



**HAL**  
open science

# Etude des relations structure-fonction du transporteur mitochondrial d'ADP/ATP et de ses interactions avec d'autres protéines membranaires mitochondriales.

Agathe Spira Afchain

► **To cite this version:**

Agathe Spira Afchain. Etude des relations structure-fonction du transporteur mitochondrial d'ADP/ATP et de ses interactions avec d'autres protéines membranaires mitochondriales.. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00162415

**HAL Id: tel-00162415**

**<https://theses.hal.science/tel-00162415>**

Submitted on 13 Jul 2007

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

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

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE I  
ECOLE DOCTORALE CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT

THESE

Pour obtenir le titre de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Présentée et soutenue publiquement par

Agathe SPIRA AFCHAIN

Le 09/07/2007

Etude des relations structure-fonction du transporteur  
mitochondrial d'ADP/ATP et de ses interactions  
avec d'autres protéines membranaires mitochondriales

**Composition du jury :**

- |   |                    |
|---|--------------------|
| > M. Eric FONTAINE, <i>Professeur</i>                     | Président          |
| > M. Marc LE MAIRE, <i>Professeur</i>                     | Rapporteur         |
| > M. Jean-Jacques LACAPERE, <i>Directeur de Recherche</i> | Rapporteur         |
| > Mme Véronique TREZEGUET, <i>Chargée de Recherche</i>    | Examineur          |
| > M. Gérard BRANDOLIN, <i>Directeur de Recherche</i>      | Directeur de thèse |

Thèse préparée au Laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés,  
Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant,  
Direction des Sciences du Vivant, CEA-Grenoble.



## Remerciements

Le travail de thèse présenté dans ce mémoire a été réalisé au sein du Laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés (LBBSI), dirigé par Monsieur Michel SATRE à mon arrivée, et désormais par Monsieur François BOULAY. Je tiens à les remercier tous les deux chaleureusement pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire pendant ces trois années.

Je remercie tout particulièrement Monsieur Gérard BRANDOLIN pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse sous sa direction. Son aide et ses conseils m'ont été extrêmement précieux, tant au niveau de la pratique expérimentale qu'au niveau de la rédaction de ce mémoire.

Je tiens à remercier également Messieurs Eric FONTAINE, Marc LE MAIRE et Jean-Jacques LACAPERE, ainsi que Madame Véronique TREZEGUET, pour avoir accepté de juger ce travail.

J'adresse également mes remerciements à Messieurs Ludovic PELOSI et Xavier BRAZZOLOTTO. Sans eux, je n'aurais pu découvrir les techniques de la biologie moléculaire.

Je tiens aussi à remercier Monsieur Guy LAUQUIN et Madame Eva PEBAY-PEYROULA pour leur active collaboration, ainsi que Messieurs Patrice CATTY et Jérôme GARIN, l'un pour les plasmides de levure, l'autre pour les analyses par spectrométrie de masse.

Je remercie également tous les membres du laboratoire LBBSI, du groupe 'Biodégradation des hydrocarbures aromatiques et métalloenzymes' du laboratoire LCBM et du groupe 'Signalisation de la réponse immunitaire innée et de l'inflammation' du laboratoire LTS, et plus particulièrement Emilie HUET, Jackie PERRIN, Elodie ENGEL, Amélie AVET-ROCHEX, Martial REY, Benjamin CLEMENCON, Claire LESIEUR-CHUNGKHAM et Viviane CAPUT.

Je tiens enfin à honorer la mémoire de Monsieur Pierre VIGNAIS, que j'ai eu la chance de rencontrer à plusieurs reprises au laboratoire avec Madame Paulette VIGNAIS.



A mes parents, à mes grands-parents,  
à mon frère Julien,  
à Stéphane.



## Résumé

La mitochondrie, organite présent chez toutes les cellules eucaryotes aérobies, est délimitée par deux membranes qui compartimentent des fonctions physiologiques essentielles. Contrairement à la membrane externe, relativement perméable en raison de la présence de porines mitochondriales qui autorisent le passage de métabolites de petite taille, la membrane interne est une véritable barrière que ces molécules ne peuvent franchir que grâce à des protéines spécifiques appelées transporteurs. Le travail présenté dans ce mémoire est scindé en trois parties mettant en jeu différents aspects du transporteur mitochondrial d'ADP/ATP.

Un premier volet s'attache à la purification du transporteur d'ADP/ATP bovin en complexe avec l'acide bongkrélique. Il s'inscrit dans le cadre des approches structurales précédemment engagées au laboratoire, qui visent à résoudre la structure tridimensionnelle du transporteur bloqué dans différentes conformations impliquées lors de l'échange des nucléotides. Les résultats obtenus indiquent que ce complexe se dissocie lors de sa purification, ce qui nous amène à envisager d'autres stratégies pour le stabiliser avant d'entamer la cristallisation.

Les deux autres volets concernent deux protéines mitochondriales susceptibles d'interactions fonctionnelles avec le transporteur d'ADP/ATP de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ainsi, une protéine membranaire nommée yOm14, située dans la membrane externe des mitochondries, a été caractérisée et son interaction physique avec le transporteur clairement démontrée. La seconde protéine est la porine de levure yVDAC1, qu'une abondante littérature décrit comme étant un partenaire du transporteur d'ADP/ATP. Elle a été purifiée en mettant en œuvre des méthodologies complémentaires, détaillées dans ce mémoire. Des essais de cristallisation vont désormais pouvoir être entrepris dans le but de résoudre sa structure tridimensionnelle et de pouvoir rechercher ainsi les bases moléculaires de son interaction avec le transporteur d'ADP/ATP.

Mots clés : mitochondrie, protéine membranaire, transporteur d'ADP/ATP, purification, interaction protéine-protéine, porine mitochondriale (VDAC), acide bongkrélique, yOm14, ergostérol.



# Sommaire

<b>Partie I – Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>I.A. La mitochondrie</b> .....	<b>1</b>
I.A.1. Caractéristiques, découverte et origine évolutive. ....	1
I.A.2. Organisation morphologique.....	2
I.A.3. Rôle dans le métabolisme énergétique. ....	3
<b>I.B. Le transporteur d’ADP/ATP de la membrane interne</b> .....	<b>5</b>
I.B.1. La famille des transporteurs mitochondriaux. ....	5
I.B.2. Caractéristiques physiologiques du transporteur d’ADP/ATP.....	7
I.B.2.1. Fonctionnement <i>in vivo</i> du transporteur d’ADP/ATP. ....	8
I.B.2.2. Inhibiteurs spécifiques du transport des nucléotides. ....	8
I.B.2.3. Mise en évidence des états conformationnels du transporteur. ....	10
I.B.3. Aspects génétiques et structuraux. ....	11
I.B.3.1. Isoformes du transporteur d’ADP/ATP. ....	11
I.B.3.2. Structure secondaire du transporteur d’ADP/ATP.....	12
I.B.3.3. Analyse de la structure tridimensionnelle. ....	13
I.B.3.4. Organisation oligomérique <i>in vivo</i> ? .....	14
I.B.3.5. Existence de boucles réentrantantes dans le transporteur de levure. ....	15
<b>I.C. La porine VDAC de la membrane externe</b> .....	<b>16</b>
I.C.1. Identification et caractéristiques physiologiques de la porine.....	16
I.C.2. Aspects génétiques et structuraux. ....	17
I.C.2.1. Structure secondaire en tonneau $\beta$ . ....	18
I.C.2.2. Structure tertiaire de la porine ? .....	19
I.C.2.3. Organisation oligomérique dans la membrane ? .....	21
I.C.2.4. Rôle des stérols ? .....	21
<b>I.D. Des partenaires possibles du transporteur</b> .....	<b>22</b>
I.D.1. Rapprochement des membranes mitochondriales aux sites de contact ? .....	23
I.D.2. L’interaction transporteur-VDAC.....	23
I.D.2.1. Transition de perméabilité et PTP.....	24
I.D.2.2. Rôle du PTP ? .....	25
I.D.2.3. Nature du PTP.....	26
<b>I.E. Protéines membranaires et détergents : des difficultés</b> .....	<b>28</b>
I.E.1. Choix du détergent pour la purification de protéines membranaires. ....	28
I.E.2. Concentration de protéines membranaires : problèmes posés par le détergent. ....	30
<b>I.F. Objectifs de ce travail</b> .....	<b>31</b>
<b>Partie II – Matériels &amp; Méthodes</b> .....	<b>33</b>
<b>II.A. Matériel biologique</b> .....	<b>33</b>
II.A.1. Souches de levure et de bactéries. ....	33
II.A.2. Milieux de culture des levures. ....	34
II.A.3. Conditions de croissance des levures. ....	35
II.A.4. Milieux de culture et conditions de croissance des bactéries. ....	36
<b>II.B. Techniques de biologie moléculaire</b> .....	<b>37</b>
II.B.1. Préparation et dosage d’ADN de levure. ....	37
II.B.2. Amplification d’un fragment d’ADN par PCR.....	38
II.B.3. Purification d’un fragment d’ADN.....	40
II.B.4. Ligation d’un fragment d’ADN sur un plasmide. ....	41
II.B.5. Transformation de bactéries par de l’ADN plasmidique.....	42
II.B.6. Mutagenèse ponctuelle dirigée.....	43
II.B.7. Transformation de levures $\Delta$ Por par un fragment d’ADN.....	43

<b>II.C. Techniques de biochimie.....</b>	<b>44</b>
II.C.1. Préparation de mitochondries de cœur de bœuf.....	44
II.C.2. Préparation de mitochondries de levure.....	44
II.C.3. Dosage des protéines.....	46
II.C.4. Extraction des mitochondries par le carbonate de sodium.....	47
II.C.5. Détermination de l'immunoréactivité de yOm14 par ELISA.....	47
II.C.6. Titration des sites de liaison spécifiques des inhibiteurs.....	48
II.C.7. Détermination de la CMC du CHAPS.....	49
II.C.8. Purification des protéines.....	50
II.C.8.1. Purification du complexe bAnc1-BA.....	50
II.C.8.2. Purification de yAnc2-HT.....	51
II.C.8.3. Purification de yVDAC1.....	52
II.C.8.4. Purification de yVDAC1-HT.....	52
II.C.9. Observation des changements de conformation du transporteur isolé.....	53
II.C.10. Analyse des protéines par SDS-PAGE.....	53
II.C.11. Electrotransfert et immunodétection des protéines (Western blot).....	55
II.C.12. Ultracentrifugation sur gradient de sucrose.....	56
II.C.13. Co-immunoprécipitation de yAnc2 et de yOm14.....	57
II.C.14. Analyse des protéines par MALDI-TOF.....	57
II.C.15. Dosage de l'Hécameg par la méthode à l'anthrone.....	58
<b>Partie III – Résultats : Purification du complexe bAnc1-BA en vue de sa cristallisation... 59</b>	
<b>III.A. Purification et concentration du complexe bAnc1-BA.....</b>	<b>59</b>
<b>III.B. Résistance de la liaison transporteur-BA au cours de la purification.....</b>	<b>60</b>
III.B.1. Remise en question de la stabilité du complexe transporteur-BA.....	60
III.B.2. Détermination de la capacité du transporteur à lier l'acide bongkrékique.....	61
III.B.3. Caractérisation du complexe bAnc1-BA.....	63
III.B.3.1. Séparation de complexes détergent-protéine par FPLC.....	63
III.B.3.2. Etude des différences entre chromatogrammes.....	64
III.B.3.3. Expériences de changement de fluorescence sur le complexe purifié.....	65
<b>III.C. Bilan.....</b>	<b>66</b>
<b>Partie IV – Résultats : Existence d'une interaction entre yAnc2-HT et yOm14 ..... 67</b>	
<b>IV.A. Co-purification de yOm14 et de yAnc2-HT par IMAC.....</b>	<b>67</b>
<b>IV.B. Caractérisation biochimique de la protéine yOm14.....</b>	<b>69</b>
IV.B.1. Localisation de yOm14.....	69
IV.B.2. Immunoréactivité de yOm14.....	71
<b>IV.C. Interaction de yOm14 avec le transporteur yAnc2-HT.....</b>	<b>72</b>
<b>IV.D. Bilan.....</b>	<b>73</b>
<b>Partie V – Résultats : Purification de la porine yVDAC1 de S. cerevisiae ..... 74</b>	
<b>V.A. Purification de la porine yVDAC1.....</b>	<b>74</b>
V.A.1. Choix de l'Hécameg.....	74
V.A.2. Présence d'ergostérol dans la fraction protéique purifiée.....	76
<b>V.B. Elimination de l'ergostérol par extraction.....</b>	<b>77</b>
V.B.1. Extraction par un solvant organique.....	77
V.B.2. Extraction différentielle par un détergent.....	78
V.B.3. Extraction par la méthyl-β-cyclodextrine.....	79
V.B.3.1. Principales caractéristiques des cyclodextrines.....	79
V.B.3.2. Bilan des expériences d'extraction par la méthyl-β-cyclodextrine.....	80
V.B.4. Extraction par le charbon actif.....	82
<b>V.C. Séparation de l'ergostérol et de yVDAC1 dans la fraction purifiée.....</b>	<b>82</b>
V.C.1. Séparation par FPLC.....	82
V.C.1.1. Principe de la méthode de séparation.....	82
V.C.1.2. Caractérisation des pics du chromatogramme.....	83

