsion de 90° bascule l'aimantation résiduelle du plan xy sur l'axe z . Ainsi, il n'y a pas d'effet de phasage ou déphasage dans le temps de mélange, t_m . Le t_m , un multiple de t_r , permet le changement d'orientation des noyaux dans le champ magnétique. La deuxième vague d'impulsions de 90 et 180° mesure une seconde phase dans le plan xy . La différence de phase entre les deux vagues d'impulsions de part et d'autre du t_m annule une partie du signal perçu. Ensuite, un temps de filtration sur l'axe z , t_z , de durée égale à t_r , est présent. Finalement, une dernière impulsion de 90° bascule l'aimantation dans le plan xy pour que le signal puisse y être détecté. L'ordre de cette séquence est pour le spectre ayant une perte de signal (S). Un spectre de référence (S_0) où les durées de t_m et t_z sont interchangées est nécessaire pour éliminer l'atténuation du signal causée par le T_1 pendant le t_m . Le découplage en proton a lieu en tout temps à l'exception des délais de t_m et t_z . Toutes les impulsions doivent être bien synchronisées sur la période de rotation du rotor. Les spectres S et S_0 sont faits à différents t_m . Dans cette technique, le nombre d'impulsions possibles de 180° pendant le recouplage de l'ADC est limité par le temps de corrélation du mouvement analysé et le T_2 . Cependant, l'augmentation du nombre d'impulsions de 180° augmente la sensibilité du CODEX au mouvement qui est détecté.

Le ratio d'intensité ou d'aire des bandes des spectres S sur S_0 décroît de manière exponentielle en fonction de t_m (Équation 2.27).

$$\frac{S(t_m, \delta Mt_r, R_i)}{S_0(t_z, \delta Mt_r, R_i)} = \exp\left(-\frac{t_m}{\tau_c(R_i, D_{rot})}\right) \quad \text{Équation 2.27}$$

$S(t_m, \delta Mt_r, R_i)$ = aire ou intensité du signal de CODEX ayant une décroissance dépendante de t_m , du nombre d'impulsions de 180° (δMt_r) et du rayon (R_i)

$S_0(t_z, \delta Mt_r, R_i)$ = aire ou intensité du signal de CODEX de référence dépendant de t_z , du nombre d'impulsions de 180° (δMt_r) et du rayon (R_i)

t_r = temps d'une période de rotor (1/vitesse de MAS en Hz)

t_m = temps de mélange étant un multiple du temps d'une période de rotor

t_z = temps de filtration sur l'axe z d'une durée de t_r

$\tau_c(R_i, D_{rot})$ = temps de corrélation rotationnel

R_i = rayon d'une bicouche d'un liposome

Cette décroissance dépend aussi du coefficient de diffusion rotationnelle, D_{rot} (Équation 2.28).

$$D_{rot} = \frac{k_B T}{8\pi\eta R_i} \quad \text{Équation 2.28}$$

D_{rot} = coefficient de diffusion rotationnelle

k_B = constante de Boltzmann

T = température

η = coefficient de viscosité

Ainsi, le temps de corrélation rotationnel, $\tau_c(R_i, D_{rot})$, (Équation 2.29) dépend des fonctions de corrélation pour la relaxation dipolaire en spectroscopie RMN ayant une fonction de l'harmonique sphérique (l) d'ordre 2.

$$\frac{1}{\tau_c(R_i, D_{rot})} = \frac{D_{rot}}{R_i^2} l(l+1) = \frac{6D_{rot}}{R_i^2} \quad \text{Équation 2.29}$$

l = fonction d'harmonique sphérique

Le D_{rot} contient deux contributions indépendantes, soit celles de la diffusion rotationnelle de la vésicule sur elle-même (*tumbling*), D_{tum} , et de la diffusion latérale des lipides individuellement autour d'une vésicule sphérique, D_{lat} (Équation 2.30).

$$D_{rot} = D_{tum} + D_{lat} \quad \text{Équation 2.30}$$

D_{tum} = coefficient de diffusion rotationnelle de la vésicule sur elle-même

D_{lat} = coefficient de diffusion latérale des lipides individuellement autour du rayon

de courbure d'une vésicule sphérique

L'utilisation des Équations 2.28, 2.29 et 2.30 pour obtenir à l'Équation 2.31 montre une relation entre le rayon des vésicules et $\tau_c(R_i, D_{rot})$.

$$\frac{1}{\tau_c(R_i, D_{rot})} = \frac{6}{R_i^2} \left(\frac{k_B T}{8\pi\eta R_i} + D_{lat} \right) = \frac{3k_B T}{4\pi\eta R_i^3} + \frac{6D_{lat}}{R_i^2} \quad \text{Équation 2.31}$$

Compte tenu que le CODEX est effectué avec des VMLs dans le cadre de ce projet de doctorat, il n'est pas possible d'extraire la valeur de D_{lat} étant donné la grande polydispersité du rayon des bicouches dans les VMLs. Néanmoins, la décroissance du signal apportera des informations sur la dynamique de la diffusion des lipides du système.

2.4.2 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire à l'état solide du deutérium^{288, 296, 312}

L'atome de deutérium possède un spin de 1. Comme l'abondance naturelle de l'atome de deutérium est faible (0,016 %), le marquage isotopique est nécessaire. Ce marquage ne perturbe généralement pas le système à l'exception des positions où des liaisons hydrogène spécifiques sont impliquées.³¹³ De plus, il y a aussi peu de contamination de la part des atomes de deutérium présents naturellement dans l'échantillon. Dans le cadre de ce projet de doctorat, c'est le groupement myristoylé de la recoverine qui est perdeutéié (recoverine myristoylée perdeutéiée : Rec-Myr-d₂₇). Le spin de 1 fait en sorte qu'il existe trois niveaux d'énergie et donc deux transitions énergétiques sont possibles. La présence d'un champ magnétique externe provoque la levée de dégénérescence de l'atome de deutérium par l'interaction de Zeeman (Section 2.3.2.1) donnant ainsi un seul pic centré à la fréquence de Larmor de l'atome de deutérium, ν_0 , étant donné que les deux transitions ont la même énergie (Figure 2.23). Cependant, dû à l'interaction quadrupolaire, soit l'interaction entre le moment quadrupolaire du noyau et les gradients de champ électrique (Section 2.3.2.5), la différence d'énergie entre les niveaux n'est pas la même. Ainsi, le spectre résulte plutôt en un doublet situé à $\pm \frac{\Delta\nu}{2}$ de ν_0 de l'atome de deutérium. L'effet du champ magnétique sur un atome de deutérium avec les interactions de Zeeman et quadrupolaire est illustré à la Figure 2.23.

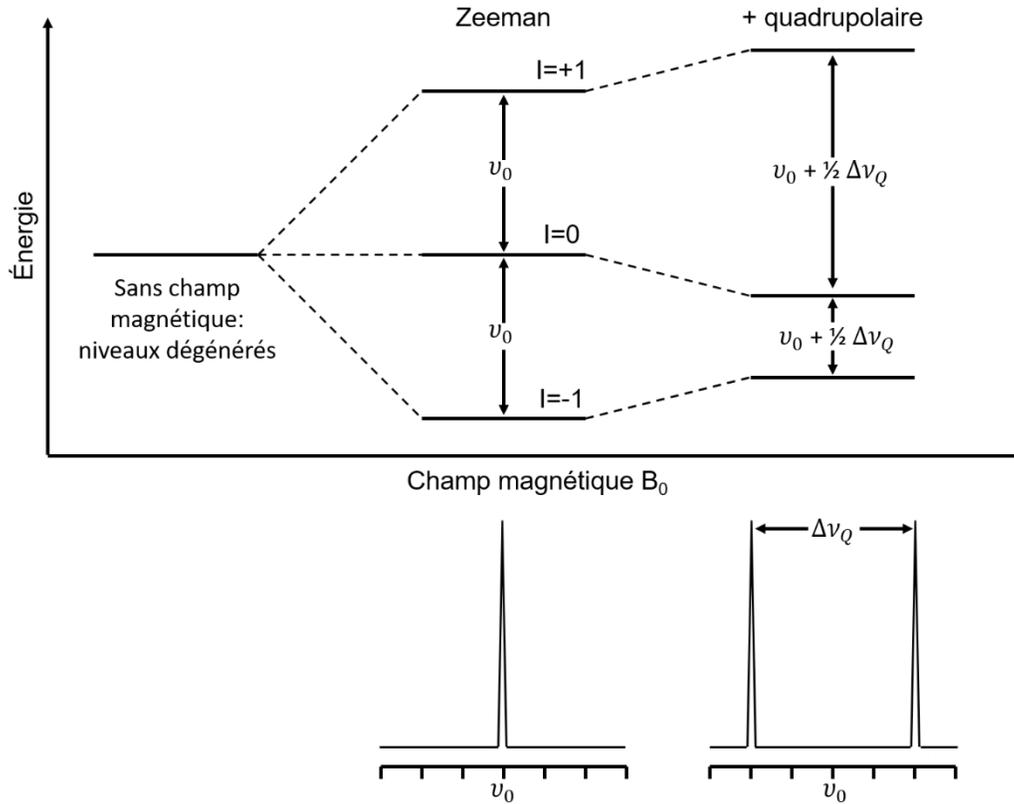


Figure 2.23 : Diagramme des niveaux d'énergie pour le deutérium et des spectres en résonance magnétique nucléaire en deutérium montrant que l'interaction quadrupolaire dédouble la raie de Zeeman.

L'écart entre les deux doublets est nommé écart quadrupolaire, $\Delta\nu_Q$, et se calcule tel que montré à l'Équation 2.32.

$$\Delta\nu_Q = \frac{3A_q}{4} [(3 \cos^2 \theta - 1) + (\eta \cos 2\phi \sin^2 \theta)] \quad \text{Équation 2.32}$$

- $\Delta\nu_Q =$ écart quadrupolaire en Hertz
- θ et $\phi =$ angles définissant l'orientation du tenseur EFG par rapport au champ magnétique B_0
- $\eta =$ paramètre d'asymétrie du système

Le $\Delta\nu_Q$ dépend de l'orientation du système et de sa symétrie. Cependant, une chaîne acyle possède une symétrie axiale où η égale 0. Ainsi, la présence de mouvements de rotation et d'oscillation transforme l'Équation 2.32 en l'Équation 2.33.

$$\Delta\nu_Q = \frac{3A_q}{2} \left\langle \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right\rangle \left\langle \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right\rangle \left\langle \frac{3 \cos^2 \gamma - 1}{2} \right\rangle \quad \text{Équation 2.33}$$

- $\theta =$ angle entre la normale à la bicouche lipidique n pouvant immobiliser la chaîne acyle de la recoverine et la direction du champ magnétique B_0
 $\beta =$ angle entre le lien C-D et l'axe de rotation la chaîne acyle n'
 $\gamma =$ angle entre l'axe de rotation de la chaîne acyle et la normale à la bicouche lipidique n pouvant immobiliser la chaîne acyle de la recoverine

Les crochets anguleux indiquent une moyenne dans le temps pour les angles β et γ . La position des angles θ , β et γ , ainsi que n et n' est illustrée à la Figure 2.24.

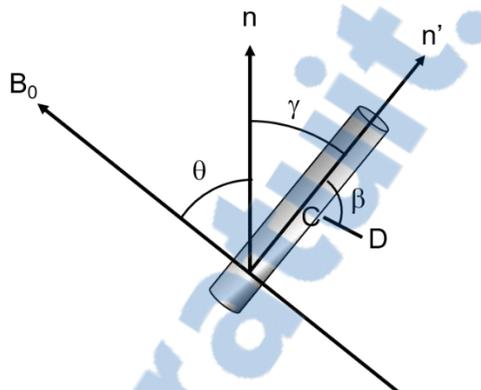


Figure 2.24 : Angles θ , β et γ reliant le vecteur C-D au système d'axes du laboratoire.

Les angles β et γ sont très difficiles à mesurer; ils ne sont donc pas évalués directement. Pour ce faire, un paramètre d'ordre orientationnel, S_{CD} , est plutôt mesuré et tient compte des mouvements du lien C-D (Équation 2.34). L'Équation 2.33 devient ainsi l'Équation 2.35 en tenant compte de l'Équation 2.34.

$$S_{CD} = \left\langle \frac{(3 \cos^2 \beta - 1)}{2} \right\rangle \left\langle \frac{(3 \cos^2 \gamma - 1)}{2} \right\rangle \quad \text{Équation 2.34}$$

$$\Delta\nu_Q = \frac{3A_Q}{2} \frac{(3 \cos^2 \theta - 1)}{2} S_{CD} \quad \text{Équation 2.35}$$

$S_{CD} =$ paramètre d'ordre orientationnel

Les Équation 2.35 et 2.33 montrent l'influence de l'orientation du système dans le champ magnétique et des mouvements du lien C-D sur le $\Delta\nu_Q$ qui se reflètent sur l'allure des spectres (Figure 2.25). Chaque atome de deutérium résulte en un doublet à des fréquences caractéristiques selon son orientation et son mouvement. La superposition d'une série de doublets à toutes les orientations possibles des liens C-D par rapport au

champ magnétique B_0 forme un spectre de poudre tel que montré aussi à la Figure 2.25.

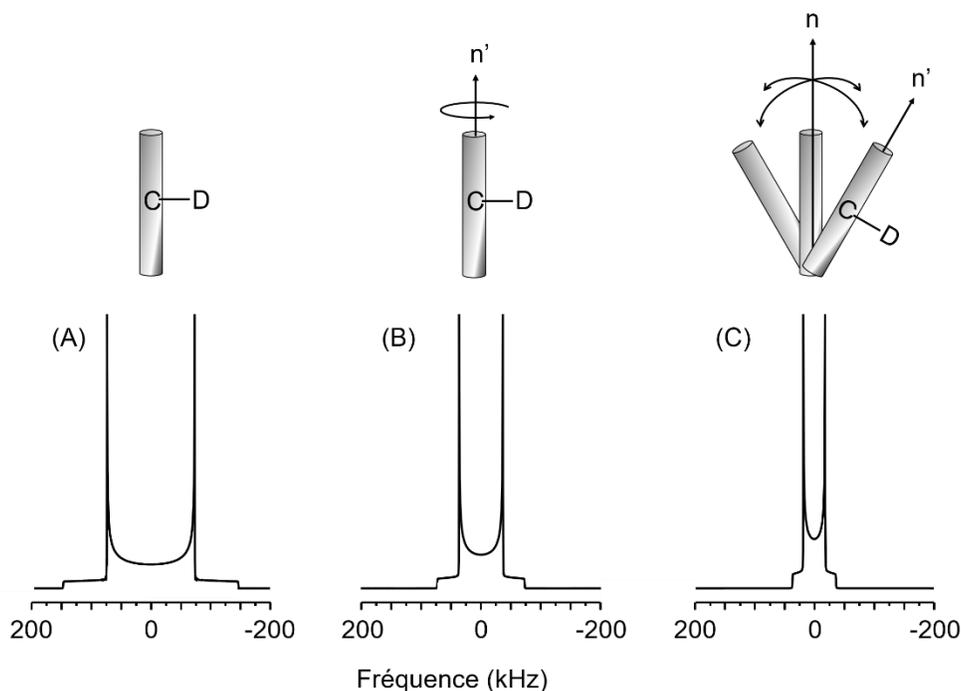


Figure 2.25 : Effet des mouvements de rotation et d'oscillation sur l'allure des spectres de poudre en résonance magnétique nucléaire à l'état solide du deutérium: (A) Chaîne acyle statique, (B) Chaîne acyle animée d'un mouvement de rotation, et (C) Chaîne acyle animée de mouvements de rotation et d'oscillation.

Un lien C-D d'une chaîne acyle animée d'un mouvement de rotation axiale et ayant son axe principal orienté parallèlement au champ magnétique B_0 aura un $\Delta\nu_Q$ plus élevé (double) que celui ayant son axe principal orienté perpendiculairement au champ magnétique B_0 (simple). De plus, un lien C-D d'une chaîne acyle ayant peu de mouvement aura un $\Delta\nu_Q$ plus élevé que celui ayant beaucoup de mouvement. Sur le groupement myristoylé de la recoverine ou de la même manière sur un lipide, les groupements C-D près des groupements carbonyle du lien amide pour l'acylation de la recoverine sur la Gly en N-terminal ou du lien ester pour la liaison des chaînes acyle sur le glycérol (ayant comme troisième liaison la tête polaire des lipides) bougeront moins, donc auront un $\Delta\nu_Q$ plus élevé. À l'opposé, les groupements C-D à l'extrémité de la chaîne acyle, tel que les CD_3 , bougeront beaucoup et auront donc un $\Delta\nu_Q$ plus faible. La quantité de mouvement explique ici aussi pourquoi en solution le spectre ne présentera qu'une bande au

déplacement chimique isotrope pour l'atome de deutérium, le $\Delta\nu_Q$ étant annulé.

Comme l'atome de deutérium est très sensible à l'orientation et au mouvement, c'est un noyau de choix dans ce projet de doctorat pour sonder l'immobilisation du groupement myristoylé de la recoverine dans les membranes. Lorsqu'il y a immobilisation du groupement myristoylé, un spectre de poudre apparaîtra. Bien que le groupement myristoylé de la recoverine soit marqué par des atomes de deutérium, il y a un problème de sensibilité causé par le ratio molaire de 1 protéine pour 200 lipides qui a été utilisé dans les études spectroscopiques avec des membranes modèles. Ainsi, il y a une chaîne perdeutérée pour 400 chaînes lipidiques non marquées. Pour contourner ce problème, un spectromètre à plus haut champ, soit le spectromètre RMN 900 MHz du Centre national de RMN à ultrahaut champ pour les solides à Ottawa, a été utilisé.^a De cette façon, il y a une plus grande différence de population entre les deux niveaux énergétiques et plus de signal est obtenu selon la distribution de Boltzmann. Aussi, à la suite de mesures effectuées par Geneviève Valois-Paillard au cours de sa maîtrise,²⁵³ il fut remarqué qu'il était préférable d'orienter les lipides mécaniquement entre des plaques de verre pour obtenir un meilleur signal. Ainsi, la probabilité est plus grande que le groupement myristoylé perdeutééré de la protéine soit immobilisée dans des lipides orientés mécaniquement entre des plaques de verre par rapport à des lipides sous forme de VMLs. Les bicouches lipidiques orientées par des plaques de verre sont toutefois moins hydratées que des VMLs, ce qui pourrait favoriser l'immobilisation du groupement myristoylé.

2.4.2.1 Séquence d'impulsions « Écho quadrupolaire »³¹⁴

L'écho quadrupolaire est une séquence d'impulsions permettant de corriger les effets du délai entre l'impulsion et l'acquisition, d'avoir uniquement le signal correspondant à la refocalisation du couplage quadrupolaire de premier ordre et d'effectuer la TF au début du FID. La décroissance du FID est très rapide pour l'atome de deutérium comparativement à son temps d'acquisition par rapport à d'autres noyaux; il est ainsi très important d'enregistrer les premiers points du maximum du FID. C'est une séquence d'impulsions

^a Access to the 21.1 T NMR spectrometer was provided by the National Ultrahigh-Field NMR Facility for Solids (Ottawa, Canada), a national research facility funded by a consortium of Canadian Universities, supported by the National Research Council Canada and Bruker BioSpin, and managed by the University of Ottawa (<http://nmr900.ca>).

couramment utilisée en spectroscopie RMN à l'état solide du deutérium. La Figure 2.26 montre la séquence d'impulsions de l'écho quadrupolaire.

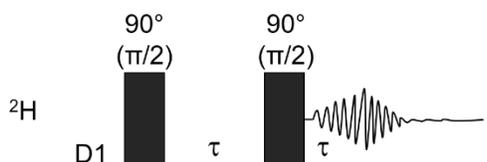


Figure 2.26 : Séquence d'impulsions de l'écho quadrupolaire.

La séquence d'impulsions commence par un délai d'équilibration $D1$ permettant le retour des spins à l'état d'équilibre avant d'induire une nouvelle perturbation. La première impulsion est de 90° sur l'axe x d'une durée suffisante pour faire basculer l'aimantation de l'axe z à y . Les spins subissent un déphasage pendant le premier temps τ , ce qui réduit le signal. Pour retrouver le maximum de signal, une seconde impulsion de 90° est appliquée sur l'axe $\pm y$ pour refocaliser sélectivement les spins déphasés par le couplage quadrupolaire de premier ordre. Le deuxième temps τ est le temps nécessaire requis entre l'impulsion et l'acquisition du signal pour éviter d'observer les fréquences d'impulsions dans le FID.

2.4.3 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du fluor-19

L'atome de fluor-19 possède un spin $\frac{1}{2}$ comme l'atome de phosphore-31. Cependant, son rapport gyromagnétique est élevé, soit $25,18 \times 10^7 \text{ rad}\cdot\text{T}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, il est ainsi très près de celui du proton ($26,75 \times 10^7 \text{ rad}\cdot\text{T}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). De plus, son abondance naturelle de 100 %, l'absence de signal provenant de l'atome de fluor-19 dans les échantillons biologiques naturels et sa grande largeur spectrale en font un noyau de choix comme sonde pour l'étude de systèmes biologiques.³¹⁵⁻³¹⁸ En raison de la largeur spectrale du fluor-19, un petit changement dans son environnement amènera un grand changement de déplacement chimique.^{315, 319-322} Ainsi, un changement isotopique entre un proton et un atome de fluor devient intéressant pour la spectroscopie RMN. L'atome de fluor-19 est le deuxième plus petit atome avec un rayon de Van der Waals de $1,47 \text{ \AA}$ après l'atome d'hydrogène à $1,20 \text{ \AA}$ et son lien C-F est très stable.³²³ De plus, l'atome de fluor-19 est un noyau couramment utilisé pour modifier des biomolécules et étudier leur changement

structural,^{319, 324-338} l'action enzymatique,³³⁹⁻³⁴¹ la dynamique^{338, 342} et les interactions protéine-protéine,^{343, 344} protéine-ligand^{324, 325, 333, 345-347} et protéine-lipide.^{333, 348, 349} Des acides gras monofluorés ont déjà été incorporés dans des membranes cellulaires par biosynthèse et montraient des résultats prometteurs pour la spectroscopie RMN du fluor-19.³⁵⁰⁻³⁵⁶ Ainsi, l'incorporation d'un seul atome de fluor sur le groupement myristoyle de la recoverine ne devrait pas créer une grande perturbation au sein de la protéine à la fois pour sa surexpression et sa purification que pour sa stabilité thermique et son interaction membranaire. Le groupement myristoyle monofluoré à diverses positions est obtenu grâce à une collaboration avec le laboratoire de chimie organique médicinale de l'Université Laval dirigé par le Pr Jean-François Paquin. Marie-Claude Gagnon, qui a récemment obtenu son doctorat sous la supervision du Pr Jean-François Paquin et de la Pre Michèle Auger, a synthétisé et purifié les acides myristiques monofluorés utilisés dans ce projet de doctorat. En utilisant des analogues de groupement myristoyle monofluoré à diverses positions, il devrait être possible de confirmer l'insertion du groupement myristoyle dans les bicouches lipidiques. Des expériences ont été effectuées tant en solution qu'à l'état solide.

Seulement les interactions Zeeman, de déplacement chimique et de couplage scalaire entre les protons et les atomes de fluor sont présentes en solution. Le facteur d'ADC et les couplages dipolaires hétéronucléaires entre les protons et les atomes de fluor et homonucléaires entre les atomes de fluor s'ajoutent à l'état solide. Le déplacement chimique en spectroscopie RMN du fluor-19 est très sensible à son environnement local autant à l'état liquide qu'à l'état solide. Deux éléments influencent principalement le déplacement chimique, soit le solvant et une contribution paramagnétique qui est très sensible aux interactions de van der Waals locales et aux champs électrostatiques.^{318, 357-359} Toutefois, la prédiction de spectres de protéines à grande mobilité conformationnelle ayant des atomes de fluor-19 reste difficile, bien que des progrès significatifs aient été faits.³⁶⁰ Les couplages scalaires se font à travers de nombreux liens pour l'atome de fluor. Ainsi, le signal est souvent sous forme de multiplets s'il n'y a pas de découplage. Le couplage dipolaire homonucléaire est significatif jusqu'à une distance de 18 Å.^{318, 361, 362} Comparativement à d'autres couples homonucléaires de noyaux tels que ¹³C et ¹⁵N où la distance maximale est de 7 ou 4 Å, respectivement, la distance entre deux atomes de fluor est très grande compte tenu de son rapport gyromagnétique élevé.^{318, 361} Toutefois, la distance entre les atomes de fluor du groupement myristoyle de chaque recoverine devrait

être élevée en tenant compte de la concentration de protéine, ainsi que la dimension de cette protéine (dimension en présence de Ca^{2+} du demi-grand axe $a = 17,15 \text{ \AA}$, demi-petit axe $b = 10,80 \text{ \AA}$ et du demi-grand axe $c = 30 \text{ \AA}$ d'une ellipsoïde et en absence de Ca^{2+} d'un rayon de 20 \AA) et de celle d'un groupement myristoyle (longueur de 16 \AA et largeur de $5,5 \text{ \AA}$) (dimensions pour la recoverine et le groupement myristoyle déterminés en utilisant une représentation PyMol de la recoverine, Protein Data Bank 1JSA en présence de Ca^{2+} et 1IKU en absence de Ca^{2+}) donnant une aire en près de 2327 \AA^2 par protéine en présence de Ca^{2+} et de 20 \AA^2 par chaîne de CH_2 en configuration serrée.³⁶³ De plus, la protéine et son groupement myristoyle sont assez mobiles, ce qui réduit les possibilités de couplage homonucléaire qui requièrent une stabilité dans le temps. Ainsi, les couplages homonucléaires pourront être négligés. Tant qu'à eux, les couplages hétéronucléaires entre les protons et les atomes de fluor ne sont pas négligeables en tenant compte des distances.³⁶² Cependant, ils sont éliminés par l'irradiation à haute puissance des protons. Le découplage élimine donc les couplages scalaires en solution et à l'état solide et dipolaires à l'état solide entre les protons et les atomes de fluor. Ainsi, les spectres de fluor-19 résulteront uniquement de l'interaction de déplacement chimique qui est anisotrope à l'état solide pour expliquer la largeur des raies obtenues. L'ADC a été expliquée plus en détails dans la Section 2.4.1. Néanmoins, l'ADC du fluor-19 est sensible à la mobilité du lien C-F tel que l'a montré la relation entre le paramètre d'ordre moléculaire et la position de l'atome de fluor sur des acides gras³⁵²⁻³⁵⁴ et des phospholipides monofluorés,³⁶⁴ ce qui est appuyé par le fait qu'un CH_3 terminal est plus mobile qu'un CH_2 près d'un carbonyle.²⁰⁶

2.4.3.1 Séquence d'impulsions à découplage haute puissance

La séquence d'impulsions à découplage haute puissance, *high power decoupling* (hpdec), est une des séquences les plus simples en spectroscopie RMN. Le découplage permet d'éliminer les couplages hétéronucléaires entre les protons et les atomes de fluor pour ne conserver que les interactions de déplacement chimique avec ou sans anisotropie. La Figure 2.27 montre la séquence d'impulsions à découplage haute puissance.

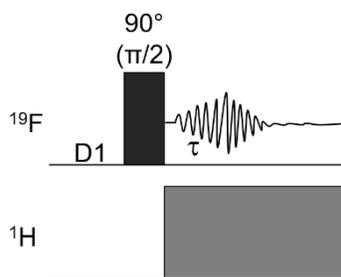


Figure 2.27 : Séquence d'impulsions à découplage haute puissance.

La séquence d'impulsions commence par un délai d'équilibration D1 permettant le retour des spins à l'état initial avant une nouvelle perturbation. L'impulsion est de 90° sur l'axe x d'une durée suffisante pour faire basculer l'aimantation de l'axe z à y. Le signal est observé et acquis après un temps τ et le découplage des protons a lieu uniquement pendant l'acquisition du signal.

Chapitre 3

The thermal stability of recoverin depends on calcium binding and its myristoyl moiety as revealed by infrared spectroscopy

Kim Potvin-Fournier,^{1,2} Thierry Lefèvre,¹ Audrey Picard-Lafond,¹ Geneviève Valois-Paillard,^{1,2} Line Cantin,² Christian Salesses² et Michèle Auger¹

Article publié dans la revue *Biochemistry* 2014, 53, 48-56.

¹ Département de chimie, Regroupement québécois de recherche sur la fonction, la structure et l'ingénierie des protéines (PROTEO), Centre de recherche sur les matériaux avancés (CERMA), Université Laval, Pavillon Alexandre-Vachon, 1045 avenue de la médecine, Québec, Québec G1V 0A6, Canada

² CUO-recherche, Centre de recherche du CHU de Québec, Hôpital du Saint-Sacrement, Département d'ophtalmologie, Faculté de médecine, PROTEO, Université Laval, Québec, Québec G1S 4L8, Canada

3.1 Résumé

La stabilité structurale de la recoverine a été étudiée en observant l'effet de la température, de la myristoylation et du ratio Ca^{2+} :protéine sur la structure secondaire de cette protéine par spectroscopie IR à transmission. À 25 °C, la structure secondaire de la Rec-Myr et Rec-nMyr comporte principalement des hélices α en plus de tours, de structures désordonnées et de feuillets β tant en présence qu'en absence de Ca^{2+} . En présence d'un excès de Ca^{2+} , la Rec-Myr ou Rec-nMyr est stable structuralement jusqu'à 65 °C. En absence ou en faible concentration en Ca^{2+} , la Rec-nMyr forme plus de feuillets β antiparallèles intermoléculaires, ce qui représente un signe d'agrégation, que la Rec-Myr. L'augmentation de la concentration en Ca^{2+} et la myristoylation diminue le contenu en feuillets β , l'agrégation, ce qui résulte donc en une augmentation de la stabilité thermique de la recoverine. Un nombre minimal de Ca^{2+} coordonnés à la recoverine semble nécessaire à sa pleine stabilité structurale.

3.2 Abstract

To evaluate the structural stability of recoverin, a member of the neuronal calcium sensor family, the effect of temperature, myristoylation, and calcium:protein molar ratio on its secondary structure has been studied by transmission infrared spectroscopy. On the basis of the data, the protein predominantly adopts α -helical structures (~50–55%) with turns, unordered structures, and β -sheets at 25 °C. The data show no significant impact of the presence of calcium and myristoylation on secondary structure. It is found that, in the absence of calcium, recoverin denatures and self-aggregates while being heated, with the formation of intermolecular antiparallel β -sheets. The nonmyristoylated protein (Rec-nMyr) exhibits a lower temperature threshold of aggregation and a higher intermolecular β -sheet content at 65 °C than the myristoylated protein (Rec-Myr). The former thus appears to be less thermally stable than the latter. In the presence of excess calcium ions (calcium:protein ratio of 10), the protein is thermally stable up to 65 °C with no significant conformational change, the presence of the myristoyl chain having no effect on the thermal stability of recoverin under these conditions. A decrease in the thermal stability of recoverin is observed as the calcium:protein molar ratio decreases, with Rec-nMyr being less stable than Rec-Myr. The data overall suggest that a minimal number of coordinated calcium ions is necessary to fully stabilize the structure of recoverin and that, when bound to the membrane, i.e., when the myristoyl chain protrudes from the interior pocket,

recoverin should be more stable than in a Ca-free solution, i.e., when the myristoyl chain is sequestered in the interior.

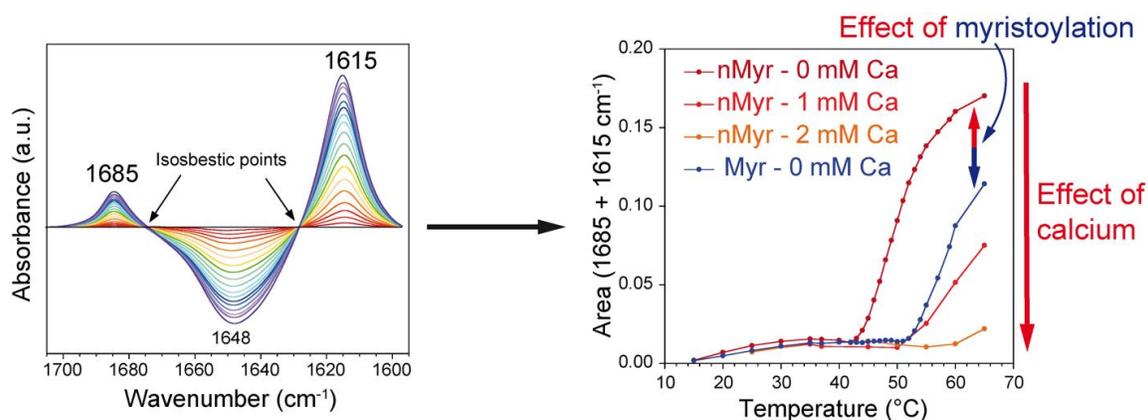


Figure 3.1 : Figure de *Table of content*.

3.3 Introduction

Calcium is a ubiquitous intracellular messenger that allows the control of numerous cellular processes, such as fertilization, proliferation, development, learning and memory, contraction, and secretion (for a review, see ref ³⁶⁵). This is mainly achieved by proteins that specifically bind calcium.^{366, 367} Calcium-binding proteins (CaBP) make up a heterogeneous and wide group of proteins, which include proteins that contribute not only to the control of calcium concentration but also to the decoding of calcium signals, thus acting as calcium sensors.^{368, 369} Among these proteins, one can find intracellular CaBP containing⁷³ or lacking EF-hand motifs.³⁶⁸ The EF-hand calcium binding motif consists of a α -helix, a calcium-binding loop, and a second helix.³⁷⁰ The proteins containing the EF-hand motif constitute a large and functionally diverse family of proteins.^{74, 371, 372}

The neuronal calcium sensor (NCS) protein family makes up part of the EF-hand family. It contains 14 members, including recoverin.^{60, 61, 100} Recoverin is a 23 kDa protein that acts as a calcium sensor in retinal rod cells.¹⁰⁸ In the dark, calcium-bound recoverin inactivates rhodopsin kinase.^{125, 126, 131} However, light activation of rhodopsin results in a large decrease in the intracellular calcium content of rod photoreceptors and a large conformational change in recoverin upon calcium dissociation. Consequently, recoverin

dissociates from rhodopsin kinase, which then phosphorylates rhodopsin (see refs ^{373, 374} for reviews on phototransduction).

Like other members of the NCS family, recoverin possesses 4 EF-hand motifs that can coordinate calcium ions. However, only two of these motifs can bind calcium (EF-hands 2 and 3). Calcium binding occurs in a successive manner, EF-Hand 3 being coordinated first because of a higher association constant.^{112, 115, 117, 118} Moreover, recoverin contains an N-terminal myristoyl moiety that can be inserted within or extruded out of a hydrophobic cavity in a calcium concentration-dependent manner, a phenomenon called the calcium-myristoyl switch.^{114, 122} It has been suggested that the myristoyl group can serve as a membrane anchor when it protrudes from the protein surface.²³⁹

The three-dimensional (3D) structure of myristoylated recoverin (Rec-Myr) has been determined in solution in the absence of calcium⁴⁰ and when coordinated with two calcium ions.³⁹ The 3D structure of nonmyristoylated recoverin (Rec-nMyr) has been determined in solution in the presence of calcium.¹¹² Recoverin mainly adopts an α -helical conformation in which two subdomains formed by EF-hand 1 and 2 (N-terminal domain) and EF-hands 3 and 4 (C-terminal domain) are joined by a U-shaped linker region.¹¹⁶ Calcium binding of recoverin is associated with a rotation of 45° of the C-terminal domain relative to the N-terminal one and the exposure of many hydrophobic residues to the solvent.³⁹

The structure of Rec-Myr and Rec-nMyr has been investigated in various environments, especially using circular dichroism (CD) and fluorescence spectroscopy. The data are contradictory as some of them suggest a change in the amount of α -helix content upon calcium binding,^{111, 375} whereas other studies detect virtually no structural modification.^{118, 243} N-myristoylation does not seem to induce conformational changes in recoverin as indicated by CD.³⁷⁵ However, it has been found by small-angle X-ray scattering (SAXS) that Rec-Myr and Rec-nMyr “aggregate” (oligomerize) at room temperature in the presence and absence of calcium, respectively.³⁷⁵

The study of the thermal stability is probably one of the simplest and most powerful ways of assessing the structural integrity of a protein, especially with regards to different protein environments. This type of information is also important because physiological processes occur at 37 °C and, from a more practical point of view, because it may serve as a reference for understanding the structural behavior of recoverin when it interacts with

phospholipid model membranes. The study of the heat-induced stability of recoverin has only been performed for Rec-Myr using microcalorimetry,¹¹⁸ fluorescence spectroscopy,²⁴³ and CD.²²⁴ The results have shown that recoverin is stabilized in the presence of calcium.

More generally, binding of calcium by proteins can have different effects on their stability. For example, it has been shown that the thermal stability of proteins containing EF-hand motifs is increased in the presence of calcium^{118, 238, 243, 376-384} which is also true when no EF-hand motif is present in the structure of the protein.³⁸⁵ However, a decrease in thermal stability has also been observed in the presence of calcium for some proteins bearing an unusual EF-hand motif^{386, 387} or in the absence of such a motif.³⁸⁸ Calcium thus allows stabilization of the structure of most proteins assayed until now. However, none of these studies has carefully studied the effect of varying the molar ratio of calcium on protein thermal stability.

Recoverin has therefore been used in this study to clarify this issue. More specifically, we have used transmission infrared (IR) spectroscopy to study the effect of calcium and N-myristoyl moiety on the secondary structure and thermal stability of recoverin in solution. IR spectroscopy is a powerful tool for investigating the secondary structure of proteins in various aqueous environments, because of the amide I band that originates from peptide bond vibrations. This technique has been often used to investigate the effect of calcium on the secondary structure of proteins.³⁸⁹⁻³⁹² In particular, the study of the antisymmetric COO⁻ stretching [$\nu_{as}(\text{COO}^-)$] vibration provides insight into the binding of amino acid side chain carboxylate groups.²⁸⁵

3.4 Material and methods

3.4.1 Material

Water used for buffer preparation was distilled and deionised (resistivity of 18.2 M Ω cm) using a Barnstead NANOpurII system (Boston, MA). Deuterium oxide (D₂O) was obtained from CDN isotopes (Pointe-Claire, QC). All solvents were of reagent grade or high-performance liquid chromatography grade [Commercial Alcohols: the industrial and beverage alcohol division of GreenField Ethanol (Brampton, ON) for ethanol and VWR International (Radnor, PA) for chloroform] and used without any further purification. Salts were of analytical grade and used as received. CaCl₂, NaOH, sodium myristate, and 2-

mercaptoethanol were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Ethylene glycol bis(β -aminoethyl ether)- N,N' -tetra-acetic acid (EGTA), NaCl and NH_4HCO_3 were purchased from Laboratoire Mat (Québec, QC). HEPES was purchased from Fischer (Fair Lawn, NJ).

3.4.2 Expression and purification of recoverin and removal of the salts

Myristoylated recoverin and nonmyristoylated recoverin were expressed and purified as previously reported by Ray et al.¹⁰⁸ with the modifications of Desmeules et al.²⁴⁵ Purified recoverin was then dialyzed four times to remove all salts. For samples in the absence of calcium, the protein sample was first dialyzed against 50 mM NH_4HCO_3 and 50 μM EGTA and then dialyzed three times against 50 mM NH_4HCO_3 . For samples in the presence of calcium, the protein sample was dialyzed four times against 50 mM NH_4HCO_3 and 50 μM CaCl_2 . All recoverin solutions were then concentrated, lyophilized, and stored at -20°C . The concentration of recoverin was determined by UV-visible spectroscopy using a molar absorption coefficient (ϵ) of $23,950 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ at 280 nm.²⁵⁸

3.4.3 Transmission infrared spectroscopy

All samples were rehydrated with D_2O buffers (pH 7.5) containing 100 mM NaCl, 25 mM HEPES, and 1 mM 2-mercaptoethanol. Samples in the absence of calcium also contained 0.5 mM EGTA. The effect of calcium has been investigated at different calcium concentrations (1, 2, or 10 mM CaCl_2). The final protein concentration was 1 mM.

Measurements were made using either a Magna 560 or 760 FTIR spectrometer from Nicolet (Thermo Scientific, Madison, WI) equipped with a nitrogen-cooled MCT A detector. The temperature was adjusted using a home-built temperature controller ($\pm 1^\circ\text{C}$). The temperature was increased from 12-15 to 65°C , with typical steps of 5°C . For samples exhibiting aggregation, the experiments were performed with 1-2 $^\circ\text{C}$ increments in the temperature range where conformational changes occur. The stabilization time for each temperature was 3 min. A protein sample volume between 5 and 9 μL was deposited between two CaF_2 windows (Spectral Systems, Hopewell Junction, NY) using a Mylar film spacer of 13 μm (Goodfellow Cambridge Ltd., Huntingdon, UK). Spectra were recorded via the acquisition of 128 interferograms at a resolution of 4 cm^{-1} using a Happ-Genzel apodization.

All spectra were treated using the GRAMS/7 AI software (Galactic Industries Corporation, Salem, NH). The appropriate buffer spectrum was first subtracted from each series of spectra. Water vapor was then subtracted, and the spectra were subsequently smoothed³⁹³ when necessary. Then, a linear or cubic baseline was subtracted in the amide I' and carboxylate asymmetric stretching regions, i.e. between 1720 and 1530 cm^{-1} . However, for samples showing aggregation, a linear baseline was further subtracted between $\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ (1701-1713 cm^{-1}) and $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ (1595-1598 cm^{-1}). Then, the area of the amide I' was normalized to unity between 1700 and 1600 cm^{-1} with a homemade program running with Grams. To evaluate the extent of aggregation, the spectrum of the series preceding the first appearance of the bands due to β -sheets (onset of aggregation) was subtracted from all the other spectra. The area of the bands due to aggregation was evaluated as a function of temperature using a homemade program, which calculates the positive area of the difference spectrum over the horizontal axis.

The curve fitting of the amide I' band was performed using various initial sets of band parameters. The amide I' band has been first decomposed using three Gaussian components, which were found to lead to improper fitting. In fact, the minimum number of components required to obtain a reasonable fit was six (located at 1676, 1663, 1648, 1633, 1617, and 1604 cm^{-1}). The two latter components most probably result from side chain vibrations. Since the curve-fitting software spontaneously tends to promote large bands, restrictions on the bandwidth have been imposed so that they could not exceed 20 cm^{-1} . The frequency was free to change during calculation but always remained within a $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$ interval, suggesting that the spectral decomposition is robust. The area of the 1648 cm^{-1} component divided by the sum of the area of all amide I' components was used for the determination of the α -helical content, assuming that the molar absorption coefficient is the same for all structures. The antisymmetric COO^- stretching [$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$] originating from glutamic acid (Glu) and aspartic acid (Asp) band near 1570 cm^{-1} has also been fit to facilitate the spectral decomposition of the amide I' band due to the overlap between these two spectral regions.

3.5 Results

3.5.1 Effect of calcium and myristoylation on the secondary structure of recoverin

Figure 3.2 shows the amide I' and the antisymmetric COO⁻ stretching [$\nu_{as}(\text{COO}^-)$] absorption bands of Rec-Myr and Rec-nMyr in the presence and absence of Ca²⁺. The maximum of the amide I' band for all spectra is located at 1647-1648 cm⁻¹, showing the predominance of α -helices, in agreement with the 3D structure of recoverin.^{39, 40, 112} This value is 3-4 cm⁻¹ lower than that obtained by Ozawa et al.²⁴² This difference is probably due to the fact that in this latter work, the protein was lyophilized after solubilization in D₂O buffer and then dissolved again into D₂O. This treatment may lead to a more complete H-D exchange of the peptide bonds, thus leading to a shift of the amide I' band towards lower wavenumbers.

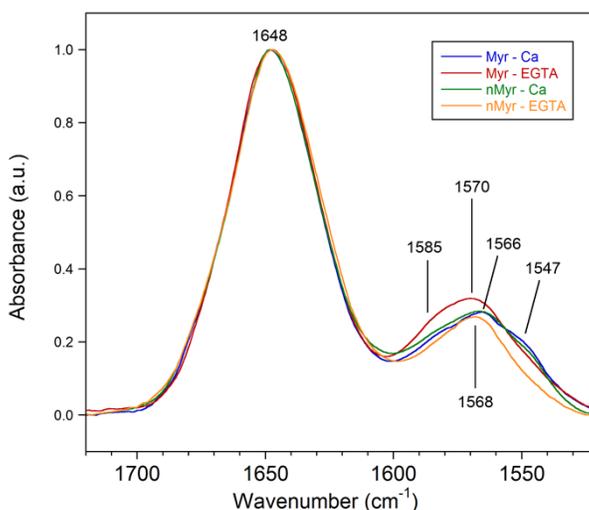


Figure 3.2 : Spectra of Rec-Myr and Rec-nMyr (1 mM in D₂O buffer) in the presence of Ca²⁺ (10 mM Ca²⁺) and in its absence (0.5 mM EGTA) at 25 °C, in the 1720-1520 cm⁻¹ frequency range. Spectra are normalized with respect to the peak maximum of the amide I' band.

The width at half-height of the amide I' band is 42 cm⁻¹, which indicates the presence of other band components on each side of the main α -helix band, thus showing that other secondary structure elements such as turns and random structures are also present. The

amide I' band shows no significant difference in shape for the different samples, suggesting no major modification of the secondary structure because of myristoylation or the presence or absence of Ca^{2+} . The lack of a change in secondary structure upon calcium binding is consistent with the absence of or the very small^{118, 240, 243} structural changes reported by circular dichroism but is in contrast with other conclusions.^{90, 222, 224, 394} Besides these apparent discrepancies, because infrared spectroscopy does not reveal changes in secondary structure upon calcium binding, it may be hypothesized that the structural change of recoverin are mainly related to tertiary alterations. Indeed, the tertiary structure changes occurring in recoverin upon calcium binding as described in ref¹¹⁶ may be detected by CD or fluorescence but cannot be detected by infrared spectroscopy.

To obtain more information about the secondary structure of recoverin, the amide I' band at 25°C has been decomposed using different components. It appeared that four amide I' components located at 1676, 1663, 1648, and 1633 cm^{-1} were necessary to obtain a reasonable curve fitting. The band at 1648 cm^{-1} is assigned to α -helices, whereas those at 1633, 1663, and 1676 cm^{-1} correspond to contributions from β -sheets, turns, and disordered structures, respectively.^{62, 395, 396} These structural components can be found in the high-resolution structure of recoverin.^{39, 40, 112}

A typical spectral decomposition is shown in Figure 3.3 for nonmyristoylated recoverin in 10 mM Ca^{2+} buffer. Using different initial band parameters, the curve-fitting calculations show that the α -helical component represents approximately 45-50% of the secondary structure content of recoverin. These values are smaller than those reported by circular dichroism showing that the amount of α -helical structure corresponds to 52 and 65% of the secondary structures in the absence and presence of calcium, respectively.^{111, 375} However, our data are rather consistent with the 43-60% α -helical content determined by NMR or X-ray diffraction for both the calcium-free recoverin or the one coordinated with two calcium ions.^{39, 40, 112}

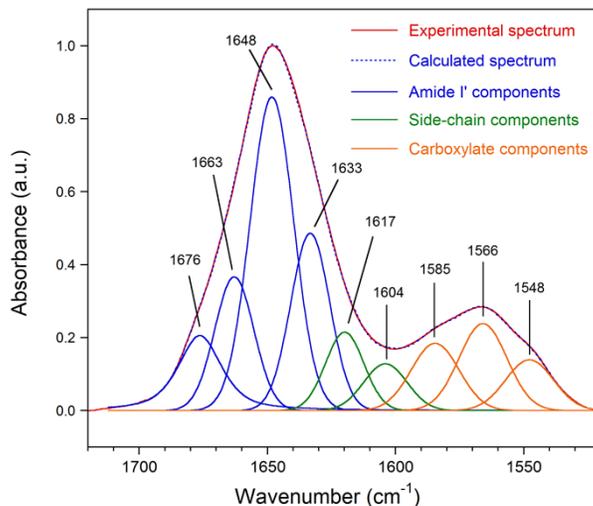


Figure 3.3 : Decomposition of the spectrum of Rec-nMyr (1 mM in D₂O buffer) in the presence of 10 mM Ca²⁺ at 25 °C, in the 1720-1520 cm⁻¹ frequency range.

As opposed to the amide I' band, the $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ vibration near 1560-1570 cm⁻¹ exhibits spectral alterations depending on the presence or absence of calcium and a myristoyl group (Figure 3.2). This band originates from the vibrations of glutamic acid and aspartic acid side chains that arise near 1558 and 1585 cm⁻¹, respectively.^{284, 286} Histidine residues may also contribute in this region, although they seem to be in too small amount (three residues) with respect to glutamic acid (25 residues) and aspartic acid (11 residues). This vibrational mode is well-known to be sensitive to the binding of divalent cations and to the coordinated structure formed.²⁸⁷ More generally, this vibration may also be affected by its environment, especially by the formation of hydrogen bonds with water.

In the absence of calcium, the maximum of this band is similar for Rec-Myr and Rec-nMyr (1570 and 1568 cm⁻¹, respectively). A shoulder can also be seen in this band for both proteins near 1585 cm⁻¹. Despite these similarities, the spectra also display differences in this region, especially near 1550 cm⁻¹. This band is indeed broader on the low-wavenumber side for Rec-Myr, suggesting that its carboxylate groups experience more diversified environments. The 3D representations of recoverin suggest that all aspartic and glutamic acid side chains are water-exposed except those located close to the myristoyl chain, notably those that belong to the EF-hand 1.¹¹⁶ It is probable that the presence of the myristoyl chain located inside the protein prevents these COO⁻ groups from being exposed

to the aqueous environment, leading to a more heterogeneous environment of the carboxylate groups. The structure of Rec-nMyr suggests that its carboxylate groups experience a more homogeneous environment that is consistent with the expectation that all side-chains are equally solvent-exposed in the absence of the myristoyl chain.¹¹⁶

In the presence of calcium, the $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ band is virtually identical for both Rec-Myr and Rec-nMyr, indicating that the absence of the myristoyl chain has no effect on the binding of calcium. Calcium binding results in a small shift of the maximum of the band from 1568-1570 to 1566 cm^{-1} and in the appearance of a shoulder near 1547 cm^{-1} . These differences are in agreement with the literature²⁴² and are due to the binding of calcium to the carboxylate groups of glutamic acid and/or aspartic acid. The 1547 cm^{-1} component has been assigned to the coordination of calcium with the COO^- group of glutamic acid in the bidentate state.²⁴²

3.5.2 Effect of calcium and myristoylation on the thermal stability of recoverin

In the presence of calcium, no significant modification of the amide I' band is observed with temperature, showing a total thermal stability for Rec-Myr (Figure 3.4A) up to 65 °C. The small shift of the $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ band from 1569 to 1566 cm^{-1} suggests a weakening of the interactions of the carboxylate groups with both water and calcium with an increase in temperature (Figure 3.4A).

In the absence of calcium, no strong modification of the amide I' band occurs until 52-54 °C (Figure 3.4B). However, from this temperature, one can observe the appearance of two well-defined bands at 1684 and 1615 cm^{-1} with intensities that increase with temperature. Simultaneously, the intensity at $\sim 1648 \text{ cm}^{-1}$ decreases. These spectral changes are due to the formation of ordered intermolecular antiparallel β -sheets⁶² at the expense of the native α -helical structural components. This phenomenon is irreversible (data not shown). It is often observed for proteins and is characteristic of the denaturation of proteins accompanied by aggregation.^{263, 397-399} These data clearly demonstrate that recoverin is stabilized by calcium, although the binding and removal of this cation do not seem to affect the protein secondary structure at 25 °C (Figure 3.2). Moreover, it can again be observed that the $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ band shifts towards higher wavenumbers with

temperature, thereby indicating a weakening of the interactions of the carboxylate groups with its environment.

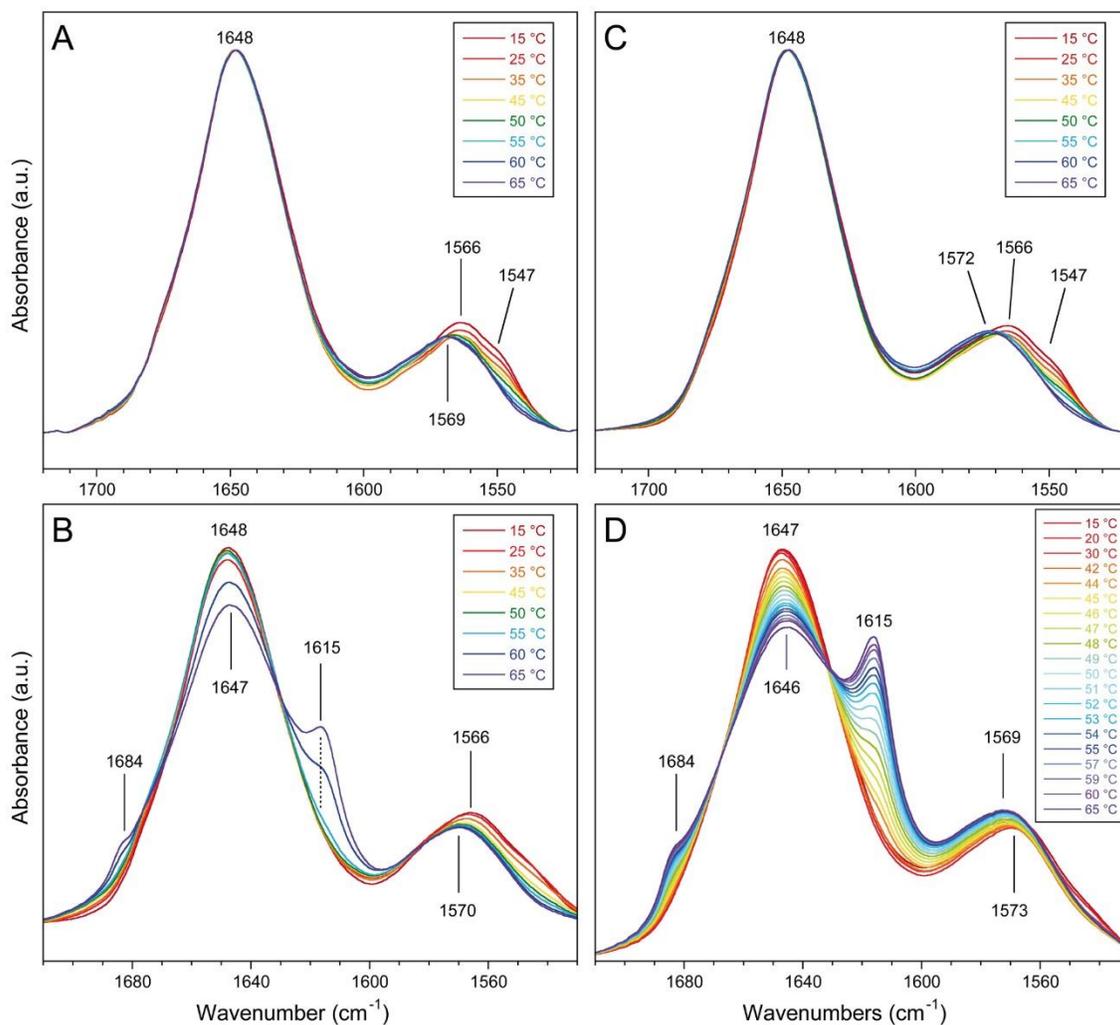


Figure 3.4 : Spectra of (A and B) Rec-Myr and (C and D) Rec-nMyr (1 mM in D₂O buffer) as a function of temperature in the (A and C) presence (10 mM Ca²⁺) and (B and D) absence of Ca²⁺ (0.5 mM EGTA), in the 1720-1520 cm⁻¹ frequency range.

In the case of Rec-nMyr, the spectral evolution observed in the 1720-1520 cm⁻¹ frequency range with temperature is very similar to that of Rec-Myr (Figure 3.4). No significant change of the amide I' band can be observed in the presence of calcium, showing again that the protein, either myristoylated or not, is highly stabilized when it is coordinated by calcium. Thus, the myristoylation of recoverin appears to have no impact on the thermal stability of recoverin when calcium is present. However, this conclusion is only valid in the

temperature range presented here and at high calcium concentrations. Indeed, as will be shown below, the thermal stability of Rec-Myr and Rec-nMyr is different at lower calcium concentrations.

In the absence of calcium, Rec-nMyr behaves the same as Rec-Myr (Figure 3.4). Indeed, the amide I' band of Rec-nMyr remains stable until two components appear because of β -aggregation. The position of these bands is the same as those of Rec-Myr, thus suggesting that Rec-nMyr forms the same type of β -sheets as Rec-Myr. However, the β -sheet components arise at lower temperatures for Rec-nMyr, and its extent of aggregation is higher as judged from the intensity of these components at 65°C (see below). Thus, the myristoyl moiety reduces the extent of denaturation of recoverin in the absence of calcium.

To characterize more quantitatively the thermal stability of myristoylated and nonmyristoylated recoverin, the area of the β -sheet component at 1685 and 1615 cm^{-1} , $A(1685 + 1615 \text{ cm}^{-1})$, has been measured as a function of temperature. To this end, a linear baseline has been subtracted under the amide I' band (1710-1590 cm^{-1} range) and the spectrum of the series preceding aggregation (onset of aggregation) has been subtracted from all subsequent spectra. A typical series of difference spectra is shown in Figure 3.5 for Rec-nMyr in the presence of 0.5 mM EGTA (the conditions under which recoverin aggregates most). This analytical procedure magnifies the progressive appearance of the bands at 1685 and 1615 cm^{-1} with heating and the concomitant disappearance of the native amide I' band. Two isosbestic points can be seen near 1675 and 1628 cm^{-1} and are also observed under other conditions (see Figures S3.1-S3.4 of the Supporting information). Such isosbestic points suggest that the aggregation of recoverin is a two-state process, the native structures being progressively converted into intermolecular β -sheets without any intermediate.

The measurement of the area of these bands as a function of temperature allows a semiquantitative evaluation of the extent and kinetics of aggregation under different conditions. Moreover, to better understand the effect of calcium on the structure of recoverin, its thermal stability has been investigated as a function of calcium concentration (1-10 mM Ca^{2+}). The data are shown in Figure 3.6 (spectra are shown in Figures S3.1-S3.4 of the Supporting information).

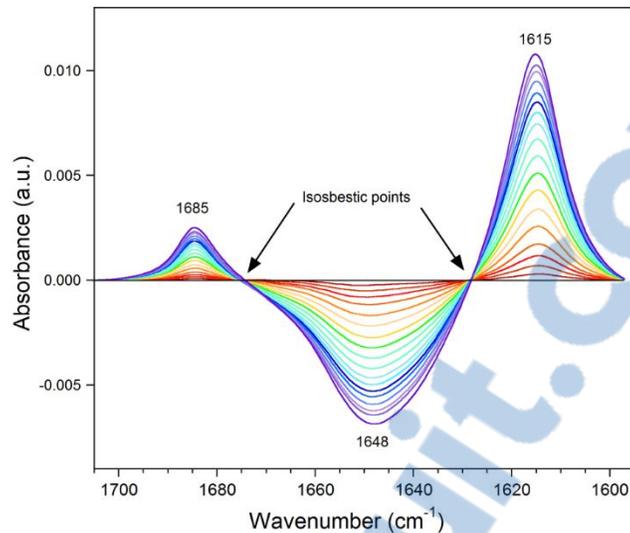


Figure 3.5 : Difference spectra of Rec-nMyr (1 mM in D₂O buffer) as a function of temperature from 42 to 65 °C in the absence of calcium (0.5 mM EGTA), in the 1700-1600 cm⁻¹ frequency range. The difference spectra are obtained by subtracting the spectrum of the series preceding aggregation from all subsequent spectra.

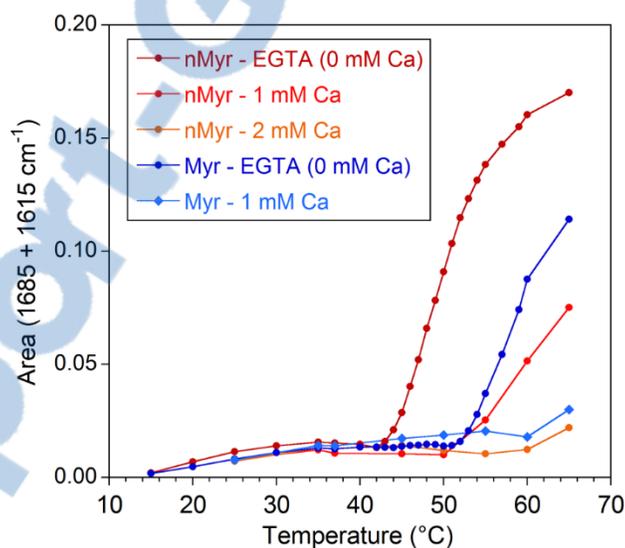


Figure 3.6 : Area at 1685 and 1615 cm⁻¹ [A(1685 + 1615 cm⁻¹)], corresponding to the formation of β -sheets, of Rec-Myr and Rec-nMyr (1 mM in D₂O buffer) as a function of temperature and calcium concentration. The uncertainty in A(1685 + 1615 cm⁻¹) is ± 0.02 .

The data are not shown for Rec-Myr and Rec-nMyr in the presence of 10 mM calcium and for Rec-Myr in the presence of 2 mM calcium because no aggregation occurs in these cases, so that $A(1685 + 1615 \text{ cm}^{-1})$ is zero at all temperatures, thus showing that above a certain calcium concentration threshold, the protein is thermally stable (up to 65 °C). The data shown in Figure 3.6 confirm that, in the absence of calcium (0.5 mM EGTA), Rec-Myr and Rec-nMyr self-aggregate and that Rec-nMyr is more prone to aggregation than Rec-Myr. In fact, Rec-nMyr aggregates at a temperature (42-44 °C) lower than that of Rec-Myr (52-54 °C), and the level of aggregation at 65 °C is larger for Rec-nMyr. It can also be seen that the extent of aggregation decreases with an increase in calcium concentration for both Rec-Myr and Rec-nMyr. In any case, the amount of intermolecular β -sheets is larger for Rec-nMyr than for Rec-Myr for a given calcium concentration.

Rec-Myr is relatively stable at 1 mM calcium (1:1 recoverin:Ca²⁺ molar ratio), as a slight formation of intermolecular β -sheets appears only at 65 °C. As mentioned above, no aggregation occurs at 2 mM calcium (1:2 recoverin:Ca²⁺ molar ratio that corresponds to the ratio allowing binding of both functional EF-hands of recoverin by calcium). In contrast, Rec-nMyr still exhibits bands at 1685 and 1615 cm⁻¹ at this calcium concentration, although with a weak intensity. The results are detailed in Figure 3.7, where the evolution of the β -sheets bands at 65 °C is plotted as a function of calcium concentration. This figure highlights the fact that Rec-Myr is more stable than Rec-nMyr and the fact that the β -sheet content of these proteins at 65 °C decreases as the calcium concentration increases.

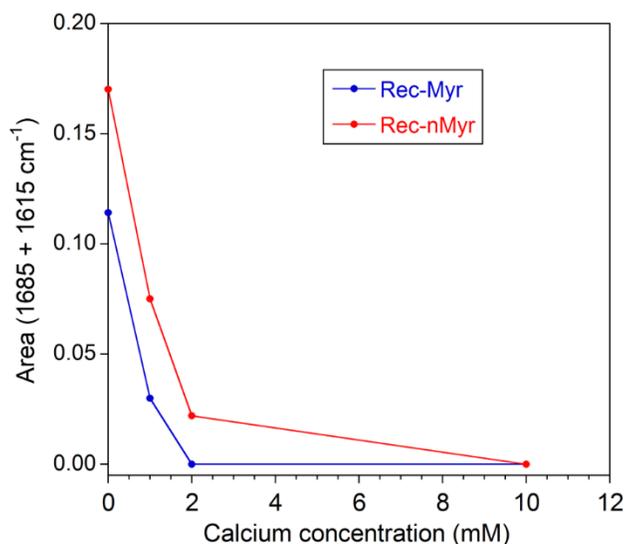


Figure 3.7 : $A(1685 + 1615 \text{ cm}^{-1})$ of Rec-Myr and Rec-nMyr (1 mM in D_2O buffer) at 65°C as a function of calcium concentration. The uncertainty in $A(1685 + 1615 \text{ cm}^{-1})$ is ± 0.02 .

3.6 Discussion

Infrared spectroscopy was used in this study to investigate the effect of calcium concentration and of myristoylation on the thermal stability of recoverin. Both the nonmyristoylated and myristoylated forms of recoverin were studied at calcium concentrations of 1, 2 and 10 mM, while the recoverin concentration was kept at 1 mM. These data show that in excess calcium, Rec-Myr and Rec-nMyr are totally stable up to 65°C , suggesting that there is no or only a weak influence on the thermal stability of the protein regardless of whether the myristoyl moiety protrudes from the protein hydrophobic pocket or is absent. Indeed, a small shift of the midtransition temperature of 0.6°C has recently been observed by CD spectroscopy upon myristoylation.²²⁴ Below a certain calcium concentration threshold, the protein denatures and undergoes β -aggregation. This type of aggregation is different from that proposed by Kataoka et al.,³⁷⁵ which has to be associated with oligomerization. This calcium concentration threshold is 2 mM for Rec-Myr. Because the protein concentration is 1 mM in these experiments, this means that when two calcium cations or more are available for the myristoylated protein, it is thermally stable (under these heating conditions).

It is well-established that two calcium cations can bind recoverin at EF-hands 2 and 3^{74, 99},



¹¹⁶ in a successive manner.¹¹⁸ This coordinated configuration seems then to correspond to the most stable structure. The stabilization effect of calcium was also demonstrated by the study of the effect of amino acid substitutions in EF-hand sites of recoverin on its calcium binding properties.¹¹⁸ On the other hand, the increase in the thermal stability of recoverin in the presence of calcium was reported in microcalorimetric,¹¹⁸ fluorescence,²⁴³ and CD²²⁴ studies. In these studies, the calcium-induced increase in stability ranges between 5-6 °C and 15 °C. These IR data show an ~10 °C stability increase in an excess of calcium (1:10 recoverin:Ca²⁺ molar ratio). The temperature difference may be due to the fact that these techniques do not probe the same parameters and physical phenomena. Calorimetry provides thermodynamic parameters while spectroscopy is sensitive to changes at the molecular level. In addition, CD and even more fluorescence spectroscopy are sensitive to tertiary structural unfolding, while the IR amide I' band is affected by change in secondary structure resulting from aggregation. It is interesting to note that the effect of calcium on protein stability has also been observed for other proteins of the NSC family, namely with guanylate cyclase activating protein-2 (GCAP-2)³⁷⁹ and guanylyl cyclase activating protein 1 (GCAP-1)^{377, 400}. Other EF-hand-containing proteins such as S100A2³⁷⁶ and α -amylase³⁷⁸ have also demonstrated an increased thermal stability with increasing calcium concentration.

The situation is slightly different for Rec-nMyr compared to that for Rec-Myr at low calcium concentrations. For Rec-nMyr, a slight aggregation is observed at 2 mM calcium, showing that Rec-nMyr is not as stable as Rec-Myr. Thus, it seems that the structure of Rec-nMyr is less stable than Rec-Myr when coordinated. In the latter case, this would suggest that the myristoyl chain plays a significant role in recoverin stability. In both cases, Rec-nMyr appears to be less stable than Rec-Myr at low calcium concentrations and in the absence of calcium. These observations thus suggest that the N-terminal myristoyl chain stabilizes recoverin, which is in line with crystallographic data obtained with Rec-nMyr¹²¹ showing that the myristoyl modification significantly stabilizes the conformation of the calcium-free protein. From IR data, this stabilization cannot be explained by differences in the "native" (i.e., before heating) secondary structure, but major tertiary structure changes may result from the absence of the myristoyl chain.^{39, 40, 112} It is also possible that the myristoyl moiety perturbs some structural elements of its surrounding hydrophobic cavity that are important for the protein thermal stability.

Our IR data therefore show that the thermal stability of recoverin decreases at lower

calcium content, i.e., upon myristoyl sequestration. The results further suggest that the release of the myristoyl chain and consequent binding to lipid bilayer membranes (i.e., at high calcium concentrations) may lead recoverin to exhibit a structural stability enhanced compared to that of its myristoyl-sequestered form.

3.7 Conclusion

IR spectroscopy appears to be a useful technique for investigating the stability of recoverin. Overall, the results show that although calcium concentration and myristoylation have a weak effect on the secondary structure of recoverin, they have a significant impact on its thermal stability, thus suggesting changes in the intramolecular interactions and/or tertiary structure. Such structural alterations may be important for the biological function of recoverin. The fact that the structural integrity of recoverin is particularly high when the myristoyl chain is extruded from its hydrophobic pocket may be necessary for the protein to be not too strongly affected by membrane binding, thus to keep a functional structure. This conclusion has to be confirmed by a study of the secondary structure of recoverin upon interaction with model membranes.

3.8 Acknowledgments

We thank Jean-François Rioux-Dubé for technical assistance and Philippe Calvez for helpful discussions.

3.9 Funding

This work was supported by the Natural Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada. The Regroupement québécois de recherche sur la fonction, la structure et l'ingénierie des protéines (PROTEO), the Centre de recherche sur les matériaux avancés (CERMA), the Centre québécois sur les matériaux fonctionnels (CQMF), and the Centre de recherche du CHU de Québec are thanked for the infrastructure they provide for the performance of the research. PROTEO and CQMF are supported by the Fonds de recherche du Québec - Nature et Technologies (FRQ-NT). K.P.-F. is the recipient of a scholarship from the FRQ-NT and NSERC, whereas G.V.-P. held a Frederick Banting and Charles Best Graduate Scholarship from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) as well as from the Réseau de recherche en santé

de la vision.

3.10 Supporting information

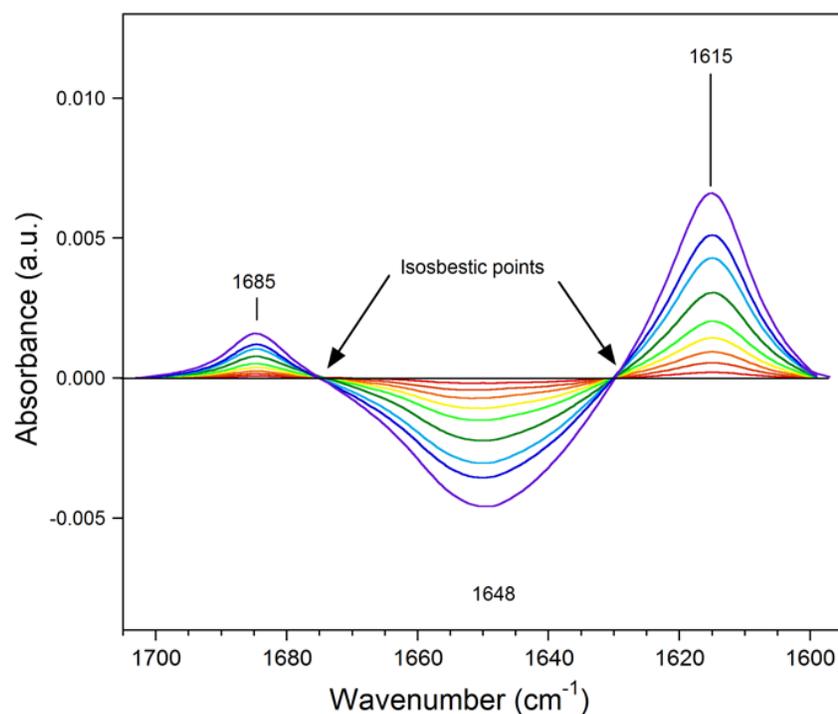


Figure S3.1 : Difference spectra of Rec-Myr (1 mM in D₂O buffer) as a function of temperature from 51 to 65 °C in the absence of calcium (0.5 mM EGTA), in the 1700-1600 cm⁻¹ frequency range. The difference spectra are obtained by subtracting the spectrum of the series preceding aggregation from all subsequent spectra. The absorbance scale is the same than in Fig 3.5.

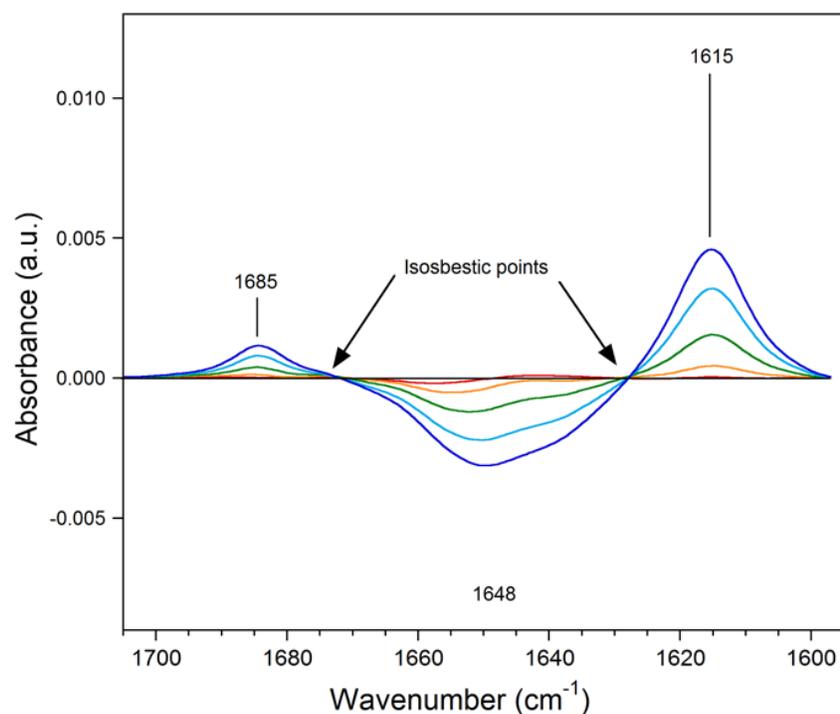


Figure S3.2 :Difference spectra of Rec-nMyr (1 mM in D₂O buffer) as a function of temperature from 51 to 65 °C in the presence of 1 mM calcium, in the 1700-1600 cm⁻¹ frequency range. The difference spectra are obtained by subtracting the spectrum of the series preceding aggregation from all subsequent spectra. The absorbance scale is the same than in Fig 3.5.

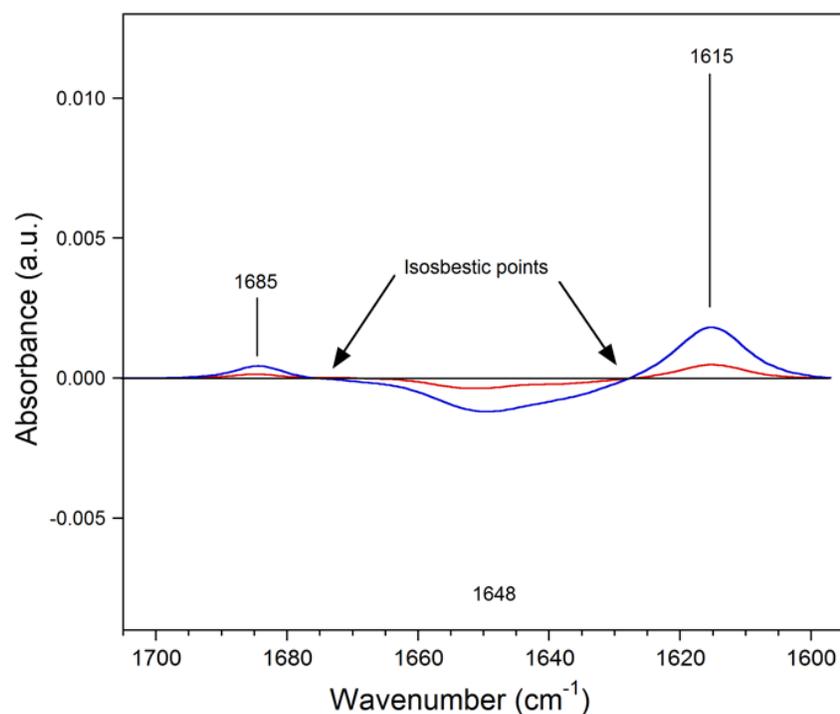


Figure S3.3 : Difference spectra of Rec-Myr (1 mM in D₂O buffer) as a function of temperature from 51 to 65 °C in the presence of 1 mM calcium, in the 1700-1600 cm⁻¹ frequency range. The difference spectra are obtained by subtracting the spectrum of the series preceding aggregation from all subsequent spectra. The absorbance scale is the same than in Fig 3.5.

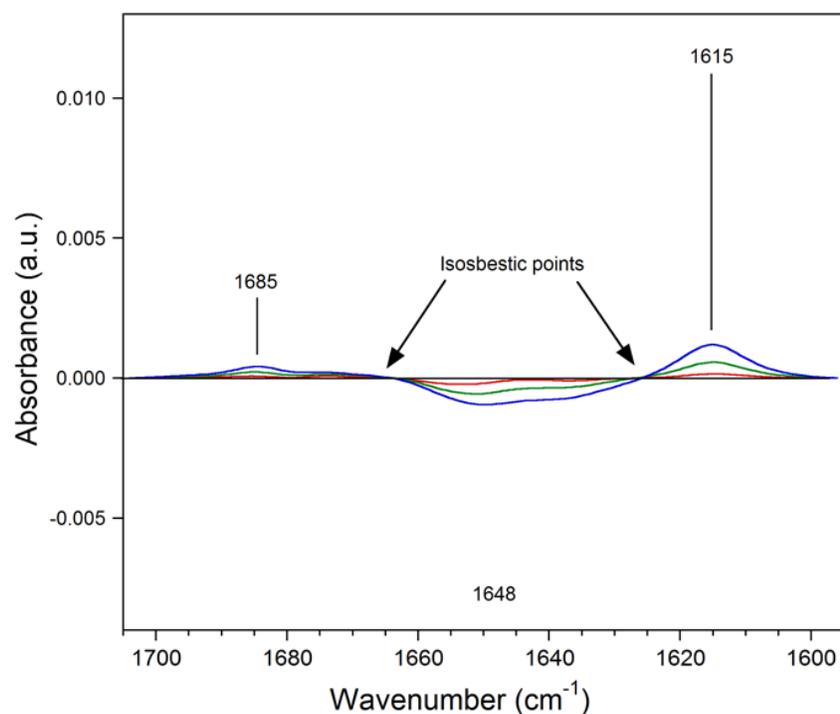


Figure S3.4 : Difference spectra of Rec-nMyr (1 mM in D₂O buffer) as a function of temperature from 51 to 65 °C in the presence of 2 mM calcium, in the 1700-1600 cm⁻¹ frequency range. The difference spectra are obtained by subtracting the spectrum of the series preceding aggregation from all subsequent spectra. The absorbance scale is the same than in Fig 3.5.

Chapitre 4

Discriminating lipid- from protein-calcium binding to understand the interaction between recoverin and phosphatidylglycerol model membranes

Kim Potvin-Fournier,^{1,2} Thierry Lefèvre,¹ Audrey Picard-Lafond,¹ Catherine Marcotte,¹ Caroline Dufresne,¹ Line Cantin,² Christian Salesses² et Michèle Auger¹

Article publié dans la revue *Biochemistry* 2016, 55, 3481-3491.

¹ Département de chimie, Regroupement québécois de recherche sur la fonction, l'ingénierie et les applications des protéines (PROTEO), Centre de recherche sur les matériaux avancés (CERMA), Centre québécois sur les matériaux fonctionnels (CQMF), Université Laval, Pavillon Alexandre-Vachon, 1045 avenue de la médecine, Québec, Québec G1V 0A6, Canada

² CUO-recherche, Centre de recherche du CHU de Québec, Hôpital du Saint-Sacrement, Département d'ophtalmologie, Faculté de médecine, PROTEO, Université Laval, Québec, Québec G1S 4L8, Canada

4.1 Résumé

La liaison membranaire de la recoverine aux disques du SEB dépend de la concentration en Ca^{2+} qui est différente à la noirceur et à la lumière, ce qui permet de réguler l'activité de la RK et, par conséquent, de la Rho. Afin d'améliorer notre compréhension du rôle de la recoverine, il est nécessaire de déterminer l'effet de la modulation de la concentration en Ca^{2+} sur sa liaison membranaire et son interaction avec les lipides anioniques. La spectroscopie IR a permis de mesurer l'effet de la disponibilité du Ca^{2+} sur la recoverine, cet ion divalent étant nécessaire pour observer une plus forte interaction avec les lipides anioniques saturés et insaturés. La séquestration du Ca^{2+} par les PG réduit le Ca^{2+} disponible pour la recoverine, ce qui réduit son interaction avec les lipides et sa stabilité thermique. La recoverine augmente la température de transition de phase des PG, ce qui suggère sa localisation périphérique. Les interactions membranaires n'affectent pas la structure secondaire de la recoverine. La disponibilité du Ca^{2+} module le recrutement de la recoverine à la surface des membranes de lipides anioniques.

4.2 Abstract

Recoverin is a protein involved in the phototransduction cascade by regulating the activity of rhodopsin kinase through a calcium-dependent binding process at the surface of rod outer segment disk membranes. Understanding how calcium modulates these interactions and how it interacts with anionic lipid membranes is necessary to gain insights into the function of recoverin. In this work, infrared spectroscopy allowed us to show that the availability of calcium to recoverin is modulated by the presence of complexes involving phosphatidylglycerol (PG), which in turn regulates its interactions with this negatively charged lipid. Calcium can indeed be sequestered into strongly bound complexes with PG and is thus sparingly available to recoverin. The thermal stability of recoverin then decreases, which results in weakened interactions with PG. By contrast, when calcium is fully available to recoverin, the protein is thermally stable, indicating that it binds two calcium ions, which results in favorable interactions with negatively charged lipids. Consequently, the protein induces an increase in the chain-melting phase transition temperature of PG, which is indicative of an enhanced lipid chain packing resulting from the peripheral location of the protein. The secondary structure of recoverin is not affected by its interactions with anionic membrane lipids. Similar results have been obtained with saturated and unsaturated anionic lipids. This work shows that the recruitment of recoverin

at the surface of anionic lipid membranes is dependent on the availability of calcium.

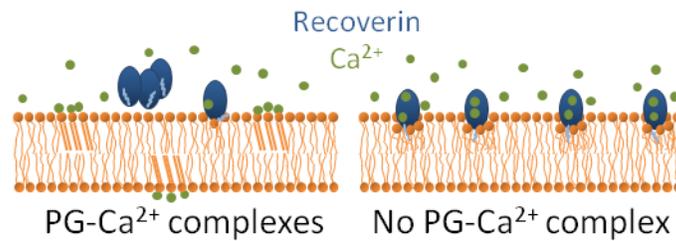


Figure 4.1 : Figure de *Table of content*.