V.C.1.3. Purification de yVDAC1 et caractérisation de la fraction purifiée.....	84
V.C.1.4. Limites de la méthode.....	85
V.C.2. Séparation par ultracentrifugation sur gradient de sucrose.....	86
V.C.3. Séparation par FPLC après élimination préalable de l'ergostérol.....	87
V.C.4. Rétention de yVDAC1 sur une colonne.....	88
<b>V.D. Expression de la porine yVDAC1-HT de <i>S. cerevisiae</i>.....</b>	<b>89</b>
V.D.1. Expression bactérienne de yVDAC1-HT.....	89
V.D.1.1. Principe de la méthode.....	89
V.D.1.2. Précédentes études d'expression de porines étiquetées.....	90
V.D.1.3. Construction et essais d'expression de yVDAC1-HT.....	91
V.D.2. Essais d'insertion génomique par recombinaison homologue.....	92
V.D.2.1. Principe de la recombinaison homologue.....	92
V.D.2.2. Principe de la sélection des levures génétiquement modifiées.....	93
V.D.2.3. Construction en quatre étapes du fragment d'ADN à recombiner.....	94
V.D.2.4. Bilan des différents essais de recombinaison homologue.....	96
V.D.3. Expression plasmidique de yVDAC1-HT chez <i>S. cerevisiae</i> .....	97
V.D.3.1. Construction des lignées V-HT et pRS.....	98
V.D.3.2. Croissance des souches de levure sur milieu solide.....	99
V.D.3.3. Croissance des souches de levure en milieu liquide.....	100
V.D.3.4. Expression de yVDAC1-HT par la lignée V-HT.....	101
<b>V.E. Purification de la porine yVDAC1-HT exprimée chez <i>S. cerevisiae</i>.....</b>	<b>104</b>
V.E.1. Solubilisation de yVDAC1-HT.....	105
V.E.2. Purification de yVDAC1-HT sur colonne HTP.....	105
V.E.3. Purification de yVDAC1-HT par chromatographie IMAC.....	106
V.E.3.1. Choix du détergent pour la chromatographie IMAC après HTP.....	106
V.E.3.2. Purification directe de yVDAC1-HT sur Ni-NTA.....	108
V.E.3.3. Détermination du volume optimal de résine Ni-NTA à utiliser.....	108
V.E.3.4. Rendement de la purification de yVDAC1-HT.....	109
<b>V.F. Bilan.....</b>	<b>109</b>
<b><i>Partie VI – Discussion générale &amp; Perspectives .....</i></b>	<b><i>113</i></b>
<b>VI.A. Le complexe bAnc1-BA : sera-t-il possible de le cristalliser ?.....</b>	<b>113</b>
<b>VI.B. Les partenaires de yAnc2 : quelle part de mythe dans la réalité ? .....</b>	<b>116</b>
VI.B.1. La protéine yOm14 : une interaction directe clairement démontrée.....	116
VI.B.2. La porine yVDAC1 : difficile de conclure quant à son interaction avec le transporteur.....	117
<b><i>Partie VII – Bibliographie .....</i></b>	<b><i>121</i></b>
<b><i>Partie VIII – Annexe : Article publié.....</i></b>	<b><i>135</i></b>



# Index des figures et des tableaux

## **Index des figures :**

Figure 1 : Structure d'une mitochondrie. ....	2
Figure 2 : Vue en 3D des crêtes de la mitochondrie.....	3
Figure 3 : Schéma de la chaîne mitochondriale de transfert des électrons. ....	4
Figure 4 : Structure chimique des principaux inhibiteurs du transporteur d'ADP/ATP.....	9
Figure 5 : Etats conformationnels du transporteur d'ADP/ATP et leur fluorescence.....	10
Figure 6 : Prédiction de structure du transporteur $\gamma$ Anc2 de levure.....	12
Figure 7 : Vues latérales de la structure tridimensionnelle de bAnc1-CATR.....	13
Figure 8 : Alignement de séquences de la porine VDAC.....	18
Figure 9 : Différents modèles topologiques proposés pour les porines mitochondriales.....	20
Figure 10 : Pore de transition de perméabilité et conséquences de son ouverture.....	24
Figure 11 : Structure des détergents utilisés pour la purification des protéines membranaires bAnc1, $\gamma$ Anc2 et $\gamma$ VDAC1.....	30
Figure 12 : Carte des principaux plasmides utilisés au cours de cette étude.....	42
Figure 13 : Principe de l'isolement des mitochondries de cœur de bœuf.....	44
Figure 14 : Principe de l'isolement des mitochondries de levure.....	46
Figure 15 : Détermination de la CMC du CHAPS par fluorimétrie.....	50
Figure 16 : Analyses de la fraction collectée en sortie de colonne HTP.....	60
Figure 17 : Expériences de changements de fluorescence intrinsèque menées sur le transporteur purifié en l'absence d'inhibiteur.....	62
Figure 18 : Analyses par FPLC de la fraction protéique purifiée en CHAPS.....	64
Figure 19 : Expériences de changements de fluorescence intrinsèque menées sur le complexe bAnc1-BA.....	66
Figure 20 : Analyse des protéines co-purifiées avec $\gamma$ Anc2-HT.....	68
Figure 21 : Extraction de mitochondries de levure par le carbonate de sodium.....	70
Figure 22 : Immunoréactivité de l'extrémité C-terminale de $\gamma$ Om14.....	71
Figure 23 : Co-immunoprécipitation de $\gamma$ Om14 et de $\gamma$ Anc2-HT.....	72
Figure 24 : Principales caractéristiques physico-chimiques de l'Hécameg.....	75
Figure 25 : Analyses menées sur la fraction purifiée contenant $\gamma$ VDAC1.....	75
Figure 26 : Solubilisation des membranes mitochondriales par l'Hécameg.....	78
Figure 27 : Caractéristiques des cyclodextrines.....	80
Figure 28 : Etude systématique de l'extraction de l'ergostérol par la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine.....	81
Figure 29 : Séparation par FPLC et caractérisation des pics du chromatogramme.....	83
Figure 30 : Séparation de $\gamma$ VDAC1 et de l'ergostérol par ultracentrifugation.....	86
Figure 31 : Chromatogrammes obtenus après élimination partielle de l'ergostérol.....	87
Figure 32 : Principe de la recombinaison homologue.....	93

Figure 33 : Principe de la sélection des transformants.....	93
Figure 34 : Principe des modifications effectuées sur le gène inséré.....	95
Figure 35 : Analyse par électrophorèse sur agarose des produits de PCR sur colonies.....	96
Figure 36 : Construction du plasmide pRS-YEp. ....	98
Figure 37 : Comparaison des niveaux d'expression de yVDAC1 et yVDAC1-HT.....	102
Figure 38 : Evaluation quantitative par immunodécoration de la quantité de porine présente dans les lysats mitochondriaux. ....	103
Figure 39 : Présence extramitochondriale de yVDAC1-HT ?.....	104
Figure 40 : Solubilisation et purification sur colonne HTP de yVDAC1-HT. ....	106
Figure 41 : Purification de yVDAC1-HT en deux étapes chromatographiques.....	107
Figure 42 : Optimisation de l'étape de chromatographie d'affinité. ....	108

## **Index des tableaux :**

Tableau 1 : Génotype des souches de levure employées. ....	33
Tableau 2 : Génotype des souches de bactéries employées. ....	34
Tableau 3 : Composition des milieux riches liquides de culture des levures. ....	34
Tableau 4 : Amorces utilisées au cours de cette étude.....	38
Tableau 5 : Déroulement de l'amplification d'une séquence par PCR.....	40
Tableau 6 : Composition des milieux pour l'isolement des mitochondries.....	45
Tableau 7 : Composition des gels de polyacrylamide.....	54
Tableau 8 : Tampons et solutions utilisés pour l'analyse des protéines par SDS-PAGE.....	55
Tableau 9 : Nature et dilution des anticorps primaires utilisés.....	56
Tableau 10 : Caractérisation des sites de fixation de l'ATR et du BA sur bAnc1 dans des mitochondries isolées. .....	61
Tableau 11 : Identification des homologues de yOm14 parmi les espèces de levure.....	70
Tableau 12 : Comparaison de la vitesse de croissance sur milieu solide des souches de levure utilisées dans cette étude. ....	100
Tableau 13 : Caractérisation de la croissance des souches de levure utilisées, en milieu liquide, à 28°C.....	101
Tableau 14 : Concentrations et rapports massiques dans les fractions collectées, après différents traitements...	110

## Abréviations

<b>5-FOA</b> = 5-FluoroOrotic Acid	<b>IMAC</b> = Immobilized-Metal Affinity Chromatography
<b>ADN</b> = Acide DesoxyriboNucléique	<b>isoBA</b> = isoBongkreki Acid
<b>ADP</b> = Adénosine 5'-DiPhosphate	<b>LAPAO</b> = 3-LaurylAmido-N,N'-dimethylPropylAminOxide
<b>Anc</b> = Adenine nucleotide carrier	<b>LB</b> = Luria Bertani
<b>ATP</b> = Adénosine 5'-TriPhosphate	<b>LDAO</b> = LaurylDimethylAmine-N-Oxide
<b>ATR</b> = ATRactyloside	<b>MCF</b> = Mitochondrial Carriers Family
<b>BA</b> = Bongkreki Acid	<b>MW</b> = Molecular Weight
<b>BCA</b> = BiCinchoninic Acid	<b>NAD<sup>+</sup></b> = Nicotinamide Adenine Dinucleotide
<b>BSA</b> = Bovine Serum Albumine	<b>NEM</b> = N-EthylMaléimide
<b>βDG</b> = n-Decyl-β-D-Glucopyranoside	<b>NTA</b> = NitriloTriacetic Acid
<b>βOG</b> = n-Octyl-β-D-Glucopyranoside	<b>pb</b> = paires de bases
<b>CATR</b> = CarboxyATRactyloside	<b>PBS – Tween</b> = Phosphate Buffered Saline – Tween 20
<b>CD</b> = CycloDextrine	<b>PCR</b> = Polymerase Chain Reaction
<b>CHAPS</b> = 3-[(3-CHolamidopropyl)-dimethylAmmonio]-1-Propane Sulfonate]	<b>Pi</b> = Phosphate inorganique
<b>CMC</b> = Concentration Micellaire Critique	<b>PMSF</b> = PhenylMethylSulfonyl Fluoride
<b>DDM</b> = n-DoDecyl-β-D-Maltopyranoside	<b>PTP</b> = Pore de Transition de Perméabilité
<b>DFP</b> = DiisopropylFluoroPhosphate	<b>SDS-PAGE</b> = Sodium DodecylSulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
<b>DO</b> = Densité Optique	<b>TA</b> = Température Ambiante
<b>DTT</b> = DiThioThreitol	<b>TEMED</b> = TetraMethylEthyleneDiamine
<b>EDTA</b> = EthyleneDiamineTetraacetic Acid	<b>T<sub>M</sub></b> = Melting Temperature
<b>ELISA</b> = Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	<b>TIM</b> = Translocase of the Inner Membrane
<b>EM</b> = EMulphogène BC720	<b>TOM</b> = Translocase of the Outer Membrane
<b>FPLC</b> = Fast Protein Liquid Chromatography	<b>Trp</b> = Tryptophane
<b>FRET</b> = Fluorescence Resonance Energy Transfer	<b>Ura</b> = Uracile
<b>Hécameg</b> = 6-O-(N-HEptylCarbamoyl)-MEthyl-α-D-Glucopyranoside	<b>VDAC</b> = Voltage-Dependant Anion Channel
<b>HTP</b> = Hydroxyapatite Powder	



# **Partie I**



## **Introduction**



# Partie I – Introduction

## **I.A. La mitochondrie.**

Les organismes eucaryotes sont caractérisés par la compartimentation du cytoplasme de leurs cellules en organites aux fonctions bien différenciées, ce qui permet une régulation de leur métabolisme beaucoup plus efficace que chez les organismes procaryotes. La mitochondrie est l'un de ces organites, et son rôle au sein de la cellule eucaryote est primordial. En effet elle est, en conditions aérobies, le principal lieu de la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP), molécule à haut potentiel énergétique qui intervient dans la plupart des voies métaboliques cellulaires.

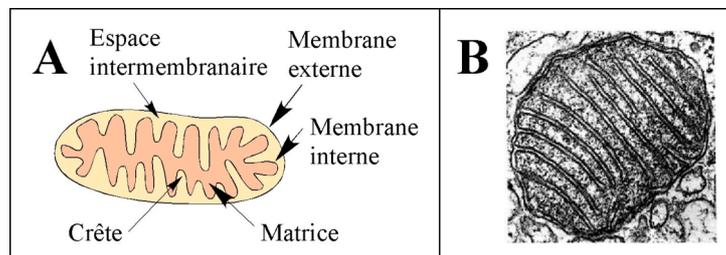
### **I.A.1. Caractéristiques, découverte et origine évolutive.**

Les mitochondries sont des organites intracellulaires présents dans toutes les cellules eucaryotes aérobies, dont le nombre, proportionnel aux besoins énergétiques de la cellule, peut aller de quelques unités à plusieurs milliers. Leur taille et leur forme sont variables et dépendent du type de cellule à laquelle elles appartiennent, mais elles sont le plus généralement de forme cylindrique et mesurent environ 1 à 3  $\mu\text{m}$  de longueur pour 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre. Ce sont ces dimensions, proches de celles d'une bactérie, qui les rendent observables par microscopie optique, et qui ont ainsi permis leur découverte en 1857 par Kölliker dans des cellules musculaires, puis leur caractérisation plus précise par Altmann en 1890. Elles ont également fait germer l'idée que la mitochondrie pouvait provenir de l'invasion du cytoplasme d'une cellule pré-eucaryote par une bactérie qui aurait ensuite évolué pour former un organite intracellulaire. Cette hypothèse de l'origine évolutive de la mitochondrie, l'endosymbiose, a été appuyée par la suite par la découverte de similarités biochimiques et génétiques entre les bactéries et les mitochondries des cellules eucaryotes aérobies. Des analyses phylogénétiques effectuées à l'occasion du séquençage complet du génome de la protéobactérie *Rickettsia prowazekii* (Andersson et al., 1998) ont notamment

prouvé que cette bactérie est le micro-organisme le plus proche génétiquement des mitochondries et qu'ils partagent probablement tous deux un ancêtre commun.

### **I.A.2. Organisation morphologique.**

Les premières images de mitochondries ont été obtenues par microscopie électronique en 1945 (Claude et Fullam, 1945) : au niveau morphologique, elles ne permettaient de conclure que sur la présence d'une membrane entourant la mitochondrie. Ce n'est qu'en 1956 qu'apparaît l'hypothèse de l'existence de deux phases aqueuses distinctes à l'intérieur d'une mitochondrie (Werkheiser et Bartley, 1957). Aujourd'hui, la représentation classique de la mitochondrie montrée sur la Figure 1A provient des progrès réalisés depuis lors dans le champ de la microscopie électronique (cf Figure 1B) : un compartiment interne, appelé matrice mitochondriale, est isolé du cytoplasme de la cellule par deux membranes ou bicouches protéolipidiques distinctes, la membrane externe et la membrane interne, qui ménagent entre elles un autre compartiment aqueux appelé espace intermembranaire.

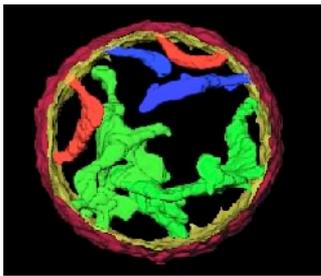


**Figure 1 : Structure d'une mitochondrie.**

A : Schéma en coupe. B : Vue en coupe par microscopie électronique.

Les deux membranes de la mitochondrie sont de nature et de composition très différentes. Ainsi la membrane externe, qui enveloppe la totalité de la mitochondrie, est très perméable aux molécules de masse moléculaire inférieure à 3000-5000 Da, car elle contient en abondance une protéine appelée porine ou VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel). Il en résulte que l'espace intermembranaire a une composition très proche de celle du cytoplasme. Au contraire, la membrane interne est une vraie barrière, qui contient des protéines capables d'assurer des fonctions biologiques très diversifiées. Elle est notamment le siège de l'oxydation phosphorylante qui aboutit à la synthèse d'ATP. Seules certaines

molécules peuvent traverser librement la membrane interne mitochondriale : elles sont pour la plupart lipophiles. D'autres sont spécifiquement reconnues par des protéines transmembranaires, qui les transportent ou les laissent passer. La membrane est repliée de façon complexe sous forme d'invaginations appelées crêtes, qui augmentent considérablement sa surface d'échange : c'est ainsi que le nombre de crêtes mitochondriales semble corrélé aux besoins énergétiques de la cellule. Plus récemment, des analyses par tomographie électronique ont montré que les crêtes mitochondriales ne sont pas de simples repliements membranaires, mais sont à elles seules des micro-compartiments internes, de morphologie très variable, reliés à la périphérie de la membrane interne par des segments tubulaires étroits (cf Figure 2). Ceux-ci limiteraient la diffusion et influeraient de cette manière sur certaines fonctions mitochondriales bien spécifiques, permettant entre autres une régulation de la synthèse d'ATP. Ainsi le métabolisme énergétique global de la cellule serait régulé par la morphologie des membranes de ses mitochondries (Mannella, 2006).



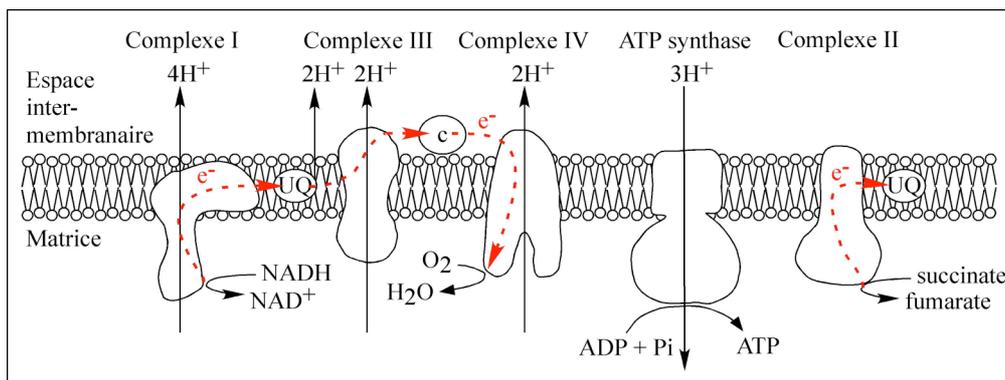
**Figure 2 : Vue en 3D des crêtes de la mitochondrie.**

Vue par tomographie électronique, d'après Mannella et al., 1997. En bleu, crêtes reliées en un seul point à la périphérie de la membrane interne ; en rouge, crêtes reliées en deux points ; en vert, crêtes reliées en de multiples points.

### **I.A.3. Rôle dans le métabolisme énergétique.**

La mitochondrie va permettre à la cellule eucaryote aérobie de subvenir à ses besoins en énergie par le biais du processus d'oxydation phosphorylante qui permet la synthèse, à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique (Pi), d'adénosine triphosphate (ATP), molécule considérée comme le carburant de la cellule de par son haut potentiel énergétique. Cette réaction est effectuée par l'ATP synthase, complexe protéique multimérique ancré dans la membrane interne, qui utilise l'énergie fournie par la dissipation du gradient de protons créé entre la matrice et l'espace intermembranaire par des pompes à protons couplées à la chaîne de transfert des électrons (cf Figure 3). Ces mécanismes ont tous lieu au niveau de la membrane interne mitochondriale : ils reposent sur la théorie du couplage chimiosmotique (Mitchell, 1961) qui a valu à son auteur le Prix Nobel de Chimie en 1978.

Un maximum de 3 molécules d'ATP peut être obtenu dans le cas où les électrons sont cédés à l'ubiquinone à la suite de l'oxydation du nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) en  $\text{NAD}^+$  au niveau du complexe I (NADH-ubiquinone réductase). Le NADH est lui-même le produit du cycle de Krebs qui permet de fournir de l'énergie à la cellule eucaryote aérobie grâce à la dégradation de substrats carbonés (lipides, protéines, sucres). En revanche, lorsque le complexe I est court-circuité, et que les électrons parviennent à l'ubiquinone à la suite de l'oxydation du succinate en fumarate au niveau du complexe II (succinate deshydrogénase), seules 2 molécules d'ATP sont synthétisées. Dans les deux cas, l'ubiquinone est réduite en ubiquinol, et sert de navette pour transférer les électrons au complexe III (ubiquinol-cytochrome *c* réductase ou complexe cytochrome *bc<sub>1</sub>*). Leur passage vers le complexe IV (cytochrome *c* oxydase) est ensuite assuré par deux molécules de cytochrome *c* associées à la membrane du côté de l'espace intermembranaire. Ils sont enfin cédés au dioxygène pour former de l'eau.



**Figure 3 : Schéma de la chaîne mitochondriale de transfert des électrons.**

Les flèches noires indiquent les transferts de protons, les flèches rouges représentent le trajet des électrons entre les différents éléments de la chaîne respiratoire. UQ = ubiquinone, c = cytochrome *c*.