4.3 Introduction

The family of neuronal calcium sensor (NCS) proteins includes 14 members.¹⁰¹ These proteins are exclusively expressed in neurons, endocrine cells, and photoreceptors.¹⁰¹ They play major functions in the regulation of ion channel and neurotransmitter release as well as in lipid metabolism, in phototransduction, and in the control of cyclic nucleotide metabolism and gene expression.¹⁰⁰ Eleven members of the NCS family are N-terminally acylated with a myristoyl group.⁶⁰ All NCS proteins have four EF-Hand motifs.¹¹⁶ The canonical EF-Hand comprises 29 amino acids, which include two α -helices linked together by a β -turn composed of nine amino acids.⁷⁴ When coordination of a calcium ion (Ca^{2+}) occurs in this loop, the conformation of the EF-Hand motif changes.^{73, 76} Some of the members of the NCS family undergo a calcium-myristoyl switch as a result of Ca^{2+} coordination,⁴⁰¹ a phenomenon by which the tertiary structure of the NCS changes as a function of Ca^{2+} concentration.

Recoverin is the most widely studied member of the NCS family.⁴⁰² It is a α -helix-rich protein that is located in rod outer segments.¹⁰⁸ Recoverin is the only NCS for which the Ca^{2+} -myristoyl switch has been demonstrated without ambiguity on the basis of its structure in the presence and absence of Ca^{2+} .^{39, 40, 112} Indeed, at high Ca^{2+} concentrations, EF-Hand motifs 2 and 3 of recoverin bind Ca^{2+} , which results in the extrusion of its myristoyl group from a hydrophobic cleft, thus promoting the recruitment of this protein at the membrane surface.²³⁹ Conversely, low Ca^{2+} concentrations culminate in the dissociation of Ca^{2+} from recoverin and in the sequestration of its myristoyl group in the hydrophobic pocket, which causes the dissociation of this protein from the membrane.^{39, 40,}

Recoverin is located on the cytosolic face of rod outer segment disk membranes where ~20% phosphatidylserine, 20% phosphatidylcholine (PC), and 60% phosphatidylethanolamine (PE) can be found on the basis of their asymmetric distribution.¹⁵⁴⁻¹⁵⁷ In addition, a very large percentage of rod outer segment membrane phospholipids are polyunsaturated.¹⁵² Several *in vitro* studies have shown that the binding of recoverin to lipid model membranes is favored by its myristoyl moiety and the presence of Ca^{2+} .^{117, 135, 219, 220, 233, 236, 239, 403, 404} Valentine et al.²³⁹ have postulated that the solvent-exposed positively charged residues of recoverin upon Ca^{2+} binding favor its binding to negatively charged phospholipids. However, despite several studies devoted to recoverin lipid binding,^{117, 135, 219, 220, 233, 236, 239, 403, 404} the importance of negatively charged phospholipids and acyl chain unsaturation on recoverin function remains unclear. Moreover, although the thermal stability of recoverin in solution has been studied in the presence and absence of Ca^{2+} using several techniques,^{118, 224, 243, 405} the effect of negatively charged lipids on recoverin structure and stability is still elusive. Finally, the affinity of Ca^{2+} and its influence on both the lipids and recoverin, as well as on their interactions, are far from being understood.

The objective of this study was thus to improve our understanding of the effect of negatively charged membranes on the structure and thermal stability of recoverin in the presence of Ca^{2+} and, conversely, the effect of this protein on the organization of lipid bilayers. We have thus used infrared (IR) spectroscopy to examine myristoylated (Rec-Myr) and nonmyristoylated (Rec-nMyr) recoverin secondary structure and their effects on the hydrophobic core, interfacial region, and polar head group of both saturated and unsaturated lipid bilayers. Because the asymmetric stretching band of the phosphatidylserine carboxylate group overlaps with the amide I band of proteins, the negatively charged phosphatidylglycerol (PG) has been used as an analog of phosphatidylserine. Particular attention has been paid to the way Ca^{2+} affects the protein and the lipids and on their mutual interactions.

4.4 Materials and methods

4.4.1 Materials

The deionized water prepared using a Barnstead NANOpurII system (Boston, MA) had a resistivity of 18.2 M Ω ·cm. Deuterium oxide (D₂O) was obtained from CDN isotopes (Pointe-Claire, QC). Ethanol was purchased from Commercial Alcohols, the industrial and beverage alcohol division of GreenField Ethanol (Brampton, ON) and chloroform was from VWR International (Radnor, PA). All solvents were of reagent grade or high-performance liquid chromatography (HPLC) grade and used without any further purification. CaCl₂, NaOH, sodium myristate, and 2-mercaptoethanol were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Ethylene glycol bis(β -aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA), NaCl, and NH₄HCO₃ were from Laboratoire Mat (Québec, QC). HEPES was from Fisher (Fair Lawn, NJ). Salts were of analytical grade and used as received. All lipids [1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (sodium salt) (DMPG), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (sodium salt) (DOPG), and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (sodium salt) (POPG)] were from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL), received as chloroform solutions, and used without purification.

4.4.2 Expression and purification of recoverin

Myristoylated recoverin (Rec-Myr) and nonmyristoylated recoverin (Rec-nMyr) were expressed and purified as previously reported by Ray et al.¹⁰⁸ with the modifications described by Desmeules et al.²⁴⁵ The myristoylation level of Rec-Myr was determined by HPLC to be >97% as described previously.²⁴⁵ Salts were removed as described by Potvin-Fournier et al.⁴⁰⁵ Protein solutions were lyophilized and stored at -20 °C before being used. The concentration of recoverin was determined by UV-visible spectroscopy using a molar absorption coefficient of 22,150 M⁻¹·cm⁻¹ at 280 nm (to be published elsewhere).

4.4.3 Sample preparation

Lyophilized protein samples were hydrated with buffers containing 100 mM NaCl, 25 mM HEPES, and 1 mM 2-mercaptoethanol (pH 7.5) with 10 mM CaCl₂ ("Ca buffer") or 0.5 mM EGTA ("EGTA buffer", containing no Ca²⁺). Aqueous buffers were used to investigate the

IR phosphate bands of lipids. For the investigation of the lipid carbonyl and acyl chain as well as protein amide I bands, buffers were lyophilized and rehydrated with the same volume of D₂O containing 1 mM 2-mercaptoethanol.

Lipid chloroform solutions were dried under a nitrogen stream, lyophilised overnight, and then stored at -20 °C. Two types of sample were prepared. For the “nonmelted complexes” (nMC) protocol, multilamellar lipid vesicles (MLVs) were prepared by adding the appropriate volume of H₂O or D₂O buffer to the dried lipids (7.5 μL/mg of lipid), followed by five cycles of mechanical agitation and freeze-thawing in liquid nitrogen and at 37 °C (i.e., above the lipid chain melting temperature, T_m). When the MLV samples contained recoverin, the appropriate amount of lipids was hydrated with the protein solutions at a final lipid:protein ratio of 200:1. For the “melted complexes” (MC) protocol, pure MLVs were prepared by dissolving the dried lipids in the H₂O or D₂O buffer (7.5 μL/mg of lipid) in the presence of Ca²⁺ (10 mM) with five cycles of mechanical agitation and freeze-thawing in liquid nitrogen and at 82 °C (as opposed to 37 °C in the nMC protocol). Recoverin was then added at the same lipid:recoverin ratio of 200:1. To this end, the appropriate volume of protein in aqueous buffer [100 mM NaCl, 25 mM HEPES, and 1 mM 2-mercaptoethanol (pH 7.5)] was subsequently added to the MLVs to reach a total volume of 15 μL of buffer/mg of lipid. However, thawing was performed only at 37 °C to prevent any irreversible thermal denaturation of recoverin.⁴⁰⁵

4.4.4 Infrared (IR) spectroscopy

IR spectra were recorded using either a Magna 560 or 760 FTIR spectrometer from Nicolet (Thermo Scientific, Madison, WI) equipped with a nitrogen-cooled MCT A detector and Omnic 5.2 software. The temperature was controlled using a home-built temperature controller (± 1 °C). The temperature was increased from 12 to 65 °C, with typical steps of 5 °C and a stabilization time of 3 min at each temperature. A sample volume of 5-9 μL was deposited between two CaF₂ windows (Spectral Systems, Hopewell Junction, NY) using a Mylar film spacer of 13 μm (Goodfellow Cambridge Ltd., Huntingdon, U.K.). Spectra represent the acquisition of 128 interferograms at a resolution of 4 cm⁻¹ using a Happ-Genzel apodization.

The spectrum of the appropriate buffer was first subtracted from the spectra of the lipid or lipid/protein samples. The water vapor contribution was first subtracted, and the spectra

were subsequently smoothed when necessary. Then, baseline correction (linear, cubic, or quadratic) was performed between 1780 and 1530 cm^{-1} (encompassing the carbonyl stretching [$\nu(\text{C}=\text{O})$], amide I, and asymmetric carboxylate stretching regions), 3000 and 2800 cm^{-1} (CH stretching region), and 1355 and 990 cm^{-1} (phosphate PO_2^- stretching and CH_2 wagging regions). For the analysis of the amide I band, the $\nu(\text{C}=\text{O})$ band of the pure lipid was subtracted before baseline correction. The position of the $\nu(\text{C}=\text{O})$ and symmetric CH_2 stretching [$\nu_s(\text{CH}_2)$] bands has been determined as a function of temperature using a homemade program that calculates the center of gravity of the area formed by the band under investigation and a horizontal baseline located at 90% of the peak height.²⁷⁶ The position of the other bands has been determined by the peak maximum. All spectra were treated using GRAMS/7 AI (Galactic Industries Corp., Salem, NH), except the Fourier self-deconvolutions that were performed with Omnic 5.2 using a Happ-Genzel apodization, with a bandwidth of 64.4 and an enhancement factor of 2.1.

4.5 Results

4.5.1 DMPG forms two populations: fully hydrated or Ca^{2+} -complexed

4.5.1.1 Evidence from the lipid acyl chain conformation

The top panel of Figure 4.2 presents the temperature dependence of the $\nu_s(\text{CH}_2)$ stretching band of DMPG prepared according to the nMC protocol in the absence and presence of recoverin. This vibrational band is well-known to be sensitive to lipid chain disorder and mobility, especially to the presence of *gauche* conformers.^{146, 271} At the gel-to-fluid phase transition temperature (T_m), the $\nu_s(\text{CH}_2)$ band of DMPG broadens and sharply shifts to higher wavenumbers.^{146, 266} In the absence of Ca^{2+} (EGTA samples), the pure lipid shows a phase transition at 24 °C, as expected for DMPG.¹⁴⁹ In the presence of 10 mM Ca^{2+} , T_m slightly increases to 25 °C and the steep rise in the $\nu_s(\text{CH}_2)$ wavenumber value is much smaller than in the absence of Ca^{2+} [Figure 4.2 (top), Table S4.1].

In the presence of recoverin and Ca^{2+} , T_m increases slightly (26 °C with Rec-Myr, 27 °C with Rec-nMyr) and the transition is less cooperative as judged from the slope of the thermotropic curves [Figure 4.2 (top)]. Moreover, the $\nu_s(\text{CH}_2)$ band position in the gel and fluid phases is higher in the presence of recoverin, indicating an increase in the level of lipid chain disorder. These observations indicate that recoverin interacts with DMPG

membranes, the slight increase in T_m suggesting that recoverin stabilizes the bilayers and that it binds to the membrane surface. This point is addressed in Discussion.

The data in Figure 4.2 (top) and Table S4.1 also show a small second thermotropic event in the presence of Rec-Myr in the temperature range of 40-55 °C, which can be interpreted as a second phase transition near 40 °C (red arrow) and near 42 °C for Rec-nMyr (blue arrow). A similar phenomenon, although to a smaller extent, occurs for the pure lipid in the presence of Ca^{2+} at ~ 58 °C (black arrow). This additional phase transition is more obvious in the $\nu(\text{C}=\text{O})$ region as described in more detail below.

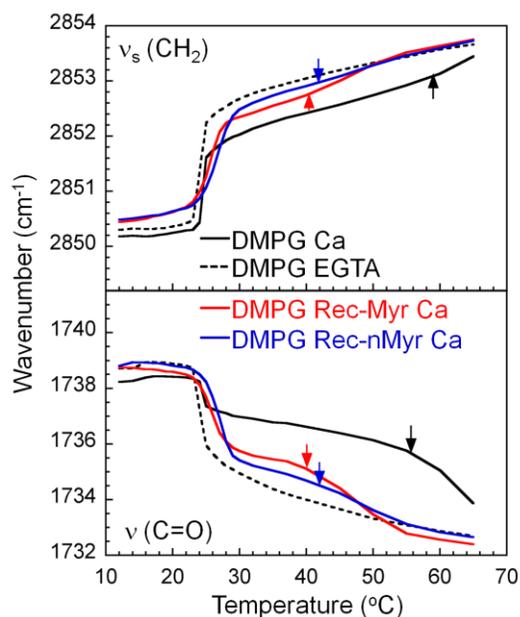


Figure 4.2 : Temperature dependence of the (top) $\nu_s(\text{CH}_2)$ and (bottom) $\nu(\text{C}=\text{O})$ wavenumbers of DMPG vesicles in the presence of Ca^{2+} (10 mM Ca^{2+}), in the absence and presence of Rec-Myr and Rec-nMyr at a 200:1 lipid:protein molar ratio. Samples were prepared according to the nMC protocol. The thermotropic curve of pure DMPG vesicles in the absence of Ca^{2+} (0.5 mM EGTA) is also shown for comparison. Arrows indicate the threshold of the phase transition of the Ca^{2+} -lipid complexes.

4.5.1.2 Evidence from the interfacial and polar head regions

Figure 4.3 shows the temperature dependence of the $\nu(\text{C}=\text{O})$ band of DMPG prepared according to the nMC protocol in the absence and presence of Ca^{2+} and recoverin. Like

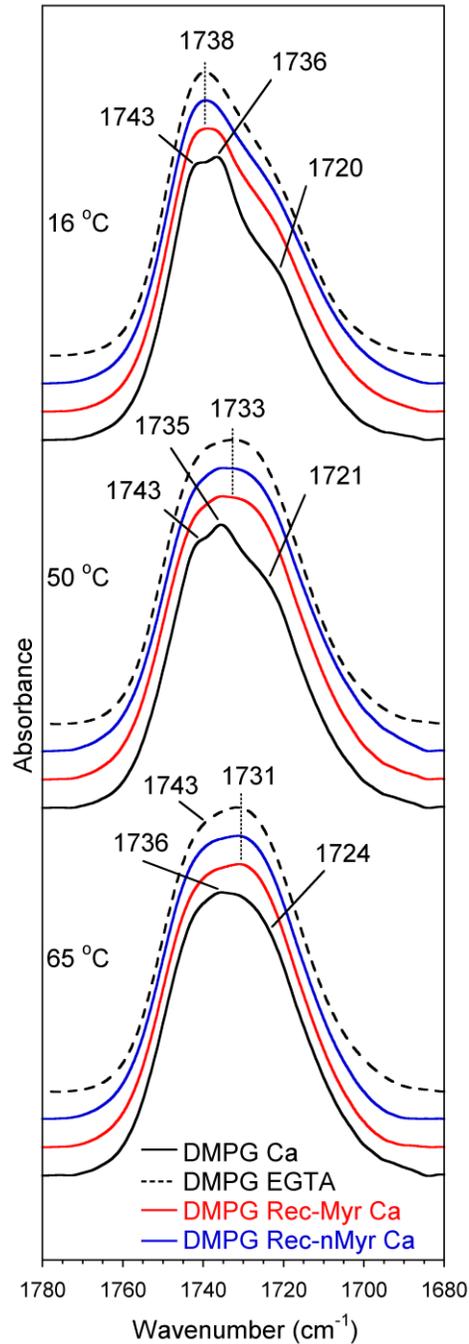


Figure 4.3 : Infrared spectra of DMPG vesicles in the $\nu(\text{C}=\text{O})$ region in the presence of Ca^{2+} (10 mM), in the absence and presence of Rec-Myr and Rec-nMyr at a 200:1 lipid:protein molar ratio at 16, 50 and 65 °C. Samples were prepared according to the nMC protocol. The spectrum of pure DMPG vesicles in the absence of Ca^{2+} (0.5 mM EGTA) is also shown for comparison. Spectra are normalized with respect to the band maximum and shifted for the sake of clarity.

other hydrated phospholipids, the $\nu(\text{C}=\text{O})$ band of DMPG (without Ca^{2+} or EGTA) is composed of two bands, one at $\sim 1738 \text{ cm}^{-1}$ assigned to free C=O groups and a second at $\sim 1720 \text{ cm}^{-1}$ assigned to hydrated (hydrogen-bonded) C=O groups.^{267, 272} At a temperature below the main phase transition [$16 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figure 4.3)], the low-wavenumber component of DMPG appears as a shoulder. Its intensity increases upon heating at the expense of the high-wavenumber component due to the larger amount of hydrated C=O groups in the fluid phase. The shoulder then disappears, and the $\nu(\text{C}=\text{O})$ band broadens with a maximum at $\sim 1731 \text{ cm}^{-1}$ at $65 \text{ }^\circ\text{C}$. The $\nu(\text{C}=\text{O})$ band is thus a marker of the hydration level of the interfacial region of lipid membranes. This change in the relative intensity of the two components results in a shift to lower wavenumbers of the band peak maximum with heating that can thus also be used to monitor lipid phase transitions.

The bottom panel of Figure 4.2 presents the temperature dependence of the position of the $\nu(\text{C}=\text{O})$ band of pure DMPG in the absence and presence of Ca^{2+} . In the absence of Ca^{2+} , the transition temperature occurs at $24 \text{ }^\circ\text{C}$, which is consistent with the $\nu_s(\text{CH}_2)$ data [Figure 4.2 (top)]. In the presence of Ca^{2+} , T_m is found to increase by $1 \text{ }^\circ\text{C}$ (Table S4.1), such as in the case of the $\nu_s(\text{CH}_2)$ band. On the basis of the small amplitude of the bandshift, the transition appears to be only partial. Subsequently, the wavenumber value decreases smoothly until $\sim 56 \text{ }^\circ\text{C}$, where a second thermotropic event occurs [black arrow, Figure 4.2 (bottom)], which is consistent with the $\nu_s(\text{CH}_2)$ data [Figure 4.2 (top) and Table S4.1].

The spectra of DMPG in the $\nu(\text{C}=\text{O})$ region in the presence of Ca^{2+} (Figure 4.3) actually exhibit three bands at ~ 1743 , ~ 1736 and $\sim 1720 \text{ cm}^{-1}$ (spectra at $16 \text{ }^\circ\text{C}$). They are more obvious in the deconvolved spectra (Figure S4.1) where they appear as sharp bands. Such features are unusual for hydrated lipids, but similar data have been observed in the presence of Ca^{2+} and other divalent cations for DMPG²⁴⁷ and phosphatidylserine.²⁴⁸⁻²⁵⁰ They have been attributed to non-hydrated, solidlike phospholipid-cation complexes resulting from the high affinity of divalent cations for these anionic phospholipids. Therefore, the addition of Ca^{2+} to DMPG in our experiments should result in the formation of such complexes.

Figure S4.2 shows vibrational bands originating from the “phosphate region” of DMPG. This region is dominated by two strong bands near 1214 and 1091 cm^{-1} assigned to

asymmetric [$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$] and symmetric [$\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$] phosphate stretching vibrations, respectively. Below T_m , the $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ band overlaps with the CH_2 wagging progression modes originating from ordered lipid chains and arising between 1380 and 1150 cm^{-1} .²⁷⁷ This region also contains a vibrational mode at 1068 cm^{-1} and a shoulder at 1046 cm^{-1} assigned to the two C-O-P stretching modes of the phosphodiester moiety.^{247, 277} As can be seen at 16 °C and to a lesser extent at 37 and 50 °C, Ca^{2+} modifies the high-wavenumber side of the broad $\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$ feature (near 1218-1230 cm^{-1}), indicating that the polar head group of DMPG is also affected by the formation of the solidlike phospholipid-cation complexes.

Melting of DMPG- Ca^{2+} complexes at >56 °C is actually related to the second thermal event observed on the $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ and $\nu(\text{C}=\text{O})$ curves (arrows in Figure 4.2) and is characterized by an increase in chain disorder and carbonyl group hydration. At 65 °C, the sharp $\nu(\text{C}=\text{O})$ components are no longer visible (Figure 4.3), suggesting that the complexes have melted. A similar observation can be made in the phosphate region (Figure S4.2), where spectral differences at 1218-1230 cm^{-1} disappear with heating (spectra at 65 °C). However, inspection of the deconvolved $\nu(\text{C}=\text{O})$ bands (Figure S4.1) reveals the persistence of the three band components at 65 °C showing that there are residual complexes left for pure DMPG. These spectra thus represent the superposition of a two-phase system composed of a fluid phase of fully hydrated DMPG with a solid phase formed of DMPG- Ca^{2+} complexes. These observations lead us to anticipate that less Ca^{2+} may be available for binding to recoverin under such experimental conditions.

In the presence of recoverin, the $\nu(\text{C}=\text{O})$ thermotropic curve shows that T_m slightly increases, which is consistent with the $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ data (Figure 4.2 and Table S4.1). In particular, Rec-nMyr affects the main phase transition of DMPG in a manner slightly more extensive than that of Rec-Myr [ΔT_m of +2 °C for Rec-nMyr and +1 °C for Rec-Myr, (Table S4.1)]. The amplitude of the shift of the $\nu(\text{C}=\text{O})$ wavenumbers at T_m is larger when recoverin is present while the melting temperature of the DMPG- Ca^{2+} complexes, T_c , decreases to ~40 °C (Figure 4.2). This second transition is globally more visible with the $\nu(\text{C}=\text{O})$ band on the basis of the larger wavenumber shift observed in Figure 4.2 than in the case of the $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ band (compare the difference in wavenumbers between 35 and 65 °C for the solid curves). This is due to the fact that the presence of the sharp component at 1735 cm^{-1} dominates the position of the $\nu(\text{C}=\text{O})$ band, which is then strongly affected by

the presence of the DMPG-Ca²⁺ complexes. The observation of an equivalent $\nu(\text{C=O})$ wavenumber in the presence of recoverin at 65 °C and for pure DMPG in the absence of Ca²⁺ (Figure 4.3), i.e. in the absence of the complexes, strongly suggests that all complexes have melted above 55 °C when recoverin is present. Deconvolution of the $\nu(\text{C=O})$ band (Figure S4.1) confirms that the complexes are still present at 55 °C, but not at 65 °C. Thus, IR data suggest that the DMPG-Ca²⁺ complexes progressively melt above 40 °C in the presence of recoverin.

This “protecting effect” of recoverin against DMPG-Ca²⁺ complex formation may be related to the binding of some Ca²⁺ to the protein (thus depriving lipids from Ca²⁺) or to the occurrence of Rec-PG interactions (thus restricting the binding of Ca²⁺ to DMPG). Because T_c decreases by ~ 16-18 °C in the presence of recoverin (Table S4.1), one can argue that the protein binds some of the Ca²⁺ ions, thus partly depriving lipids from this cation. As discussed below, this hypothesis is supported by the higher binding constant of recoverin¹¹⁵ with Ca²⁺ compared to that of DMPG with this cation.⁴⁰⁶ It is also consistent with the fact that T_c varies with the lipid:Ca²⁺ molar ratio.^{146, 247, 248, 251} Our own experiments with pure DMPG vesicles show that T_c decreases from ~ 56 to 47 °C when the Ca²⁺ content decreases from 10 to 5 mM (data not shown). Then, while the binding of recoverin to DMPG may prevent the formation of complexes between DMPG and Ca²⁺, it seems that the higher affinity of recoverin for Ca²⁺ makes this ion less available for DMPG, thus decreasing T_c .

As judged from the thermotropic curves (Figure 4.2), this “protective effect” is slightly more efficient with Rec-nMyr than Rec-Myr, indicating that less Ca²⁺ is available for the lipids in the presence of the nonmyristoylated protein. Indeed, Figure S4.1 shows that at 16 °C, the $\nu(\text{C=O})$ bands of the PG-Ca²⁺ complexes at 1736 cm⁻¹ are better resolved in the presence of Rec-Myr than of Rec-nMyr, which indicates that the complexes are less abundant in the latter case. This result suggests that the myristoylated protein captures less Ca²⁺ ion than the nonmyristoylated one, a conclusion supported by the apparently stronger Ca²⁺ binding for Rec-nMyr than for Rec-Myr, which is based on their dissociation constants (see below).¹¹⁵

4.5.1.3 Evidence from recoverin secondary structure

Figure 4.4 shows the IR spectra in the amide I region of Rec-Myr and Rec-nMyr at 15 and

65 °C in the presence of 10 mM Ca^{2+} and of DMPG MLVs. Spectra of these proteins in the absence of lipids but in the presence of the same concentration of Ca^{2+} are presented for comparison. The peak maximum of the amide I band for all spectra is located at 1647 cm^{-1} , showing the predominance of α -helices, in agreement with previous results.^{39, 40, 112, 242, 405} The width of the amide I band indicates the presence of additional band components arising from other secondary structures as shown in previous studies.^{39, 40, 112, 242, 405} The shape of the amide I band of myristoylated and nonmyristoylated recoverin at 15 °C is similar in the absence and presence of lipids, indicating no alteration of the secondary structure of the protein by the lipids at this temperature. Also, recoverin secondary structure does not change when the lipids undergo their phase transition (data not shown).

In accordance with previous results, the spectra of myristoylated and nonmyristoylated recoverin in solution are identical at 15 and 65 °C, thus showing that the protein is thermally stable in the presence of Ca^{2+} (Figure 4.4), which is not the case in the absence of Ca^{2+} .⁴⁰⁵ In fact, recoverin has a higher thermal stability in solution as the Ca^{2+} content increases up to $\sim 2\text{ mM}$.⁴⁰⁵ The binding of Ca^{2+} is thus crucial for the stability of recoverin. In the presence of DMPG vesicles, two bands located at 1684 and 1619 cm^{-1} can be observed at 65 °C. They are attributed to antiparallel intermolecular β -sheet structures resulting from protein aggregation.³⁸⁹ Recoverin is thus destabilized in the presence of DMPG bilayers, likely because of the lower availability of Ca^{2+} as a result of the presence of complexes of Ca^{2+} with DMPG. However, because the β -sheet bands are less intense than those observed for the pure protein in the absence of Ca^{2+} ,⁴⁰⁵ a certain amount of Ca^{2+} is likely bound to recoverin, which slightly improves its stability. This observation is in line with the conclusion reached above regarding the fact that less Ca^{2+} is bound to DMPG in the presence of recoverin. However, as DMPG- Ca^{2+} complexes progressively melt with an increase in temperature, Ca^{2+} may be released and become gradually available for binding of recoverin upon heating.

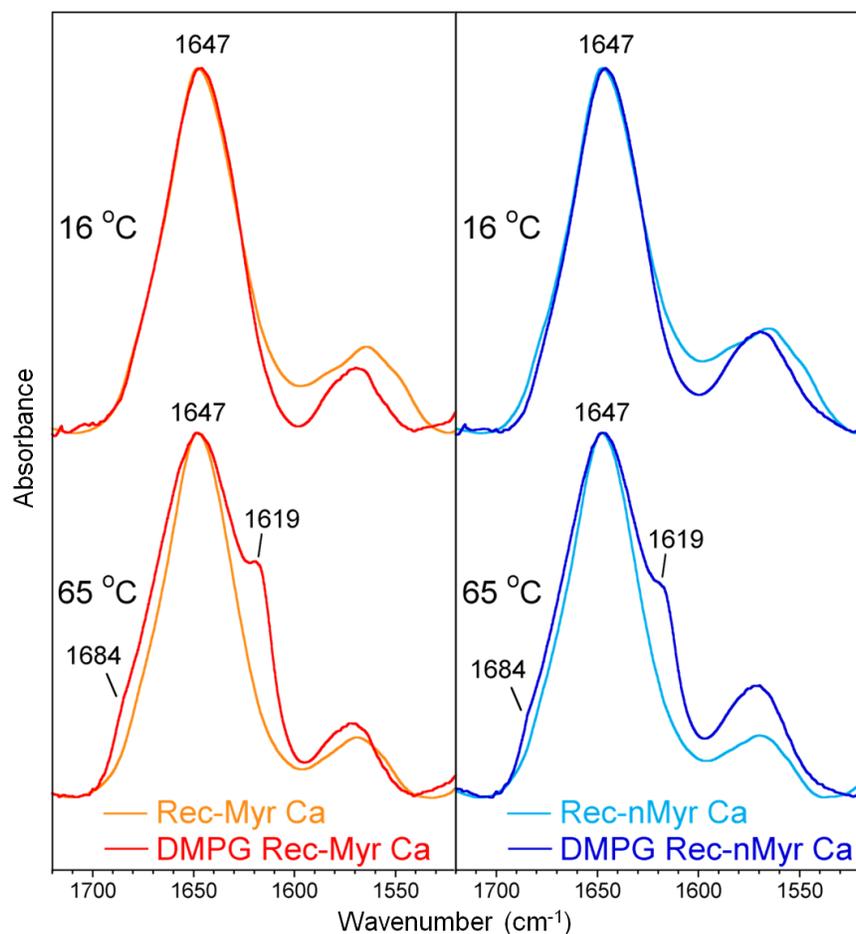


Figure 4.4 : Infrared spectra of Rec-Myr and Rec-nMyr in the amide I region in the presence of Ca^{2+} , in the absence or presence of DMPG at 16 and 65 °C. Samples were prepared according to the nMC protocol. Spectra are normalized with respect to the band maximum.

It has also previously been shown that pure Rec-nMyr is less thermally stable than Rec-Myr.⁴⁰⁵ In particular, Rec-nMyr generally formed more intermolecular β -sheets than Rec-Myr.⁴⁰⁵ This study shows the opposite behavior in the presence of DMPG. Indeed, Rec-Myr is slightly more aggregated than Rec-nMyr at 65 °C on the basis of the intensity of the β -sheet components (Figure 4.4). This observation can be rationalized by the fact that more Ca^{2+} is captured by the lipids in the presence of Rec-Myr than in the presence of Rec-nMyr because of their different affinity for this cation.¹¹⁵

4.5.2 The absence of Ca²⁺-lipid complexes enhances recoverin-lipid interactions

The results presented above suggest that the aggregation of recoverin indirectly results from the formation of DMPG-Ca²⁺ complexes and the resulting smaller quantity of available Ca²⁺. Therefore, the interactions between recoverin and DMPG are affected by the availability of Ca²⁺ for both the protein and the lipids. To avoid the sequestration of Ca²⁺ by DMPG at the expense of the Ca²⁺ bound to recoverin, we have implemented a different sample preparation called the “melted complexes” (MC) protocol, to compare with the previous sample preparation, i.e., the “nonmelted complexes” (nMC) protocol, and studied the thermal behavior of lipid bilayers in the absence and presence of recoverin. The MC protocol aims to force the fusion of the complexes and the release of Ca²⁺ without denaturing the protein. As explained in Material and Methods, the lipids are first hydrated in the presence of Ca²⁺ with five cycles of mechanical agitation and freeze-thawing at 82 °C,^{251, 252} to melt the DMPG-Ca²⁺ complexes.²⁴⁷ As a second step, Rec-Myr is added to this lipid sample followed by five more cycles of mechanical agitation and freeze-thawing that are then performed at 37 °C (below irreversible thermal modifications of recoverin⁴⁰⁵).

Figure 4.5 presents a comparison of the temperature dependence of the $\nu_s(\text{CH}_2)$ and $\nu(\text{C=O})$ vibrations of DMPG in the presence of Ca²⁺ and in the absence and presence of Rec-Myr when the samples are prepared according to the nMC and MC protocols. According to these data, the thermal event corresponding to the fusion of the complexes is hardly observable when MLVs are initially heated to 82 °C (MC protocol), showing that complexes are basically absent. Small irregularities in the thermotropic curves suggest that a few residual complexes are still present (see below).

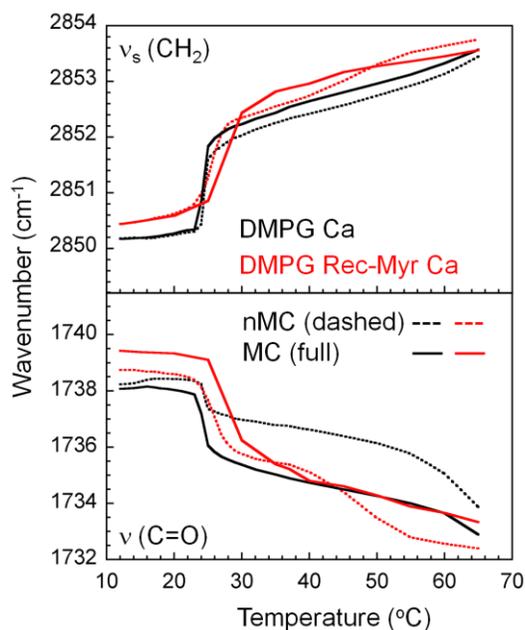


Figure 4.5 : Temperature dependence of the (top) $\nu_s(\text{CH}_2)$ and (bottom) $\nu(\text{C}=\text{O})$ wavenumbers of DMPG vesicles in the presence of Ca^{2+} (10 mM), in the absence and presence of Rec-Myr at a 200:1 lipid:protein molar ratio for samples prepared with the MC protocol. The results obtained for samples prepared with the nMC protocol are also shown for comparison.

Investigation of the $\nu(\text{C}=\text{O})$ band of DMPG (Figure 4.6) confirms that basically no complexes are present at any temperature with the MC protocol. However, the deconvolved spectra (Figure S4.3) show a small contribution from bands due to the complexes at 16 and 50 °C, indicating that a few residual complexes remain (see components characteristic of the complexes at 1734 and 1735 cm^{-1} at respectively 16 and 50 °C, in Figure S4.3). However, no band arising from these complexes is observed in the presence of Rec-Myr, which confirms that recoverin inhibits their formation (Figure S4.3).

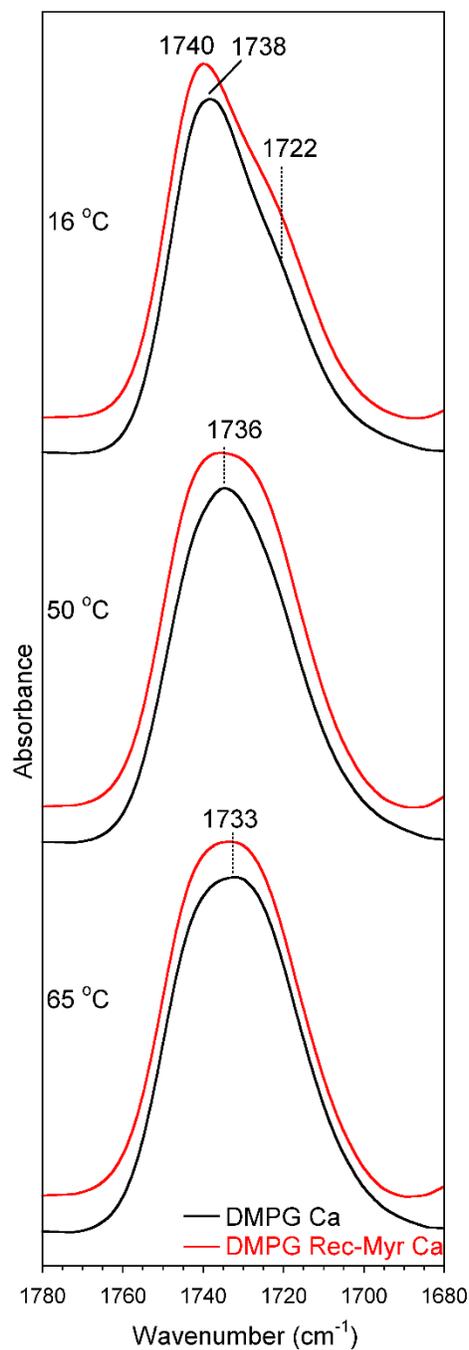


Figure 4.6 : Infrared spectra of DMPG vesicles in the $\nu(\text{C}=\text{O})$ region in the presence of Ca^{2+} (10 mM), in the absence and presence of Rec-Myr at a 200:1 lipid:protein molar ratio at 16, 50, and 65 °C for samples prepared with the MC protocol. The results obtained for the nMC protocol are also shown for comparison. Spectra are normalized with respect to the band maximum and shifted for the sake of clarity.

Moreover, β -sheet bands in the amide I region resulting from recoverin aggregation (Figure 4.4) completely disappear when the sample is prepared under the MC conditions (Figure 4.7), thus revealing that recoverin binds enough Ca^{2+} in these experiments to ensure its thermal stability, which is consistent with the (nearly) absence of lipid- Ca^{2+} complexes (Figures 4.5 and 4.6). Therefore, the thermal stability of recoverin does not seem to be affected by anionic lipids inasmuch as Ca^{2+} ions are not sequestered by the lipids, i.e., that they are available for protein binding. Overall, the interactions between recoverin and membranes are partly determined by the relative affinity of Ca^{2+} for recoverin and lipids. These interactions should therefore be modulated by the lipid composition of membranes.

Consistent with this conclusion, Figure 4.5 shows that the effect of Rec-Myr on lipid thermotropism is stronger under the MC conditions compared to that seen when using the nMC protocol. Indeed, the main phase transition temperature is increased by a ΔT_m of +4 °C with respect to pure DMPG vesicles, while the $\nu_s(\text{CH}_2)$ and $\nu(\text{C=O})$ bands are shifted to higher wavenumber values in the gel phase (~ 0.3 and $\sim 1.5 \text{ cm}^{-1}$, respectively). These data thus confirm that recoverin interacts with DMPG membranes in the presence of Ca^{2+} and show that these interactions are enhanced when Ca^{2+} is available to recoverin. The alteration of the $\nu_s(\text{CH}_2)$ and $\nu(\text{C=O})$ bands in the gel phase indicates that the lipid chains are more disordered and that the carbonyl groups are less hydrated in the presence of recoverin under the MC conditions (Figure 4.5). The increase in T_m suggests that a higher lipid chain packing results from the binding of recoverin to the lipid membrane surface. Although this protein binding is compatible with a perturbation of the hydration level of the interfacial region of the lipid bilayer, the reason for the observation of a decrease in the degree of lipid chain order in the gel phase and an increase in T_m (Figure 4.5) is unclear.

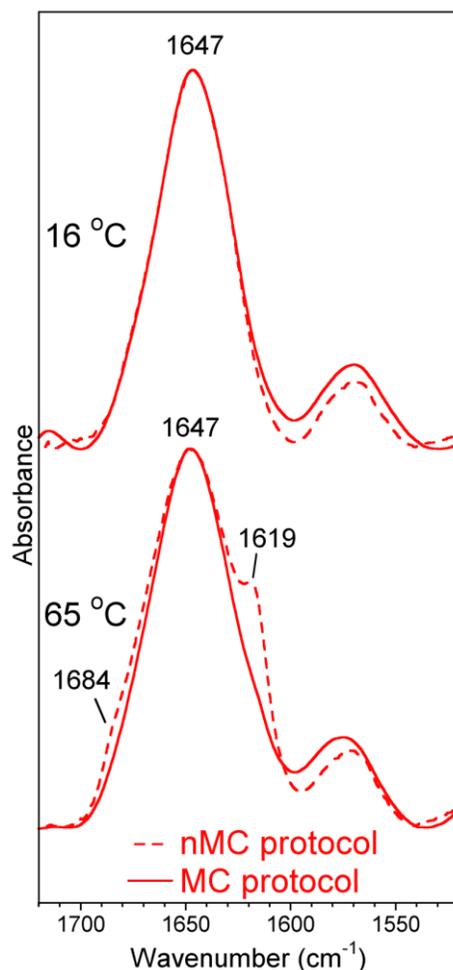


Figure 4.7 : Infrared spectra of Rec-Myr in the amide I region in the presence of Ca²⁺ and of DMPG vesicles at 16 and 65 °C for samples prepared with the MC protocol. The results obtained for samples prepared with the nMC protocol are also shown for comparison. Spectra are normalized with respect to the band maximum.

Several hypotheses might explain this apparent contradiction. First, it has to be noticed that the increase in T_m is essentially the result of a broadening of the phase transition (decrease in cooperativity), the onset of the transition being slightly affected. A decrease in cooperativity is compatible with a certain chain disorder or weakening of the interactions between lipid chains, two effects that might rationalize the present data. Second, it is possible that the protein partly stabilizes DMPG molecules due to the binding of positively charged amino acids of recoverin to the lipid polar head and, at the same time, slightly disorders the lipid chains due to the insertion of the recoverin myristoyl group and the partial insertion of the protein in the membrane. Third, the relationship between the

position of the $\nu(\text{CH}_2)$ bands and T_m is not straightforward. Although T_m generally increases when the position of the $\nu(\text{CH}_2)$ bands decreases in the gel phase, the relationship is not as simple. The $\nu_s(\text{CH}_2)$ values of phospholipid bilayers in the gel phase may be close to each other or even identical, but T_m may differ by several degrees, underlining the fact that an identical conformational state of the lipid chains (from the IR spectroscopic point of view) may lead to various phase transition temperatures.