Les pompes à protons de la chaîne respiratoire sont des complexes multimériques dont les différentes chaînes polypeptidiques sont codées soit par le génome nucléaire, soit par le génome mitochondrial. Il a récemment été suggéré que ces complexes puissent former des réseaux d'assemblages supramoléculaires dans la membrane interne mitochondriale appelés respirasomes (Schagger et Pfeiffer, 2000). Ces derniers seraient constitués chez les mammifères d'un enchaînement de deux copies du bloc  $\text{I}_1\text{III}_2\text{IV}_4$  et d'une copie du bloc  $\text{III}_2\text{IV}_4$ , et chez la levure *S. cerevisiae* du bloc  $\text{III}_2\text{IV}_1$  et/ou  $\text{III}_2\text{IV}_2$  puisque ses mitochondries

ne contiennent pas de complexe I, celui-ci étant remplacé par trois NADH deshydrogénases (Joseph-Horne et al., 2001).

Le gradient transmembranaire de protons généré par les pompes à protons couplées à la chaîne de transfert des électrons entraîne la mise en place d'un potentiel de membrane d'environ  $-200$  mV entre l'espace intermembranaire et la matrice. La dissipation de ce gradient de protons à travers la partie transmembranaire F<sub>0</sub> de l'ATP synthase force la rotation de la sous-unité c (Sambongi et al., 1999) et simultanément entraîne celle de la sous-unité  $\gamma$  de sa partie soluble F<sub>1</sub> (Noji et al., 1997), ce qui permet alors la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de Pi préalablement fixés dans le site catalytique de F<sub>1</sub>. L'entrée de ces deux molécules dans la matrice mitochondriale est assurée par deux transporteurs spécialisés qui appartiennent à une grande famille de transporteurs de métabolites de la membrane interne mitochondriale : les transporteurs de phosphate et d'ADP/ATP. Le rapprochement physique de ces trois protéines pour former l'ATP-synthasome a été récemment proposé (Chen et al., 2004).

## **I.B. Le transporteur d'ADP/ATP de la membrane interne.**

L'ATP néosynthétisé dans la matrice mitochondriale doit être exporté à l'extérieur de la mitochondrie pour pouvoir être utilisé par la cellule dans le but de subvenir à ses besoins énergétiques. C'est le rôle joué par le transporteur d'ADP/ATP, qui permet à l'ATP de franchir la barrière de la membrane interne mitochondriale en échange de l'entrée simultanée d'une molécule d'ADP cytosolique.

### **I.B.1. La famille des transporteurs mitochondriaux.**

La membrane interne de la mitochondrie, très peu perméable, nécessite la présence de protéines transmembranaires capables d'assurer le transport spécifique de métabolites variés, de l'espace intermembranaire vers la matrice ou inversement. Certaines de ces protéines permettent même un échange de molécules de part et d'autre de la membrane interne : de séquences primaires très proches et de caractéristiques biochimiques similaires, elles sont

regroupées dans la famille des transporteurs mitochondriaux, appelée MCF (Mitochondrial Carrier Family (Saraste et Walker, 1982 ; Kunji, 2004)), et très conservées chez les organismes eucaryotes. Ainsi 35 transporteurs possédant 28 fonctions différentes ont été identifiés chez la levure *S. cerevisiae*, contre 49 chez l'homme (pour revue, voir Palmieri, 2004, et Arco et Satrustegui, 2005). D'après la base de données TCDB (Transport Classification Database, <http://www.tcdb.org>), un système de classification des protéines membranaires de transport approuvé par l'IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) et basé sur fonction et phylogénie de ces protéines (Saier, 2000), il semblerait que certains membres de la MCF soient présents dans d'autres organelles de la cellule eucaryote, telles les hydrogénosomes, peroxisomes, amyloplastes et chloroplastes (Thuswaldner et al., 2007). Aucun homologue n'a jamais été encore observé chez les organismes procaryotes, mais, assez étonnamment, il a en revanche été récemment découvert un transporteur de dATP (déoxyATP) et de dTTP (déoxythymidine 5'-triphosphate) codé dans le génome du virus *Mimiviridae mimivirus* (Monne et al., 2007).

Divers métabolites sont ainsi échangés, via les membres de la MCF, pour les besoins métaboliques et énergétiques de la cellule : la plupart sont de nature anionique (ADP, ATP, phosphate, oxoglutarate, aspartate, glutamate, pyruvate, malate, citrate, etc...), d'autres sont des cations ou des zwitterions (carnitine, ornithine, glutamine, etc...). La protéine découplante (UCP, Uncoupling Protein) fait aussi partie de la MCF, tout en fonctionnant pourtant sur le mode de l'uniport (Ledesma et al., 2002), comme d'ailleurs peut le faire le transporteur de carnitine (Indiveri et al., 1991). Les signes distinctifs qui permettent de repérer assez aisément les membres de la MCF se trouvent dans leurs chaînes polypeptidiques, qui comptent toutes environ 300 acides aminés. Il s'agit d'abord de la présence d'une structure tripartite dans la séquence primaire de ces transporteurs, autrement dit de la répétition de trois séquences homologues d'environ 100 résidus chacune. Une autre de leurs caractéristiques réside dans l'existence d'un motif P-X-[D/E]-X-X-[R/K] répété à trois reprises à des distances proches de 100 acides aminés (cf Figure 6A). Ce profil résulterait de la double duplication d'un gène ancestral, donnant des protéines de masse molaire variant entre 30 et 35 kDa. Ces transporteurs présentent pour la plupart un point isoélectrique très élevé (supérieur à 10).

Les transporteurs de la MCF sont codés par le génome nucléaire et doivent donc être importés dans la membrane interne de la mitochondrie (pour revue, voir Rehling et al., 2004).

Etant pour la majorité d'entre eux synthétisés sans séquence signal, les mécanismes de leur adressage à la membrane interne mitochondriale sont encore mal connus, mais il semblerait que certaines séquences internes puissent interagir entre elles pour former un élément d'adressage tridimensionnel (De Marcos Lousa et al., 2006). Cinq étapes distinctes ont été identifiées pour ces protéines hydrophobes : prises en charge par des chaperonnes à la sortie du ribosome, elles sont transportées vers des machineries spécifiques d'import situées dans la mitochondrie, tout d'abord vers le complexe général d'import TOM (Translocase of the Outer mitochondrial Membrane) de la membrane externe mitochondriale, qui les transfère ensuite vers l'espace intermembranaire, où des membres du complexe d'import TIM (Translocase of the Inner mitochondrial Membrane) de la membrane interne se chargent de les insérer sous une forme correctement repliée et donc fonctionnelle.

### **I.B.2. Caractéristiques physiologiques du transporteur d'ADP/ATP.**

Le transporteur mitochondrial d'ADP/ATP sert très souvent de protéine modèle de la MCF car il en est actuellement le membre le mieux caractérisé, notamment grâce à son abondance dans les mitochondries et à l'existence d'inhibiteurs très spécifiques du transport des nucléotides. Son existence a été postulée dès 1965 (Chappell et Crofts, 1965) puis ses caractéristiques biochimiques ont été abondamment étudiées, mais ce n'est qu'en 1975 (Riccio et al., 1975b) qu'il a été isolé. Sa purification par non-rétention sur colonne d'hydroxyapatite a par la suite été appliquée avec succès à de nombreux autres membres de la MCF (pour revue, voir Palmieri, 1994). L'importance physiologique du transporteur mitochondrial d'ADP/ATP est soulignée par l'existence chez l'homme de pathologies dans lesquelles son dysfonctionnement a été mis en évidence, notamment des myopathies et des ophtalmoplégies (pour revue, voir Dahout-Gonzalez et al., 2006). Ces dernières sont les conséquences de mutations, dont cinq ont été identifiées (A114P, L98P, A90D, D104G et V289M), et dont les conséquences fonctionnelles ont été étudiées chez la levure (De Marcos Lousa et al., 2002 ; Fontanesi et al., 2004 ; Lodi et al., 2006).

### I.B.2.1. Fonctionnement *in vivo* du transporteur d'ADP/ATP.

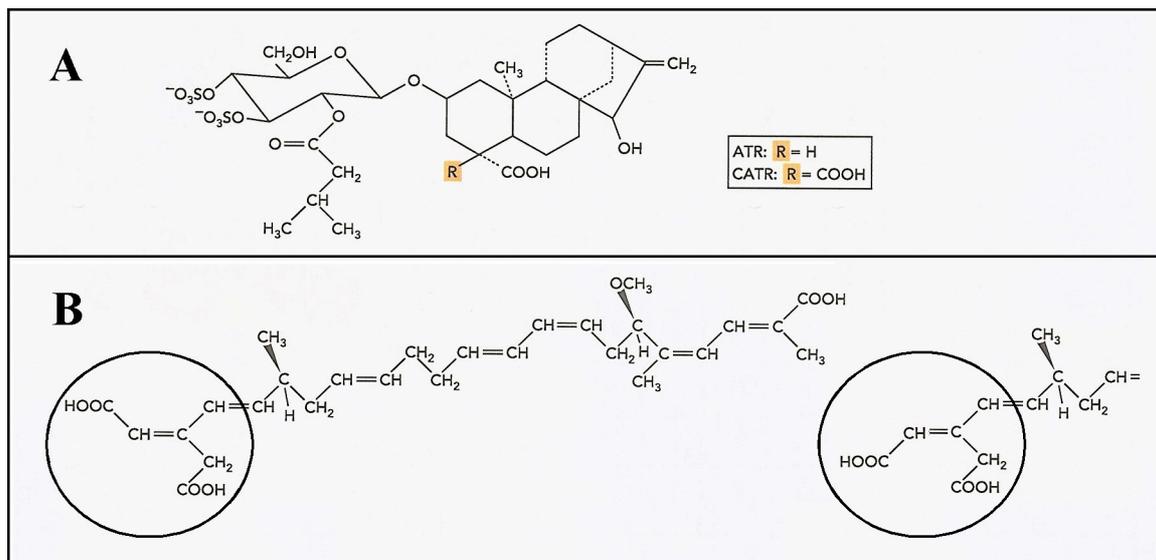
Dans les conditions physiologiques, une molécule d'ADP cytoplasmique pénètre dans la matrice mitochondriale tandis qu'une molécule d'ATP néosynthétisée en sort. Le transport des nucléotides procède selon un mécanisme d'échange-diffusion avec une stoechiométrie de 1:1 et suit une cinétique de type Michaelis-Menten. La constante de dissociation pour les nucléotides est de l'ordre de quelques  $\mu\text{M}$  et la vitesse maximale d'échange est comprise entre 200 et 600 nmol/min/mg de protéines mitochondriales totales (Klingenberg, 1980). Bien que l'activité de transport soit relativement faible, de l'ordre de  $600 \text{ min}^{-1}$  à  $18^\circ\text{C}$  dans les mitochondries de foie de rat, un homme consomme pourtant chaque jour son propre poids en ATP, recyclé grâce au transporteur d'ADP/ATP. Ceci est possible grâce à l'abondance du transporteur, qui peut représenter jusqu'à 10% des protéines de la membrane interne mitochondriale dans des tissus à haute dépense énergétique, comme le muscle cardiaque.