4.5.3 Unsaturated and saturated lipids behave similarly and have an equivalent effect on recoverin

The effect of chain unsaturation on lipid-recoverin interactions has been investigated using C16:0/C18:1 (POPG) and di-C18:1 (DOPG) MLVs prepared with the nMC protocol. For these lipids, T_m values ($-2\text{ }^\circ\text{C}$ for POPG and $-18\text{ }^\circ\text{C}$ for DOPG)¹⁴⁹ are below the temperature range that can be accessed with our equipment so that only the fluid phase can be studied. The thermotropic curves monitored with the $\nu_s(\text{CH}_2)$ and $\nu(\text{C=O})$ bands of POPG and DOPG are shown in Figure S4.4. They show standard linear variations in the fluid phase reflecting slight changes in the lipid chain order and carbonyl group hydration with temperature. The position of the $\nu_s(\text{CH}_2)$ band of unsaturated lipids is not significantly affected by the presence of recoverin, while the position of the $\nu(\text{C=O})$ band very slightly shifts to lower wavenumbers. Although this effect is weak, it is reproducible and may reflect a slightly lower hydration level of the lipid interfacial region in the presence of the protein.

The spectra of POPG and DOPG in the $\nu(\text{C=O})$ region (Figure S4.5) in the presence of Ca^{2+} are almost identical to those obtained in the absence of Ca^{2+} (EGTA buffer), being all typical of fully hydrated phospholipids, i.e., without band components due to the lipid- Ca^{2+} complexes, which has been confirmed by spectral deconvolution (data not shown). The spectra of the pure phospholipids in the phosphate region, however, show some differences with those obtained in the absence of Ca^{2+} (Figure S4.6). The main disparity is related to the intensity ratio between the bands at 1091 and 1068 cm^{-1} , suggesting that some PG- Ca^{2+} complexes likely exist. These complexes are, however, likely weak because the $\nu(\text{C=O})$ region is not affected by Ca^{2+} .

The amide I band of recoverin is not affected by the presence of POPG (Figure S4.7) or

DOPG (Figure S4.8) at 15 °C. Bands at 1617 and 1684 cm^{-1} due to intermolecular β -sheets are, however, observed at 65 °C, which suggests that Ca^{2+} is also partly chelated by unsaturated PGs, which is consistent with the observations in the phosphate region (Figure S4.6). Consequently, part of the Ca^{2+} is not available for recoverin. In fact, using the MC protocol with POPG and DOPG, it appears that recoverin exhibits only very weak β -sheet bands resulting from aggregation (data not shown), thus suggesting that heating at 82 °C allows melting of these weak complexes and release of Ca^{2+} , a phenomenon similar to that observed with DMPG (Figure 4.7). In addition, the phosphate bands of POPG and DOPG are similar for the EGTA and Ca^{2+} buffer samples when using the MC protocol (data not shown), further supporting the melting of the complexes in these experiments. Thus, the same overall trends are observed with POPG, DOPG and DMPG.

4.6 Discussion

4.6.1 Recoverin-DMPG interactions are modulated by the availability of calcium

These results show that the behaviors of recoverin and DMPG as well as their interaction are modulated by the availability of Ca^{2+} . Depending on the sample preparation protocol, Ca^{2+} can be either fully (MC protocol) or not available (nMC protocol) to recoverin. In the latter case, Ca^{2+} is in large part sequestered by anionic lipids so that insufficient Ca^{2+} can be bound to recoverin, which decreases its thermal stability. It is interesting to tentatively relate the present Ca^{2+} -dependent behavior of recoverin to the physiological “light” and “dark” Ca^{2+} conditions in photoreceptors. An insufficient Ca^{2+} binding by recoverin could take place in the lower “light” concentration of Ca^{2+} (50 nM).³⁵ In contrast, under the “dark” conditions, where the concentration of Ca^{2+} is higher (550 nM),³⁵ Ca^{2+} could “freely” partition between the protein and the lipids, thus allowing the binding of enough Ca^{2+} to recoverin to ensure its thermal stability. As suggested by our results, an optimal interaction of recoverin with membranes would be obtained under these conditions.

4.6.2 Recoverin has a strong affinity for Ca^{2+}

The strong affinity of recoverin for Ca^{2+} in our experiments is supported by two results. First, when Ca^{2+} is not sequestered by PG complexes, i.e., when it is free in solution (MC

protocol), recoverin is thermally stable, showing that it binds Ca^{2+} . Previously published data have shown that the amount of Ca^{2+} bound by recoverin can be estimated from its extent of heat-induced aggregation at 65 °C.⁴⁰⁵ On the basis of this work, the absence of aggregation of recoverin at 65 °C with the MC protocol indicates that each protein binds two Ca^{2+} ions. Second, it has been found that recoverin binds a small amount of Ca^{2+} despite the presence of the strong Ca^{2+} -DMPG complexes (nMC protocol), thus partially inhibiting the formation of Ca^{2+} -PG complexes. This strong affinity of recoverin for Ca^{2+} is consistent with the values of its binding constants.^{115, 406} Indeed, myristoylated recoverin presents a cooperative binding to Ca^{2+} with a dissociation constant of 17 μM whereas Ca^{2+} binding of the nonmyristoylated protein is noncooperative with a dissociation constant of 6.9 μM for EF-Hand 2 and 0.11 μM for EF-Hand 3.¹¹⁵ In contrast, the dissociation constant of PG with Ca^{2+} is close to 118 mM.⁴⁰⁶ The Ca^{2+} affinity of myristoylated and nonmyristoylated recoverin are thus $\sim 7 \times 10^3$ and 1×10^6 times larger, respectively, than that of PG. Therefore, the affinity of recoverin for Ca^{2+} is much larger than that of PG for this cation, even when considering the 200:1 PG:recoverin molar ratio.

4.6.3 Ca^{2+} -bound recoverin acts a peripheral protein

It is remarkable that the strongest effect of recoverin on DMPG membranes precisely occurs under the MC conditions. This observation shows that Ca^{2+} should be available and bound to recoverin for protein-lipid interactions to plentifully occur. This in turn suggests that the myristoyl moiety of recoverin has to be extruded from its hydrophobic pocket to fully interact with anionic lipids, which is consistent with other works.^{219, 220, 223, 403} Moreover, it is noteworthy that, when recoverin fully interacts with PG, the overall secondary structure of recoverin is identical to that observed for the pure protein whatever the temperature, thus showing that recoverin structure is not affected by its membrane binding.

Recoverin induces an increase of 4 °C of the main phase transition temperature T_m of DMPG. Such an effect is generally associated with a higher level of lipid chain packing and intermolecular interactions within the hydrophobic core of the membrane. This behavior is attributed to a neutralization of the lipid charge due the location of the protein at the membrane surface (peripheral proteins) and the exposure of positively charged side chains.²³⁹ This conclusion is in agreement with previous data showing the binding of recoverin to the surface of membranes made of DOPC:DOPG (80:20) mixtures, with the insertion of its myristoyl moiety within membranes.²³⁹ The present location of recoverin at

the membrane surface is also consistent with a study demonstrating that N-myristoylation is necessary for the binding of recoverin to negatively charged phospholipid monolayers in the presence of Ca^{2+} .⁷⁵

4.6.4 Proportion of interacting phospholipids

A model of the peripheral insertion of recoverin has been proposed,⁷⁵ where the protein is slightly inserted within the membrane and the myristoyl group penetrates the bilayer in the presence of negatively charged phospholipids. An adaptation of this model is shown in Figure 4.8. On the basis of this model and simple geometric arguments, the proportion of lipids affected by recoverin can be estimated. Some of the lipids are vertically displaced by recoverin, whereas those surrounding the protein interact directly with recoverin. Assuming that the lateral area of the protein is an ellipse of semimajor axis $a = 17.15 \text{ \AA}$ and semiminor axis $b = 10.80 \text{ \AA}$ (determined using a PyMol representation of recoverin, Protein Data Bank 1JSA) and considering a lateral molecular area of 62 \AA^2 for DMPG molecules,⁴⁰⁷ it can be estimated that ~ 9 DMPG molecules can be found beneath recoverin and ~ 13 around its perimeter. Under our conditions (200:1, DMPG:recoverin molar ratio), this represents a total of $\sim 11\%$ of lipids that would be affected upon protein binding. If one now considers that a second ring of lipids is also under the chain stiffening influence of recoverin, 19 additional DMPG molecules per recoverin (43 in total) would be affected by its binding. In total, this would represent $\sim 22\%$ of DMPG, which is likely enough to induce significant effects on the thermotropism of the lipid bilayers. These figures can be compared with the amount of lipids in rod outer segment membranes. The outer monolayer of the rod outer segment disk membranes includes 72 negatively-charged phospholipids (20%) of 358 lipids per recoverin.^{154-157, 162, 408} Assuming that recoverin influences at most 22% of the membrane phospholipids, this corresponds to 77 phospholipids of the rod outer segment disk per recoverin, including 15 anionic lipids.

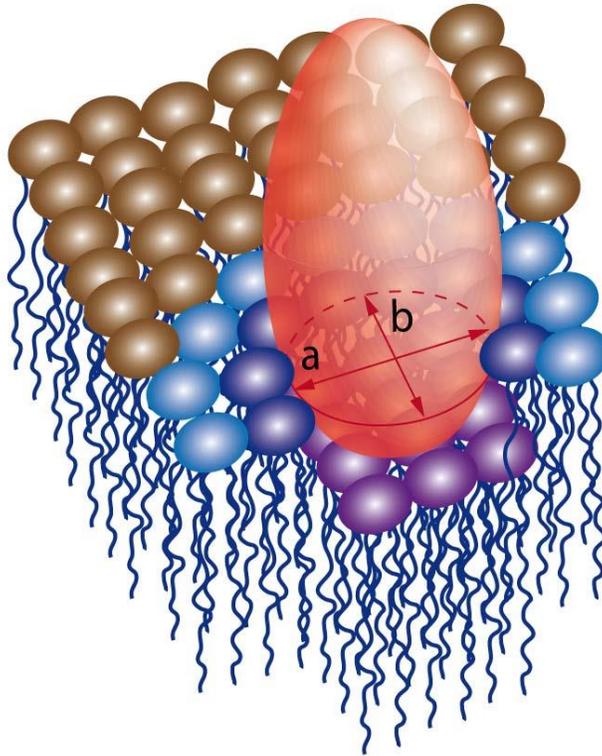


Figure 4.8 : Model of membrane insertion of recoverin (red). Recoverin is represented as an ellipsoid with a lateral semimajor axis a and a semiminor axis b . Purple lipids are those displaced upon protein binding and located beneath it, dark blue lipids form the first ring of molecules around the protein (in direct contact), and light blue lipids represent the second ring of molecules. Brown lipids represent unaffected lipids. Modified from ref ⁷⁵.

4.6.5 Similar interactions are observed between recoverin and unsaturated or saturated lipids

Investigating the behavior and role of unsaturated phospholipids is particularly important because they represent the major content of rod outer segment membranes.¹⁵² Ca^{2+} has basically the same effect on either DMPG, POPG or DOPG. Indeed, Ca^{2+} complexes are formed under the nMC protocol, and Ca^{2+} can be released by appropriate heating (MC protocol) in the presence of all of these lipids. The complexes with Ca^{2+} seem, however, to be weaker for unsaturated lipids because only the phosphate bands of POPG and DOPG, and not their $\nu(\text{C}=\text{O})$ bands, are modified by the nMC protocol. This may be related to their main phase transition temperature, T_m , that is quite lower for unsaturated than for



saturated phospholipids, likely leading to a significantly lower content of crystal-like and dehydrated Ca^{2+} -PG complexes in the presence of the unsaturated phospholipids. Although it has not been possible to study their chain melting transition, the fact that unsaturated PGs interact like the saturated PG with Ca^{2+} suggests that interactions of recoverin with POPG and DOPG are similar to those with DMPG. For instance, recoverin is stable and form heat-induced aggregates in the same conditions with unsaturated PGs and DMPG. It may thus be anticipated that recoverin essentially induces the same effects and adopts the same location and orientation at the membrane surface in the presence of both unsaturated and saturated negatively charged lipids. This would, however, have to be confirmed by the study of the chain melting transition of these unsaturated lipids. In addition, the negatively charged phosphatidylserine is the most unsaturated phospholipid of rod outer segment membranes. Indeed, it contains ~20% saturated (16:0 and 18:0) and ~74% polyunsaturated (22:4, 22:5, 22:6, 24:4 and 24:5) fatty acyl chains.^{159, 162} One can thus speculate that recoverin binding mainly takes place with unsaturated phosphatidylserine.

4.7 Conclusion

In this study, the interactions between Ca^{2+} , recoverin, and PG have been rationalized on the basis of previous studies, which provided information about the affinity of PG for Ca^{2+} . These anionic lipids indeed have a propensity to form complexes with Ca^{2+} , thus making divalent ions less available for recoverin, which affects its thermal behavior and its interactions with lipids. If Ca^{2+} is not fully available for recoverin, the protein thermal stability is decreased and its interactions with lipids are also weakened. By contrast, when Ca^{2+} is fully available, recoverin thermal stability is preserved and the extent of its interactions with fully hydrated lipids is increased. It appears that recoverin disturbs the gel phase and increases the gel-to-fluid phase transition temperature of DMPG. The interactions between PG and recoverin seem to be stronger for the myristoylated than the nonmyristoylated protein, likely because of the differences in their affinity for Ca^{2+} . Although these results help in our understanding of the modulation of recoverin-anionic lipid interactions by Ca^{2+} and the factors that promote them, further works are required to improve our understanding of the process by which this protein binds at the membrane surface and the impact of the heterogeneity of the lipid content^{152, 154-157} and complex organization of rod outer disk membranes¹³ on recoverin binding.

4.8 Associated content

4.8.1 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00408.

Transition temperature of DMPG in the absence and presence of recoverin (Table S4.1), deconvolved IR spectra of DMPG in the $\nu(\text{C}=\text{O})$ region in the absence and presence of recoverin (Figure S4.1), IR spectra of DMPG vesicles in the $\nu_s(\text{PO}_2^-)$ region (Figure S4.2), deconvolved IR spectra of DMPG prepared with the MC protocol in the $\nu(\text{C}=\text{O})$ region (Figure S4.3), temperature dependence of the $\nu_s(\text{CH}_2)$ and $\nu(\text{C}=\text{O})$ wavenumbers of POPG and DOPG in the absence and presence of recoverin (Figure S4.4), IR spectra of POPG and DOPG in the $\nu(\text{C}=\text{O})$ region in the absence and presence of recoverin (Figure S4.5), IR spectra of DMPG and POPG in the $\nu(\text{PO}_2^-)$ region in the absence and presence of Ca^{2+} (Figure S4.6), IR spectra of recoverin in the amide I region in the absence or presence of POPG (Figure S4.7), and IR spectra of recoverin in the amide I region in the absence or presence of DOPG (Figure S4.8).

4.9 Funding

This work was supported by the Natural Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada. The Regroupement québécois de recherche sur la fonction, l'ingénierie et les applications des protéines (PROTEO), the Centre de recherche sur les matériaux avancés (CERMA), the Centre québécois sur les matériaux fonctionnels (CQMF), and the Centre de recherche du CHU de Québec are thanked for the infrastructure they provide for the performance of the research. PROTEO and CQMF are supported by the Fonds de recherche du Québec-Nature et Technologies (FRQ-NT). K.P.-F. is the recipient of graduate scholarships from NSERC and FRQNT. A.P.-L. is the recipient of an undergraduate scholarship from NSERC. C.M. and C.D. are recipients of undergraduate summer scholarships from PROTEO.

4.10 Acknowledgements

The authors would like to thank Jean-François Rioux-Dubé and François Paquet-Mercier

for their support with the FTIR experiments.

4.11 Supporting information

Table S4.1 : Transition temperature as determined from the position of the $\nu(\text{CH}_2)$ and $\nu(\text{C=O})$ bands for fully hydrated DMPG bilayers and DMPG- Ca^{2+} complexes in the absence and presence of Rec-Myr and Rec-nMyr. The values of pure DMPG vesicles in the absence of Ca^{2+} (0.5 mM EGTA) are also shown for comparison.

		DMPG		DMPG - Rec-Myr	DMPG - Rec-nMyr
Buffer		EGTA	Ca^{2+}		
Acyl chain ($\nu_s(\text{CH}_2)$ vibration)					
PG	T_m ($^{\circ}\text{C}$) *	24	25 (25) [§]	26 (29) [§]	27
PG-Ca complexes	T_c ($^{\circ}\text{C}$) †	-	58 (57) [§]	40 (40) [§]	42
Interfacial region ($\nu(\text{C=O})$ vibration)					
PG	T_m ($^{\circ}\text{C}$) *	24	25 (25) [§]	27 (29) [§]	28
PG-Ca complexes	T_c ($^{\circ}\text{C}$) †	-	56 (59) [§]	40 (46) [§]	42

[§] Data in parentheses represent the values for sample prepared with two series of freeze-thaw cycles (MC protocol).

* T_m was determined from the maxima of the first derivatives of the thermotropic curves.

† T_c represents the onset of the transition and is estimated from the intersection of two straight lines that are tangent to the thermotropic profiles.

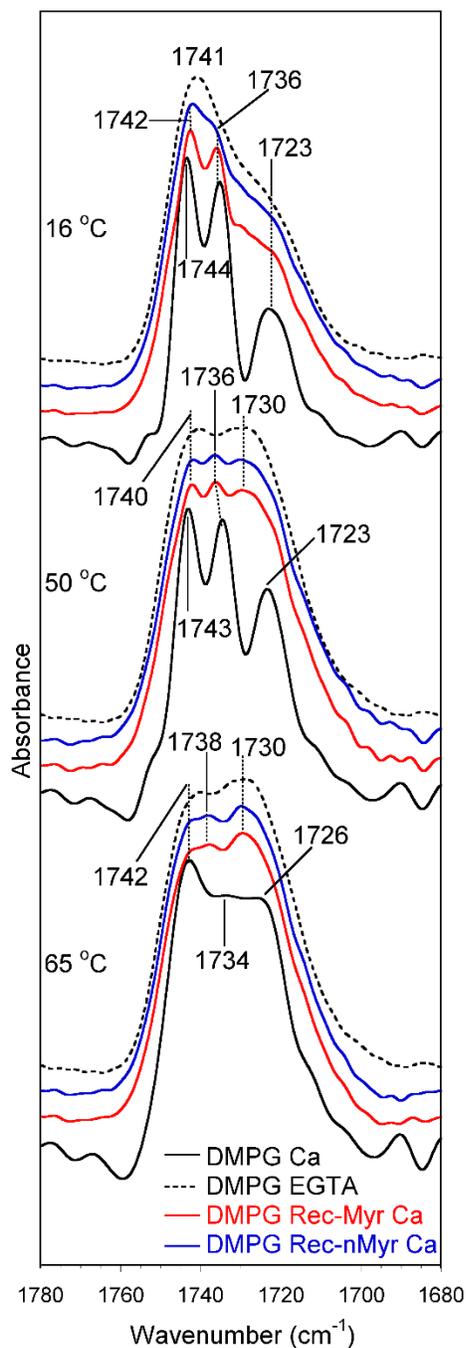


Figure S4.1 : Deconvoluted IR spectra of DMPG vesicles in the $\nu(\text{C}=\text{O})$ region in the presence of Ca^{2+} (10 mM), in the absence and presence of Rec-Myr and Rec-nMyr, at 16, 50 and 65 °C. The spectrum of pure DMPG vesicles in the absence of Ca^{2+} (0.5 mM EGTA) is also shown for comparison. Spectra are normalized with respect to the band maximum and shifted for the sake of clarity.

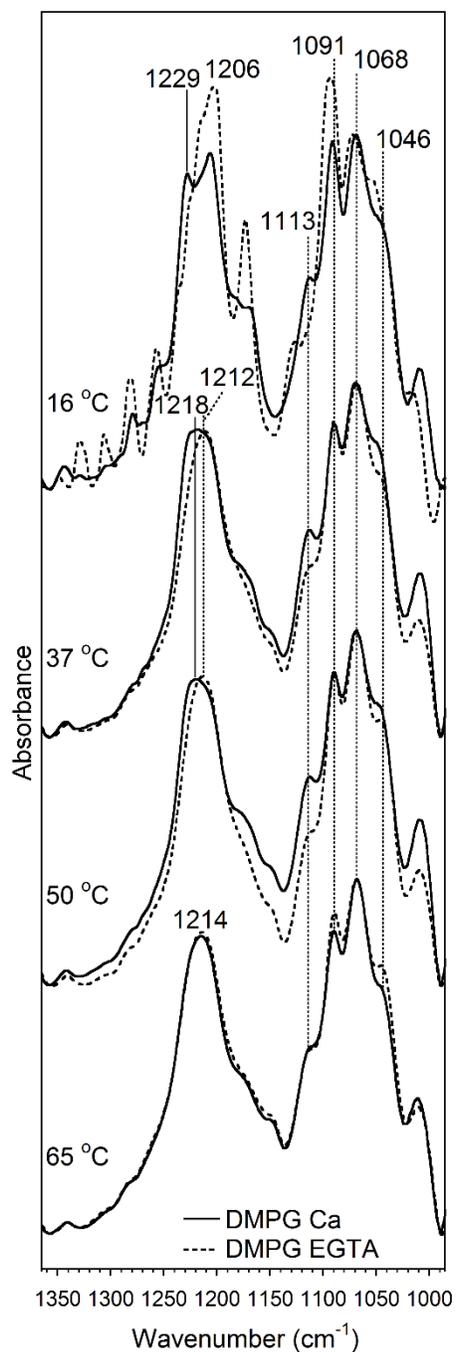


Figure S4.2 : IR spectra of DMPG vesicles in the phosphate region at 16, 37, 50, and 65 °C in the absence (0.5 mM EGTA) and presence of Ca²⁺ (10 mM Ca²⁺). Spectra are normalized with respect to the band at 1068 cm⁻¹.

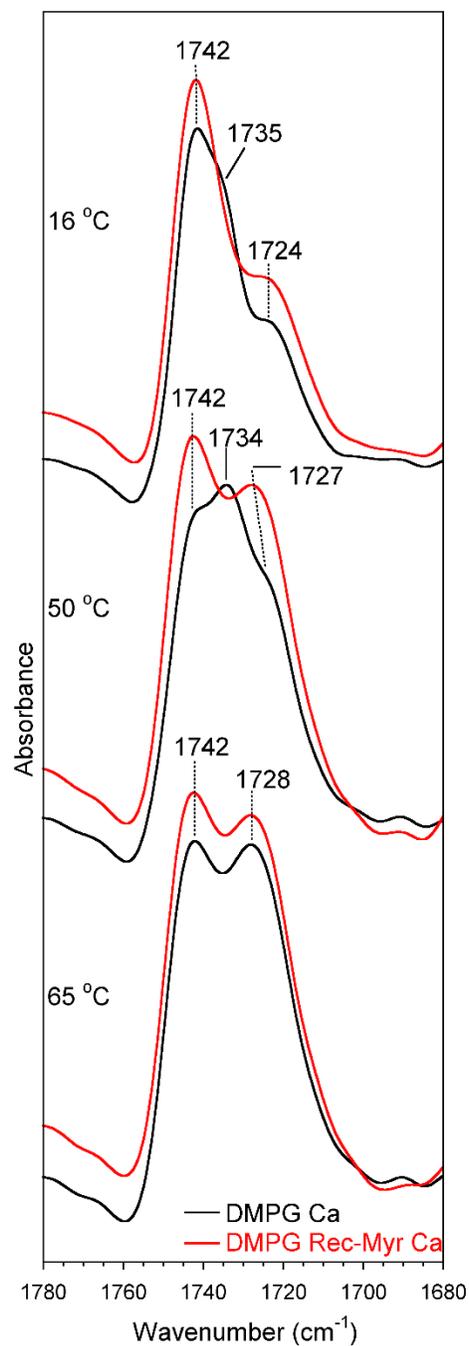


Figure S4.3 : Deconvoluted IR spectra in the $\nu(\text{C}=\text{O})$ region of DMPG vesicles prepared with the MC protocol, in the presence of Ca^{2+} (10 mM), in the absence and presence of Rec-Myr, at 16, 50 and 65 °C. Spectra are normalized with respect to the band maximum and shifted for the sake of clarity.

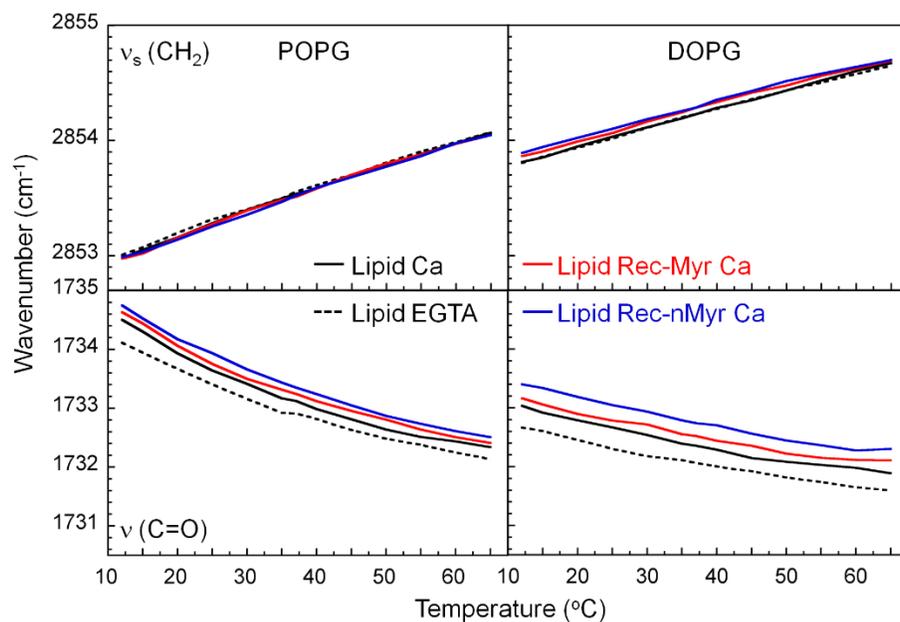


Figure S4.4 : Temperature dependence of the $\nu_s(\text{CH}_2)$ (top) and $\nu(\text{C}=\text{O})$ (bottom) wavenumbers for POPS (left) and DOPS (right) vesicles, in the presence of Ca^{2+} (10 mM Ca^{2+}), in the absence and presence of Rec-Myr and Rec-nMyr at a 200:1 lipid:Rec molar ratio. The thermotropic curve of pure POPS and DOPS vesicles in the absence of Ca^{2+} (0.5 mM EGTA) is also shown for comparison.

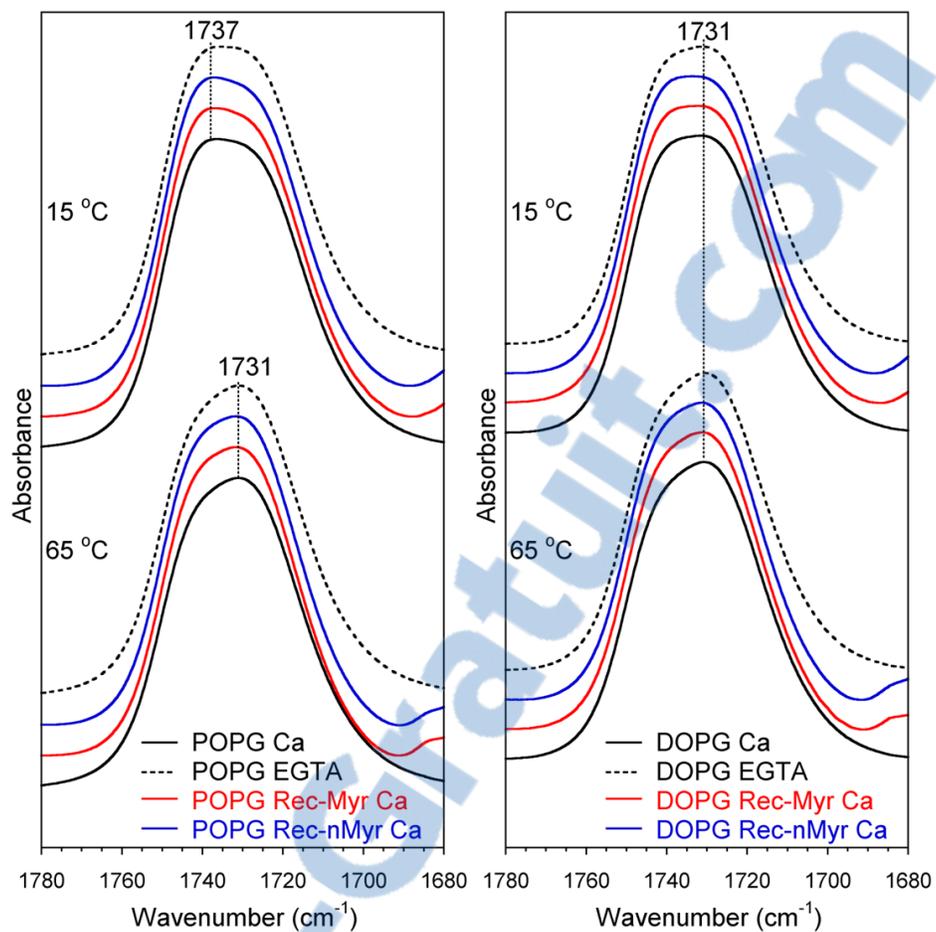


Figure S4.5 : IR spectra of POPG (left) and DOPG (right) vesicles in the $\nu(\text{C}=\text{O})$ region, in the presence of Ca^{2+} (10 mM), in the absence and presence of Rec-Myr and Rec-nMyr, at 15 and 65 °C. The spectrum of pure POPG or DOPG vesicles in the absence of Ca^{2+} (0.5 mM EGTA) is also shown for comparison. Spectra are normalized with respect to the band maximum and shifted for the sake of clarity.

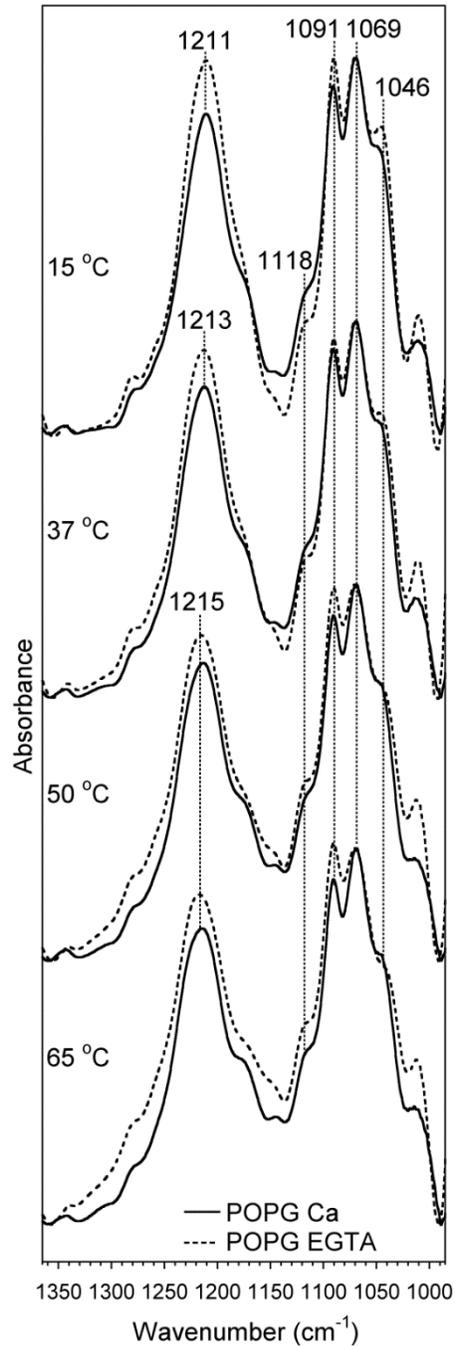


Figure S4.6 : IR spectra of POPG vesicles in the $\nu(\text{PO}_2^-)$ region, in the absence (0.5 mM EGTA) and presence of Ca^{2+} (10 mM Ca^{2+}) at 12, 37, 50 and 65 °C. Spectra are normalized with respect to the band at 1069 cm^{-1} .

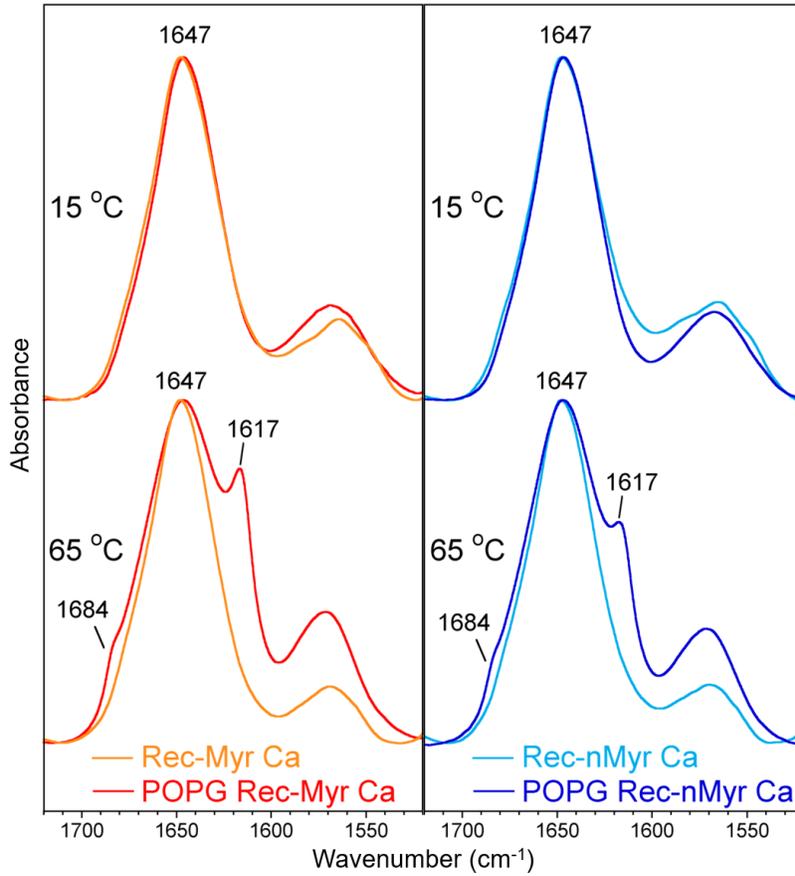


Figure S4.7 : IR spectra of Rec-Myr (left side) and Rec-nMyr (right side) in the presence of Ca^{2+} in the amide I region, in the absence or presence of POPG vesicles, at 15 and 65 °C. Spectra are normalized with respect to the band maximum.

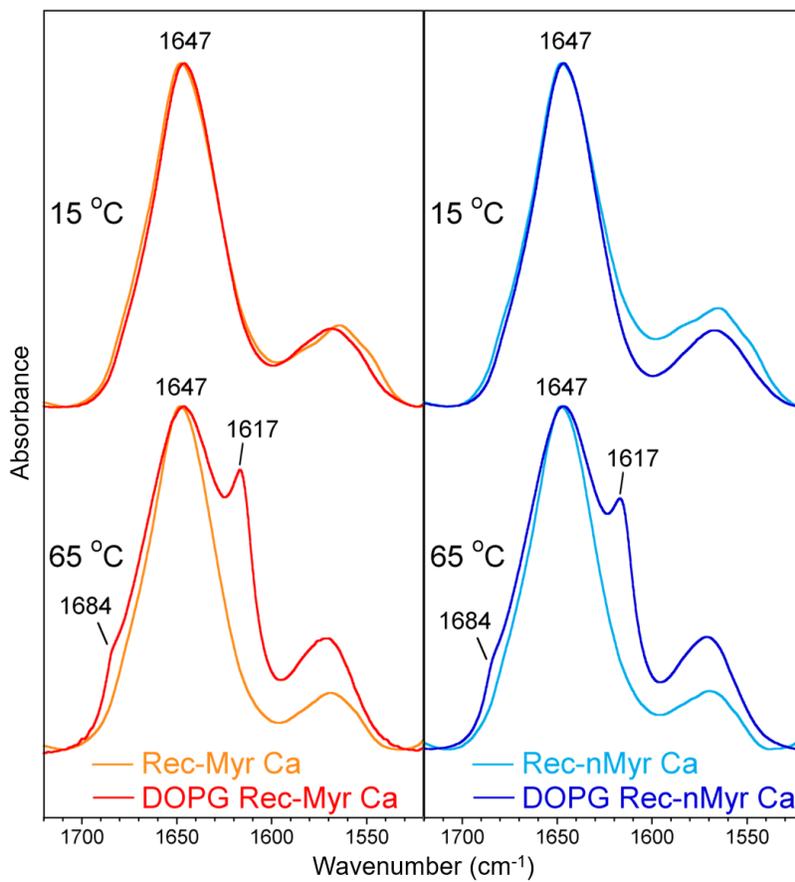


Figure S4.8 : IR spectra of Rec-Myr (left side) and Rec-nMyr (right side) in the presence of Ca^{2+} in the amide I region in the absence or presence of DOPG vesicles, at 15 and 65 °C. Spectra are normalized with respect to the band maximum.

Chapitre 5

Membrane fluidity is a driving force for recoverin myristoyl immobilization in zwitterionic lipids

Kim Potvin-Fournier,^{1,2} Geneviève Valois-Paillard,^{1,2} Thierry Lefèvre,¹ Line Cantin,² Christian Salessé² et Michèle Auger¹

Communication publiée dans la revue *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2017, 490, 1268-1273.

¹ Département de chimie, Regroupement québécois de recherche sur la fonction, l'ingénierie et l'applications des protéines (PROTEO), Centre de recherche sur les matériaux avancés (CERMA), Centre québécois sur les matériaux fonctionnels (CQMF), Université Laval, Pavillon Alexandre-Vachon, 1045 avenue de la médecine, Québec, Québec G1V 0A6, Canada

² CUO-recherche, Centre de recherche du CHU de Québec, Hôpital du Saint-Sacrement, Département d'ophtalmologie, Faculté de médecine, PROTEO, Université Laval, Québec, Québec G1S 4L8, Canada

5.1 Résumé

La recoverine est la seule protéine pour laquelle le phénomène de *calcium-myristoyl switch* a été montré sans ambiguïté. Elle se situe dans les disques membranaires des SEB où le plus grand contenu en chaînes acyle polyinsaturées sur les lipides est retrouvé. Cependant, bien qu'essentiel pour mieux comprendre l'inactivation du processus de la phototransduction, le rôle de la fluidité membranaire sur le recrutement membranaire de la recoverine n'est pas encore clair. Ainsi, nous avons analysé l'immobilisation membranaire du groupement myristoyle de la recoverine en présence de bicouches lipidiques de PC par la spectroscopie RMN du deutérium. La fluidité membranaire a été étudiée en variant le contenu en chaînes acyle des lipides des membranes modèles. L'immobilisation du groupement myristoyle de la recoverine a été observée uniquement en présence de Ca^{2+} et avec un état de désordre spécifique des lipides membranaires. Ce dernier point montre qu'une fluidité membranaire optimale est nécessaire pour l'immobilisation du groupement myristoyle de la recoverine.

5.2 Abstract

Recoverin is the only protein for which the phenomenon of calcium-myristoyl switch has been demonstrated without ambiguity. It is located in rod disk membranes where the highest content in polyunsaturated lipid acyl chains can be found. However, although essential to better understand the inactivation of the phototransduction process, the role of membrane fluidity on recoverin recruitment is unclear. We have therefore investigated the immobilization of the recoverin myristoyl moiety in the presence of phosphocholine bilayers using ^2H solid-state NMR spectroscopy. Several lipids with different acyl chains were selected to investigate model membranes characterized by different fluidity. Immobilization of the recoverin myristoyl moiety was successfully observed but only in the presence of calcium and in specific lipid disordered states, showing that an optimal fluidity is required for recoverin immobilization.

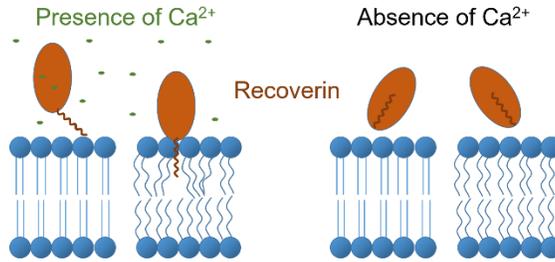


Figure 5.1 : Figure de *Table of content*.

5.3 Introduction

Neuronal calcium sensor (NCS) proteins are a family of proteins involved in phototransduction, lipid metabolism, cyclic nucleotide metabolism and gene expression for ion-channel regulation and neurotransmitter release.⁴⁰¹ The 14 NCS proteins are mainly located in photoreceptors, neuroendocrine cells and neurons.⁴⁰¹ They share common characteristics such as the presence of four EF-hand motifs, calcium ion (Ca^{2+}) binding sites, and an N-acylation allowing the calcium-myristoyl switch phenomenon.⁴⁰¹ The canonical EF-hand motif is composed of two α -helices linked by a turn of 12 amino acids that can bind Ca^{2+} .⁷⁴ This binding induces a change in the three-dimensional structure of the EF-hand motifs.⁴⁰⁹ Therefore, in the presence of Ca^{2+} , the myristoyl moiety can be extruded out of a hydrophobic pocket and recruited at the membrane interface whereas, in the absence of Ca^{2+} , the protein is in a cytosolic form with its myristoyl moiety buried within the hydrophobic pocket.⁴⁰¹ This process is called “calcium-myristoyl switch” and has not been confirmed for all NCS.⁴⁰¹

Recoverin (Rec) is a member of NCS proteins that can be found in rod outer segments (ROS). This protein presents a calcium-myristoyl switch without ambiguity based on its three-dimensional structure in the absence and presence of Ca^{2+} ,^{39, 40, 112} as shown in Figure 5.2. Myristoylated recoverin binds cooperatively two Ca^{2+} by means of its EF-hands 2 and 3.¹¹⁵ Its acylation is in majority a myristoyl group such as 11 members of the NCS family.⁴⁰¹ Recoverin plays a role in the modulation of the activity of rhodopsin kinase for the return to the dark state.^{125, 126, 129}

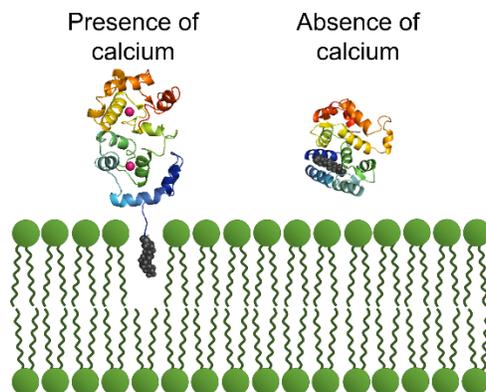


Figure 5.2 : Influence of calcium binding on the structure of myristoylated recoverin.