La spécificité du transporteur envers l'ATP et l'ADP est très grande, puisqu'aucun autre nucléotide ni même l'adénosine monophosphate ne peuvent être transportés (Pfaff et Klingenberg, 1968). Leur prise en charge sous les formes libres  $\text{ATP}^{4-}$  et  $\text{ADP}^{3-}$ , sans transport d'ions associé, résulte en un transport électrogénique (LaNoue et al., 1978). Ceci permet d'expliquer le processus asymétrique de l'échange, qui préfère l'import de l'ADP et la sortie de l'ATP, sous l'effet du potentiel de membrane mitochondrial, positif à l'extérieur, qui résulte du fonctionnement de la chaîne de transfert des électrons. Il est intéressant de constater que, lorsque le transporteur est reconstitué en liposomes, il peut échanger les nucléotides de quatre façons différentes : deux homo-échanges pour l'ADP et l'ATP respectivement, mais aussi deux hétéro-échanges, soit dans le sens physiologique, soit dans le sens de l'import de l'ATP et de la sortie de l'ADP lorsque le potentiel de membrane imposé est inversé (Krämer et Klingenberg, 1980).

### I.B.2.2. Inhibiteurs spécifiques du transport des nucléotides.

L'existence de deux principales familles de molécules capables d'inhiber le transport mitochondrial d'ADP/ATP, les acides bongkréiques et les atractylosides, a beaucoup

contribué à faciliter la caractérisation biochimique du transporteur. Ce sont des molécules très différentes, aussi bien au niveau de leur structure chimique (cf Figure 4) qu'au niveau de leur interaction avec la protéine. En effet, les atractylosides interagissent avec le transporteur d'ADP/ATP sur sa face exposée dans l'espace intermembranaire, tandis que les acides bongkréiques doivent traverser la membrane interne mitochondriale pour aller se fixer sur la face matricielle du transporteur, ce qui est facilité *in vitro* par leur protonation dans un milieu légèrement acide.



**Figure 4 : Structure chimique des principaux inhibiteurs du transporteur d'ADP/ATP.**

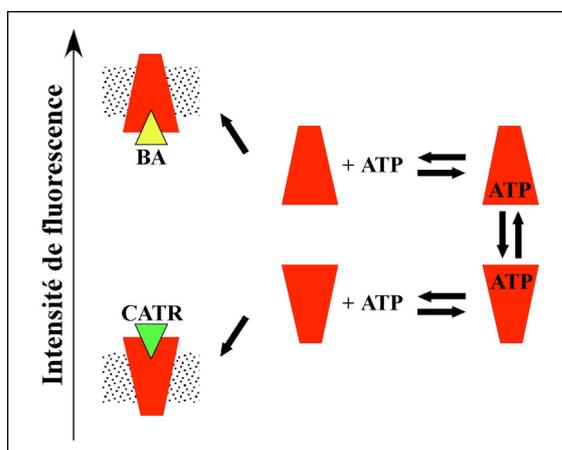
A : L'atractyloside (ATR) et le carboxyatractyloside (CATR), membres de la famille des atractylosides. B : L'acide bongkréique (BA, représenté en entier) et l'acide isobongkréique (isoBA, partiellement reproduit), membres de la famille des acides bongkréiques.

L'atractyloside (ATR), isolé par Lefranc en 1868, et le carboxyatractyloside (CATR), appelé aussi gummiférine (Stanislas et Vignais, 1964), sont des poisons naturels qui se trouvent principalement dans la racine du chardon à glu *Atractylis gummifera*, une plante qui se développe notamment en bordure de la mer Méditerranée. Ces deux composés, qui ne diffèrent que par la présence d'un groupement carboxylique supplémentaire dans la molécule de CATR, ont des propriétés biochimiques différentes (Vignais et al., 1971) : une concentration élevée de nucléotides peut ainsi permettre de déplacer l'ATR lié mais pas le CATR, dont l'affinité pour le transporteur d'ADP/ATP est plus forte (constantes de dissociation de l'ordre de 100 à 300 nM pour l'ATR contre seulement 10 à 30 nM pour le CATR).

Les acides bongkréique (BA, Henderson et Lardy, 1970) et isobongkréique (isoBA, Lauquin et al., 1976) sont eux aussi des poisons naturels, synthétisés et sécrétés par la bactérie *Burkholderia cocovenenans*, qui se développe sur la pulpe de noix de coco. Ces deux molécules sont des isomères, deux des trois groupements carboxyliques portés par la longue chaîne carbonée polyinsaturée étant en *trans* pour le BA, alors qu'ils sont en *cis* pour l'isoBA. Ce sont des inhibiteurs non-compétitifs de la fixation des nucléotides sur le transporteur, qui présentent une forte affinité pour celui-ci, avec des constantes de dissociation voisines de celle du CATR, d'environ 20 nM et 80 nM respectivement.

### I.B.2.3. Mise en évidence des états conformationnels du transporteur.

Au cours de l'échange des nucléotides, le transporteur d'ADP/ATP passe par différents états conformationnels, parmi lesquels deux états ont été relativement bien caractérisés car ils correspondent à la protéine stabilisée par ses inhibiteurs CATR et BA. Le fait que les deux états bloqués par le CATR et le BA soient différents a été montré par de nombreuses expériences (pour revue, voir Brandolin et al., 1993), notamment par des analyses immunochimiques (Buchanan et al., 1976 ; Brandolin et al., 1989), des marquages chimiques (Brdiczka et Schumacher, 1976 ; Boulay et Vignais, 1984) et de la protéolyse ménagée (Marty et al., 1992), mais également par des expériences de mesure de variations de fluorescence intrinsèque du transporteur.



**Figure 5 : États conformationnels du transporteur d'ADP/ATP et leur fluorescence.**

Les inhibiteurs CATR et BA forment avec le transporteur des complexes stables, de conformations distinctes, équivalentes aux deux états extrêmes adoptés par la protéine au cours du processus d'échange.

Isolés en micelles de détergent, les complexes bAnc1-CATR et bAnc1-BA, où bAnc1 est l'isoforme 1 du transporteur d'ADP/ATP bovin, présentent respectivement des états de basse et de haute fluorescence (Brandolin et al., 1985), et le passage d'un état à l'autre requiert l'ajout d'ATP dans le milieu (cf Figure 5). L'hypothèse selon laquelle le transporteur enchâssé dans la membrane, en l'absence d'inhibiteur, oscillerait entre ces deux états conformationnels – la transition de l'un à l'autre étant accélérée par la présence d'un nucléotide transporté – a été confirmée par l'utilisation d'un dérivé non transporté de l'ADP, le naphthoyl-ADP (Block et al., 1983), qui se fixe au transporteur natif : l'analyse de son déplacement par les inhibiteurs CATR ou BA, visualisé par une augmentation de fluorescence, indique que celui-ci n'est pas total, sauf lorsqu'une quantité catalytique d'ADP ou d'ATP est ajoutée dans le milieu. Des expériences similaires ont été réalisées sur le transporteur isolé en micelles de détergent (Block et Vignais, 1986), avec cette fois-ci comme sonde extrinsèque le naphthoyl-ATP (N-ATP). Lorsque le transporteur est isolé en micelles de LAPAO, le N-ATP est rapidement déplacé par l'ajout de CATR, mais il ne l'est pas par le BA, sauf si de l'ATP a auparavant été ajouté dans le milieu. En revanche lorsque le transporteur est isolé en micelles de CHAPS, une situation réciproque est observée. Ces résultats prouvent que le détergent peut favoriser l'un ou l'autre des deux états conformationnels, mais que, quel que soit le détergent choisi, l'ajout d'un inhibiteur induit toujours la formation du complexe stable correspondant, le transporteur étant alors figé dans un état conformationnel dit 'extrême'.

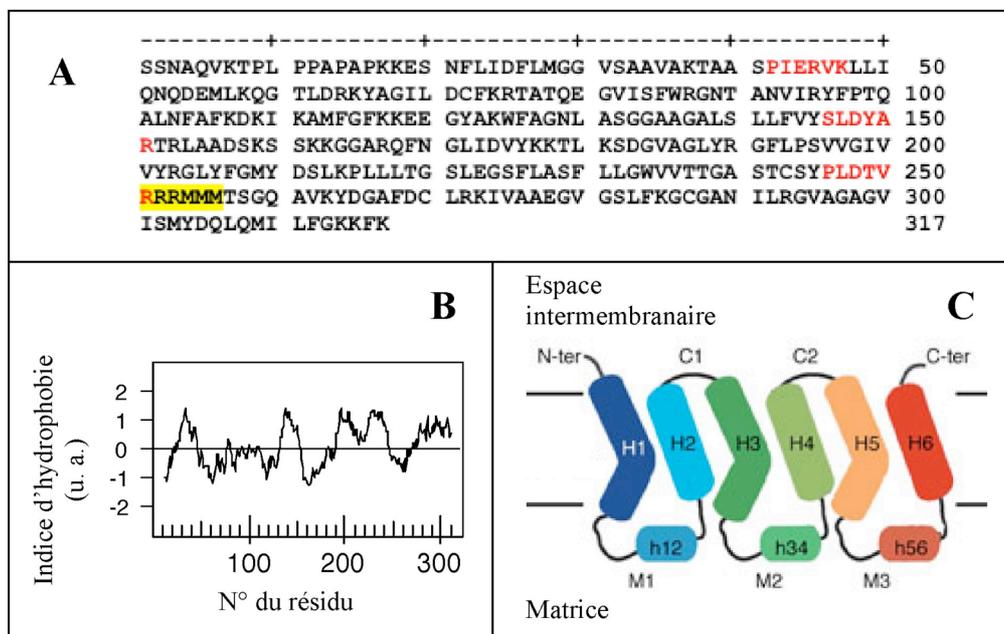
### **I.B.3. Aspects génétiques et structuraux.**

#### **I.B.3.1. Isoformes du transporteur d'ADP/ATP.**

D'après les banques de données, il existe environ 115 transporteurs d'ADP/ATP identifiés dans différentes cellules eucaryotes. Tous sont caractérisés par un enchaînement d'arginines et de méthionines R-R-R-M-M-M dans la partie C-terminale de leur séquence primaire (Brandolin et al., 1993 ; Nury et al., 2006 ; cf Figure 6A). Chez un même organisme, il peut exister plusieurs isoformes du transporteur, exprimées différemment suivant les tissus et n'ayant probablement pas toutes le même rôle. Ainsi chez la levure *S. cerevisiae*, qui

possède pourtant trois isoformes du transporteur (Kolarov et al., 1990), seule l'isoforme majoritaire yAnc2 est essentielle au développement des cellules sur milieu non fermentescible. Chez l'homme, quatre isoformes du transporteur d'ADP/ATP ont été identifiées (Dolce et al., 2005), pour lesquelles la distribution tissulaire, déterminée par la quantification des ARN messagers, est extrêmement variable, l'isoforme hAnc1 étant majoritaire dans le cœur et dans les muscles. De façon surprenante, il y a davantage de similitude de séquence entre des isoformes issues de différents organismes et exprimées dans un tissu donné qu'entre les trois isoformes d'un même organisme.

### I.B.3.2. Structure secondaire du transporteur d'ADP/ATP.

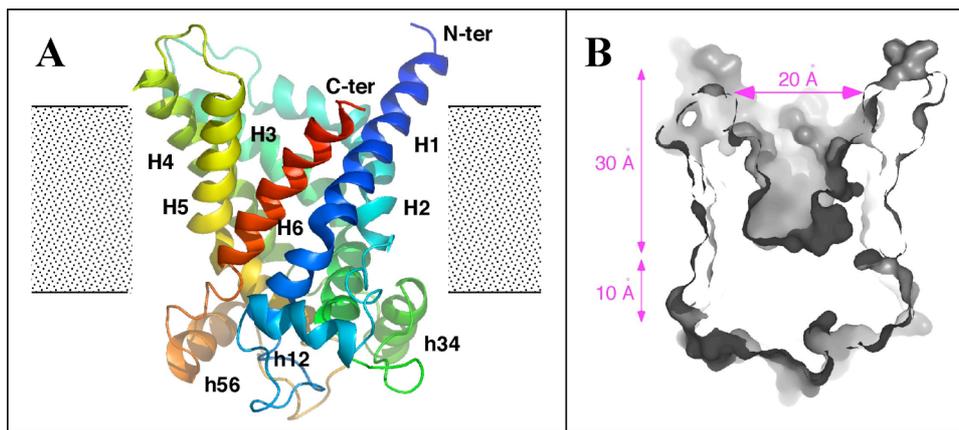


**Figure 6 : Prédiction de structure du transporteur yAnc2 de levure.**

A : Séquence primaire du transporteur d'ADP/ATP yAnc2 de la levure *S. cerevisiae*. Il faut noter l'absence de résidu méthionine à l'extrémité N-terminale de la protéine, qui est le fruit de modifications post-traductionnelles (Dianoux et al., 2000). En rouge est indiqué le motif signature triplé de la MCF. L'enchaînement RRRMMM caractéristique des transporteurs d'ADP/ATP est surligné en jaune. B : Profil d'hydrophobicité de Kyte et Doolittle calculé avec une fenêtre de 19 résidus. C : Topographie membranaire hypothétique de yAnc2 copiée sur celle de bAnc1.

L'observation du profil d'hydrophobicité selon Kyte et Doolittle du transporteur yAnc2 de la levure *S. cerevisiae*, c'est-à-dire l'observation de la répartition des résidus hydrophiles et hydrophobes le long de sa séquence, font clairement ressortir cinq régions hydrophobes (cf Figure 6B). Cependant, de nombreuses études topographiques du

transporteur bovin d'ADP/ATP (pour revue, voir Brandolin et al., 1993), ainsi que la notion de structure doublement dupliquée des membres de la MCF, soutenaient plutôt une organisation en six hélices  $\alpha$  transmembranaires. Dans le cas du transporteur d'ADP/ATP bovin bAnc1, seule l'extrémité N-terminale a pu être localisée sans ambiguïté dans l'espace intermembranaire par des analyses immunochimiques (Brandolin et al., 1989). Cependant, les analyses menées sur un dimère covalent en tandem du transporteur  $\gamma$ Anc2 de levure ont prouvé que les extrémités de ce transporteur se trouvent toutes deux dans le même compartiment mitochondrial (Trézéguet et al., 2000). Ceci a été validé et complété en 2003 (cf Figure 6C) grâce à la structure tridimensionnelle du transporteur d'ADP/ATP bovin bAnc1 en complexe avec le CATR (cf Figure 7A), obtenue à haute résolution (2,2 Å) par diffraction de cristaux de cette protéine aux rayons X (Pebay-Peyroula et al., 2003), et déposée dans la Protein Data Bank sous le code 1okc.



**Figure 7 : Vues latérales de la structure tridimensionnelle de bAnc1-CATR.**

A : Vue en rubans. La chaîne polypeptidique est colorée du bleu au rouge, en allant de l'extrémité N- à l'extrémité C-terminale. La position de la membrane est déterminée relativement au caractère hydrophobe des hélices. B : Vue en coupe du transporteur. Le CATR ménage une large cavité conique dans la face de la protéine orientée du côté de l'espace intermembranaire.

### I.B.3.3. Analyse de la structure tridimensionnelle.

Le transporteur présente une pseudo-symétrie d'ordre trois. Chacun des trois motifs est formé de deux hélices  $\alpha$  transmembranaires fortement inclinées, dont l'une est coudée au niveau du résidu proline contenu dans la signature P-X-[D/E]-X-X-[R/K] des membres de la MCF. Ces hélices sont reliées entre elles par une boucle matricielle contenant une courte hélice  $\alpha$  parallèle à la surface de la membrane interne. Les trois motifs sont reliés par deux

courtes boucles hydrophiles situées dans l'espace intermembranaire. Les segments transmembranaires délimitent une large cavité, ouverte du côté de l'espace intermembranaire (cf Figure 7B), au fond de laquelle est maintenu l'inhibiteur CATR au moyen de nombreuses interactions avec la chaîne peptidique, dont des liaisons hydrogène et des interactions électrostatiques. Cette structure permet d'expliquer la moindre affinité de l'ATR vis-à-vis du transporteur, pour lequel la présence d'un seul groupement carboxylique au lieu des deux portés par le CATR limite le nombre des interactions. Elle permet aussi d'avancer l'hypothèse d'un filtre de sélectivité formé d'acides aminés chargés positivement pour présélectionner et préorienter les substrats de la protéine, et d'expliquer certains événements moléculaires impliqués dans les mécanismes de transport (pour revue, voir Pebay-Peyroula et Brandolin, 2004, et Nury et al., 2006). Enfin, l'hypothèse de l'existence probable d'un site de liaison du substrat commun à tous les membres de la MCF a pu être émise grâce à des simulations informatiques de la structure de plusieurs transporteurs de levure (Robinson et Kunji, 2006), effectuées à partir de la structure tridimensionnelle du complexe bAnc1-CATR. Il faut noter la présence de trois molécules de cardiolipide fortement liées au transporteur, qui pourraient jouer un rôle dans le contrôle des changements conformationnels de la protéine (Pebay-Peyroula et Brandolin, 2004) ou dans sa dimérisation (Nury et al., 2005).

#### I.B.3.4. Organisation oligomérique *in vivo* ?

L'obtention de la structure tridimensionnelle du transporteur a contribué à réalimenter un débat portant sur son organisation oligomérique. En effet le complexe bAnc1-CATR a été cristallisé sous la forme d'un monomère, alors que de nombreuses données biochimiques indiquent que les transporteurs d'ADP/ATP mitochondriaux dans l'état micellaire sont des homodimères. En effet, lorsque le complexe bAnc1-CATR est purifié dans un détergent non dénaturant tel que le Triton X-100, les analyses indiquent qu'il s'est fixé sur le transporteur une quantité de CATR équivalente à une molécule de CATR pour deux monomères de protéine (Riccio et al., 1975b). La même valeur a été obtenue pour l'acide bongkrélique après purification du complexe bAnc1-BA (Aquila et al., 1978). Ce résultat a été également corroboré par d'autres études, dont des analyses hydrodynamiques (Hackenberg et Klingenberg, 1980) ou par diffusion de neutrons (Block et al., 1982), réalisées à partir de transporteur bovin isolé en présence de détergent.

Il n'a jamais été mis en évidence de manière directe quel état oligomérique du transporteur intervient au cours du processus de transport. Cependant, l'échange des nucléotides, qui a lieu avec une stricte stoechiométrie de 1:1, ainsi que la mise en évidence de plusieurs sites de fixation pour les nucléotides (Block et Vignais, 1984), semblent indiquer la coopération de deux sites. De plus, des études cinétiques ont démontré que l'échange ADP/ATP implique une forte coopérativité dans la fixation des deux nucléotides au transporteur (Duyckaerts et al., 1980). Plus récemment, la construction de dimères covalents (Postis et al., 2005) a montré la nécessité d'un dialogue entre les deux monomères pour que le transport puisse avoir lieu. De même, l'existence d'un dimère fonctionnel a été prouvé pour d'autres membres de la MCF, comme le transporteur d'oxoglutarate (expériences de réticulation (Bisaccia et al., 1996)), celui de phosphate (utilisation de monomères étiquetés (Schroers et al., 1998)) ou celui de citrate (gel d'électrophorèse en conditions natives (Kotaria et al., 1999)). Une organisation tétramérique du transporteur d'ADP/ATP a même été suggérée sur la base des données de fixation du CATR (Brandolin et al., 1993). En 2005, une autre forme de cristaux du complexe bAnc1-CATR a été obtenue, dans laquelle ont été identifiés des interfaces de dimérisation mettant en jeu des interactions médiées par des cardiolipides endogènes (Nury et al., 2005), ce qui a aussi été observé pour la protéine membranaire formate déhydrogénase-N (Jormakka et al., 2002). Cependant le dimère est fragile, et il est certain que la monomérisation est favorisée par l'utilisation de détergents (Bamber et al., 2006).

#### I.B.3.5. Existence de boucles réentrantantes dans le transporteur de levure.

La structure de bAnc1-CATR ne permet pas d'expliquer l'existence d'une boucle matricielle réentrantante, mise en évidence par protéolyse limitée et marquage chimique de cystéine, dans le cas du transporteur yAnc2 de la levure *S. cerevisiae* (Dahout-Gonzalez et al., 2005). Etant donné que l'enchaînement fixation-transport-libération des nucléotides induit probablement des réarrangements structuraux majeurs, les boucles matricielles pourraient être impliquées dans la fixation des nucléotides (Mayinger et al., 1989) puis dans leur transport (Majima et al., 1995). Le même phénomène a été observé par des études biochimiques pour le transporteur de carnitine du rat (Indiveri et al., 2002). Récemment, la structure d'un

transporteur de glutamate chez *Pyrococcus horikoshii* a été obtenue à haute résolution et a démontré l'existence des boucles réentrantés (Yernool et al., 2004).

### **I.C. La porine VDAC de la membrane externe.**

Contrairement à la membrane interne, qui ne laisse passer que certaines molécules grâce à des transporteurs spécifiques très diversifiés comme le transporteur d'ADP/ATP, la membrane externe est beaucoup plus perméable et joue seulement un rôle de filtre moléculaire en retenant les molécules de masse moléculaire supérieure à 3000-5000 Da. Cette diffusion contrôlée de métabolites, et donc cette régulation de la communication intracellulaire, s'effectue au moyen de canaux transmembranaires présents en grande quantité chez tous les eucaryotes : les porines mitochondriales. Ainsi, dans le cas de la levure *S. cerevisiae*, des analyses menées après purification de la porine yVDAC1 indiquent que celle-ci représente au minimum 10% des protéines totales de la membrane externe mitochondriale (Forte et al., 1987). Jusqu'ici il n'a été rapporté qu'un seul cas de pathologie humaine impliquant une déficience en porine (Huizing et al., 1994), et entraînant des désordres dans le métabolisme énergétique des cellules.

#### **I.C.1. Identification et caractéristiques physiologiques de la porine.**

D'après la base de données TCDB (cf Partie I.B.1.), VDAC fait partie de l'une des 47 familles du groupe des porines de type tonneau  $\beta$  : la famille des porines MPP (Mitochondrial and Plastid Porin), qui est l'une des rares familles de porines existant chez les organismes eucaryotes, et dont VDAC est actuellement le membre le mieux caractérisé. Les premières études biochimiques sur la composition protéique de la membrane externe avaient montré l'existence chez plusieurs eucaryotes d'une protéine majoritaire de masse moléculaire proche de 30 kDa, et de fonction inconnue (Mannella et Bonner, 1975). Ce n'est qu'en 1976, après reconstitution dans une membrane artificielle, et à cause de ses caractéristiques électrophysiologiques, qu'elle a été identifiée dans l'organisme unicellulaire *Paramecium aurelia* (Schein et al., 1976) et nommée pour la première fois VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel). Par la suite, la porine a été observée chez le rat, le bœuf, la levure

*Saccharomyces cerevisiae* et *Neurospora crassa* (Colombini, 1979), puis chez d'autres organismes eucaryotes, toujours avec des caractéristiques biochimiques et biophysiques hautement conservées (De Pinto et al., 1987). La présence de VDAC, soit dans d'autres organelles de la cellule eucaryote, soit dans la membrane plasmique, a été observée par plusieurs équipes (pour revue, voir Bathori et al., 2000, et Shoshan-Barmatz et Israelson, 2005), mais ses fonctions extramitochondriales sont toujours actuellement inconnues.