Structure of recoverin with calcium ions (pink spheres) bound to its EF-Hand 2 (green) and 3 (yellow-orange) (left, pdb 1JSA) and recoverin in absence of calcium (right, pdb 1IKU).

Recoverin acts in a particular membrane environment. The cytosolic face of ROS disk membranes contains a large proportion of zwitterionic lipids (nearly 60% phosphoethanolamine (PE) and 20% phosphocholine (PC)) in addition to a minor content of negatively charged lipids (20% phosphoserine).¹⁵⁵ These phospholipids contain close to 60% polyunsaturated and approximately 30% saturated acyl chains.¹⁵² Such a high degree of unsaturation suggests that ROS disk membranes are highly fluid.

The impact of the physical state of ROS membrane lipids is well known for rhodopsin.^{168, 410} However, it is not well characterized for other proteins involved in the phototransduction cascade.^{218, 236} Due to the high content of polyunsaturated lipids in ROS membranes,¹⁵² it may be questioned whether recoverin needs Ca^{2+} and lipids in a fluid state to play its role in phototransduction. The requirement of the high dark visual concentration in Ca^{2+} for the maximal inhibition of rhodopsin kinase by recoverin is well known.^{125, 126, 129} The membrane binding of recoverin as a result of its calcium-myristoyl switch could restrict its motion, thus increasing the probability to inhibit the membrane-bound rhodopsin kinase. Therefore, a better understanding of the role of membrane fluidity on recoverin binding could help to establish the importance of photoreceptor membrane fluidity in the inactivation of phototransduction.

The aim of the present study is to investigate the role of the degree of unsaturation of zwitterionic lipids on the immobilization of the recoverin myristoyl moiety. ^2H solid-state nuclear magnetic resonance (ssNMR) has been used since it has been shown to efficiently

probe the immobilization of myristoylated proteins^{239, 411, 412} or peptides (see for example⁴¹³⁻⁴¹⁶) in membranes. Phosphocholine (PC) lipids have been chosen since they represent the major neutral lipid component of the cytosolic face of ROS disk membranes where recoverin is located.¹⁵⁵ To better understand the impact of membrane fluidity, lipids with saturated (dimyristoyl, C14:0), unsaturated (monounsaturated (dioleoyl, C18:1) and polyunsaturated (didocosahexaenoyl, C22:6)) acyl chains were used. Furthermore, recoverin was studied in the absence and presence of Ca²⁺ to monitor its calcium-myristoyl switch.

5.4 Materials and methods

5.4.1 Materials

All lipids were from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL), received as chloroform solutions, and used without purification. Salts were of analytical grade and used as received. All solvents were of reagent grade or high-performance liquid chromatography (HPLC) grade and used without further purification. Water used was distilled and then deionized (resistivity of 18.2 MΩ.cm) using a Barnstead NANOpurII system (Boston, MA).

5.4.2 Sample preparation

Perdeuterated myristoylated recoverin (Rec-Myr-d₂₇) was obtained by the protocol previously reported by Ray et al.¹⁰⁸ with the modifications described by Desmeules et al.²⁴⁵ The myristic-d₂₇ acid solution was converted into sodium myristate-d₂₇ by NaOH to deprotonate the acid group at a pH near 12.5 above 50 °C. The Rec-Myr-d₂₇ myristoylation level was determined by HPLC to be > 97% as described previously.²⁴⁵ Salts were removed as described previously.⁴⁰⁵ An extinction coefficient of 22,071 M⁻¹.cm⁻¹ at 280 nm has been determined experimentally for recoverin. This value was then used to determine the concentration of recoverin in solutions by UV-visible absorption. Protein solutions were lyophilized and stored at -20 °C until use.

The glass plates used for the preparation of mechanically oriented lipid bilayers were purchased from Bellco Glass Inc. (Vineland, NJ, USA). Approximately 6 μL (1 mg of lipid) was spread on each glass plate (total of 12-16 glass plates) from a chloroform solution. The lipids were dried under vacuum at ambient temperature for 30 min. Lyophilized protein

samples were hydrated with a buffer containing 100 mM NaCl, 25 mM 4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), 1 mM 2-mercaptoethanol (pH 7.5) and either 0.5 mM ethylene glycol bis(β -aminoethyl ether)-N,N'-tetraacetic acid (EGTA) (absence of Ca^{2+} , EGTA buffer) or 10 mM CaCl_2 (Ca buffer) to obtain a lipid:Rec molar ratio of 200:1 and a recoverin: Ca^{2+} molar ratio of 1:10.⁴⁰⁵ The protein solution was then spread onto the dried lipid film. The protein/lipid mixture on glass plates was dried overnight under vacuum at ambient temperature before stacking the glass plates. Hydration was carried out by placing the stacked glass plates for 24 hours in an incubator at 37 °C and a relative humidity of 96% using a saturated K_2SO_4 solution in deuterium-depleted water containing 1 mM 2-mercaptoethanol.⁴⁰⁵ After completion of the hydration process, the stacked glass plates were wrapped with parafilm M® prior to data acquisition.

5.4.3 NMR spectroscopy

A Bruker Avance 400 MHz (magnetic field strength of 9.4 T) nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometer (Bruker Biospin, Milton, ON) was used for the acquisition of static ^{31}P ssNMR spectra at a spectral frequency of 161.9 MHz. A Bruker Avance II 900 MHz (magnetic field strength of 21.1 T) NMR spectrometer (Bruker Biospin) was used for the acquisition of ^2H ssNMR spectra of Rec-Myr- d_{27} at a spectral frequency of 138 MHz. Oriented samples were investigated with two different homemade probeheads with a 9 mm flat coil. Spectra were acquired at 5 or 30 °C. Phosphoric acid was used as an external reference at 0 ppm for ^{31}P . Phosphorus spectra were acquired with a 90° pulse length of 5 μs , an interpulse delay of 10.3 μs and a recycle delay of 3 s with a Hahn echo sequence³⁰⁸ and two-pulse phase-modulated proton decoupling.⁴¹⁷ The spectral width was 48.5 kHz, and a line broadening of 150 Hz was applied to all spectra. Using 1024 data points, a total of 1024 scans were acquired. The deuterium spectra were acquired with a 90° pulse length of 7 μs , an interpulse delay of 53 μs and a recycle time of 200 ms with a quadrupolar echo sequence.³¹⁴ The spectral width was 500 kHz, and a line broadening of 750 Hz was applied to all spectra. Using 8192 data points, between 120 k and 300 k scans were acquired. Baseline correction was performed with a Bernstein polynomial fit. All NMR spectral analyses were done with the MestReNova software (Mestrelab Research S.L, Santiago de Compostela, Spain).

5.5 Results

We have investigated the potential immobilization of the ^2H -labelled recoverin myristoyl moiety in lipid bilayers using ^2H ssNMR and mechanically oriented lipid bilayers. The low natural abundance (0.016%) and sensitivity of deuterium require isotope-labelled samples.

Since ^2H has a spin of 1, it possesses a quadrupolar moment that interacts with the electric field gradients, giving rise to the quadrupolar interaction. The latter is measured via the quadrupolar splitting ($\Delta\nu_Q$) that is given by:

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} \times \left(\frac{e^2qQ}{h} \right) \times \left(\frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \right) \times S_{CD}$$

where $\left(\frac{e^2qQ}{h} \right)$ is the quadrupole coupling constant (≈ 167 kHz for a C-D bond), θ is the orientation between the bilayer normal and the direction of the magnetic field and S_{CD} is the order parameter.³¹² The latter is sensitive to the orientational order and dynamics of the C-D bond. It is expected that fast motion of the myristoyl group would result in the disappearance of the powder spectrum in favor of an isotropic peak. If the recoverin myristoyl moiety is immobilized in the membrane, the mobility would decrease and the powder spectrum will be more intense as a function of the content of the immobilized population.

Investigation of the potential immobilization of recoverin myristoyl moiety in the presence of lipid bilayers requires determining the orientation of the lipids between glass plates. For this purpose, ^{31}P ssNMR was used since ^{31}P chemical shift is sensitive to lipid orientation.²⁹⁹ Figure 5.3 shows the ^{31}P ssNMR spectra of mechanically oriented 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) bilayers between glass plates in the presence of Ca^{2+} and in the absence and presence of Rec-Myr- d_{27} . A strong peak appears at approximately 30 ppm which is assigned to phosphocholine oriented parallel to the magnetic field. In addition, a broad spectral pattern typical of multilamellar vesicles is also observed, indicating that a population of lipids (about 40 to 55%) is not well oriented. This is most likely due to our sample preparation method. The results presented in Figure 5.3 also indicate that the addition of Ca^{2+} and/or protein does not significantly perturb the lipid orientation. Similar results were obtained for the other lipids investigated in the present study.

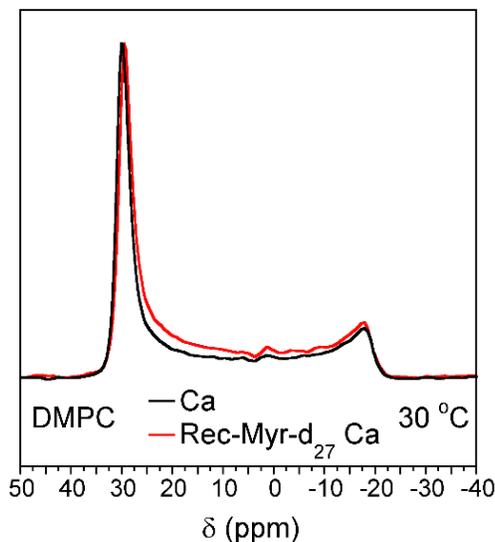


Figure 5.3 : ^{31}P static ssNMR spectra of DMPC mechanically oriented bilayers in the absence (black) and presence (red) of Rec-Myr-d₂₇ and in the presence of Ca²⁺ (10 mM) at 30 °C and a lipid:Rec molar ratio of 200:1.

Figure 5.4 shows the ^2H ssNMR spectra of Rec-Myr-d₂₇ in the absence and presence of Ca²⁺ with DMPC at 5 and 30 °C, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) at 5 °C and 1,2-didocosahexaenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DDPC) at 5 °C. No significant difference can be observed between the spectra of Rec-Myr-d₂₇ in the absence and presence of Ca²⁺ and in the presence of DMPC at 5 °C. These two spectra show an isotropic peak, characteristic of fast motions of the deuterons of the myristoyl moiety. These results indicate that there is no immobilization of the recoverin myristoyl moiety in DMPC bilayers at 5 °C, both in the absence and presence of Ca²⁺.

When DMPC bilayers are heated from 5 to 30 °C, the physical state of these lipids changes from a gel to a fluid phase (chain melting phase transition temperature, $T_m = 24\text{ °C}^{149}$). In this case, a powder spectrum of low intensity is observed in the presence of Ca²⁺ due to restricted motions of deuterons. In addition, this spectrum is due to an oriented fraction and an unoriented fraction of the myristoyl moiety of recoverin. It is interesting to note that this partial orientation was also observed for the lipids in the ^{31}P NMR spectra (Figure 5.3). In contrast, the spectrum in the absence of Ca²⁺ at 30 °C displays only an isotropic peak. These results therefore indicate a partial immobilization of the recoverin myristoyl moiety in fluid DMPC membranes in the presence of Ca²⁺.

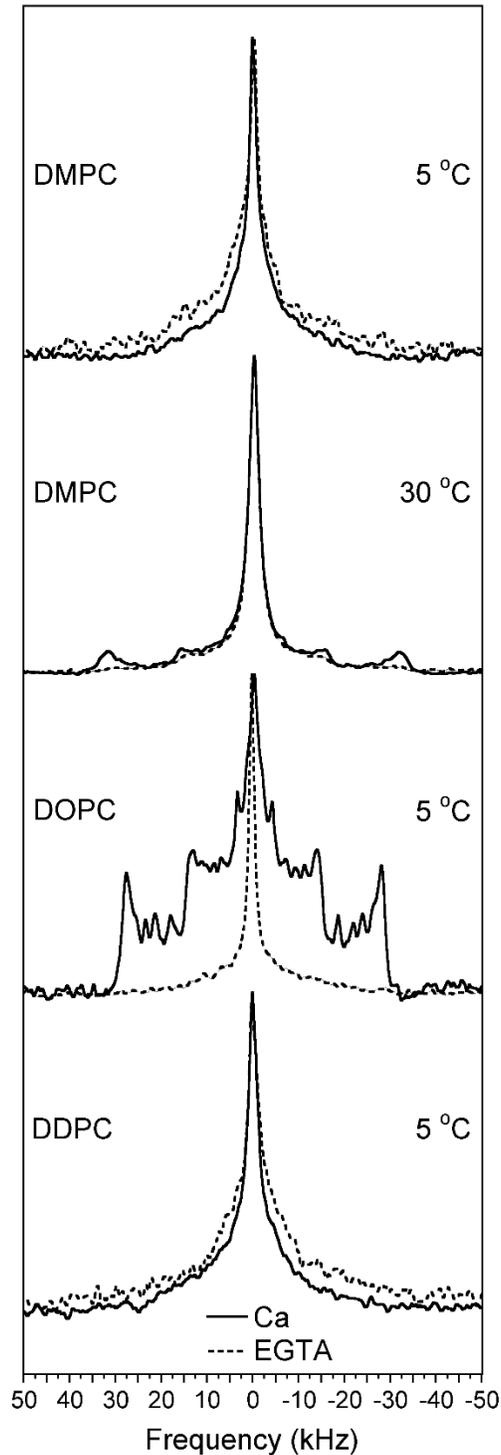


Figure 5.4 : ^2H ssNMR spectra of Rec-Myr- d_{27} in mechanically oriented bilayers of DMPC at 5 °C (top) and 30 °C (middle-top), DOPC at 5 °C (middle-bottom) and DDPC at 5 °C (bottom) in the absence (0.5 mM EGTA) (dotted line) and presence of Ca^{2+} (10 mM Ca^{2+}) (full line) at a lipid:Rec molar ratio of 200:1.



Recoverin mixed with DOPC at 5 °C (i.e. in the fluid phase, $T_m = -18\text{ °C}^{149}$) in the presence of Ca^{2+} shows a similar spectral pattern to the one obtained for Rec-Myr-d₂₇ in the presence of DMPC at 30 °C. However, the intensity of the broad spectrum in the presence of Ca^{2+} is much higher for DOPC at 5 °C. Interestingly, the quadrupolar splitting of the plateau region of the oriented recoverin fraction is slightly lower (by about 8 kHz) in DOPC membranes at 5 °C compared to that observed in DMPC membranes at 30 °C, suggesting a more disordered recoverin myristoyl moiety in DOPC membranes. Finally, Rec-Myr-d₂₇ in the presence of the polyunsaturated DDPC membrane ($T_m = -68\text{ °C}^{418}$) at 5 °C does not show a significant difference in the absence and presence of Ca^{2+} as the two spectra present an isotropic peak.

The results presented above clearly indicate that the immobilization of the recoverin myristoyl moiety in membranes is related to membrane fluidity and that an optimal fluidity is required for maximum immobilization. In addition, the fact that isotropic spectra are observed with DMPC at 30 °C and DOPC at 5 °C in the absence of calcium while powder spectra are observed in the presence of Ca^{2+} strongly suggests that the phenomenon of calcium-myristoyl switch is observed with these two lipid systems.

5.6 Discussion

The objective of the present study was to investigate the role of the degree of unsaturation of zwitterionic lipids on the immobilization of the recoverin myristoyl moiety. The immobilization of the recoverin myristoyl moiety observed in the present study is consistent with other studies addressing the immobilization of protein myristoyl moieties in membranes, giving rise to a powder spectrum.^{239, 411, 412} In particular, Valentine et al.²³⁹ previously reported a powder spectrum of recoverin perdeuterated myristoyl moiety in the presence of Ca^{2+} and a mixture of 80:20 DOPC:DOPG (DOPG: 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol) at 5 °C. Our results for DOPC are similar to those of Valentine et al.²³⁹ since the $\Delta\nu_Q$ values are comparable. In addition, they also observed the presence of two lipid populations, unoriented and oriented parallel to the bilayer normal, with a similar ratio between the area due to the immobilized myristoyl moiety and the isotropic peak. However, no data was shown in the absence of Ca^{2+} , thus raising ambiguity concerning the calcium-myristoyl switch phenomenon.²³⁹ Since DOPC:DOPG membranes are fluid at 5 °C, their results are consistent with the immobilization of the recoverin myristoyl moiety in fluid membranes. However, to the best of our knowledge, our work is the first to

demonstrate that an optimal membrane fluidity is a driving force for the immobilization of myristoylated proteins in membranes.

Time resolved fluorescence emission and decay of fluorescence anisotropy of diphenyl hexatriene (DPH) has been used to provide information on the dynamic structural properties of bilayers made of lipids with different types of fatty acyl chains.¹⁶⁶ The rotational correlation time (RCT) of DPH reflects the equilibrium orientational order and degree of flexibility or conformational freedom of the phospholipid acyl chains surrounding this probe. Almost identical values of RCT have been observed for bilayers made of DMPC, 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine and DOPC between 10 and 40 °C. They concluded that adding a single double bond has a very small effect on the order of lipid bilayers.¹⁶⁶ On the basis of additional measurements with 1-palmitoyl-2-docosahexaenoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine and DDPC, these authors also concluded that the addition of polyunsaturation on one or both fatty acyl chains produced a bilayer environment that allowed much more rotational mobility of DPH.¹⁶⁶ Finally, they emphasized the fact that polyunsaturated fatty acids are the most loosely packed phospholipid acyl chains and that the effect of acyl chain unsaturation is magnified when both acyl chains are highly polyunsaturated.¹⁶⁶ In addition, on the basis of NMR measurements, X-ray diffraction and molecular dynamics simulations, Eldho et al.⁴¹⁹ have concluded that the conformational freedom and the rate of structural transitions of polyunsaturated fatty acyl chains surpass their saturated and monounsaturated counterparts. In fact, the amplitudes and correlation times of motions of polyunsaturated chains are close to those in neat liquids. Furthermore, in the review of Feller⁴²⁰, it is mentioned that the number of conformers of polyunsaturated fatty acyl chains far exceeds those of saturated lipids, even in their fluid state; they can thus be viewed as highly flexible and highly dynamic.

Considering the RCT and the intensities of the ²H ssNMR powder spectra related to the recoverin myristoyl moiety immobilized population (Figure 5.4), recoverin seems to be more immobilized in a certain range of membrane fluidity, such as those of DMPC at 30 °C and DOPC at 5 °C. Measurements with highly disordered polyunsaturated DDPC at 5 °C result in no powder spectra, suggesting a high mobility of the recoverin myristoyl moiety on the ²H ssNMR time scale in these membranes (Figure 5.4). DOPC therefore seems to have the optimal membrane fluidity for the immobilization of the recoverin myristoyl moiety. At the opposite, no powder spectra were observed for the recoverin myristoyl moiety in

DMPC at 5 °C as the membrane was most likely too rigid to allow immobilization.

Tamm and Kwon²³⁰ presented a fluorescence spectroscopy study with a site-specifically labelled recoverin. Their results suggested that recoverin prefers lipids with negative curvature as a larger fluorescence increase was seen when the protein was mixed with PC:PE compared to pure PC or PC:lysophosphocholine lipid systems. Our results are consistent with these observations. More specifically, the geometrical shape of DMPC molecules in the gel phase is more cylindrical than in the fluid phase where it is slightly conical. Moreover, DMPC in the fluid phase is less conical than DOPC and DDPC due to the nature of their acyl chains. The immobilization of the recoverin myristoyl moiety observed with DMPC at 30 °C and DOPC at 5 °C is therefore in agreement with the trend these authors observed as a function of lipid curvature. However, for the highly fluid DDPC, which possesses the highest negative curvature among the lipids used, the rapid motion of recoverin in the membrane plane relative to the ssNMR time scale could explain the absence of a powder spectrum, even in the presence of Ca²⁺.

In summary, the present study allowed us to observe the calcium-myristoyl switch of recoverin in the presence of calcium with DOPC at 5 °C and in a smaller extent with DMPC at 30 °C. The immobilization of the recoverin myristoyl moiety is correlated with membrane fluidity, an optimal fluidity being required for maximum immobilization. In view of the high fluidity of ROS membranes, these results could provide insightful information on the correlation between membrane fluidity and the inactivation of the phototransduction process which must proceed quickly to return to the dark state.

5.7 Conflict of interest statement

The authors have declared no conflict of interest.

5.8 Acknowledgements

The authors would like to thank Pierre Audet and Victor Terskikh for their support with the NMR experiments, Audrey Picard-Lafond, Caroline Dufresne and Catherine Marcotte for their help in sample preparation, and Matthieu Fillion for helpful discussions.

5.9 Funding

This work was supported by the Natural Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada. K.P.-F. is the recipient of graduate scholarships from NSERC and Fonds de recherche du Québec-Nature et Technologies. The Centre de recherche du CHU de Québec is acknowledged for the infrastructure they provided to us. Access to the 21.1 T NMR spectrometer is provided by the National Ultrahigh-Field NMR Facility for Solids (Ottawa, Canada), a national research facility funded by a consortium of Canadian Universities, supported by the National Research Council of Canada and Bruker BioSpin, and managed by the University of Ottawa (<http://nmr900.ca>).

Chapitre 6

Novel approaches to probe the binding of recoverin to membranes

Kim Potvin-Fournier^{1,2}, Geneviève Valois-Paillard^{1,2}, Marie-Claude Gagnon^{1,3}, Thierry Lefèvre¹, Pierre Audet⁴, Line Cantin², Jean-François Paquin³, Christian Salessé² et Michèle Auger¹

Article accepté le 13 avril 2018 dans *European Biophysics Journal* et disponible en version électronique au <https://doi.org/10.1007/s00249-018-1304-4>.

¹Département de chimie, Regroupement québécois de recherche sur la fonction, l'ingénierie et l'application des protéines (PROTEO), Centre de recherche sur les matériaux avancés (CERMA), Centre québécois sur les matériaux fonctionnels (CQMF), Université Laval, Pavillon Alexandre-Vachon, 1045 avenue de la médecine, Québec, Québec G1V 0A6, Canada

²CUO-recherche, Centre de recherche du CHU de Québec, Hôpital du Saint-Sacrement, Département d'ophtalmologie, Faculté de médecine, PROTEO, Université Laval, Québec, Québec G1S 4L8, Canada

³Département de chimie, PROTEO, Centre in Green Chemistry and Catalysis (CGCC), Université Laval, Pavillon Alexandre-Vachon, 1045 avenue de la médecine, Québec, Québec G1V 0A6, Canada

⁴Département de chimie, Université Laval, Pavillon Alexandre-Vachon, 1045 avenue de la médecine, Québec, Québec G1V 0A6, Canada

6.1 Résumé

La recoverine est responsable de la régulation de l'activité de la RK par le biais de sa liaison membranaire qui dépend de la concentration en Ca^{2+} . L'interaction de la recoverine avec des bicouches zwitterioniques de PC, le lipide majoritaire de la membrane des disques du SEB, a été investiguée. La spectroscopie IR montre que la stabilité thermique de la recoverine n'est pas modifiée en présence des bicouches lipidiques et que cette protéine ne perturbe pas l'organisation de ces membranes. La Rec-nMyr augmente légèrement l'hydratation des lipides qui semble être corrélée avec une hausse de la diffusion latérale des lipides, tel que déterminé par la technique de CODEX en spectroscopie RMN à l'état solide du ^{31}P . La spectroscopie RMN du ^{19}F a permis d'observer le *calcium-myristoyl switch* et l'immobilisation du groupement myristoyle de la recoverine dans des membranes de PC en présence de Ca^{2+} , ainsi que deux environnements différents pour le groupement myristoyle de la recoverine en absence de Ca^{2+} .

6.2 Abstract

Recoverin is a protein involved in the phototransduction cascade by regulating the activity of rhodopsin kinase through a calcium-dependent binding process at the surface of rod outer segment disk membranes. We have investigated the interaction of recoverin with zwitterionic phosphatidylcholine bilayers, the major lipid component of the rod outer segment disk membranes, using both ^{31}P and ^{19}F solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) and infrared spectroscopy. In particular, several novel approaches have been used, such as the centerband-only detection of exchange (CODEX) technique to investigate lipid lateral diffusion and ^{19}F NMR to probe the environment of the recoverin myristoyl group. The results reveal that the lipid bilayer organization is not disturbed by recoverin. Non-myristoylated recoverin induces a small increase in lipid hydration that appears to be correlated with an increased lipid lateral diffusion. The thermal stability of recoverin remains similar in the absence or presence of lipids and Ca^{2+} . Fluorine atoms have been strategically introduced at positions 4 or 12 on the myristoyl moiety of recoverin to respectively probe its behavior in the interfacial and more hydrophobic regions of the membrane. ^{19}F NMR results allow the observation of the calcium-myristoyl switch, the myristoyl group experiencing two different environments in the absence of Ca^{2+} and the immobilization of the recoverin myristoyl moiety in phosphatidylcholine membranes in the

presence of Ca^{2+} .

6.3 Introduction

Recoverin (Rec) is a neuronal calcium sensor (NCS) protein. The NCS protein family includes 14 members which are involved in different processes such as phototransduction, lipid and cyclic nucleotide metabolism as well as neurotransmitter release.⁴²¹ These proteins can mainly be found in photoreceptors, neuroendocrine cells and neurons.⁴²¹ They share three common characteristics such as the presence of four EF-hand motifs, the binding of calcium ions (Ca^{2+}) and an N-acylation.^{60, 116} More specifically, the canonical EF-hand motif is characterized by two α -helices linked by a turn of 12 amino acids that can bind Ca^{2+} ions.⁷⁴ The Ca^{2+} binding to the turn of the EF-hand motif induces a change in its three-dimensional structure.⁴⁰⁹ Thus, the two α -helices of the EF-hand motif change from an antiparallel organization in the absence of Ca^{2+} to a quasi-perpendicular organization in the presence of Ca^{2+} . An interesting feature associated with this class of proteins is the calcium-myristoyl switch phenomenon. In the presence of Ca^{2+} , the myristoyl group is extruded out of a hydrophobic pocket as a result of the protein conformational change and several lines of evidence suggest that it allows membrane recruitment of the protein. In the absence of Ca^{2+} , the myristoyl group is buried within the protein hydrophobic pocket which likely results in its dissociation from the membrane.⁴²¹ It is noteworthy that the calcium-myristoyl switch has not yet been confirmed for all members of the NCS protein family.⁴²¹

Recoverin inhibits rhodopsin kinase in rod outer segments (ROS).^{125, 126, 129} Its three-dimensional structures in the presence and absence of Ca^{2+} have allowed illustrating without ambiguity the calcium-myristoyl switch phenomenon (Figure 6.1).^{39, 40, 112} EF-hands 2 and 3 of recoverin allow binding of two Ca^{2+} in a cooperative and uncooperative manner for the myristoylated and non-myristoylated forms, respectively.¹¹⁵ As for 11 other members of the NCS family, the myristoylated form is the most common.⁶⁰ In addition, ROS membranes have a particular lipid composition. More specifically, the cytosolic face of ROS disk membranes, where recoverin is located, contains a high proportion of zwitterionic phospholipids with nearly 20% phosphatidylcholine (PC) and 60% phosphatidylethanolamine as well as a minor content of negatively charged phospholipids, with close to 20% phosphatidylserine.¹⁵⁵

Presence of calcium



Absence of calcium



Figure 6.1 : Three-dimensional structure of myristoylated recoverin with calcium ions (pink spheres) bound to its EF-Hands 2 (green) and 3 (yellow-orange) (left, PDB 1JSA) and myristoylated recoverin in absence of calcium (right, PDB 1IKU).

Recoverin is a widely studied member of the NCS protein family. However, the effects of myristoylation and of the presence or absence of Ca^{2+} on the membrane interactions of recoverin in the presence of PC have not yet been clarified in detail^{140, 220, 230} although this phospholipid is one of the main components of ROS membranes.¹⁵² Moreover, we have previously shown that 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DOPC) allows a greater immobilization of recoverin in comparison with other zwitterionic lipids bearing different lipid acyl chains.²¹⁰ The present study is thus designed to further understand the behavior of recoverin in the presence of this lipid.

The main objective of our study is to determine the role of Ca^{2+} , myristoylation and the zwitterionic DOPC on the membrane interaction of recoverin. More specifically, the effect of recoverin on the conformational order of DOPC acyl chains, hydration of the interfacial region, and shape of the lipid vesicles as well as the effect of DOPC on the protein secondary structure and thermal stability have been investigated by Fourier transform infrared (FT-IR) and ^{31}P solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. In particular, novel approaches such as the recently developed centerband-only detection of exchange (CODEX) NMR experiment have been used to study the effect of recoverin on DOPC lateral diffusion,^{309, 310, 422} whereas the recoverin myristoyl moiety environment has been investigated by ^{19}F solid-state NMR using multilamellar vesicles (MLV) as model membranes.

6.4 Materials and methods

6.4.1 Materials

DOPC was obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL), received in chloroform solutions and used without any further purification. Myristic acids monofluorinated at positions 4 or 12 were synthesized as described previously.^{423, 424} CaCl₂, NaOH, K₂SO₄, sodium myristate and 2-mercaptoethanol were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Ethylene glycol bis(β-aminoethyl ether)-N,N'-tetraacetic acid (EGTA), NaCl, and NH₄HCO₃ were obtained from Laboratoire Mat (Québec, QC). 2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid (HEPES) was from Fisher (Fair Lawn, NJ). Salts were of analytical grade and used as received. Deuterium oxide (D₂O) was obtained from CDN isotopes (Pointe-Claire, QC). Ethanol was from Commercial Alcohols, the industrial and beverage alcohol division of GreenField Ethanol (Brampton, ON), methanol was from Fisher and chloroform was from VWR International (Radnor, PA). All solvents were of reagent grade or high-performance liquid chromatography (HPLC) grade and used without any further purification. Water used for buffer preparation was distilled and then deionized (resistivity of 18.2 MΩ.cm) using a Barnstead NANOpurII system (Boston, MA).

6.4.2 Sample preparation

Myristoylated (Rec-Myr) (mass = 23,412 Da), recoverin with a fluorine atom at position 4 in the myristoyl moiety (Rec-Myr4F) and recoverin with a fluorine atom at position 12 in the myristoyl moiety (Rec-Myr12F) (mass = 23,430 Da) and non-myristoylated (Rec-nMyr) recoverin (mass = 23,202 Da) were obtained by a procedure previously reported¹⁰⁸ with the modifications described by Desmeules et al.²⁴⁵ Myristic acids with a fluorine at position 4 or 12 were converted to sodium myristate as described previously for perdeuterated myristic acid.²¹⁰ The >97% myristoylation level of Rec-Myr was determined by HPLC as described previously.²⁴⁵ Salts were removed during lyophilization as described previously.⁴⁰⁵ Recoverin concentration was ascertained by UV-Vis absorption using a molar absorption coefficient of 22,071 M⁻¹.cm⁻¹ at 280 nm, which has been determined as described in the Supporting information (Figure S6.1). Protein solutions were lyophilized and stored at -20 °C until used. The fluorine atom on the myristoyl moiety did not affect the overexpression, myristoylation and purification of recoverin.

Hydration of lyophilized protein samples was done with buffers containing 100 mM NaCl, 25 mM HEPES, 1 mM 2-mercaptoethanol (pH 7.5) and 0.5 mM EGTA in the absence of Ca^{2+} (EGTA buffer) or 10 mM CaCl_2 in the presence of Ca^{2+} (Ca buffer). All buffers were prepared with deionized water for solid-state NMR spectroscopy experiments. For infrared (IR) spectroscopy, lyophilized buffer was rehydrated in D_2O containing 1 mM 2-mercaptoethanol to investigate the protein amide I' band and the lipid carbonyl stretching band ($\nu(\text{C}=\text{O})$) that are hidden by the H_2O bending band.²⁸¹

MLVs were prepared from dried lipids with five mechanical agitation and freeze-thawing cycles with freezing in liquid nitrogen and thawing at 37 °C at a 88% hydration and a lipid:recoverin molar ratio of 200:1 as described previously.⁴²⁵

6.4.3 Infrared (IR) spectroscopy

IR spectra were recorded with Magna 560 or 760 FTIR spectrometers from Nicolet (Thermo Scientific, Madison, WI) equipped with a nitrogen-cooled mercury-cadmium-telluride detector and Omnic 5.2 software (Nicolet, Thermo Electron Corp, Madison, WI, USA). Samples were heated at the desired temperatures (± 1 °C) with a home-built temperature controller. Typically, temperature was increased in steps of 5 °C between 12 and 65 °C with a stabilization time of 3 min for each temperature. A sample volume of 5-9 μL was deposited between two CaF_2 windows (Spectral Systems, Hopewell Junction, NY) using a Mylar film spacer of 13 μm (Goodfellow Cambridge Ltd., Huntingdon, U.K.). Spectra resulted from the acquisition of 128 interferograms at a resolution of 4 cm^{-1} using a Happ-Genzel apodization.

The spectrum of the appropriate buffer was first subtracted from the spectra of the lipids, protein or lipid-protein samples. When required, water vapor contribution was subtracted and the spectra subsequently smoothed with the Savitzky-Golay method.³⁹³ Then, two spectral regions, between 1780 and 1530 cm^{-1} (encompassing the $\nu(\text{C}=\text{O})$, amide I' and asymmetric carboxylate stretching regions) and between 3000 and 2800 cm^{-1} (CH stretching region), were baselined corrected using either a linear, cubic or quadratic function. For the analysis of the amide I' band, the $\nu(\text{C}=\text{O})$ band of the pure lipids was subtracted before applying a baseline correction for lipid-protein samples. The position of the $\nu(\text{C}=\text{O})$ and symmetric CH_2 stretching ($\nu_s(\text{CH}_2)$) bands as a function of temperature was obtained with a homemade program that calculates the center of gravity of the area

formed by the band of interest and a horizontal baseline located at 90% of the peak height.²⁷⁶ The position of the other bands was obtained from the peak maximum. GRAMS/7 AI (Galactic Industries Corp., Salem, NH, USA) was used to process all spectra.

6.4.4 NMR spectroscopy

A Bruker Avance 400 MHz (magnetic field strength of 9.4 T) NMR spectrometer (Bruker Biospin, Milton, ON) was used for the acquisition of static ³¹P and ¹⁹F solid-state NMR spectra at a ³¹P spectral frequency of 161.9 MHz and a ¹⁹F spectral frequency of 376.4 MHz. ³¹P and ¹⁹F solid-state NMR experiments were performed using a 4 mm NMR sample tube inserted into two different magic-angle spinning (MAS) probe heads (Bruker Biospin) at 37 °C for ³¹P and 5 and 25 °C for ¹⁹F. Phosphoric acid was used as an external reference at 0 ppm for ³¹P. The ³¹P static NMR spectra were acquired with a 90° pulse length of 2.8 μs, an interpulse delay of 10.3 μs and a recycle delay of 3 s with a Hahn echo sequence³⁰⁸ and two-pulse phase-modulated (TPPM) proton decoupling.⁴¹⁷ The spectral width was 48.5 kHz, and a line broadening of 150 Hz was applied to all spectra. Using 1024 data points, a total of 3000 scans was acquired for static MLVs.

The ³¹P CODEX MAS NMR spectra were acquired at a spinning speed of 5.5 kHz with a previously described CODEX sequence³¹¹ with adaptation^{309, 310}. To minimize spectrometer drift, spectra were recorded with 16 blocks of 32 scans per mixing time, alternating the acquisition of S and S₀ for a total of 512 scans for each individual spectrum. TPPM proton decoupling,⁴¹⁷ with a ¹H B₁ field strength of 60 kHz, was applied during the recoupling and acquisition periods. Pulse and receiver phases were cycled according to direct excitation as described.⁴²⁶ The spectra were acquired on resonance with a 90° pulse length of 3.3 μs, an interpulse delay of 30.9 μs, a recycle delay of 4 s, a dephasing/rephasing train of three 180° pulses, a spectral width of 16 kHz and 1024 data points. A line broadening of 50 Hz was applied to all spectra. The beginning and end of mixing time was triggered before the rephasing train or acquisition. CODEX decay curves were fitted with a monoexponential function using KaleidaGraph (Synergy Software, Reading, PA).

¹⁹F NMR spectra were acquired with a 90° pulse length of 4.8 μs and a recycle delay of 5 s (at both 5 and 25 °C) with high power decoupling sequence. Using 2048 data points, a total between 1k and 15k scans was acquired. The spectral width was 75.2 kHz and a line

broadening of 400 Hz was applied to all spectra. A polynomial baseline correction was also applied. Trifluoroacetic acid was used as an external reference at -76.55 ppm for ^{19}F . Chemical shifts were determined by peak piking. Full widths at half maximum were calculated by fitting the spectra with one or two pure Lorentzian peaks. All NMR spectral analyses were performed with MestReNova software (Mestrelab Research S.L, Santiago de Compostela, Spain).

6.5 Results

6.5.1 Vesicle integrity

The shape and integrity of MLVs in the absence or presence of recoverin can be determined by analyzing the lineshape of ^{31}P NMR spectra. For this nucleus, the major interaction is the chemical shift anisotropy. Therefore, the chemical shift depends on the orientation of the lipids relative to the magnetic field. Furthermore, the intensity of a peak at a specific chemical shift value is proportional to the population of lipids at this orientation.²⁹⁹ For instance, the spectral lineshape allows determining whether vesicles are spherical or elongated. Figure 6.2 shows the static ^{31}P solid-state NMR spectra of DOPC vesicles in the absence and presence of Ca^{2+} and recoverin. Membrane integrity is preserved in all conditions as a typical MLV spectral pattern is observed in all experiments. An isotropic peak on the DOPC vesicle spectra is observed in the absence of recoverin, but the intensity of this peak is negligible in comparison with the overall area of the spectra. In addition, the chemical shift anisotropies of DOPC spectra indicate that lipids are in a fluid phase as expected given the temperature at which the experiments were performed. The DOPC vesicles in the presence of Rec-Myr, both in the absence and presence of Ca^{2+} , are slightly less spherical as indicated by the larger population of lipids oriented along the magnetic field.³⁰² The addition of a fluorine atom on the myristoyl moiety of recoverin does not significantly perturb the vesicle shape (Figure S6.2).

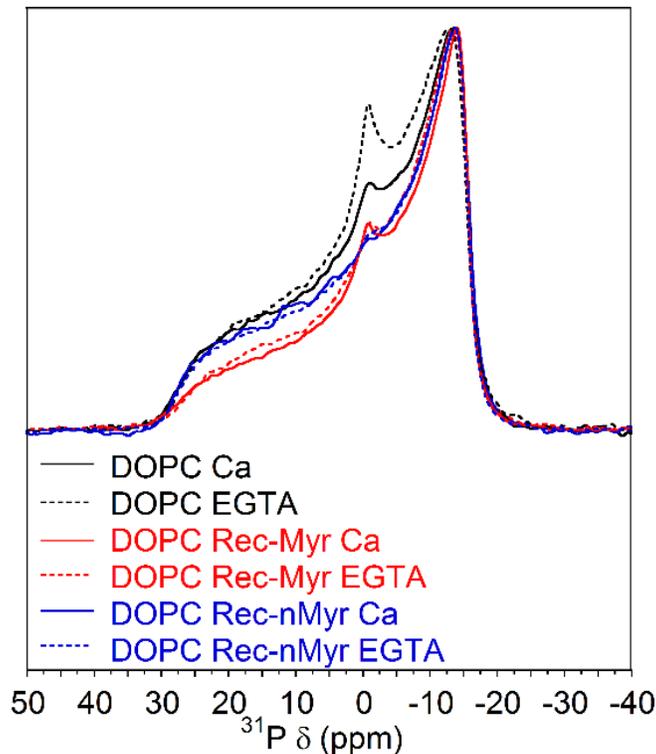


Figure 6.2 : ^{31}P static solid-state NMR spectra of DOPC vesicles in the absence (black) and presence of Rec-Myr (red) or Rec-nMyr (blue) and in the absence (0.5 mM EGTA) (dotted line) and presence of Ca^{2+} (10 mM Ca^{2+}) (full line) at 37 °C and a lipid:Rec molar ratio of 200:1. Spectra were normalized with respect to the peak height maximum.