Les expériences d'électrophysiologie menées sur la protéine reconstituée soit en liposomes soit en bicouches lipidiques planes montrent que VDAC contrôle le flux des métabolites grâce à des variations de fréquence d'ouverture du canal, suivant le potentiel de membrane (pour revue, voir Benz, 1994, et voir Colombini, 2004). Il existe ainsi un état dit 'ouvert', légèrement sélectif vis-à-vis des anions, caractérisé par une perméabilité élevée, où la microscopie électronique permet de visualiser de larges pores remplis d'eau, de 2-3 nm de diamètre environ (Mannella, 1998). A l'inverse, à partir d'une différence de potentiel de membrane supérieure à 30 mV, il est possible de distinguer plusieurs états dits 'fermés', légèrement sélectifs vis-à-vis des cations, pour lesquels la perméabilité est réduite, n'autorisant alors plus le passage de nucléotides tels que l'ADP ou l'ATP. L'ouverture du canal semble être régulée par des molécules variées, telles que le glutamate et le NADH (Shoshan-Barmatz et Gincel, 2003). L'existence de deux sites de fixation de nucléotides (Yehezkel et al., 2006) et d'au moins un site de fixation de  $Ca^{2+}$  (Israelson et al., 2007) a été démontrée. En revanche, à l'heure qu'il est, on ne connaît pas d'inhibiteur spécifique pour VDAC, ce qui est préjudiciable pour nombre d'études biochimiques.

### **I.C.2. Aspects génétiques et structuraux.**

Les porines mitochondriales sont des protéines très conservées chez les organismes eucaryotes : légèrement basiques, d'environ 30 kDa, elles sont caractérisées par des séquences primaires constituées d'environ 280 acides aminés, qui présentent un pourcentage d'homologie relativement faible (cf Figure 8). Codées par le génome nucléaire mais dépourvues de séquence signal, les porines sont prises en charge par des chaperonnes cytosoliques, puis reconnues par le complexe d'import TOM de la membrane externe mitochondriale, avant d'être insérées dans la membrane par le complexe SAM (Sorting and Assembly Machinery (Taylor et Pfanner, 2004)). Suivant les espèces, il peut exister plusieurs

isoformes de VDAC, et il est intéressant de noter que plus l'organisme est complexe, plus il possède d'isoformes de VDAC : une seule isoforme est ainsi présente chez *N. crassa* tandis que *S. cerevisiae* en compte deux et la souris trois.

<i>S. cerevisiae</i>	-SPPVYSDISRNDLLNKDFYHATPAAFDVQTTANGIKFSLKAKQPVKDGPLSTNVEA
<i>N. crassa</i>	MAVPAFSDIAKSANDLLNKDFYHLAAGTIEVKSNTFPNNVAFKVTGKS-THDKVTSGALEG
Humain	AVPPTYADLGKSARDVFTKG-YGFGLIKLCLKTKSENGLEFTSSGSANTETTKVTSLET
Rat	AVPPTYADLGKSARDVFTKG-YGFGLIKLCLKTKSENGLEFTSSGSANTETTKVNGSLET
	* :*: : *:: * * : : : : : * : *
<i>S. cerevisiae</i>	KLNDKQTGLGLTQGWSTNNLQTKLEFAN-LTPGLKNEIITSLTFPGV-AKSAVLNLTFTQ
<i>N. crassa</i>	KFTDKPGLTQVQWNTANALETQKVEADNLAKGLKAEGIFSFLEPATNARGAKFNLFHKQ
Humain	KYRWTEYGLTFTEKWNTDNTLQTEITVEDQLARGLKLTFDSSFSFENTGKKNAKIKTYKR
Rat	KYRWTEYGLTFTEKWNTDNTLQTEITVEDQLARGLKLTFDSSFSFENTGKKNAKIKTYKR
	* ** * : * * * * : : * : *** * : * : * : : :
<i>S. cerevisiae</i>	PFFTARGAFDLCLKSPFTVGDLTMAHEGIVGGAEFGYDISAGSISRYAMALSYFAKDYSI
<i>N. crassa</i>	SNFHGRAFFDL-LKGPATANIDAIVGHEGFLAGASAGYDVQKAAITGYSAAVGYHAPTYSA
Humain	EHINLGCMDDFDIAGPSIRGALVVLGYEGWLAGYQMNFEAKSRVTSQSNFAVGYKTDEFQL
Rat	EHINLGCDDVDFDIAGPSIRGALVVLGYEGWLAGYQMNFEAKSRVTSQSNFAVGYKTDEFQL
	: * : : * : : : : * : : : : * : * : :
<i>S. cerevisiae</i>	GATLN-NEQITTVDFQNVNAFLQVGAKATMNCKLPNSNVNIEFATRYLPDASSQVKAKV
<i>N. crassa</i>	AITATDNLVFSASYYHKVNSQVEAGSKATWNSKTGN-TVGLEVATKYRIDPVSFVKGKI
Humain	HTNVN-DGTEFGGSIYQKVNKKLETAVNLAWTAGNSN--TRFGIAAKYQIDPDACFSAKV
Rat	HTNVN-DGTEFGGSIYQKVNKKLETAVNLAWTAGNSN--TRFGIAAKYQVDPDACFSAKV
	: : : : * : : : : * : : * : * : * : * :
<i>S. cerevisiae</i>	SDSGIVTLAYKQLLRPGVTLGVGSSFDALKLSEPVHKLGWSLSEFDA
<i>N. crassa</i>	NDRGVAAIAYNVLLREGVTLGVGASFDTQKLDQATHKVGTSFTFES
Humain	NNSSLIGLGYTQTLKPGIKLTLSSALLDGKNVNAGGHKLGLEFQA
Rat	NNSSLIGLGYTQTLKPGIKLTLSSALLDGKNVNAGGHKLGLEFQA
	: : : * * : * : * : : * : : * : * : * : :

**Figure 8 : Aligement de séquences de la porine VDAC.**

Les acides aminés conservés à l'identique entre les quatre espèces sont surlignés en jaune et marqués par un astérisque (\*), ceux qui sont homologues sont indiqués par les deux points (:), et ceux qui ne sont conservés que pour trois des quatre espèces sont grisés.

### I.C.2.1. Structure secondaire en tonneau $\beta$ .

La composition en acides aminés des porines ressemble à celle des protéines solubles, avec plus de 50% d'acides aminés hydrophiles. L'analyse de leurs séquences peptidiques montre qu'il existe une alternance d'acides aminés polaires et non polaires, ce qui est caractéristique de brins  $\beta$ . Ceux-ci, d'une longueur de 10 acides aminés environ (ce qui est suffisant pour traverser la membrane), et organisés en tonneau, permettent de séparer l'environnement polaire du canal de celui, hydrophobe, de la membrane. Des spectres de dichroïsme circulaire et des analyses par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier

(Abrecht et al., 2000), ainsi que l'observation par microscopie électronique de cristaux bidimensionnels de porine de *N. crassa* (Mannella, 1998), ont confirmé que sa structure secondaire est bien de type tonneau  $\beta$ . Assez étonnamment, celle-ci est très conservée parmi les eucaryotes, même quand le pourcentage d'homologie entre les séquences primaires est faible.

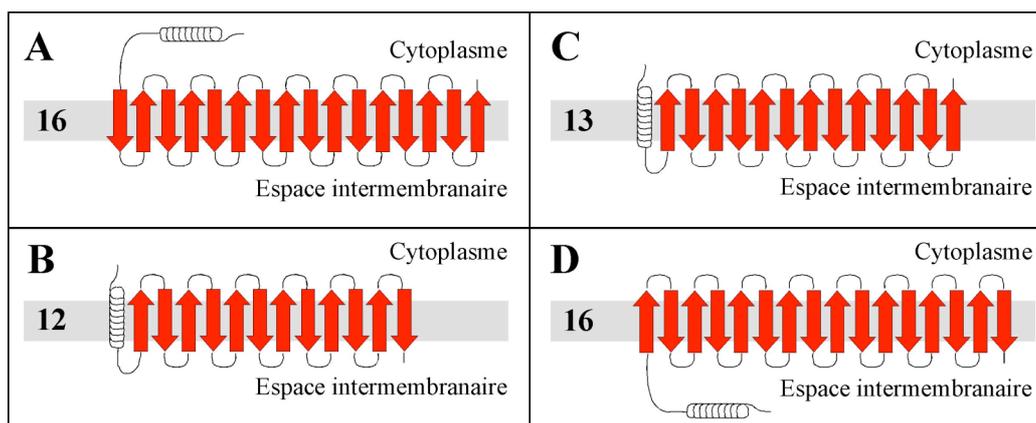
### I.C.2.2. Structure tertiaire de la porine ?

Les désaccords sur la structure de VDAC apparaissent dès lors qu'il s'agit de déterminer la topographie de VDAC et le nombre de brins  $\beta$  qui constituent le tonneau  $\beta$ . En effet, il n'existe actuellement aucune structure tridimensionnelle à haute résolution de VDAC, et les modèles proposés, pourtant basés sur des analyses de séquences et confortés par diverses approches expérimentales, sont tous très différents (cf Figure 9). Au contraire, les porines bactériennes, situées dans la membrane externe des bactéries Gram-négatives, sont très bien caractérisées depuis que certains de leurs membres ont été cristallisés, en particulier OmpF et PhoE (Cowan et al., 1992) : elles forment *in vivo* des homotrimères de tonneaux  $\beta$  chiraux constitués chacun de 16 brins  $\beta$  antiparallèles, dont les boucles sortantes contrôlent la largeur du canal et donc la diffusion des molécules à travers le pore (Schulz, 2002). Bien que leurs séquences présentent peu de résidus identiques, VDAC et les porines bactériennes ont de nombreuses caractéristiques communes, et il est donc tentant de calquer la structure de VDAC sur la leur.

Un modèle de tonneau  $\beta$  constitué de 16 brins  $\beta$ , avec la présence d'une courte hélice  $\alpha$  à l'extrémité N-terminale, exposée du côté cytoplasmique, a ainsi été proposé sur la base de simples analyses de séquence pour les porines de plusieurs organismes eucaryotes (cf Figure 9A ; Rauch et Moran, 1994 ; Casadio et al., 2002). Ces résultats sont en accord avec la structure des porines des mammifères proposée à partir d'expériences de protéolyse ménagée et de tests ELISA réalisés avec des anticorps dirigés contre un peptide synthétique mimant la partie N-terminale de la protéine (De Pinto et Palmieri, 1992). Une courte hélice  $\alpha$  s'étendant sur l'une des deux faces de la membrane a aussi été observée, d'une part par dichroïsme circulaire à l'aide d'un peptide synthétique correspondant à la partie N-terminale de la porine de *N. crassa*, et d'autre part par microscopie électronique sur des cristaux bidimensionnels de

VDAC incubés en présence de fragments Fab d'anticorps dirigés contre l'extrémité N-terminale de la porine (Guo et al., 1995).