6.5.2 Acyl chain order and lipid hydration

FTIR spectroscopy allows to probe the conformational order of lipid acyl chains and lipid hydration by analyzing the CH_2 symmetric stretching vibration ($\nu_s(\text{CH}_2)$) and the carbonyl symmetric stretching vibration ($\nu(\text{C}=\text{O})$), respectively. The $\nu_s(\text{CH}_2)$ band has been shown to appear close to 2850 cm^{-1} and to shift and broaden according to the number of gauche conformers, disorder in the acyl chains and overall mobility.^{146, 266, 271} The $\nu(\text{C}=\text{O})$ band is composed of two bands, one close to 1740 cm^{-1} that is assigned to free, non-bound or non-hydrated carbonyl groups, and another one close to 1730 cm^{-1} assigned to hydrated or water bound carbonyl groups.^{267, 272, 427} A shift to higher wavenumber values and an increase in the bandwidth for the $\nu_s(\text{CH}_2)$ band or a decrease in wavenumber values for the $\nu(\text{C}=\text{O})$ band as function of temperature can, therefore, provide information on the

effect of proteins on the gel-to-fluid phase transition temperature of lipids (T_m). The temperature at the inflexion point corresponds to T_m .^{146, 266}

Figure 6.3 shows the temperature-dependence of the position of the $\nu_s(\text{CH}_2)$ and $\nu(\text{C}=\text{O})$ bands of DOPC vesicles in the absence and presence of recoverin and Ca^{2+} . No phase transition can be observed since the T_m of DOPC is $-19\text{ }^\circ\text{C}$.¹⁴⁹ For both the $\nu_s(\text{CH}_2)$ and $\nu(\text{C}=\text{O})$ bands, a difference in wavenumber values at all temperatures is observed for DOPC with Rec-nMyr in the absence as well as in the presence of Ca^{2+} . More specifically, Rec-nMyr increases the lipid acyl chain order and hydration. In contrast, overlapping curves are observed for DOPC in the presence and absence of recoverin and Ca^{2+} . Therefore, the addition of Rec-Myr to lipids does not significantly affect the acyl chain order and lipid hydration in the absence or presence of Ca^{2+} .

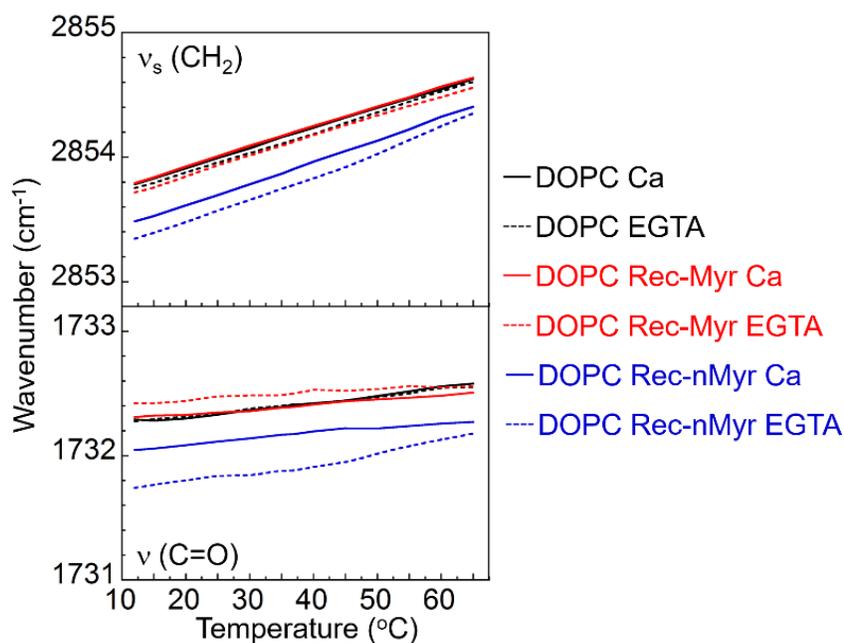


Figure 6.3 : Temperature dependence of the $\nu_s(\text{CH}_2)$ (up) and the $\nu(\text{C}=\text{O})$ (down) wavenumbers of DOPC vesicles in the absence (black) and presence of Rec-Myr (red) and Rec-nMyr (blue) and in the absence (0.5 mM EGTA) (dotted line) and presence of Ca^{2+} (10 mM Ca^{2+}) (full line) at a lipid:Rec molar ratio of 200:1. The error is estimated to be $\pm 0.1\text{ cm}^{-1}$.

6.5.3 Lipid lateral diffusion

Lateral diffusion of lipids has been probed by CODEX. In this technique, MAS allows elimination of the orientation-dependent terms and refocusing of the signal in the orientation-independent isotropic chemical shift. This refocusing increases the sensitivity and enhances resolution. 180° pulses are applied with a synchronization of the rotor period to reintroduce (recouple) the orientation dependence of the chemical shift anisotropy.³¹¹ Lateral diffusion is probed in the exchange period where a change in the orientation of lipids in the membrane can occur.^{310, 311} The second recoupling period monitors the new orientation of lipids in comparison with the first recoupling period. The signal decay following the exchange period is proportional to lateral diffusion rate, a greater lateral diffusion resulting in a greater decay and a lower plateau value.³⁰⁹⁻³¹¹ However, the use of MLV in our experiments does not allow the determination of the lateral diffusion coefficient as a high polydispersity of lipid bilayer radii is present.^{309, 310} In addition, the CODEX decay may encompass several lipid motions.

Figure 6.4 shows the CODEX decay of DOPC multilamellar vesicles in the absence and presence of recoverin and Ca^{2+} . The smallest lateral diffusion has been obtained for pure DOPC, which displays the largest plateau values. Both Rec-Myr and Rec-nMyr increase lipid lateral diffusion as the resulting plateau decays are located at lower values than those of pure DOPC. The presence of Ca^{2+} alters the lateral diffusion of pure DOPC as well as in the presence of Rec-nMyr. More specifically, the lipid lateral diffusion is greater for DOPC in the presence of Ca^{2+} as the decay plateau reaches a lower value. On the other hand, the lipid lateral diffusion is smaller in the presence of Rec-nMyr and Ca^{2+} as the decay plateau reaches a higher value than in the absence of Ca^{2+} and in the presence of protein. In contrast, no significant difference of DOPC lateral diffusion is observed in the presence of Rec-Myr and Ca^{2+} or EGTA. Rec-nMyr results in a greater increase of DOPC lateral diffusion than Rec-Myr. It is interesting to note that the decrease in lipid hydration was also greater in the presence of Rec-nMyr compared to Rec-Myr, which suggests that the interfacial location of recoverin may have an important effect in the membrane lateral diffusion of DOPC.

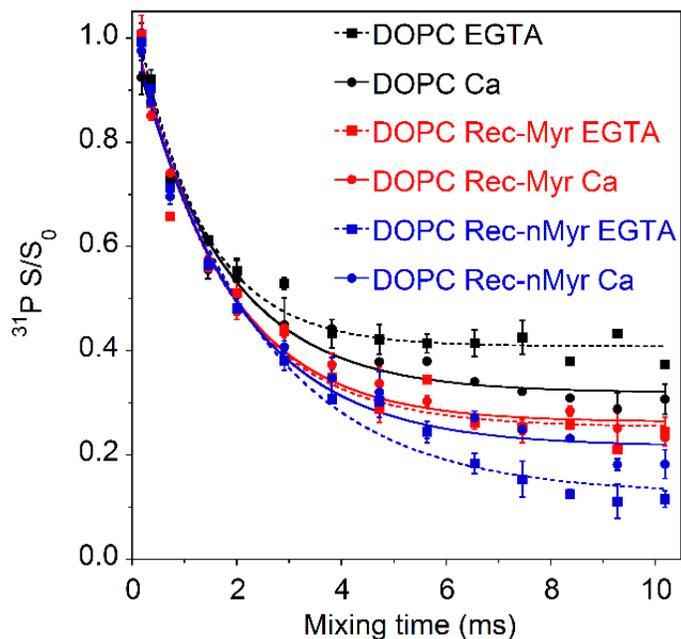


Figure 6.4: ^{31}P CODEX decay at a spinning speed of 5.5 kHz with a dephasing/rephasing train of three 180° pulses of DOPC vesicles in the absence (black) or presence of Rec-Myr (red) or Rec-nMyr (blue) and in the absence (0.5 mM EGTA) (dotted line, square) and presence of Ca^{2+} (10 mM Ca^{2+}) (full line, circle) at 37 °C and a lipid:Rec molar ratio of 200:1.

6.5.4 Recoverin thermal stability

FTIR spectroscopy allows analysis of protein structure using the amide I' band which is centered between 1700 and 1600 cm^{-1} . Indeed, each protein secondary structure gives rise to a band having a characteristic interval of wavenumber values.^{62, 265, 282, 428} Recoverin thermal stability was investigated by monitoring the amide I' band as a function of temperature in the absence and presence of DOPC.

Figure 6.5 presents FTIR spectra in the amide I' region for Rec-Myr and Rec-nMyr in the absence and presence of Ca^{2+} and of DOPC vesicles at 15 and 65 °C. Recoverin is predominantly α -helical in the absence or presence of lipids (Figure 6.5). The spectra are characterized by an amide I' band centered at 1646 cm^{-1} as previously reported.^{39, 40, 112, 242, 405} Moreover, it is thermally stable up to 65 °C in the presence of Ca^{2+} and in the absence or presence of lipids. Furthermore, the absence of Ca^{2+} results in the aggregation of recoverin at 65 °C in the absence or presence of lipids, as shown by the two additional

bands assigned to intermolecular anti-parallel β -sheet structures at 1684 and 1616 cm^{-1} ^{389, 405, 425} (Figure 6.5). The aggregation of recoverin occurs only in the absence of Ca^{2+} at 65 °C. The level of aggregation of recoverin only slightly changes in the absence or presence of lipids (Figure 6.5). Overall, DOPC does not significantly affect the thermal stability of recoverin.

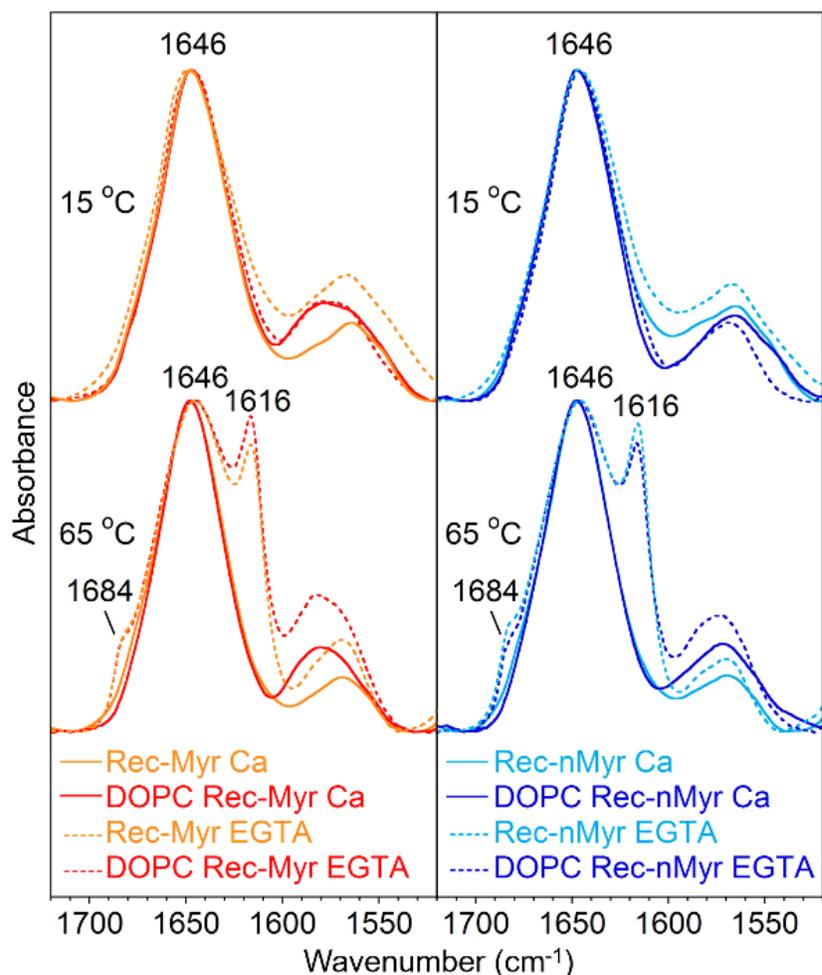


Figure 6.5 : IR spectra of Rec-Myr (left side) (reddish color) and Rec-nMyr (right side) (bluish color) in the amide I' region in the absence (orange and light blue) or in the presence of DOPC (light red and dark blue) vesicles, in the absence (0.5 mM EGTA) (dash line) and presence of Ca^{2+} (10 mM Ca^{2+}) (full line) at 15 (up) and 65 °C (down) and lipid:Rec molar ratio of 200:1 in D_2O buffer. Spectra were normalized with respect to the band maximum at 1646 cm^{-1} .

6.5.5 Myristoyl group environment

The fluorine environment of the recoverin monofluorinated myristoyl group was probed by solid-state NMR. The advantage of fluorine is its spin of $\frac{1}{2}$, high gyromagnetic ratio, natural abundance of 100%, wide spectral width and absence of background signal in biological systems.³¹⁵⁻³¹⁸ Moreover, the ^{19}F chemical shift is highly sensitive to the fluorine atom environment; thus, a small change in its environment may trigger an important change of its chemical shift.^{315, 319-322} The binding of fluorinated molecules to diverse targets was recently reviewed.³⁴⁵

Fluorine atoms were strategically introduced at positions 4 or 12 on the myristoyl moiety of recoverin to, respectively, probe its behavior in the interfacial and more hydrophobic regions of the membrane. Only the fluorinated myristoyl of the protein can give rise to a signal. Therefore, ^{19}F represents the nucleus of choice to study the behavior of the recoverin myristoyl moiety in a more detailed fashion because the sample protein concentration is relatively low. Since recoverin is known to have a different conformation in the absence or presence of calcium,^{39, 40, 112} as well as in the absence or presence of membranes,^{220, 223, 232, 235, 242} the environment surrounding the fluorine of recoverin myristoyl moiety can also be expected to experience significant changes.

Figure 6.6 shows the ^{19}F solid-state NMR spectra of Rec-Myr4F and Rec-Myr12F in the absence and presence of Ca^{2+} as well as in the absence and presence of DOPC membranes. The spectra are presented at 5 °C because optimal interaction between recoverin and DOPC membranes has been observed at this temperature.²¹⁰ Similar results have been obtained at 25 °C (Figure S6.3). The chemical shifts and full widths at half maximum (FWHM) of the different peaks are also presented in Table 6.1. Measurements were first performed in the absence of lipids. In the presence of Ca^{2+} , Rec-Myr4F shows one narrow peak at -179.0 ppm with a slight asymmetry (Figure 6.6A). In the absence of calcium, Rec-Myr4F displays two peaks at -173.7 and -178.5 ppm. The peaks of Rec-Myr4F in the absence of Ca^{2+} are narrower than in the presence of Ca^{2+} . A similar trend is observed for Rec-Myr12F (Figure 6.6B), namely one peak at -177.4 ppm in the presence of Ca^{2+} while two peaks at -177.2 and -180.6 ppm can be observed in the absence of Ca^{2+} .

It is interesting to note that the protein in the absence of Ca^{2+} gives rise to two peaks even though only one fluorine is present on each myristoyl moiety. The presence of these two

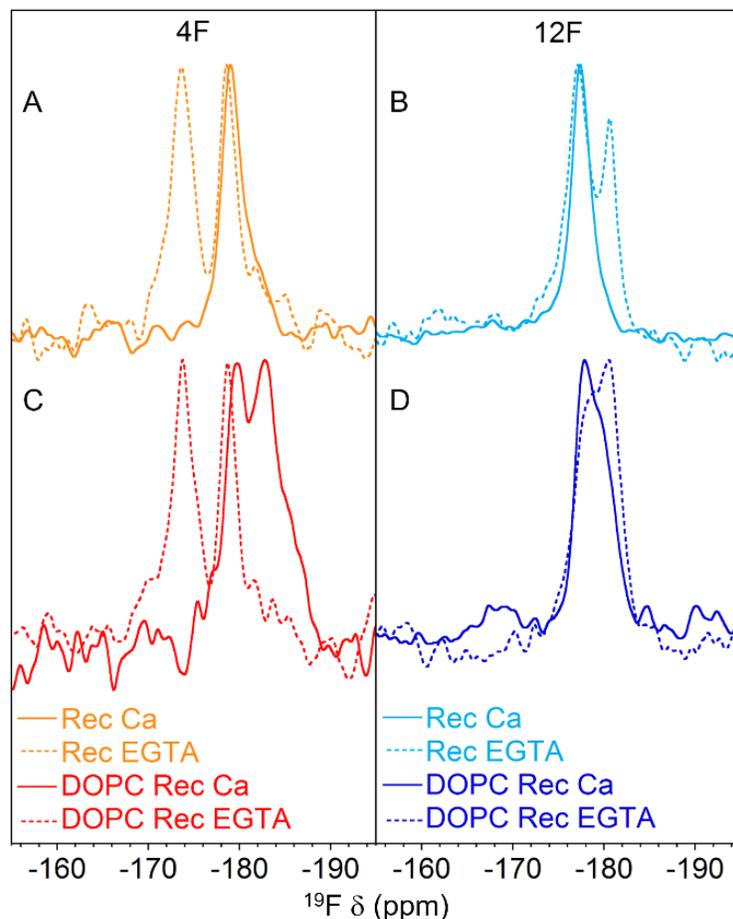


Figure 6.6 : ^{19}F NMR spectra of (A,C) Rec-Myr4F and (B,D) Rec-Myr12F in the absence (A,B) or presence (C,D) of DOPC vesicles in the absence (0.5 mM EGTA) (dashed line) and presence of Ca^{2+} (10 mM Ca^{2+}) (full line) at 5 °C and a lipid:Rec molar ratio of 200:1. Spectra were normalized with respect to the peak height maximum.

Table 6.1 : Chemical shifts (δ) (in ppm) and full width at half maximum (FWHM) (in Hz) of Rec-Myr4F and Rec-Myr12F in the absence (EGTA) or presence (Ca) of Ca^{2+} and in the absence (Rec) or presence of DOPC (DOPC Rec) at 5°C.

		<i>Rec-Myr4F</i>				<i>Rec-Myr12F</i>			
		Ca		EGTA		Ca		EGTA	
Rec	δ	-179.0	-173.7	-178.5	-177.4	-177.2	-180.6		
	FWHM	979	1081	843	944	1020	696		
DOPC Rec	δ	-179.8	-182.8	-173.8	-178.7	-177.9	-179.6	-179.0	-180.5
	FWHM	1008	1195	954	781	722	1266	1127	949

peaks suggests that there are two different populations of recoverin. Previous studies have shown that in the absence of Ca^{2+} , the myristoyl moiety is buried into the hydrophobic pocket.⁴⁰ Nevertheless, the presence of fluorine might partially prevent the introduction of the myristoyl moiety into the hydrophobic pocket by preventing proper interactions with hydrophobic amino acids in this pocket. This would account for the presence of the two peaks. However, the fluorine atom could also experience two different environments in the hydrophobic pocket, which cannot be excluded based on our results. The peaks of both Rec-Myr4F and Rec-Myr12F in the absence of Ca^{2+} have a similar chemical shift to the single peak observed in the presence of Ca^{2+} for both proteins. Therefore, these peaks may correspond to a population of recoverin with an extruded myristoyl moiety. Then, the other peak observed in the absence of Ca^{2+} for both Rec-Myr4F and Rec-Myr12F may correspond to a population of recoverin with a buried myristoyl moiety. For Rec-Myr4F in the presence of Ca^{2+} , the chemical shift of the single peak is more similar to that of the most shielded peak in the absence of Ca^{2+} , while for Rec-Myr12F, the single peak in the presence of Ca^{2+} is more similar to that of the least shielded peak in the absence of Ca^{2+} . This indicates that the environment of the fluorine atom in Rec-Myr4F is more hydrophilic or polar in the buried form than in the extruded form while the opposite is seen for Rec-Myr12F.

The position of the peaks in the presence of calcium with regard to that of the most or least shielded peaks in the absence of calcium provides additional information. Indeed, these data suggest that the environment of the fluorine of Rec-Myr4F is more hydrophobic in the extruded than in the buried form, which is surprising but may be related to the close proximity of carbon 4 with the carbonyl end of the myristoyl group (see below). In contrast, the fluorine of Rec-Myr12F is more hydrophilic in the extruded than in the buried form, which is consistent with the structure of Rec-Myr in the absence⁴⁰ and presence³⁹ of calcium (Figure 6.1). One could conclude that Rec-Myr4F and Rec-Myr12F experience binding with different amino acids in the protein hydrophobic pocket. However, the structure of Rec-Myr in the absence of calcium is showing that equally hydrophobic residues, contributed from different surrounding alpha helices, are in close contact with carbons 4 (Y32, L28, W104) and 12 (W31, I52, F57, F83, Y86, V87, L90) of the myristoyl moiety in the hydrophobic pocket. This inconsistency may be explained by a slight conformational change resulting from the presence of a fluorine on carbon 4. For example, it has been shown that the C-terminal residue W104, which is in close contact with carbon

4 in the hydrophobic pocket, is spatially close to the carbonyl end of the myristoyl group of Rec-Myr in the absence of calcium.¹²¹ However, as an example, this residue is displaced far away from the myristoyl group upon binding of a single calcium, leading to a significantly more polar environment.⁴²⁹ Thus, one could postulate that the fluorine of Rec-Myr4F is somewhat more sensitive to its environment than that of Rec-Myr12F as a result of its proximity from the carbonyl end of the myristoyl.

It is also interesting to note that the two peaks in the absence of Ca^{2+} for Rec-Myr12F have a more similar chemical shift than the ones of Rec-Myr4F, likely because the fluorine atom at position 12 experiences less changes in environment between the two postulated protein populations. Finally, the width of the peak associated with the exposed myristoyl moiety is smaller for Rec-Myr12F (FWHM: 696 Hz), suggesting a greater mobility, as expected for a fluorine closer to the end of the myristoyl chain.³⁶⁴

The ^{19}F NMR spectra of Rec-Myr4F and Rec-Myr12F in the presence of DOPC vesicles are presented in Figure 6.6C,D, respectively. For Rec-Myr4F-Ca (Figure 6.6C), two peaks can be seen in the presence of DOPC while a single peak can be seen in the absence of lipids. The downfield peak of DOPC/Rec-Myr4F-Ca has a similar chemical shift (-179.8 ppm) as that of the single peak of Rec-Myr4F-Ca in the absence of lipids (-179.0 ppm) while the other peak in the DOPC/Rec-Myr4F-Ca spectrum is more shielded, with a chemical shift of -182.8 ppm. The shielding of this additional peak suggests that it could be assigned to a population of Rec-Myr4F-Ca that is inserted in the more hydrophobic DOPC membrane. These results, therefore, suggest that a proportion of the myristoyl moiety of Rec-Myr4F Ca is recruited in the DOPC membrane.

The spectra of Rec-Myr4F-EGTA do not change significantly in the absence and presence of lipids. However, the population of myristoyl extruded out of the hydrophobic pocket could be more closely in contact with the protein hydrophobic pocket or with the lipid acyl chains as its chemical shift is slightly decreased (-178.7 ppm in the presence of lipids compared to -178.5 ppm in the absence of lipids), thus indicating a slight increase in hydrophobic interactions.

The peaks of Rec-Myr12F-Ca are less symmetrical and more shielded (-177.9 and -179.6 ppm) in the presence than in the absence of lipids (-177.4 ppm). The change in shape of the peaks between the presence and absence of DOPC suggests that two populations are present. One of them would be more in contact with the hydrophobic core of DOPC

membranes than the other one. In addition, the most shielded peak, most likely associated to membrane-bound recoverin, is broader (FWHM: 1266 Hz) compared to that observed in the absence of lipids (FWHM: 966 Hz). These results suggest less motion of the myristoyl moiety in a more hydrophobic environment in the presence of DOPC membranes.

For Rec-Myr12F-EGTA in the presence of lipids, the two peaks observed in the absence of lipids merge to a single broad peak with a clear shoulder on the downfield side. This first indicates that the myristoyl population of Rec-Myr12F extruded of the hydrophobic pocket has a lower chemical shift in the presence (-179.0 ppm) than in the absence (-177.2 ppm) of lipids, which suggests that this population is in contact with a more hydrophobic environment such as that of the DOPC membrane. In addition, the population of Rec-Myr12F-EGTA that has an exposed myristoyl moiety is less important compared to that of the buried form.

6.6 Discussion

The goal of the present study was to better understand the interactions between recoverin and zwitterionic lipids such as phosphatidylcholine, which can be found in large amounts in the outer leaflet of ROS disk membranes where recoverin is located. More specifically, the impact of recoverin myristoylation and the presence of calcium were investigated using various spectroscopic methods including several novel approaches.

6.6.1 ^{19}F NMR as a probe of myristoyl group location

The calcium-myristoyl switch phenomenon of recoverin results either in the extrusion of some hydrophobic amino acids and its myristoyl moiety in the presence of Ca^{2+} ³⁹ or in its embedment in the hydrophobic pocket in the absence of Ca^{2+} .⁴⁰ In view of the previous observation of the membrane recruitment of the myristoyl moiety of recoverin in the presence of Ca^{2+} using a perdeuterated myristoyl chain by ^2H -NMR,^{210, 239} more details on the calcium-myristoyl switch is necessary to improve our understanding of the membrane binding behavior of this protein.

The present study is the first to use a fluorinated myristoyl moiety as a probe for the calcium-myristoyl switch of the EF-hand family of proteins. Two peaks have been observed for both Rec-Myr4F and Rec-Myr12F in the absence of lipids and Ca^{2+} . It must

be stressed that the myristoyl group should be buried in the hydrophobic pocket of recoverin in these conditions on the basis of its structure in the Ca^{2+} -free state.⁴⁰ In contrast, the present data suggest that the fluorine on the myristoyl moiety is surrounded by both a hydrophilic and a hydrophobic environment, such as that of the cytosol and that corresponding to the aromatic and other hydrophobic residues of the five flanking helices of the hydrophobic pocket of recoverin, respectively. It is interesting to note that in the absence of Ca^{2+} , the recoverin myristoyl moiety in its three-dimensional structure has strong contacts with the hydrophobic amino acids lining the hydrophobic pocket (PDB number 1IKU).⁴⁰ Therefore, the observation of two different environments for the myristoyl moiety in the absence of Ca^{2+} is consistent with a partial extrusion of the fluorinated myristoyl group most likely due to the presence of the fluorine atom.

In the presence of lipids and Ca^{2+} , the myristoyl of Rec-Myr4F is located in two distinct environments. This is likely observed because the fluorine at this position probes a more interfacial region of the lipid bilayer where the myristoyl moiety might not be tightly associated with the lipid bilayer, thus leading to an exchange between hydrophilic and hydrophobic environments. In fact, N-myristoylation is likely barely sufficient for membrane binding of recoverin.⁹¹ However, the combined action of N-terminal acylation and positively charged residues is likely necessary to allow stable membrane binding of proteins such as recoverin in the presence of anionic lipids instead of zwitterionic lipids.^{82, 97, 430-433} In addition, the myristoyl of both Rec-Myr4F and Rec-Myr12F in the presence of Ca^{2+} is in a more hydrophobic environment in the presence than in the absence of lipids, thus suggesting the immobilization of their myristoyl moiety in the membrane. These results are in agreement with the immobilization of the recoverin myristoyl group observed using the same type of phospholipid membranes previously observed by ^2H NMR spectroscopy.²¹⁰ The increase in bandwidth observed for Rec-Myr12F in the presence of DOPC and Ca^{2+} (FWHM: 944 Hz for Rec compared to 1266 Hz for the membrane-bound fraction of DOPC-Rec) also indicates less mobility, thus confirming the immobilization of the myristoyl group.

^{19}F and ^2H NMR spectroscopies, therefore, provide complementary information on the recoverin calcium-myristoyl switch phenomenon. More specifically, the observation of an isotropic peak in ^2H NMR spectra indicated that recoverin is not immobilized at the membrane interface in the absence of Ca^{2+} and in the presence of phospholipid membranes.²¹⁰ However, powder spectra were observed in the presence of Ca^{2+} and lipids bearing an optimal membrane fluidity, indicating immobilization of the recoverin myristoyl

moiety. The presence of an isotropic peak indicates a high mobility of recoverin both in the presence of Ca^{2+} and lipids with a nonoptimal membrane fluidity as well as in the absence of Ca^{2+} , even in the presence of lipids.²¹⁰ ^2H NMR spectroscopy is thus helpful to evaluate the mobility of a protein-lipid mixture and the proportion of the immobilized population. However, ^{19}F NMR is not only sensitive to mobility, but also to local environment and solvents.^{318, 357-359} In the present study, ^{19}F NMR spectroscopy has shown that the fluorine local environment and solvent exposure of the recoverin myristoyl group are different in the presence and absence of Ca^{2+} and lipids. Therefore, the combined use of ^2H and ^{19}F NMR spectroscopy allows a better understanding of the recoverin calcium-myristoyl switch and the immobilization of its myristoyl moiety in membranes.

The use of fluorine NMR spectroscopy could be extended to other acylated proteins with different types of lipid membranes to probe the environment and dynamics of their acyl chains. Given the sensitivity of fluorine NMR, this represents an interesting and promising alternative to other techniques such as ^2H NMR spectroscopy.^{210, 239}

6.6.2 Effect of myristoylation and calcium on recoverin membrane interactions and thermal stability

The effect of myristoylation and calcium on recoverin membrane interactions was investigated by measuring the vesicle shape, the conformational order of lipid acyl chains, the lipid hydration profile and the lateral diffusion of lipids. Our results demonstrate that the vesicle integrity is preserved in the presence of both forms of recoverin. Rec-nMyr increases the conformational order of the lipid acyl chains while Rec-Myr has no significant effect. In addition, our results indicate that Rec-nMyr has a greater effect on the increase of the hydration of the lipid carbonyl groups compared to Rec-Myr, likely as a result of the expansion of the polar headgroup area. Nevertheless, the most striking effect of recoverin on the conformational order of lipid acyl chains, lipid hydration and lateral diffusion of lipids has been observed with Rec-nMyr in the absence of Ca^{2+} . This is difficult to explain given the structure of recoverin in the Ca^{2+} -free state where its hydrophobic residues should be located in its hydrophobic pocket⁴⁰ although the structure of Rec-nMyr in the absence Ca^{2+} has not yet been solved. Nevertheless, on the basis of the behavior of Rec-Myr4F and Rec-Myr12F in the absence of Ca^{2+} , one can postulate that a significantly larger population of the “extruded conformational state” of Rec-nMyr might exist, which would significantly

perturb the lipid membrane.

The effect of recoverin on lipid lateral diffusion was investigated in the present study by ³¹P CODEX NMR. To the best of our knowledge, this is the first study of the effect of a protein on lipid lateral diffusion using this novel approach. The results indicate that both Rec-Myr and Rec-nMyr increase the DOPC lateral diffusion but that the increase is more important in the presence of Rec-nMyr, most likely due to the more interfacial location of the protein. The increase in lipid lateral diffusion observed with Rec-Myr is supported by the ¹⁹F NMR results demonstrating an interfacial location of the myristoylated protein. Since a greater increase in lipid hydration was also observed in the presence of Rec-nMyr, these results suggest that there is likely a unique correlation between the hydration of the lipid polar headgroup and lipid lateral diffusion. It is interesting to note that a similar trend has been observed for the interaction between 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine and disaccharides; a low hydration has indeed been found to be associated with a low lipid lateral diffusion by fluorescence spectroscopy.⁴³⁴

Our results also indicate that Ca²⁺ increases the lateral diffusion of pure DOPC, whereas no significant effect of Ca²⁺ was previously observed on lipid lateral diffusion⁴³⁵ using, however, mechanically oriented lipid bilayers by glass plates. Nevertheless, a more important increase in lipid lateral diffusion in the presence of protein and in the absence of Ca²⁺ has also been observed for the protein annexin.⁴³⁶⁻⁴³⁸

Finally, the presence of DOPC does not affect the thermal stability of recoverin in all conditions investigated. This is consistent with the postulated peripheral membrane binding of recoverin where the largest share of this protein is not membrane embedded.^{220,}

^{230, 234, 235, 239, 425}

6.7 Conclusions

The interaction between recoverin and phosphatidylcholine, the major lipid component of rod out segments, as well as the impact of both calcium and protein myristoylation, has been investigated in the present study. The vesicle integrity is preserved in the presence and absence of Ca²⁺ for the myristoylated and non-myristoylated forms of the protein. In addition, our results indicate that lipid lateral diffusion is correlated with lipid hydration, the effect being more important with Rec-nMyr. The use of ¹⁹F NMR spectroscopy provided useful information on the calcium-myristoyl switch of recoverin, namely that the myristoyl

group probes two different environments in the absence of Ca^{2+} and the immobilization of the recoverin myristoyl moiety in DOPC membranes in the presence of Ca^{2+} . The combination of these novel approaches provided detailed information on the membrane interactions of recoverin and could be applied to other acylated proteins.

6.8 Acknowledgements

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada (J.-F.P., C.S. and M.A.), the Fonds de recherche du Québec-Nature et Technologies (FRQ-NT) (J.-F.P. and M.A.), and Université Laval (J.-F.P., C.S. and M.A.). The Regroupement québécois de recherche sur la fonction, l'ingénierie et les applications des protéines (PROTEO), the Centre de recherche sur les matériaux avancés (CERMA), the Centre québécois sur les matériaux fonctionnels (CQMF), and the Centre de recherche du CHU de Québec are acknowledged for the infrastructure provided to us. PROTEO and CQMF are supported by FRQ-NT. K.P.-F. is the recipient of graduate scholarships from NSERC and FRQ-NT. G.V.-P. is the recipient of a graduate scholarship from the Fonds de recherche du Québec-Santé (FRQS). M.-C.G. is the recipient of graduate scholarships from PROTEO and NSERC. The authors would like to thank Jean-François Rioux-Dubé and François Paquet-Mercier for their support with the FT-IR experiments, and Matthieu Fillion for helpful discussions.

6.9 Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

6.10 Supporting information

6.10.1 Determination of the molar absorption coefficient of recoverin by UV-visible spectroscopy

Since various values of the absorption coefficient of recoverin at 280 nm have been reported in the literature^{111, 117, 128, 129, 217, 258} and obtained with different methodologies,^{439, 440} the absorption coefficient of myristoylated (protonated (current study) or perdeuterated²¹⁰) and non myristoylated recoverin have been determined experimentally.

To this aim, solutions of dialyzed protein obtained as described in the Materials and

methods section have first been lyophilized. Dried recoverin in the absence or presence of calcium has been precisely weighted and solubilized separately in a buffer (50 mM NH_4HCO_3 and 50 μM CaCl_2 in the presence of calcium or 50 μM NH_4HCO_3 in the absence of calcium). A calibration curve has been established with dilutions of a stock solution. Absorbance was measured three times for each sample using the same solution. The cell was washed minimally three times with water before drying with compressed air between each analysis. The UV-visible spectrophotometer used was a Varian Cary 50 Bio (Agilent Technologies, Mulgrave, Australia). A cell with an optical path length of 0.5 or 1 cm was used. Spectra were obtained with a scan rate of 300 nm/min.

The molar absorption coefficient was determined from the plot of the absorbance versus the concentration of all different diluted solutions of various stock solutions for a same form of the protein (Rec-Myr/Rec-nMyr, Ca/EGTA). A minimum of two stock solutions were prepared with each form of the protein. Combining all solutions of the same form of the protein in the same plot eliminates or reduces the impact of the error caused by sample preparation. Each individual experimental point in the plot is the average value of the replicate measurements. Only diluted solutions of a stock solution that allowed a correlation coefficient (R^2) > 0.99 were retained for the plot. The molar absorption coefficient was calculated with a simple linear regression by linear least squares. This statistical treatment was adequate as the error on concentration is very small compared to the values of absorbance. Only the absorbance values have an uncertainty. Also, this model is based on the hypothesis of a normal distribution of the residual error. The uncertainty in the molar absorption coefficient was calculated by $\frac{s \cdot t}{\sqrt{n}}$, where s is the standard deviation of the slope, t is the value of T of the Student test for 95% confidence level (between 4.303 and 2.000) and n is the number of points on the slope.

Figure S6.1 presents the absorbance at 280 nm as a function of concentration of the various forms of recoverin (Rec-nMyr/Rec-Myr-h₂₇/Rec-Myr-d₂₇) and in the absence or presence of calcium. The absorption coefficient of all conditions combined is estimated to be $22071 \pm 52 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. In addition, the values obtained for the different forms of the protein are very similar taken into account the experimental error.

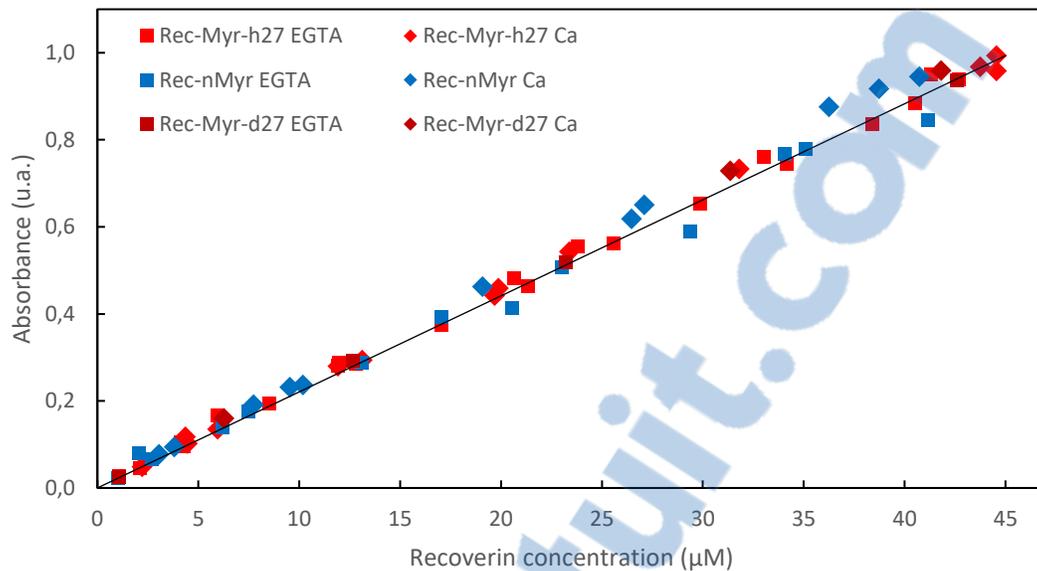


Figure S6.1 : Absorbance at 280 nm as a function of recoverin concentration in the absence (Rec-nMyr) or presence (Rec-Myr) of the myristoyl group in the protonated (h_{27}) and perdeuterated (d_{27}) forms and in the absence (EGTA) and presence of calcium (Ca) with the curve of molar absorption coefficient at $22071 \pm 52 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ as guideline.

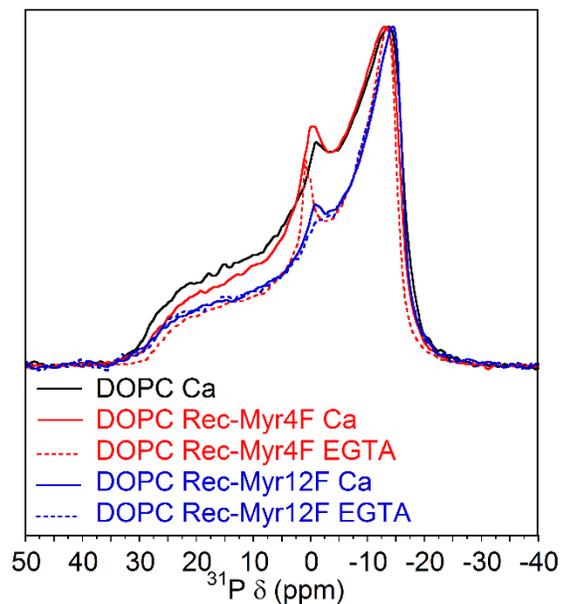


Figure S6.2 : ^{31}P static solid-state NMR spectra of DOPC vesicles in the absence (black) and presence of Rec-Myr4F (red) or Rec-Myr12F (blue) and in the absence (0.5 mM EGTA) (dotted line) and presence of Ca^{2+} (10 mM Ca^{2+}) (full line) at 25 °C and a lipid:Rec molar ratio of 200:1. Spectra were normalized with respect to the peak height maximum.

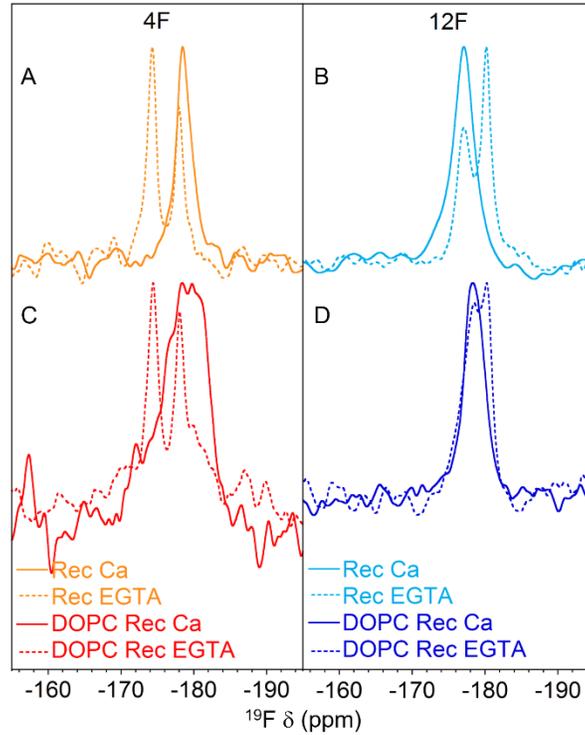


Figure S6.3 : ^{19}F NMR spectra of (A,C) Rec-Myr4F and (B,D) Rec-Myr 12F in the absence (A,B) or presence (C,D) of DOPC vesicles in the absence (0.5 mM EGTA) (dashed line) and presence of Ca^{2+} (10 mM Ca^{2+}) (full line) at 25 °C and a lipid:Rec molar ratio of 200:1. Spectra were normalized with respect to the peak height maximum.

Chapitre 7

Conclusion et perspectives

L'objectif général de ce projet de doctorat était de mieux comprendre les paramètres qui influencent les interactions entre la recoverine et les membranes lipidiques, ainsi que le phénomène de *calcium-myristoyl switch*. Ces paramètres permettaient de faire un lien avec le processus de phototransduction impliquant la recoverine au niveau moléculaire en fonction de la composition lipidique des membranes. La présence du Ca^{2+} , de la myristoylation de la recoverine et de la composition membranaire sont les trois paramètres ayant été étudiés dans cette thèse qui pouvaient influencer l'interaction membranaire de la recoverine et qui seront discutés successivement. Ces trois paramètres ont été étudiés par spectroscopie IR et RMN. La spectroscopie IR a permis de caractériser la structure secondaire, la coordination du Ca^{2+} sur les carboxylates des chaînes latérales des acides aminés et la stabilité thermique de la recoverine, ainsi que l'ordre conformationnel des chaînes acyle, l'hydratation des carbonyles et la coordination du Ca^{2+} sur les phosphates des lipides. La spectroscopie RMN en solution et à l'état solide a permis d'évaluer l'immobilisation et la mobilité du groupement myristoylé de la recoverine dans des membranes lipidiques, l'intégrité des structures lipidiques modèles utilisées et la diffusion latérale des lipides.

7.1 Importance de la présence d'ions calcium

7.1.1 Influence sur la recoverine

La structure secondaire de la recoverine pure en solution est peu influencée par la présence ou l'absence de Ca^{2+} à la température ambiante ou corporelle. Cependant, la présence de Ca^{2+} augmente la stabilité thermique de la recoverine. De plus, la Rec-Myr nécessite une plus faible concentration en Ca^{2+} pour conserver sa stabilité thermique au-dessus de 40 °C comparativement à la Rec-nMyr. La liaison du Ca^{2+} par la recoverine a été observée par le changement de forme et de position du maximum de la bande de vibration des carboxylates des chaînes latérales des acides aminés. La diminution de la concentration effective de Ca^{2+} pour la recoverine, en raison de la liaison de cet ion divalent par la charge négative des lipides PG grâce à la formation de complexes entre

ces lipides et le Ca^{2+} , a résulté en une diminution de la stabilité thermique de la recoverine. L'absence de Ca^{2+} en présence des lipides PG n'a pas induit de changement majeur sur la stabilité thermique de la recoverine (résultats non publiés). De plus, la présence du lipide zwitterionique DOPC n'a pas résulté en un changement majeur de la stabilité thermique de la recoverine tant en présence qu'en absence de Ca^{2+} . Ainsi, l'étude de l'interaction membranaire avec les PG et PC a confirmé l'importance du Ca^{2+} pour conserver la stabilité thermique de la recoverine.

Pour l'immobilisation du groupement myristoylé de la recoverine, l'obtention d'un spectre de poudre en présence de Ca^{2+} et d'un pic isotrope en absence de Ca^{2+} en spectroscopie RMN à l'état solide du deutérium pour le groupement myristoylé perdeutééré indiquent un changement de conformation de la recoverine en conséquence de son *calcium-myristoyl switch* en présence des lipides PC. Pour la recoverine avec un groupement myristoylé monofluoré en présence de Ca^{2+} , un seul type d'environnement est ressenti par le groupement myristoylé comparativement en absence de Ca^{2+} où il ressent deux environnements selon le nombre de pic présent sur les spectres en RMN du fluor-19. L'apparition d'un deuxième pic pour la Rec-Myr4F et d'un épaulement du pic de la Rec-Myr12F en présence de Ca^{2+} et DOPC indique l'immobilisation de l'atome de fluor sur le groupement myristoylé dans la membrane. Ainsi, le Ca^{2+} est nécessaire pour l'immobilisation membranaire du groupement myristoylé et pour observer le phénomène de *calcium-myristoyl switch*.

7.1.2 Influence sur les lipides

Les PG forment des complexes en présence de Ca^{2+} . La réduction en concentration de ces complexes PG- Ca^{2+} en les faisant fondre à haute température a résulté en une augmentation de l'interaction de la recoverine avec les membranes, ce qui a été observé par l'ordre conformationnel des chaînes acyle et l'hydratation des lipides. À l'opposé, les PC ne forment pas de complexe avec le Ca^{2+} . La présence de Ca^{2+} ne perturbe pas significativement l'orientation des lipides orientés mécaniquement entre des lamelles de verre (PC) ni la forme des VMLs (PC et PG) (résultats non publiés). Néanmoins, des spectres de DMPG ont montré un pic isotrope en présence de recoverine, ce qui indique la présence de petites structures mobiles qui est plus significative en absence qu'en présence de Ca^{2+} (résultats non publiés). Finalement, nos travaux ont montré que la diffusion latérale des lipides en présence de Ca^{2+} augmente pour la DOPC pure, ne varie

pas significativement pour la DOPC en présence de Rec-Myr et diminue pour la DOPC en présence de Rec-nMyr.

7.2 Importance du groupement myristoylé de la recoverine

7.2.1 Influence sur la recoverine

La structure secondaire de la recoverine pure en solution est peu influencée par la présence ou l'absence de son groupement myristoylé à la température ambiante ou corporelle. Cependant, ce groupement myristoylé augmente la stabilité thermique de la recoverine pure en solution en réduisant le ratio Ca^{2+} :recoverine nécessaire avant l'apparition de l'agrégation. En effet, la présence du groupement myristoylé permet d'observer une réduction de l'accessibilité des acides aminés de la poche hydrophobe de la recoverine au solvant, ce qui résulte en une modification de la forme et du maximum de la bande de vibration des carboxylates. En présence de DOPC, la myristoylation de la recoverine ne modifie pas de manière significative sa stabilité thermique. En présence de lipides chargés négativement complexant le Ca^{2+} , la Rec-nMyr est moins agrégée à 65 °C que la Rec-Myr, ce qui est corrélé avec leur constante d'association au Ca^{2+} .¹¹⁵ L'inverse est cependant observé pour la protéine pure en solution.

7.2.2 Influence sur les lipides

La myristoylation de la recoverine a mené à une légère réduction de son interaction membranaire avec le DMPG selon les valeurs de T_M . Les courbes de thermotropisme des PG insaturés ne montrent pas d'impact de la myristoylation de la recoverine sur l'ordre des chaînes acyle. De plus, l'hydratation des carbonyles des PG insaturés diminue légèrement plus en présence de la Rec-nMyr que de la Rec-Myr comparativement aux lipides purs. Les courbes de thermotropisme de la DOPC montrent que la Rec-Myr n'a pas d'influence sur ce lipide. Toutefois, la Rec-nMyr ordonne et hydrate la DOPC. Cet effet pourrait être relié à la plus grande diffusion latérale de la DOPC en présence de la Rec-nMyr comparativement à la Rec-Myr. Le groupement myristoylé de la recoverine élimine la diminution de la diffusion latérale des lipides en présence de Ca^{2+} en conséquence de la liaison membranaire de la recoverine. L'absence ou la présence d'un groupement myristoylé protoné, perdeutééré ou monofluoré de la recoverine ne perturbe pas

l'orientation des lipides sur des lamelles de verre (PC) ou en VMLs (PC et PG) (résultats non publiés). Néanmoins, des spectres de DMPG ont montré un pic isotrope en présence de recoverine, ce qui indique la présence de petites structures mobiles qui est plus significative en présence de la Rec-Myr que la Rec-nMyr (résultats non publiés).

7.3 Importance de la composition membranaire

7.3.1 Influence des lipides sur la recoverine

Cette thèse a montré que la charge de la tête polaire des lipides n'influence pas la stabilité thermique de la recoverine tant qu'elle peut lier suffisamment de Ca^{2+} . En complexant le Ca^{2+} , le PG réduit la stabilité thermique de la recoverine. Toutefois, la fonte des complexes DMPG- Ca^{2+} a permis à la recoverine d'avoir accès à suffisamment de Ca^{2+} pour conserver sa stabilité thermique jusqu'à une température de 65 °C. La DOPC n'a pas d'effet sur la stabilité thermique de la recoverine en présence de Ca^{2+} . En absence de Ca^{2+} , la nature de la tête polaire des lipides n'a pas d'influence sur l'agrégation de la recoverine à 65 °C.

En présence de Ca^{2+} , l'augmentation du nombre d'insaturations des chaînes acyle des PG diminue la stabilité thermique de la recoverine, même si l'augmentation du nombre d'insaturations des chaînes acyle des lipides diminue leur liaison du Ca^{2+} ,⁴⁴¹ ce qui n'est pas le cas avec les PC ne montrant pas d'agrégation (résultats non publiés). En absence de Ca^{2+} , les lipides avec deux chaînes acyle saturées (dimyristoyl) augmentent la stabilité thermique de la recoverine à l'exception de la Rec-nMyr en présence de PG alors que les lipides avec deux chaînes acyle insaturées (dioléoyl) diminuent la stabilité thermique de la recoverine à l'exception de la Rec-nMyr en présence de PC (résultats non publiés). Ainsi, globalement, l'augmentation de la fluidité membranaire déstabilise la recoverine.

L'immobilisation du groupement myristoyle de la recoverine est visible par spectroscopie RMN à l'état solide du deutérium dans une plage de fluidité membranaire optimale en présence de Ca^{2+} . Une immobilisation maximale a été observée en présence de DOPC. Ce lipide a donc été sélectionné pour confirmer l'immobilisation membranaire du groupement myristoyle de la recoverine en présence de Ca^{2+} en utilisant des groupements myristoyle monofluorés en position 4 et 12.

7.3.2 Influence de la recoverine sur les lipides

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse ont permis de démontrer que la Rec-nMyr ordonne les chaînes acyle de la DOPC, mais n'a pas d'effet sur les PG à l'exception du DMPG. La Rec-Myr n'a pas d'effet sur l'ordre conformationnel des chaînes acyle des lipides à l'exception des lipides à deux chaînes acyle saturées (DMPC (résultats non publiés) et DMPG) qu'elle désordonne. La recoverine déshydrate tous les lipides à l'exception de la Rec-nMyr qui hydrate la DOPC.

La localisation membranaire de la recoverine en présence de PC et PG est observée par la mesure de paramètres différents. La présence de la recoverine résulte en une augmentation de la T_M uniquement pour le DMPG et non pour la DMPC (résultats non publiés). Cependant, les spectres en RMN du deutérium et du fluor-19 montrent que la Rec-Myr est immobilisée dans les membranes de PC. Ces résultats suggèrent que la recoverine doit être une protéine périphérique. Finalement, l'intégrité des structures lipidiques modèles a été globalement conservée en présence et absence de recoverine et de Ca^{2+} .

7.4 Perspectives des travaux de recherche

La composition membranaire des disques du SEB est très particulière et montre une importance pour l'interaction membranaire de la recoverine. Seulement des lipides purs ont été étudiés dans le cadre de cette thèse. Les membranes des disques du SEB ont cependant une composition hétérogène. Ainsi, la préparation de mélanges de lipides pour mimer progressivement les membranes des disques du SEB et observer l'influence des différents paramètres étudiés dans cette thèse pourraient permettre de comprendre l'impact de la composition membranaire particulière des disques du SEB sur la liaison membranaire de la recoverine. De plus, le contenu moyen en Chol des disques du SEB est plus faible que dans d'autres membranes. Cependant, la concentration en Chol des disques augmente progressivement jusqu'à l'extrémité apicale des SEB à proximité de l'épithélium pigmentaire rétinien. Ainsi, il serait intéressant de faire des expériences à différentes concentrations en Chol. Des essais préliminaires à 10 % de Chol en mélange avec les lipides étudiés ont été réalisés. L'utilisation de la PS au lieu du PG serait aussi intéressante compte tenu que le phénomène de *calcium-myristoyl switch* a été observé uniquement avec la PS en tant que lipide chargé négativement en monocouche à

l'interface air-eau.²³⁴

L'étude des lipides purs pourrait aussi être poursuivie pour clarifier certains questionnements toujours en suspens. En effet, des études supplémentaires pourraient être effectuées pour comprendre l'existence du pic isotrope observé en présence de recoverine et de DMPG. Quelques essais ont été entrepris pour déterminer si le ratio molaire lipide:recoverine avait une influence sur l'intensité de ce pic isotrope en absence de Ca^{2+} pour le DMPG, mais aucune conclusion claire n'a pu être tirée suite à ces expériences. De plus, il serait avantageux de varier la concentration des différentes composantes du tampon (NaCl, HEPES, EGTA), de protéine et le pH pour déterminer si des charges de la recoverine pourraient influencer le DMPG par des interactions électrostatiques et causer le pic isotrope. La fluidité membranaire pourrait être en cause pour l'observation de ce pic. Plus encore, faire des analyses à de plus hautes températures avec le DMPG et à de plus basses températures pour le POPG et le DOPG dans une zone de stabilité thermique de la recoverine pourraient apporter des informations additionnelles. Il serait aussi intéressant de déterminer l'effet de la fonte des complexes PG- Ca^{2+} sur les spectres RMN en présence de DMPG car aucune expérience de ce type n'a été entreprise en spectroscopie RMN à l'état solide du phosphore-31.

La diffusion latérale des lipides a été étudiée seulement avec la DOPC. Ainsi, il serait très intéressant de tester d'autres têtes polaires lipidiques en considérant l'impact des lipides chargés négativement sur l'interaction membranaire de la recoverine. Quelques essais avaient été effectués avec la DMPC en plus de la DOPC. Toutefois, l'optimisation du signal et de sa décroissance pour les mêmes nombres de pulses de 180° dans le recouplage du signal était ardu en fonction du lipide étudié. Il est en effet important de conserver le même nombre de pulses de 180° dans le recouplage pour les différents lipides afin de comparer adéquatement l'effet du Ca^{2+} et de la recoverine sur ces lipides.

Il serait également intéressant de poursuivre l'étude avec les groupements myristoyle monofluorés aux mêmes positions et/ou à d'autres positions. Différentes positions de monofluoration sur le groupement myristoyle de la recoverine permettraient de sonder la mobilité du fluor à différents endroits dans la poche hydrophobe de la recoverine en absence de Ca^{2+} et possiblement à différentes profondeurs d'insertion dans la membrane en présence de Ca^{2+} . Ainsi, les hypothèses posées pour la présence des deux populations en absence de Ca^{2+} pourraient être clarifiées. Des études en spectroscopie RMN en

solution de l'interaction entre l'atome de fluor et les acides aminés de la poche hydrophobe de la recoverine pourraient permettre de confirmer ou infirmer l'enfouissement du groupement myristoyle. Ainsi, des spectres hétéronucléaires d'effet nucléaire Overhauser (NOE, *nuclear Overhauser effect*) multidimensionnels entre les atomes de fluor du groupement myristoyle et de ^{13}C ou ^{15}N des acides aminés dans la poche hydrophobe pourraient montrer quel(s) acide(s) aminé(s) de la poche hydrophobe interagit avec l'atome de fluor selon sa position sur le groupement myristoyle. Les interactions entre chaque atome de carbone du groupement myristoyle de la recoverine et les acides aminés de sa poche hydrophobe sont déjà connus.⁴⁰ De plus, étant donné que l'analyse de l'immobilisation de la recoverine par spectroscopie RMN du ^{19}F exposée dans ce projet de doctorat ne demande pas d'échantillons mécaniquement orientés par des lamelles de verre, les PG pourraient ainsi être étudiés plus facilement. Différentes combinaisons de chaînes acyle et de têtes polaires des lipides purs ou en mélange pourraient aussi être étudiées pour déterminer leur effet sur l'immobilisation du groupement myristoyle de la recoverine. L'utilisation d'un système lipidique modèle orienté comme celui utilisé pour la spectroscopie RMN à l'état solide du deutérium dans cette thèse serait aussi intéressant. L'atome de fluor à l'état solide montre une dépendance orientationnelle dans le champ magnétique et n'est pas quadropolaire. Ce système lipidique modèle étant aussi moins hydraté que des VMLs, il pourrait favoriser l'immobilisation du groupement myristoyle de la recoverine. La variation du déplacement chimique du fluor-19 pourrait ainsi être supérieure que pour les VMLs et aiderait à déterminer son orientation par rapport à la normale de la bicouche lipidique. Cependant, il faudrait développer une sonde RMN capable de faire des échantillons orientés en fluor-19 à l'Université Laval ou aller au *The National High Magnetic Field Laboratory* à Tallahassee (Floride, États-Unis) pour utiliser leur sonde déjà conçue pour cet usage. L'utilisation de la spectroscopie RMN du fluor-19 pourrait aussi être élargie à l'étude d'autres protéines myristoylées avec des groupements myristoyle monofluorés. Cela permettrait de démontrer encore plus clairement l'utilité de cette approche pour observer l'immobilisation membranaire des groupements myristoyle de ces protéines.

L'interaction membranaire de la recoverine pourrait aussi être étudiée par une technique complémentaire, telle que la diffraction des neutrons (voir les revues suivantes : ⁴⁴²⁻⁴⁴⁵). Des systèmes biologiques incluant des lipides, des protéines et des lipopeptides ont déjà été étudiés par cette technique. La diffraction des neutrons permet d'avoir accès à la

dynamique collective et d'un unique atome à l'échelle de temps entre les pico- et les nanosecondes et à l'échelle de distance des nanomètres. Les échelles de temps et de distance ainsi obtenues ont permis de raffiner les modèles de dynamique moléculaire. Une étude en dynamique moléculaire pour déterminer l'angle entre la Rec-Myr et Rec-nMyr et l'interface membranaire ainsi que l'insertion du groupement myristoyle de la recoverine a déjà été publiée.²²⁷ Les données expérimentales pourraient être comparées à de telles simulations. La dynamique de l'immobilisation membranaire du groupement myristoyle pourrait ainsi être étudiée expérimentalement. La profondeur d'insertion du groupement myristoyle de la recoverine pourrait être mesurée en utilisant un groupement myristoyle perdeutééré ou monofluoré tel que décrit dans cette thèse. La diffraction des neutrons permet d'utiliser différents types de membranes modèles. Ainsi l'interaction de la recoverine avec ces différents modèles membranaires pourrait être étudiée pour déterminer si un modèle est meilleur qu'un autre. De plus, les mesures peuvent être effectuées à diverses températures et au-dessus de 0 °C, ce qui est intéressant considérant l'impact de la fluidité membranaire sur la recoverine. L'influence de la recoverine en absence et en présence de son groupement myristoyle sur les lipides membranaires pourrait aussi être analysée d'un point de vue dynamique. La diffraction des neutrons peut aussi servir à étudier des systèmes à deux composés tels que des assemblages de protéines. L'interaction entre la RK et la recoverine pourrait ainsi être analysée.

Le rôle de la recoverine dans l'inhibition de la RK est bien connu. Les premiers 25 résidus en N-terminal de la RK se lient dans la poche hydrophobe en N-terminal qu'en présence de 2 Ca²⁺,^{39, 40, 121, 130, 133, 231, 446-449} mais la région C-terminal de la recoverine serait aussi utilisée pour renforcer la liaison.²⁴⁴ Des études en spectroscopie RMN^{130, 450} et en diffraction des rayons-X²¹⁴ de l'interaction entre la recoverine et la RK ont déjà été effectuées. Cependant, l'influence de la RK sur la structure secondaire de la recoverine et sur leur stabilité thermique respective est inconnue. La spectroscopie IR pourrait permettre d'étudier cette interaction. Des simulations de dynamique moléculaire suggèrent que la présence de la RK augmente l'immobilisation membranaire de la recoverine.²²⁷ Il a aussi été précédemment démontré que la présence de la recoverine augmentait la liaison membranaire de la RK.⁴⁵¹ Les approches utilisées dans cette thèse pourraient être combinées pour quantifier ces interactions. Ainsi, la RK pourrait avoir son groupement farnesyle²³¹ perdeutééré et la recoverine, un groupement myristoyle monofluoré.

L'immobilisation membranaire de la RK et de la recoverine pourrait être étudiée de manière synchrone par la spectroscopie RMN du deutérium et du fluor-19. L'interaction entre la recoverine et la RK pourrait aussi être observée en utilisant différents peptides plus ou moins longs et natifs ou mutés pour la recoverine et la RK pour cibler l'impact des acides aminés de chacune des protéines dans l'interaction. Quelques mutants de ces protéines complètes, tronquées ou en segments peptiques ont déjà été étudiés.^{121, 133, 135, 214, 244, 447, 449} Toutefois, il faudrait dans un premier temps étudier la RK seule (entière ou un peptide impliqué dans la liaison avec la recoverine) avant de l'incorporer à une étude d'interaction avec la recoverine tant en solution qu'en présence de lipides.

Bibliographie

- [1] Sharma, RK et Ehinger, B. (2003) Development and structure of the retina, dans *Adler's physiology of the eye: Clinical applications* (Kaufman, PL et Alm, A, Éditeurs) 10e édition, pp 319-347, Mosby.
- [2] Salesse, C. (2016) *EMC-Ophthalmologie* 13, 1-12.
- [3] Marieb, EN et Lachaine, R (1999) *Anatomie et physiologie humaines*, 2e édition, Éditions du Renouveau pédagogique, Saint-Laurent.
- [4] Rodieck, RW (2003) *La vision*, De Boeck, Paris.
- [5] Meek, KM et Boote, C. (2009) *Prog. Retin. Eye Res.* 28, 369-392.
- [6] Lamb, TD et Pugh, EN. (2006) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 5138-5152.
- [7] Curcio, CA, Sloan, KR, Kalina, RE et Hendrickson, AE. (1990) *J. Comp. Neurol.* 292, 497-523.
- [8] Kawamura, S et Tachibanaki, S. (2008) *Comp. Biochem. Physiol. A-Mol. Integr. Physiol.* 150, 369-377.
- [9] DeMar, JC, Rundle, DR, Wensel, TG et Anderson, RE. (1999) *Prog. Lipid. Res.* 38, 49-90.
- [10] Leibovic, KN. (1990) *Biol. Cybern.* 63, 359-361.
- [11] Young, RW et Bok, D. (1969) *J. Cell Biol.* 42, 392-403.
- [12] Palczewski, K, Kumasaka, T, Hori, T, Behnke, CA, Motoshima, H, Fox, BA, Le Trong, I, Teller, DC, Okada, T, Stenkamp, RE, Yamamoto, M et Miyano, M. (2000) *Science* 289, 739-745.
- [13] Buzhynskyy, N, Salesse, C et Scheuring, S. (2011) *J. Mol. Recognit.* 24, 483-489.
- [14] Kukura, P, McCamant, DW, Yoon, S, Wandschneider, DB et Mathies, RA. (2005) *Science* 310, 1006-1009.
- [15] Schoenlein, RW, Peteanu, LA, Mathies, RA et Shank, CV. (1991) *Science* 254, 412-415.
- [16] Smitienko, OA, Mozgovaya, MN, Shelaev, IV, Gostev, FE, Feldman, TB, Nadochenko, VA, Sarkisov, OM et Ostrovsky, MA. (2010) *Biochem.-Moscow* 75, 25-35.
- [17] DeLange, F, Bovee-Geurts, PHM, VanOostrum, J, Portier, MD, Verdegem, PJE, Lugtenburg, J et DeGrip, WJ. (1998) *Biochemistry* 37, 1411-1420.
- [18] Okada, T et Palczewski, K. (2001) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 420-426.
- [19] Emeis, D, Kuhn, H, Reichert, J et Hofmann, KP. (1982) *FEBS Lett.* 143, 29-34.
- [20] Stryer, L. (1986) *Annu. Rev. Neurosci.* 9, 87-119.
- [21] Kuhn, H. (1980) *Nature* 283, 587-589.
- [22] Scheerer, P, Heck, M, Goede, A, Park, JH, Choe, HW, Ernst, OP, Hofmann, KP et Hildebrand, PW. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 10660-10665.
- [23] Filipek, S, Krzysko, KA, Fotiadis, D, Liang, Y, Saperstein, DA, Engel, A et Palczewski, K. (2004) *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 628-638.
- [24] Fung, BKK, Hurley, JB et Stryer, L. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 152-156.
- [25] Fung, BKK et Stryer, L. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 2500-2504.
- [26] Heck, M et Hofmann, KP. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 10000-10009.
- [27] Spickofsky, N, Robichon, A, Danho, W, Fry, D, Greeley, D, Graves, B, Madison, V et Margolskee, RF. (1994) *Nat. Struct. Biol.* 1, 771-781.
- [28] Heck, M et Hofmann, KP. (1993) *Biochemistry* 32, 8220-8227.
- [29] Clerc, A et Bennett, N. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 6620-6627.
- [30] Catty, P, Pfister, C, Bruckert, F et Deterre, P. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 19489-19493.
- [31] D'Amours, MR et Cote, RH. (1999) *Biochem. J.* 340, 863-869.

- [32] Mou, HM, Grazio, HJ, Cook, TA, Beavo, JA et Cote, RH. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 18813-18820.
- [33] Chabre, M et Deterre, P. (1989) *Eur. J. Biochem.* 179, 255-266.
- [34] Kaupp, UB et Seifert, R. (2002) *Physiol. Rev.* 82, 769-824.
- [35] Gray-Keller, MP et Detwiler, PB. (1994) *Neuron* 13, 849-861.
- [36] Toyoda, J, Hashimoto, H, Anno, H et Tomita, T. (1970) *Vision Res.* 10, 1093-1100.
- [37] Copenhagen, DR et Jahr, CE. (1989) *Nature* 341, 536-539.
- [38] Baylor, DA. (1987) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 28, 34-49.
- [39] Ames, JB, Ishima, R, Tanaka, T, Gordon, JI, Stryer, L et Ikura, M. (1997) *Nature* 389, 198-202.
- [40] Tanaka, T, Ames, JB, Harvey, TS, Stryer, L et Ikura, M. (1995) *Nature* 376, 444-447.
- [41] Gorodovikova, EN, Gimelbrant, AA, Senin, II et Philippov, PP. (1994) *FEBS Lett.* 349, 187-190.
- [42] Arshavsky, VY, Dizhoor, AM, Shestakova, IK et Philippov, PP. (1985) *FEBS Lett.* 181, 264-266.
- [43] Maeda, T, Imanishi, Y et Palczewski, K. (2003) *Prog. Retin. Eye Res.* 22, 417-434.
- [44] Mendez, A, Burns, ME, Roca, A, Lem, J, Wu, LW, Simon, MI, Baylor, DA et Chen, J. (2000) *Neuron* 28, 153-164.
- [45] Kuhn, H, Hall, SW et Wilden, U. (1984) *FEBS Lett.* 176, 473-478.
- [46] Gibson, SK, Parkes, JH et Liebman, PA. (2000) *Biochemistry* 39, 5738-5749.
- [47] Kiser, PD, Golczak, M, Maeda, A et Palczewski, K. (2012) *Biochim. Biophys. Acta* 1821, 137-151.
- [48] Saari, JC. (2012) Vitamin A metabolism in rod and cone visual cycles, dans *Annual review of nutrition, Vol 32* (Cousins, RJ, Éditeur), pp 125-146, Annual reviews, Palo Alto.
- [49] Parker, RO et Crouch, RK. (2010) *Exp. Eye Res.* 91, 788-792.
- [50] Lhor, M et Salesse, C. (2014) *Biochem. Cell Biol.* 92, 510-523.
- [51] Lamb, TD et Pugh, EN. (2004) *Prog. Retin. Eye Res.* 23, 307-380.
- [52] Palczewski, K, Hargrave, PA, McDowell, JH et Ingebritsen, TS. (1989) *Biochemistry* 28, 415-419.
- [53] He, W, Cowan, CW et Wensel, TG. (1998) *Neuron* 20, 95-102.
- [54] Watson, AJ, Katz, A et Simon, MI. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 22150-22156.
- [55] Hu, G et Wensel, TG. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9755-9760.
- [56] Arshavsky, VY et Wensel, TG. (2013) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 7725-7733.
- [57] Palczewski, K, Sokal, I et Baehr, W. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 1123-1130.
- [58] Stephen, R, Filipek, S, Palczewski, K et Sousa, MC. (2008) *Photochem. Photobiol.* 84, 903-910.
- [59] Sharma, RK et Duda, T. (2012) *Front. Molec. Neurosci.* 5, article 42.
- [60] Burgoyne, RD. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* 1742, 59-68.
- [61] Burgoyne, RD, O'Callaghan, DW, Hasdemir, B, Haynes, LP et Tepikin, AV. (2004) *Trends Neurosci.* 27, 203-209.
- [62] Krimm, S et Bandekar, J. (1986) *Adv. Protein Chem.* 38, 181-364.
- [63] Ramachandran, Gt et Sasisekharan, V. (1968) *Adv. Protein Chem.* 23, 283-437.
- [64] Campbell, NA, Reece, JB, Lachaine, R et Bosset, M. (2007) *Biologie*, 3^e édition, ERPI, Saint-Laurent, Québec.
- [65] Voet, D et Voet, JG. (2005) *Biochimie*, De Boeck Supérieur.
- [66] Garrett, R et Grisham, C. (2002) *Principles of biochemistry: With a human focus.*, Harcourt College Publishers, Orlando.

- [67] Richardson, JS. (1981) The anatomy and taxonomy of protein structure, dans *Adv. Protein Chem.* (Anfinsen, CB, Edsall, JT et Richards, FM, Éditeurs), pp 167-339, Academic Press.
- [68] Bootman, MD et Berridge, MJ. (1995) *Cell* 83, 675-678.
- [69] McCue, HV, Haynes, LP et Burgoyne, RD. (2010) *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 2, a004085.
- [70] Schwaller, B. (2010) *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 2, a004051.
- [71] Croall, DE et Demartino, GN. (1991) *Physiol. Rev.* 71, 813-847.
- [72] Kretsinger, RH et Nockolds, CE. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 3313-3326.
- [73] Lewit-Bentley, A et Rety, S. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 637-643.
- [74] Gifford, JL, Walsh, MP et Vogel, HJ. (2007) *Biochem. J.* 405, 199-221.
- [75] Calvez, P. (2012) La liaison membranaire de neuroprotéines sensibles au calcium impliquées dans la phototransduction visuelle et optimisation de la méthode d'analyse de la liaison de protéines aux films monomoléculaires lipidiques, Thèse de doctorat (Ph.D.) en biochimie sous la supervision de Salesse, C, 290 p., Université Laval, Québec, Qc, Canada.
- [76] Yap, KL, Ames, JB, Swindells, MB et Ikura, M. (1999) *Proteins* 37, 499-507.
- [77] Biekofsky, RR et Feeney, J. (1998) *FEBS Lett.* 439, 101-106.
- [78] Julenius, K, Robblee, J, Thulin, E, Finn, BE, Fairman, R et Linse, S. (2002) *Proteins* 47, 323-333.
- [79] Hannoush, AN et Sun, J. (2010) *Nat. Chem. Biol.* 6, 498-506.
- [80] Dunphy, JT et Linder, ME. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* 1436, 245-261.
- [81] Boutin, JA. (1997) *Cell. Signal.* 9, 15-35.
- [82] Resh, MD. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 1451, 1-16.
- [83] Farazi, TA, Waksman, G et Gordon, JI. (2001) *Biochemistry* 40, 6335-6343.
- [84] Wilcox, C, Hu, JS et Olson, EN. (1987) *Science* 238, 1275-1278.
- [85] Duronio, RJ, Rudnick, DA, Adams, SP, Towler, DA et Gordon, JI. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 10498-10504.
- [86] Towler, DA, Adams, SP, Eubanks, SR, Towery, DS, Jacksonmachelski, E, Glaser, L et Gordon, JI. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 1784-1790.
- [87] Towler, DA, Eubanks, SR, Towery, DS, Adams, SP et Glaser, L. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 1030-1036.
- [88] Towler, DA, Gordon, JI, Adams, SP et Glaser, L. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57, 69-99.
- [89] Rundle, DR, Rajala, R et Anderson, RE. (2002) *Exp. Eye Res.* 75, 87-97.
- [90] Johnson, RS, Ohguro, H, Palczewski, K, Hurley, JB, Walsh, KA et Neubert, TA. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 21067-21071.
- [91] McLaughlin, S et Aderem, A. (1995) *Trends Biochem.Sci.* 20, 272-276.
- [92] Resh, MD. (2004) Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins, dans *Membrane dynamics and domains* (Quinn, PJ, Éditeur), pp 217-232, Springer, Boston, MA.
- [93] Cross, FR, Garber, EA, Pellman, D et Hanafusa, H. (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4, 1834-1842.
- [94] Bryant, M et Ratner, L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 523-527.
- [95] Weaver, TA et Panganiban, AT. (1990) *J. Virol.* 64, 3995-4001.
- [96] Sigal, CT, Zhou, WJ, Buser, CA, McLaughlin, S et Resh, MD. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 12253-12257.
- [97] Zhou, WJ, Parent, LJ, Wills, JW et Resh, MD. (1994) *J. Virol.* 68, 2556-2569.
- [98] Zhang, WY, Crocker, E, McLaughlin, S et Smith, SO. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 21459-21466.
- [99] Ames, JB, Tanaka, T, Stryer, L et Ikura, M. (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 432-438.

- [100] Burgoyne, RD et Weiss, JL. (2001) *Biochem. J.* 353, 1-12.
- [101] Weiss, JL et Burgoyne, RD. (2003) EF-Hand proteins and calcium sensing: The neuronal calcium sensors, dans *Handbook of cell signaling* (Bradshaw, RA et Dennis, EA, Éditeurs), pp 79-82, Academic Press, Burlington
- [102] Dizhoor, AM, Nekrasova, ER et Philippov, PP. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162, 544-549.
- [103] Lambrecht, HG et Koch, KW. (1991) *Embo J.* 10, 793-798.
- [104] Dizhoor, AM, Ray, S, Kumar, S, Niemi, G, Spencer, M, Brolley, D, Walsh, KA, Philipov, PP, Hurley, JB et Stryer, L. (1991) *Science* 251, 915-918.
- [105] Gray-Keller, MP, Polans, AS, Palczewski, K et Detwiler, PB. (1993) *Neuron* 10, 523-531.
- [106] Gorodovikova, EN et Philippov, PP. (1993) *FEBS Lett.* 335, 277-279.
- [107] Dizhoor, AM, Chen, CK, Olshevskaya, E, Sinelnikova, VV, Phillipov, P et Hurley, JB. (1993) *Science* 259, 829-832.
- [108] Ray, S, Zozulya, S, Niemi, GA, Flaherty, KM, Brolley, D, Dizhoor, AM, McKay, DB, Hurley, J et Stryer, L. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 5705-5709.
- [109] Dizhoor, AM, Ericsson, LH, Johnson, RS, Kumar, S, Olshevskaya, E, Zozulya, S, Neubert, TA, Stryer, L, Hurley, JB et Walsh, KA. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 16033-16036.
- [110] Sanada, K, Kokame, K, Yoshizawa, T, Takao, T, Shimonishi, Y et Fukada, Y. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 15459-15462.
- [111] Johnson, WC, Palczewski, K, Gorczyca, WA, Riazance-Lawrence, JH, Witkowska, D et Polans, AS. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1342, 164-174.
- [112] Flaherty, KM, Zozulya, S, Stryer, L et McKay, DB. (1993) *Cell* 75, 709-716.
- [113] Ames, JB, Tanaka, T, Ikura, M et Stryer, L. (1996) *Faseb J.* 10, 2271-2271.
- [114] Ames, JB, Tanaka, T, Ikura, M et Stryer, L. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 30909-30913.
- [115] Ames, JB, Porumb, T, Tanaka, T, Ikura, M et Stryer, L. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 4526-4533.
- [116] Ames, JB et Lim, S. (2012) *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 1205-1213.
- [117] Senin, II, Fischer, T, Komolov, KE, Zinchenko, DV, Philippov, PP et Koch, KW. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 50365-50372.
- [118] Permyakov, SE, Cherskaya, A, Senin, II, Zargarov, AA, Shulga-Morskoy, SV, Alekseev, AM, Zinchenko, DV, Lipkin, VM, Philippov, PP, Uversky, VN et Permyakov, EA. (2000) *Protein Eng.* 13, 783-790.
- [119] Tanaka, T, Ames, JB, Kainosho, M, Stryer, L et Ikura, M. (1998) *J. Biomol. NMR* 11, 135-152.
- [120] Ames, JB, Hamasaki, N et Molchanova, T. (2002) *Biochemistry* 41, 5776-5787.
- [121] Weiergraber, OH, Senin, II, Philippov, PP, Granzin, J et Koch, KW. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 22972-22979.
- [122] Hughes, RE, Brzovic, PS, Klevit, RE et Hurley, JB. (1995) *Biochemistry* 34, 11410-11416.
- [123] Li, JL, Geng, CY, Bu, YX, Huang, XR et Sun, CC. (2009) *J. Comput. Chem.* 30, 1135-1145.
- [124] Pepe, IM. (2001) *Prog. Retin. Eye Res.* 20, 733-759.
- [125] Kawamura, S, Cox, JA et Nef, P. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 121-127.
- [126] Chen, CK, Inglese, J, Lefkowitz, RJ et Hurley, JB. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 18060-18066.
- [127] Senin, II, Zargarov, AA, Alekseev, AM, Gorodovikova, EN, Lipkin, VM et Philippov, PP. (1995) *FEBS Lett.* 376, 87-90.
- [128] Calvert, PD, Klenchin, VA et Bownds, MD. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 24127-24129.

- [129] Klenchin, VA, Calvert, PD et Bownds, MD. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 16147-16152.
- [130] Ames, JB, Levay, K, Wingard, JN, Lusin, JD et Slepak, VZ. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 37237-37245.
- [131] Kawamura, S, Hisatomi, O, Kayada, S, Tokunaga, F et Kuo, CH. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 14579-14582.
- [132] Senin, II, Koch, KW, Akhtar, M et Philippov, PP. (2002) *Adv.Exp.Med.Biol.* 514, 69-99.
- [133] Alekseev, AM, Shulga-Morskoy, SV, Zinchenko, DV, Shulga-Morskaya, SA, Suchkov, DV, Vaganova, SA, Senin, II, Zargarov, AA, Lipkin, VM, Akhtar, M et Philippov, PP. (1998) *FEBS Lett.* 440, 116-118.
- [134] Gorodovikova, EN, Senin, II et Philippov, PP. (1994) *FEBS Lett.* 353, 171-172.
- [135] Senin, II, Hoppner-Heitmann, D, Polkovnikova, OO, Churumova, VA, Tikhomirova, NK, Philippov, PP et Koch, K-W. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 48647-48653.
- [136] Kawamura, S. (1993) *Nature* 362, 855-857.
- [137] Makino, CL, Dodd, RL, Chen, J, Burns, ME, Roca, A, Simon, MI et Baylor, DA. (2004) *J. Gen. Physiol.* 123, 729-741.
- [138] Sampath, AP, Strissel, KJ, Elias, R, Arshavsky, VY, McGinnis, JF, Chen, J, Kawamura, SU, Rieke, F et Hurley, JB. (2005) *Neuron* 46, 413-420.
- [139] Sampath, AP, Matthews, HR, Cornwall, MC, Bandarchi, J et Fain, GL. (1999) *J. Gen. Physiol.* 113, 267-277.
- [140] Zozulya, S et Stryer, L. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 11569-11573.
- [141] Kennedy, MJ, Sowa, ME, Wensel, TG et Hurley, JB. (2003) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 1016-1022.
- [142] Satpaev, DK, Chen, CK, Scotti, A, Simon, MI, Hurley, JB et Slepak, VZ. (1998) *Biochemistry* 37, 10256-10262.
- [143] Subramanian, L et Polans, AS. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 1153-1165.
- [144] Bhat, P et Huo, S. (2016) *Exp. Opin. Orphan Drugs* 4, 1207-1216.
- [145] Nelson, DL, Lehninger, AL et Cox, MM. (2008) *Lehninger principles of biochemistry*, Macmillan.
- [146] Casal, HL et Mantsch, HH. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 779, 381-401.
- [147] Mantsch, HH et McElhaney, RN. (1991) *Chem. Phys. Lipids* 57, 213-226.
- [148] Cevc, G. (1991) *Chem. Phys. Lipids* 57, 293-307.
- [149] Marsh, D. (1990) *CRC Handbook of lipid bilayers*, CRC Press, Boca Raton (USA).
- [150] Daemen, FJM. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 300, 255-288.
- [151] Krebs, W et Kuhn, H. (1977) *Exp. Eye Res.* 25, 511-526.
- [152] Fliesler, SJ et Anderson, RE. (1983) *Prog. Lipid. Res.* 22, 79-131.
- [153] Dratz, EA, Miljanich, GP, Nemes, PP, Gaw, JE et Schwartz, S. (1979) *Photochem. Photobiol.* 29, 661-670.
- [154] Miljanich, GP, Nemes, PP, White, DL et Dratz, EA. (1981) *J. Membr. Biol.* 60, 249-255.
- [155] Tsui, FC, Sundberg, SA et Hubbell, WL. (1990) *Biophys. J.* 57, 85-97.
- [156] Hubbell, WL. (1990) *Biophys. J.* 57, 99-108.
- [157] Wu, G et Hubbell, WL. (1993) *Biochemistry* 32, 879-888.
- [158] Lauritzen, L, Hansen, HS, Jorgensen, MH et Michaelsen, KF. (2001) *Prog. Lipid. Res.* 40, 1-94.
- [159] Miljanich, GP, Sklar, LA, White, DL et Dratz, EA. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 552, 294-306.
- [160] Stone, WL, Farnsworth, CC et Dratz, EA. (1979) *Exp. Eye Res.* 28, 387-397.
- [161] Nsoukpoekossi, CN, Salesse, C, Leblanc, RM et Boucher, F. (1985) *Anal. Biochem.* 151, 409-417.

- [162] Salesse, C, Boucher, F et Leblanc, RM. (1984) *Anal. Biochem.* 142, 258-266.
- [163] Vance, DE et Vance, JE. (1985) *Biochemistry of lipids and membranes*, Benjamin/Cummings Pub. Co.
- [164] Stillwell, W et Wassall, SR. (2003) *Chem. Phys. Lipids* 126, 1-27.
- [165] Wiegand, RD et Anderson, RE. (1983) *Exp. Eye Res.* 37, 159-173.
- [166] Mitchell, DC et Litman, BJ. (1998) *Biophys. J.* 74, 879-891.
- [167] Soubias, O et Gawrisch, K. (2007) *J. Am. Chem. Soc.* 129, 6678-6679.
- [168] Mitchell, DC, Niu, SL et Litman, BJ. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 42801-42806.
- [169] Niu, SL, Mitchell, DC, Lim, SY, Wen, ZM, Kim, HY, Salem, N et Litman, BJ. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 31098-31104.
- [170] Niu, SL, Mitchell, DC et Litman, BJ. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 42807-42811.
- [171] SanGiovanni, JP et Chew, EY. (2005) *Prog. Retin. Eye Res.* 24, 87-138.
- [172] Holte, LL, Peter, SA, Sinnwell, TM et Gawrisch, K. (1995) *Biophys. J.* 68, 2396-2403.
- [173] Albert, AD et Boesze-Battaglia, K. (2005) *Prog. Lipid. Res.* 44, 99-124.
- [174] Wassall, SR et Stillwell, W. (2009) *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 24-32.
- [175] Huster, D, Arnold, K et Gawrisch, K. (1998) *Biochemistry* 37, 17299-17308.
- [176] Elliott, MH, Nash, ZA, Takemori, N, Fliesler, SJ, McClellan, ME et Naash, MI. (2008) *J. Neurochem.* 104, 336-352.
- [177] Litman, BJ et Mitchell, DC. (1996) *Lipids* 31, S193-S197.
- [178] Mitchell, DC, Niu, SL et Litman, BJ. (2003) *J. Pediatr.* 143, S80-S86.
- [179] Pates, RD et Marsh, D. (1987) *Biochemistry* 26, 29-39.
- [180] Miljanich, GP, Brown, MF, Mabreygaud, S, Dratz, EA et Sturtevant, JM. (1985) *J. Membr. Biol.* 85, 79-86.
- [181] Israelachvili, JN, Mitchell, DJ et Ninham, BW. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 470, 185-201.
- [182] Cullis, PR et Dekruiff, B. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 559, 399-420.
- [183] Epand, RM. (2007) Membrane lipid polymorphism: relationship to bilayer properties and protein function, dans *Methods in membrane lipids* (Dopico, AM, Éditeur), pp 15-26, Humana Press, New Jersey.
- [184] Epand, RM, D'Souza, K, Berno, B et Schlame, M. (2015) *Biochim. Biophys. Acta* 1848, 220-228.
- [185] Brown, MF. (2012) *Biochemistry* 51, 9782-9795.
- [186] Singer, SJ et Nicolson, GL. (1972) *Science* 175, 720-731.
- [187] Nicolson, GL. (2014) *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 1451-1466.
- [188] Lingwood, D et Simons, K. (2010) *Science* 327, 46-50.
- [189] Simons, K et Ikonen, E. (1997) *Nature* 387, 569-572.
- [190] Pike, LJ. (2003) *J. Lipid Res.* 44, 655-667.
- [191] Laude, AJ et Prior, IA. (2004) *Mol. Membr. Biol.* 21, 193-205.
- [192] Sezgin, E, Levental, I, Mayor, S et Eggeling, C. (2017) *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* 18, 361-374.
- [193] Levental, I et Veatch, SL. (2016) *J. Mol. Biol.* 428, 4749-4764.
- [194] Yeagle, P. (2005) *The structure of biological membranes*, 2^e édition, CRC Press, Boca Raton, USA.
- [195] Fillion, M. (2017) Études spectroscopiques du mécanisme d'action de peptides synthétiques à potentiel antimicrobien, Thèse de doctorat (Ph.D.) en chimie sous la supervision de Auger, M et Voyer, N, 221 p., Université Laval, Québec, Qc, Canada.
- [196] Myers, D. (1999) *Surfaces, interfaces, and colloids : principles and applications*, Wiley-VCH, New York.
- [197] Luckey, M. (2008) *Membrane structural biology : With biochemical and biophysical foundations*, Cambridge University Press, Cambridge.

- [198] Siontorou, CG, Nikoleli, GP, Nikolelis, DP et Karapetis, SK. (2017) *Membranes* 7, article 38.
- [199] Warschawski, DE, Arnold, AA, Beaugrand, M, Gravel, A, Chartrand, E et Marcotte, I. (2011) *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 1957-1974.
- [200] Bechinger, B, Kinder, R, Helmle, M, Vogt, TCB, Harzer, U et Schinzel, S. (1999) *Biopolymers* 51, 174-190.
- [201] Bechinger, B et Sizun, C. (2003) *Concepts Magn. Reso. A* 18, 130-145.
- [202] Cross, TA et Opella, SJ. (1994) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4, 574-581.
- [203] Cross, TA et Quine, JR. (2000) *Concept Magnetic Res.* 12, 55-70.
- [204] Perkins, WR, Minchey, SR, Ahl, PL et Janoff, AS. (1993) *Chem. Phys. Lipids* 64, 197-217.
- [205] Macdonald, RC, Macdonald, RI, Menco, BPM, Takeshita, K, Subbarao, NK et Hu, LR. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1061, 297-303.
- [206] Luckey, M. (2014) *Membrane structural biology: With biochemical and biophysical foundations*, Cambridge University Press.
- [207] Franzin, CM et Marassi, FM. (2005) NMR Structure determination of proteins in bilayer lipid membranes: The FXD family proteins, dans *Advances in planar lipid bilayers and liposomes* (Ottova-Leitmannova, A, Éditeur), pp 77-93, Academic Press.
- [208] Marassi, FM, Ramamoorthy, A et Opella, SJ. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 8551-8556.
- [209] Crowell, KJ, Franzin, CM, Koltay, A, Lee, S, Lucchese, AM, Snyder, BC et Marassi, FM. (2003) *Biochim. Biophys. Acta* 1645, 15-21.
- [210] Potvin-Fournier, K, Valois-Paillard, G, Lefèvre, T, Cantin, L, Salesse, C et Auger, M. (2017) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 490, 1268-1273.
- [211] Fu, RQ et Cross, TA. (1999) *Annu. Rev. Biophys. Biomolec. Struct.* 28, 235-268.
- [212] Cremer, PS et Boxer, SG. (1999) *J. Phys. Chem. B* 103, 2554-2559.
- [213] Wi, S et Kim, C. (2008) *J. Phys. Chem. B* 112, 11402-11414.
- [214] Kumar, RP, Ranaghan, MJ, Ganjei, AY et Oprian, DD. (2015) *Biochemistry* 54, 7222-7228.
- [215] Weiergraber, OH, Senin, II, Zernii, EY, Churumova, VA, Kovaleva, NA, Nazipova, AA, Permyakov, SE, Permyakov, EA, Philippov, PP, Granzin, J et Koch, KW. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 37594-37602.
- [216] Ranaghan, MJ, Kumar, RP, Chakrabarti, KS, Buosi, V, Kern, D et Oprian, DD. (2013) *J. Biol. Chem.* 288, 36160-36167.
- [217] Baldwin, AN et Ames, JB. (1998) *Biochemistry* 37, 17408-17419.
- [218] Boucher, J, Trudel, E, Methot, M, Desmeules, P et Salesse, C. (2007) *Colloids Surf. B* 58, 73-90.
- [219] Desmeules, P, Grandbois, M, Bondarenko, VA, Yamazaki, A et Salesse, C. (2002) *Biophys. J.* 82, 3343-3350.
- [220] Desmeules, P, Penney, SE, Desbat, B et Salesse, C. (2007) *Biophys. J.* 93, 2069-2082.
- [221] Dell'Orco, D, Sulmann, S, Linse, S et Koch, KW. (2012) *Anal. Chem.* 84, 2982-2989.
- [222] Kataoka, M, Mihara, K et Tokunaga, F. (1993) *J. Biochem.* 114, 535-540.
- [223] Lange, C et Koch, KW. (1997) *Biochemistry* 36, 12019-12026.
- [224] Marino, V, Astegno, A, Pedroni, M, Piccinelli, F et Dell'Orco, D. (2014) *Nanoscale* 6, 412-423.
- [225] Marino, V, Sulmann, S, Koch, KW et Dell'Orco, D. (2015) *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 2055-2065.
- [226] Senin, II, Churumova, VA, Philippov, PP et Koch, K-W. (2007) *BMC Biochemistry* 8, article 24.

- [227] Timr, S, Pleskot, R, Kadlec, J, Kohagen, M, Magarkar, A et Jungwirth, P. (2017) *ACS Central Sci.* 3, 868-874.
- [228] Wache, N, Scholten, A, Kluner, T, Koch, KW et Christoffers, J. (2012) *Eur. J. Org. Chem.* 5712-5722.
- [229] Wache, N, Schroder, C, Koch, KW et Christoffers, J. (2012) *ChemBioChem* 13, 993-998.
- [230] Yang, ST, Lim, SI, Kiessling, V, Kwon, I et Tamm, LK. (2016) *Sci. Rep.* 6, article 32866.
- [231] Grigoriev, II, Senin, II, Tikhomirova, NK, Komolov, KE, Permyakov, SE, Zernii, EY, Koch, KW et Philippov, PP. (2012) *Front. Molec. Neurosci.* 5, 13.
- [232] Permyakov, SE, Zernii, EY, Knyazeva, EL, Denesyuk, AI, Nazipova, AA, Kolpakova, TV, Zinchenko, DV, Philippov, PP, Permyakov, EA et Senin, II. (2012) *Amino Acids* 42, 1435-1442.
- [233] Boisselier, E, Calvez, P, Demers, E, Cantin, L et Salesse, C. (2013) *Colloid Surf. B* 109, 109-114.
- [234] Calvez, P, Schmidt, TF, Cantin, L, Klinker, K et Salesse, C. (2016) *J. Am. Chem. Soc.* 138, 13533-13540.
- [235] Nullmeier, M, Koliwer-Brandl, H, Kelm, S, Zagel, P, Koch, KW et Brand, I. (2011) *ChemPhysChem* 12, 1066-1079.
- [236] Calvez, P, Demers, E, Boisselier, E et Salesse, C. (2011) *Langmuir* 27, 1373-1379.
- [237] Valentine, KG, Peterson, RW, Saad, JS, Summers, MF, Xu, XZ, Ames, JB et Wand, AJ. (2010) *Structure* 18, 9-16.
- [238] Dell'Orco, D, Muller, M et Koch, KW. (2010) *Chem. Commun.* 46, 7316-7318.
- [239] Valentine, KG, Mesleh, MF, Opella, SJ, Ikura, M et Ames, JB. (2003) *Biochemistry* 42, 6333-6340.
- [240] Permyakov, SE, Cherskaya, AM, Wasserman, LA, Khokhlova, TI, Senin, II, Zargarov, AA, Zinchenko, DV, Zernii, EY, Lipkin, VM, Philippov, PP, Uversky, VN et Permyakov, EA. (2003) *J. Proteome Res.* 2, 51-57.
- [241] Fischer, T, Senin, II, Philippov, PP et Koch, KW. (2002) *Spectr.-Int. J.* 16, 271-279.
- [242] Ozawa, T, Fukuda, M, Nara, M, Nakamura, A, Komine, Y, Kohama, K et Umezawa, Y. (2000) *Biochemistry* 39, 14495-14503.
- [243] Uversky, VN, Permyakov, SE, Senin, II, Cherskaya, AM, Shulga-Morskoy, SV, Zinchenko, DV, Alekseev, AM, Zargarov, AA, Lipkin, VM, Philippov, PP et Permyakov, EA. (2000) *Bioorg. Khim.* 26, 173-178.
- [244] Zernii, EY, Komolov, KE, Permyakov, SE, Kolpakova, T, Dell'Orco, D, Poetzsch, A, Knyazeva, EL, Grigoriev, II, Permyakov, EA, Senin, II, Philippov, PP et Koch, KW. (2011) *Biochem. J.* 435, 441-450.
- [245] Desmeules, P, Penney, SE et Salesse, C. (2006) *Anal. Bioch.* 349, 25-32.
- [246] Zhang, CQ, Pan, TZ, Salesse, C, Zhang, DM, Miao, L, Wang, L, Gao, YZ, Xu, JY, Dong, ZY, Luo, Q et Liu, JQ. (2014) *Angew. Chem.-Int. Edit.* 53, 13536-13539.
- [247] Garidel, P, Blume, A et Hubner, W. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1466, 245-259.
- [248] Dluhy, RA, Cameron, DG, Mantsch, HH et Mendelsohn, R. (1983) *Biochemistry* 22, 6318-6325.
- [249] Casal, HL, Mantsch, HH et Hauser, H. (1987) *Biochemistry* 26, 4408-4416.
- [250] Lopez-Garcia, F, Micol, V, Villalain, J et Gomez-Fernandez, JC. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1169, 264-272.
- [251] Papahadjopoulos, D. (1977) *J. Colloid Interface Sci.* 58, 459-470.
- [252] Garidel, P et Blume, A. (1999) *Langmuir* 15, 5526-5534.
- [253] Valois-Paillard, G. (2012) Études spectroscopiques de la structure et de l'interaction membranaire de la recoverine, Mémoire de maîtrise en chimie sous la supervision de Auger, M et Salesse, C, 118 p., Université Laval, Québec, Qc, Canada.

- [254] Apffel, A, Fischer, S, Goldberg, G, Goodley, PC et Kuhlmann, FE. (1995) *J. Chromatogr. A* 712, 177-190.
- [255] Takada, Y, Nakayama, K, Yoshida, M et Sakairi, M. (1994) *Anal. Sci.* 10, 713-717.
- [256] Straub, RF et Voyksner, RD. (1993) *J. Chromatogr.* 647, 167-181.
- [257] Overcashier, DE, Brooks, DA, Costantino, HR et Hsu, CC. (1997) *J. Pharm. Sci.* 86, 455-459.
- [258] Xu, XZ, Ishima, R et Ames, JB. (2011) *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 79, 1910-1922.
- [259] Silverstein, RM, Bassler, GC et Morrill, TC. (1998) *Identification spectrométrique de composés organiques*, De Boeck Université, Paris.
- [260] Barth, A. (2007) *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 1073-1101.
- [261] Tamm, LK et Tatulian, SA. (1997) *Q. Rev. Biophys.* 30, 365-429.
- [262] Stuart, BH. (2005) Biological applications, dans *Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications*, pp 137-165, John Wiley & Sons, Ltd.
- [263] Susi, H, Timashef, SN et Stevens, L. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 5460-5466.
- [264] Fabian, H et Mäntele, W. (2002) *Handbook of vibrational spectroscopy*.
- [265] Arrondo, JLR, Muga, A, Castresana, J et Goni, FM. (1993) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 59, 23-56.
- [266] Lewis, R et McElhaney, RN. (1998) *Chem. Phys. Lipids* 96, 9-21.
- [267] Blume, A, Hübner, W et Messner, G. (1988) *Biochemistry* 27, 8239-8249.
- [268] Schultz, ZD et Levin, IW. (2011) Vibrational spectroscopy of biomembranes, dans *Annual review of analytical chemistry, Vol 4* (Cooks, RG et Yeung, ES, Éditeurs), pp 343-366, Annual Reviews, Palo Alto.
- [269] Asher, IM et Levin, IW. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 468, 63-72.
- [270] Umemura, J, Cameron, DG et Mantsch, HH. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 602, 32-44.
- [271] Kodati, VR et Lafleur, M. (1993) *Biophys. J.* 64, 163-170.
- [272] Lewis, RN, McElhaney, RN, Pohle, W et Mantsch, HH. (1994) *Biophys. J.* 67, 2367-2375.
- [273] Arrondo, JLR et Goni, FM. (1998) *Chem. Phys. Lipids* 96, 53-68.
- [274] Griffiths, PR et Pariente, GL. (1986) *Trac-Trends Anal. Chem.* 5, 209-215.
- [275] Cameron, DG, Kauppinen, JK, Moffatt, DJ et Mantsch, HH. (1982) *Appl. Spectrosc.* 36, 245-250.
- [276] Kauppinen, JK, Moffatt, DJ, Mantsch, HH et Cameron, DG. (1981) *Appl. Spectrosc.* 35, 271-276.
- [277] Senak, L, Moore, D et Mendelsohn, R. (1992) *J. Phys. Chem.* 96, 2749-2754.
- [278] Goni, FM et Arrondo, JLR. (1986) *Faraday Discuss.* 81, 117-126.
- [279] Zhang, YP, Lewis, R et McElhaney, RN. (1997) *Biophys. J.* 72, 779-793.
- [280] Tatulian, SA. (2003) *Biochemistry* 42, 11898-11907.
- [281] Jackson, M et Mantsch, HH. (1995) *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 30, 95-120.
- [282] Goormaghtigh, E, Cabiaux, V et Ruyschaert, J-M. (1994) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy, dans *Physicochemical methods in the study of biomembranes* (Hilderson, HJ et Ralston, GB, Éditeurs), pp 405-450, Springer US, Boston, MA.
- [283] Miyazawa, T. (1960) *J. Chem. Phys.* 32, 1647-1652.
- [284] Barth, A. (2000) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 74, 141-173.
- [285] Nara, M, Morii, H et Tanokura, M. (2013) *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 2319-2327.
- [286] Venyaminov, SY et Kalnin, NN. (1990) *Biopolymers* 30, 1243-1257.
- [287] Deacon, GB et Phillips, RJ. (1980) *Coord. Chem. Rev.* 33, 227-250.

- [288] Chary, KVR et Govil, G. (2008) Basic concepts in NMR spectroscopy, dans *NMR in biological systems: From molecules to humans* (Chary, KVR et Govil, G, Éditeurs), pp 1-41, Springer Netherlands, Dordrecht.
- [289] King, RW et Williams, KR. (1989) *J. Chem. Educ.* 66, A213-A219.
- [290] Harris, RK, Becker, ED, De Menezes, SMC, Goodfellow, R et Granger, P. (2001) *Pure Appl. Chem.* 73, 1795-1818.
- [291] Derome, AE. (1987) *Modern NMR techniques for chemistry research*, Pergamon Press, Oxford.
- [292] Levitt, MH. (2001) *Spin dynamics: Basics of nuclear magnetic resonance*, Wiley.
- [293] Williams, KR et King, RW. (1990) *J. Chem. Educ.* 67, A93-A99.
- [294] Chary, KVR et Govil, G. (2008) High-resolution solid-state NMR, dans *NMR in biological systems: From molecules to humans* (Chary, KVR et Govil, G, Éditeurs), pp 317-349, Springer Netherlands, Dordrecht.
- [295] Jelinski, LW et Melchior, MT. (2000) *Appl. Spectrosc. Rev.* 35, 25-93.
- [296] Davis, JH. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 737, 117-171.
- [297] Ashbrook, SE et Duer, MJ. (2006) *Concepts Magn. Reso. A* 28A, 183-248.
- [298] Burnett, LJ et Muller, BH. (1971) *J. Chem. Phys.* 55, 5829-5831.
- [299] Seelig, J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 515, 105-140.
- [300] Iuga, A, Ader, C, Gröger, C et Brunner, E. (2006) Applications of solid-state ³¹P NMR spectroscopy, dans *Annual reports on NMR spectroscopy* (Webb, GA, Éditeur), pp 145-189, Academic Press.
- [301] Smith, ICP et Ekiel, IH. (1984) Phosphorous-31 NMR of phospholipids in membranes, dans *Phosphorous-31 NMR: Principles and applications* (Gorenstein, DG, Éditeur), pp 447-475, Academic Press Inc., London.
- [302] Speyer, JB, Sripada, PK, Dasgupta, SK, Shipley, GG et Griffin, RG. (1987) *Biophys. J.* 51, 687-691.
- [303] Qiu, XX, Mirau, PA et Pidgeon, C. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1147, 59-72.
- [304] Seelig, J, Borle, F et Cross, TA. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 814, 195-198.
- [305] Brumm, T, Mops, A, Dolainsky, C, Bruckner, S et Bayerl, TM. (1992) *Biophys. J.* 61, 1018-1024.
- [306] Peersen, OB et Smith, SO. (1993) *Concept Magnetic Res.* 5, 303-317.
- [307] Hahn, EL. (1950) *Phys. Rev.* 80, 580-594.
- [308] Rance, M et Byrd, RA. (1983) *J. Magn. Reson.* 52, 221-240.
- [309] Lai, A, Saleem, Q et Macdonald, PM. (2015) *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17, 25160-25171.
- [310] Saleem, Q, Lai, A, Morales, HH et Macdonald, PM. (2012) *Chem. Phys. Lipids* 165, 721-730.
- [311] deAzevedo, ER, Hu, WG, Bonagamba, TJ et Schmidt-Rohr, K. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* 121, 8411-8412.
- [312] Seelig, J. (1977) *Q. Rev. Biophys.* 10, 353-418.
- [313] Seelig, J et Seelig, A. (1980) *Q. Rev. Biophys.* 13, 19-61.
- [314] Davis, JH, Jeffrey, KR, Bloom, M, Valic, MI et Higgs, TP. (1976) *Chem. Phys. Lett.* 42, 390-394.
- [315] Danielson, MA et Falke, JJ. (1996) *Annu. Rev. Bioph. Biom.* 25, 163-195.
- [316] Gerig, JT. (1989) [1] Fluorine nuclear magnetic resonance of fluorinated ligands, dans *Methods in enzymology*, pp 3-23, Academic Press.
- [317] Kitevski-LeBlanc, JL et Prosser, RS. (2012) *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 62, 1-33.
- [318] Ulrich, AS. (2005) *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 46, 1-21.
- [319] Bann, JG, Pinkner, J, Hultgren, SJ et Frieden, C. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 709-714.

- [320] Liu, JJ, Horst, R, Katritch, V, Stevens, RC et Wuthrich, K. (2012) *Science* 335, 1106-1110.
- [321] Seifert, MH, Ksiazek, D, Azim, MK, Smialowski, P, Budisa, N et Holak, TA. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124, 7932-7942.
- [322] Ye, LB, Van Eps, N, Zimmer, M, Ernst, OP et Prosser, RS. (2016) *Nature* 533, 265-268.
- [323] Smart, BE. (2001) *J. Fluor. Chem.* 109, 3-11.
- [324] Cobb, SL et Murphy, CD. (2009) *J. Fluor. Chem.* 130, 132-143.
- [325] Didenko, T, Liu, JJ, Horst, R, Stevens, RC et Wuthrich, K. (2013) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23, 740-747.
- [326] Elvington, SM, Liu, CW et Maduke, MC. (2009) *Embo J.* 28, 3090-3102.
- [327] Fanghanel, S, Wadhvani, P, Strandberg, E, Verdurmen, WPR, Burck, J, Ehni, S, Mykhailiuk, PK, Afonin, S, Gerthsen, D, Komarov, IV, Brock, R et Ulrich, AS. (2014) *PLoS One* 9, article e99653.
- [328] Frieden, C. (2007) *Protein Sci.* 16, 2334-2344.
- [329] Klein-Seetharaman, J, Getmanova, EV, Loewen, MC, Reeves, PJ et Khorana, HG. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13744-13749.
- [330] Kokhan, SO, Tymtsunik, AV, Grage, SL, Afonin, S, Babii, O, Berditsch, M, Strizhak, AV, Bandak, D, Platonov, MO, Komarov, IV, Ulrich, AS et Mykhailiuk, PK. (2016) *Angew. Chem.-Int. Edit.* 55, 14788-14792.
- [331] Li, CG, Lutz, EA, Slade, KM, Ruf, RAS, Wang, GF et Pielak, GJ. (2009) *Biochemistry* 48, 8578-8584.
- [332] Li, HL et Frieden, C. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 11993-11998.
- [333] Marsh, ENG et Suzuki, Y. (2014) *ACS Chem. Biol.* 9, 1242-1250.
- [334] Oxenoid, K, Sonnichsen, FD et Sanders, CR. (2002) *Biochemistry* 41, 12876-12882.
- [335] Strandberg, E, Wadhvani, P, Tremouilhac, P, Durr, UHN et Ulrich, AS. (2006) *Biophys. J.* 90, 1676-1686.
- [336] Suzuki, Y, Brender, JR, Hartman, K, Ramamoorthy, A et Marsh, ENG. (2012) *Biochemistry* 51, 8154-8162.
- [337] Suzuki, Y, Brender, JR, Soper, MT, Krishnamoorthy, J, Zhou, YL, Ruotolo, BT, Kotov, NA, Ramamoorthy, A et Marsh, ENG. (2013) *Biochemistry* 52, 1903-1912.
- [338] Wadhvani, P, Strandberg, E, van den Berg, J, Mink, C, Burck, J, Ciriello, RAM et Ulrich, AS. (2014) *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 940-949.
- [339] Lee, HW, Sohn, JH, Yeh, BI, Choi, JW, Jung, SH et Kim, KW. (2000) *J. Biochem.* 127, 1053-1056.
- [340] Thorson, JS, Shin, I, Chapman, E, Stenberg, G, Mannervik, B et Schultz, PG. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* 120, 451-452.
- [341] Rozovsky, S, Jogl, G, Tong, L et McDermott, AE. (2001) *J. Mol. Biol.* 310, 271-280.
- [342] Wadhvani, P, Strandberg, E, Heidenreich, N, Bürck, J, Fanghänel, S et Ulrich, AS. (2012) *J. Am. Chem. Soc.* 134, 6512-6515.
- [343] Richards, KL, Rowe, ML, Hudson, PB, Williamson, RA et Howard, MJ. (2016) *Sci. Rep.* 6, article 19518.
- [344] Quint, P, Ayala, I, Busby, SA, Chalmers, MJ, Griffin, PR, Rocca, J, Nick, HS et Silverman, DN. (2006) *Biochemistry* 45, 8209-8215.
- [345] Dalvit, C et Knapp, S. (2017) *Magn. Reson. Chem.* 55, 1091-1095.
- [346] Yu, LP, Hajduk, PJ, Mack, J et Olejniczak, ET. (2006) *J. Biomol. NMR* 34, 221-227.
- [347] Papeo, G, Giordano, P, Brasca, MG, Buzzo, F, Caronni, D, Ciprandi, F, Mongelli, N, Veronesi, M, Vulpetti, A et Dalvit, C. (2007) *J. Am. Chem. Soc.* 129, 5665-5672.
- [348] Anderluh, G, Razpotnik, A, Podlesek, Z, Macek, P, Separovic, F et Norton, RS. (2005) *J. Mol. Biol.* 347, 27-39.

- [349] Bouchard, M, Pare, C, Dutasta, JP, Chauvet, JP, Gicquaud, C et Auger, M. (1998) *Biochemistry* 37, 3149-3155.
- [350] Birdsall, NJ, Lee, AG, Levine, YK et Metcalfe, JC. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 241, 693-696.
- [351] Esfahani, M, Cavanaugh, JR, Pfeffer, PE, Luken, DW et Devlin, TM. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 306-311.
- [352] Macdonald, PM, Sykes, BD et McElhaney, RN. (1985) *Biochemistry* 24, 2237-2245.
- [353] Macdonald, PM, Sykes, BD et McElhaney, RN. (1985) *Biochemistry* 24, 2412-2419.
- [354] Macdonald, PM, Sykes, BD et McElhaney, RN. (1984) *Can. J. Biochem. Cell B.* 62, 1134-1150.
- [355] Macdonald, PM, Sykes, BD, McElhaney, RN et Gunstone, FD. (1985) *Biochemistry* 24, 177-184.
- [356] McDonough, B, Macdonald, PM, Sykes, BD et McElhaney, RN. (1983) *Biochemistry* 22, 5097-5103.
- [357] Dedios, AC, Pearson, JG et Oldfield, E. (1993) *Science* 260, 1491-1496.
- [358] Oldfield, E. (1995) *J. Biomol. NMR* 5, 217-225.
- [359] Gerig, JT. (1994) *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 26, 293-370.
- [360] Sternberg, U, Klipfel, M, Grage, SL, Witter, R et Ulrich, AS. (2009) *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11, 7048-7060.
- [361] Chen, H, Viel, S, Ziarelli, F et Peng, L. (2013) *Chem. Soc. Rev.* 42, 7971-7982.
- [362] Loewen, MC, Klein-Seetharaman, J, Getmanova, EV, Reeves, PJ, Schwalbe, H et Khorana, HG. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4888-4892.
- [363] Helm, CA, Möhwald, H, Kjaer, K et Als-Nielsen, J. (1987) *Europhys. Lett.* 4, 697-703.
- [364] Gagnon, MC, Strandberg, E, Ulrich, AS, Paquin, JF et Auger, M. (2018) *Biochim. Biophys. Acta* 1860, 654-663.
- [365] Berridge, MJ, Lipp, P et Bootman, MD. (2000) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 11-21.
- [366] Permyakov, EA et Kretsinger, RH. (2011) *Calcium binding proteins*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
- [367] Kretsinger, RH. (1976) *Annu. Rev. Biochem.* 45, 239-266.
- [368] Yanez, M, Gil-Longo, J et Campos-Toimil, M. (2012) Calcium binding proteins, dans *Calcium signaling* (Islam, MS, Éditeur), Springer, Dordrecht.
- [369] Haynes, LP, McCue, HV et Burgoyne, RD. (2012) *Front. Mol. Neurosci.* 5, article 9.
- [370] Braunewell, KH et Gundelfinger, ED. (1999) *Cell Tissue Res.* 295, 1-12.
- [371] Grabarek, Z. (2006) *J. Mol. Biol.* 359, 509-525.
- [372] Bhattacharya, S, Bunick, CG et Chazin, WJ. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* 1742, 69-79.
- [373] Korenbrot, JI. (2012) *Prog. Retin. Eye Res.* 31, 442-466.
- [374] Burns, ME et Pugh, EN. (2010) *Physiology* 25, 72-84.
- [375] Kataoka, M, Mihara, K et Tokunaga, F. (1993) *J. Biochem.* 114, 535-540.
- [376] Botelho, HM, Koch, M, Fritz, G et Gomes, CM. (2009) *Febs J.* 276, 1776-1786.
- [377] Lim, S, Peshenko, I, Dizhoor, A et Ames, JB. (2009) *Biochemistry* 48, 850-862.
- [378] Sadeghi, L, Khajeh, K, Mollania, N, Dabirmanesh, B et Ranjbar, B. (2013) *Mol. Biotechnol.* 53, 270-277.
- [379] Schroder, T, Lilie, H et Lange, C. (2011) *Protein Sci.* 20, 1155-1165.
- [380] Spurway, TD, Morland, C, Cooper, A, Sumner, I, Hazlewood, GP, Odonnell, AG, Pickersgill, RW et Gilbert, HJ. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 17523-17530.
- [381] Wendt, B, Hofmann, T, Martin, SR, Bayley, P, Brodin, P, Grunstrom, T, Thulin, E, Linse, S et Forsen, S. (1988) *Eur. J. Biochem.* 175, 439-445.
- [382] Yamniuk, AP, Nguyen, LT, Hoang, TT et Vogel, HJ. (2004) *Biochemistry* 43, 2558-2568.

- [383] Ye, YM, Lee, HW, Yang, W, Shealy, SJ, Wilkins, AL, Liu, ZR et Yang, JJ. (2001) *Protein Eng.* 14, 1001-1013.
- [384] Zhou, YB, Tzeng, WP, Yang, W, Zhou, YM, Ye, YM, Lee, HW, Frey, TK et Yang, J. (2007) *J. Virol.* 81, 7517-7528.
- [385] Turnay, J, Olmo, N, Gasset, M, Iloro, I, Arrondo, JLR et Lizarbe, MA. (2002) *Biophys. J.* 83, 2280-2291.
- [386] Heredia, P et De Las Rivas, J. (2003) *Biochemistry* 42, 11831-11838.
- [387] Chen, CP, Lee, L et Chang, LS. (2006) *Protein J.* 25, 345-351.
- [388] del Valle, LJ, Escribano, C, Perez, JJ et Garriga, P. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* 1601, 100-109.
- [389] Jackson, M, Haris, PI et Chapman, D. (1991) *Biochemistry* 30, 9681-9686.
- [390] Dong, A, Caughey, B, Caughey, WS, Bhat, KS et Coe, JE. (1992) *Biochemistry* 31, 9364-9370.
- [391] Wu, G, Gao, Z, Dong, A et Yu, S. (2012) *Int. J. Biol. Macromol.* 50, 1011-1017.
- [392] Saba, RI, Goormaghtigh, E, Ruyschaert, JM et Herchuelz, A. (2001) *Biochemistry* 40, 3324-3332.
- [393] Savitzky, A et Golay, MJE. (1964) *Anal. Chem.* 36, 1627-1639.
- [394] Hughes, RE, Brzovic, PS, Dizhoor, AM, Klevit, RE et Hurley, JB. (1998) *Protein Sci.* 7, 2675-2680.
- [395] Krimm, S et Bandekar, J. (1986) *Adv. Protein Chem.* 38, 181-364.
- [396] Goormaghtigh, E, Cabiaux, V et Ruyschaert, J-M. (1994) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform spectroscopy. II. Experimental aspects, side-chain structure and H/D exchange, dans *Physico-chemical methods in the study of biomembranes* (Hilderson, HJ et Ralston, GB, Éditeurs), pp 363-403, Plenum Press, New York.
- [397] Casal, HL, Kohler, U et Mantsch, HH. (1988) *Biochim. Biophys. Acta.* 957, 11-20.
- [398] Fabian, H, Falber, K, Gast, K, Reinstadler, D, Rogov, VV, Naumann, D, Zamyatkin, DF et Filimonov, VV. (1999) *Biochemistry* 38, 5633-5642.
- [399] Clark, AH, Saunderson, DHP et Suggett, A. (1981) *Int. J. Peptide Protein Res.* 17, 353-364.
- [400] Dell'Orco, D, Behnen, P, Linse, S et Koch, KW. (2010) *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 973-984.
- [401] Burgoyne, RD et Haynes, LP. (2015) *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 1921-1932.
- [402] Koch, KW. (2012) *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 1228-1233.
- [403] Philippov, PP, Churumova, VA, Senin, II et Koch, K-W. (2007) *BMC Biochem.* 8, article 24.
- [404] Gensch, T, Komolov, KE, Senin, II, Philippov, PP et Koch, K-W. (2007) *Proteins* 66, 492-499.
- [405] Potvin-Fournier, K, Lefèvre, T, Picard-Lafond, A, Valois-Paillard, G, Cantin, L, Salesse, C et Auger, M. (2014) *Biochemistry* 53, 48-56.
- [406] Lau, A, McLaughlin, A et McLaughlin, S. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 645, 279-292.
- [407] Garidel, P et Blume, A. (2005) *Chem. Phys. Lipids* 138, 50-59.
- [408] Pugh, ENJ et Lamb, TD. (2000) Phototransduction in vertebrate rods and cones: Molecular mechanisms of amplification, recovery and light adaptation, dans *Molecular mechanisms in visual transduction* (Stavenga, DG, de Grip, WJ et Pugh, EN, Éditeurs), pp 183-255, Elsevier, Amsterdam.
- [409] Carafoli, E et Krebs, J. (2016) *J. Biol. Chem.* 291, 20849-20857.
- [410] Baldwin, PA et Hubbell, WL. (1985) *Biochemistry* 24, 2633-2639.
- [411] Theisgen, S, Thomas, L, Schroder, T, Lange, C, Kovermann, M, Balbach, J et Huster, D. (2011) *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.* 40, 565-576.

- [412] Vogel, A, Schroder, T, Lange, C et Huster, D. (2007) *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 3171-3181.
- [413] Sankaram, MB. (1994) *Biophys. J.* 67, 105-112.
- [414] Scheidt, HA, Klingler, J, Huster, D et Keller, S. (2015) *Biophys. J.* 109, 586-594.
- [415] Gaffarogullari, EC, Masterson, LR, Metcalfe, EE, Traaseth, NJ, Balatri, E, Musa, MM, Mullen, D, Distefano, MD et Veglia, G. (2011) *J. Mol. Biol.* 411, 823-836.
- [416] Brunsveld, L, Waldmann, H et Huster, D. (2009) *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 273-288.
- [417] Bennett, AE, Rienstra, CM, Auger, M, Lakshmi, KV et Griffin, RG. (1995) *J. Chem. Phys.* 103, 6951-6958.
- [418] Kariel, N, Davidson, E et Keough, KMW. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1062, 70-76.
- [419] Eldho, NV, Feller, SE, Tristram-Nagle, S, Polozov, IV et Gawrisch, K. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* 125, 6409-6421.
- [420] Feller, SE. (2008) *Chem. Phys. Lipids* 153, 76-80.
- [421] Burgoyne, RD et Haynes, LP. (2012) *Mol. Brain* 5, article 2.
- [422] Macdonald, PM, Saleem, Q, Lai, A et Morales, HH. (2013) *Chem. Phys. Lipids* 166, 31-44.
- [423] Guimond-Tremblay, J, Gagnon, MC, Pineault-Maltais, JA, Turcotte, V, Auger, M et Paquin, JF. (2012) *Org. Biomol. Chem.* 10, 1145-1148.
- [424] Gagnon, MC, Turgeon, B, Savoie, JD, Parent, JF, Auger, M et Paquin, JF. (2014) *Org. Biomol. Chem.* 12, 5126-5135.
- [425] Potvin-Fournier, K, Lefèvre, T, Picard-Lafond, A, Marcotte, C, Dufresne, C, Cantin, L, Salesse, C et Auger, M. (2016) *Biochemistry* 55, 3481-3491.
- [426] Wachowicz, M, Gill, L et White, JL. (2009) *Macromolecules* 42, 553-555.
- [427] Hubner, W et Blume, A. (1998) *Chem. Phys. Lipids* 96, 99-123.
- [428] Surewicz, WK, Mantsch, HH et Chapman, D. (1993) *Biochemistry* 32, 389-394.
- [429] Ames, JB et Ikura, M. (2002) *Adv. Exp. Med. Biol.* 514, 333-348.
- [430] Martin, BA, Oxhorn, BC, Rossow, CR et Perrino, BA. (2001) *J. Biochem.* 129, 843-849.
- [431] Boman, AL et Kahn, RA. (1995) *Trends Biochem. Sci.* 20, 147-150.
- [432] Bentham, M, Mazaleyrat, S et Harris, M. (2006) *J. Gen. Virol.* 87, 563-571.
- [433] Moskes, C, Burghaus, PA, Wernli, B, Sauder, U, Durrenberger, M et Kappes, B. (2004) *Mol. Microbiol.* 54, 676-691.
- [434] Roy, A, Dutta, R, Kundu, N, Banik, D et Sarkar, N. (2016) *Langmuir* 32, 5124-5134.
- [435] Filippov, A, Oradd, G et Lindblom, G. (2009) *Chem. Phys. Lipids* 159, 81-87.
- [436] Junker, M et Creutz, CE. (1993) *Biochemistry* 32, 9968-9974.
- [437] Kohler, G, Hering, U, Zschornig, O et Arnold, K. (1997) *Biochemistry* 36, 8189-8194.
- [438] Saurel, O, Cezanne, L, Milon, A, Tocanne, JF et Demange, P. (1998) *Biochemistry* 37, 1403-1410.
- [439] Edelhoch, H. (1967) *Biochemistry* 6, 1948-1954.
- [440] Pace, CN, Vajdos, F, Fee, L, Grimsley, G et Gray, T. (1995) *Protein Sci.* 4, 2411-2423.
- [441] Huster, D, Arnold, K et Gawrisch, K. (2000) *Biophys. J.* 78, 3011-3018.
- [442] Lautner, L, Pluhackova, K, Barth, NKH, Seydel, T, Lohstroh, W, Bockmann, RA et Unruh, T. (2017) *Chem. Phys. Lipids* 206, 28-42.
- [443] Chaudhuri, BN. (2015) *Protein Sci.* 24, 267-276.
- [444] Fragneto, G. (2012) *Eur. Phys. J.-Spec. Top.* 213, 327-342.
- [445] Sakai, VG et Arbe, A. (2009) *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 14, 381-390.
- [446] Wallisch, M, Sulmann, S, Koch, KW et Christoffers, J. (2017) *Chem.-Eur. J.* 23, 6535-6543.

- [447] Tachibanaki, S, Nanda, K, Sasaki, K, Ozaki, K et Kawamura, S. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 3313-3319.
- [448] Higgins, MK, Oprian, DD et Schertler, GFX. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 19426-19432.
- [449] Komolov, KE, Zinchenko, DV, Churumova, VA, Vaganova, SA, Weiergraber, OH, Senin, II, Philippov, PP et Koch, KW. (2005) *Biol. Chem.* 386, 285-289.
- [450] Chakrabarti, KS, Agafonov, RV, Pontiggia, F, Otten, R, Higgins, MK, Schertler, GFX, Oprian, DD et Kern, D. (2016) *Cell Reports* 14, 32-42.
- [451] Sanada, K, Shimizu, F, Kameyama, K, Haga, K, Haga, T et Fukada, Y. (1996) *FEBS Lett.* 384, 227-230.