Un modèle différent a été proposé pour les porines de plusieurs eucaryotes (cf Figure 9B) sur la base d'analyses de séquences primaires (Song et Colombini, 1996) : 12 brins  $\beta$  formeraient le tonneau  $\beta$ , et là encore il existerait une courte hélice  $\alpha$  portée par l'extrémité N-terminale, mais décrite ici comme étant transmembranaire. Ce modèle corrobore celui décrit auparavant pour la porine de la levure *S. cerevisiae* (Blachly-Dyson et al., 1990) et fondé sur des analyses biophysiques de mutants. Un troisième modèle a encore été proposé (cf Figure 9C), cette fois-ci uniquement pour la porine de *N. crassa*, à partir d'approches biochimiques (Song et al., 1998). Pour cela, des paires de cystéines ont été introduites dans la séquence primaire de la porine, biotinyllées, puis leur accessibilité a été analysée grâce à la streptavidine, ce qui permet de déterminer si elles sont du même côté ou non de la membrane. Il en résulte un modèle présentant un tonneau  $\beta$  constitué de 13 brins  $\beta$  et portant une courte hélice  $\alpha$  transmembranaire à l'extrémité N-terminale. Plus récemment, ce modèle a été remis en question (Runke et al., 2006), puisque l'analyse de mutants de la porine de *N. crassa* par des approches d'électrophysiologie et de spectroscopie a permis de décrire un tonneau  $\beta$  formé de 16 brins  $\beta$ , avec l'hélice  $\alpha$  exposée du côté de l'espace intermembranaire (cf Figure 9D).



**Figure 9 : Différents modèles topologiques proposés pour les porines mitochondriales.**

A : d'après Casadio et al., 2002 ; B : d'après Song et Colombini, 1996 ; C : d'après Song et al., 1998 ; D : d'après Runke et al., 2006.

Les seules données cristallographiques disponibles à basse résolution (environ 8 Å) concernent la porine humaine (Dolder et al., 1999). Elles confirment la présence de pores dont

le diamètre est compatible avec un nombre de brins  $\beta$  pouvant varier entre 12 et 16. Il n'existe donc toujours aucun consensus, bien que le modèle présenté sur la Figure 9A soit privilégié, et ce pour trois raisons principales : la porine mitochondriale dérive des porines bactériennes primitives et leur structure globale a probablement été préservée ; l'hélice  $\alpha$  de la région N-terminale est le principal élément antigénique et il n'est donc probablement pas enfoui dans la membrane ; les résultats provenant de l'étude de mutants doivent être pris avec précautions car le changement d'un seul acide aminé peut entraîner des modifications dans d'autres parties du pore. Le rôle de l'hélice  $\alpha$  n'est quant à lui pas encore clairement défini, mais serait celui de stabilisateur ou d'interrupteur, par analogie avec les porines bactériennes (Cowan et al., 1992).

#### I.C.2.3. Organisation oligomérique dans la membrane ?

L'état oligomérique de la porine est aussi matière à débat : en effet, bien que certaines études concluent à l'existence d'un VDAC fonctionnel en tant que monomère (Peng et al., 1992), d'autres indiquent que la porine dans la membrane est un dimère, un trimère ou un tétramère. Ces conclusions sont basées sur des expériences de réticulation et de FRET (Zalk et al., 2005), ou bien sur des études hydrodynamiques de la porine purifiée en présence de Triton X-100 (Linden et Gellerfors, 1983), ou encore sur des expériences d'électrophorèse en conditions non-dénaturantes (Shi et al., 2003). Cependant, la raison de l'oligomérisation éventuelle de VDAC n'est pas évidente, sachant que le canal par lequel transitent les métabolites est celui qui se trouve au centre du tonneau  $\beta$  et que la formation d'oligomères n'est donc pas *a priori* nécessaire pour le fonctionnement de VDAC. L'organisation supramoléculaire de VDAC n'aurait donc peut-être qu'un rôle de stabilisation de la protéine, de même que pour les porines bactériennes (Cowan et al., 1992).

#### I.C.2.4. Rôle des stérols ?

Comme pour le transporteur d'ADP/ATP (Jiang et al., 2000), il semble que des lipides puissent jouer un rôle important sur la fonction de la porine. Dans la membrane externe mitochondriale, les stérols sont présents en très grande quantité puisqu'un total de cinq

molécules de cholestérol par monomère de porine a été dénombré dans les mitochondries de cœur de bœuf (De Pinto et al., 1989). Dans le cas de *N. crassa* (Freitag et al., 1982) et de *S. cerevisiae* (Le Saux et al., 1996), de grandes quantités d'ergostérol ont été détectées dans des préparations de porine et de transporteur d'ADP/ATP, respectivement. La nécessité de la présence de stérols pour un bon fonctionnement de VDAC a été notamment décelée lors d'expériences de reconstitution en bicouches lipidiques (Popp et al., 1995) : les porines de *Dictyostelium discoideum*, de *Paramecium* et de rat, une fois dépourvues de lipides, sont incapables de former des canaux fonctionnels dans des membranes artificielles, mais une simple préincubation en présence de stérols et de détergent leur permet de regagner cette capacité. Cela signifie que quelques stérols font peut-être partie intégrante du complexe protéique fonctionnel dans la membrane externe mitochondriale. Ce résultat est cependant à considérer avec prudence puisque, dans le cas de transporteurs d'ADP/ATP de mammifères reconstitués en liposomes, l'activité d'échange des nucléotides est stimulée en présence de cholestérol, alors que ce stérol est absent des membranes internes mitochondriales (Krämer, 1982). L'effet des stérols sur le fonctionnement de ces deux protéines après reconstitution serait donc peut-être indirect, dû au changement d'état physique et de composition de la membrane artificielle utilisée, et non à une interaction spécifique entre stérols et protéines membranaires.

### **I.D. Des partenaires possibles du transporteur.**

Du fait de la concentration élevée des protéines dans les mitochondries, il est aisément concevable que le transporteur d'ADP/ATP puisse interagir avec des protéines solubles situées dans la matrice mitochondriale ou dans l'espace intermembranaire, mais aussi avec les parties émergentes de certaines protéines ancrées dans la membrane externe de la mitochondrie. Il avait été suggéré par Christelle Fiore au laboratoire qu'une protéine de la membrane externe mitochondriale appelée yOm14 puisse être un partenaire du transporteur mitochondrial d'ADP/ATP de levure : nous en reparlerons plus longuement dans la partie IV de ce travail. Jusqu'à présent, quelques protéines ont été citées comme étant des partenaires du transporteur. C'est notamment le cas de la porine VDAC et de la cyclophiline D. Le rôle fonctionnel de ces interactions demeure cependant un sujet de débat, abondamment décrit dans la littérature traitant de l'apoptose.

### **I.D.1. Rapprochement des membranes mitochondriales aux sites de contact ?**

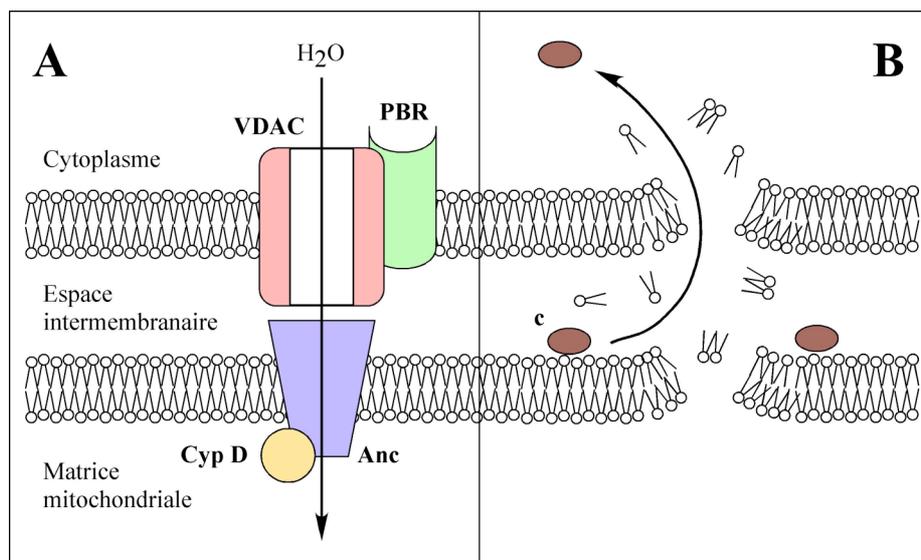
L'existence de sites de contact entre les deux membranes mitochondriales a été postulée pour la première fois en 1968, suite à l'observation par microscopie électronique de mitochondries chimiquement et physiquement fixées (Hackenbrock, 1968). Il était suggéré qu'ils puissent jouer un rôle dans le passage de métabolites entre le cytoplasme cellulaire et la matrice mitochondriale. Aujourd'hui, les sites de contact sont décrits comme des zones très stables, qui représentent entre 5 et 10% de la surface de la membrane externe, où les deux membranes sont si rapprochées (environ 4 nm) qu'elles ne peuvent pas être séparées par les forces mécaniques habituellement utilisées pour le fractionnement des mitochondries, notamment par traitement aux ultrasons (Fraser et Zammit, 1998). Cependant, ces sites de contact mitochondriaux sont très probablement multiples. En effet certains d'entre eux, loin d'être si résistants, sont formés de façon transitoire (pour revue, voir Reichert et Neupert, 2002) : constitués des sous-unités Tom22 et Tim21 des complexes généraux d'import TOM et TIM23 (Albrecht et al., 2006), respectivement situés dans les membranes externe et interne, ils permettent l'import de protéines du cytoplasme vers la membrane interne de la mitochondrie et ne sont observés qu'au niveau d'une protéine en cours d'import. D'autres sites de contact sont supposés être impliqués dans des phénomènes cellulaires variés, très différents de l'import de protéines, tels que la biogenèse des hormones stéroïdiennes (Papadopoulos et Brown, 1995) ou le transfert de phospholipides entre les mitochondries et certaines membranes du réticulum endoplasmique (Ardail et al., 1993). Enfin certains sites de contact, constitués entre autres de la porine VDAC et du transporteur d'ADP/ATP (Hoppel et al., 2002) et peut-être stabilisés par la créatine kinase mitochondriale (Speer et al., 2005), sont surtout censés jouer un rôle important dans le métabolisme énergétique et dans l'apoptose de la cellule (Brdiczka et al., 2006).

### **I.D.2. L'interaction transporteur-VDAC.**

Une littérature abondante concerne l'implication du transporteur et de la porine dans le pore de transition de perméabilité mitochondrial (PTP) qui se formerait au niveau des sites de contact mitochondriaux (pour revue, voir Brdiczka et al., 2006).

### I.D.2.1. Transition de perméabilité et PTP.

Le PTP serait constitué de protéines appartenant à tous les compartiments de la mitochondrie, assemblées en un complexe supramoléculaire. Il s'agirait notamment du transporteur d'ADP/ATP et de la porine VDAC, mais également du récepteur périphérique des benzodiazépines (McEnery et al., 1992) situé dans la membrane externe mitochondriale et de la cyclophiline D matricielle (cf Figure 10A). Par ailleurs, des travaux ont montré que l'ouverture du PTP est modulée par le flux des électrons à travers le complexe I de la chaîne respiratoire (Fontaine et al., 1998), mettant en avant la possibilité que des protéines du complexe I puissent être en contact étroit avec le PTP, voire même faire partie intégrante de ce pore.



**Figure 10 : Pore de transition de perméabilité et conséquences de son ouverture.**

A : Principaux éléments hypothétiques constitutifs du PTP mitochondrial ; VDAC = porine, ANC = transporteur d'ADP/ATP, PBR = récepteur périphérique des benzodiazépines, Cyp D = cyclophiline D. B : Conséquences de l'ouverture du PTP ; c = cytochrome c.

L'ouverture réversible du PTP, principalement déclenchée par l'accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la matrice mitochondriale ou par le vieillissement *in vitro* des mitochondries, induirait un phénomène appelé transition de perméabilité, qui correspond à une augmentation généralisée de la perméabilité de la membrane interne mitochondriale (Hunter et al., 1976), permettant la diffusion de composés de masse moléculaire allant jusqu'à 1500 Da. Le PTP peut être modulé par une multiplicité de molécules variées pour produire la perméabilisation non-lytique de la

membrane interne mitochondriale (pour revue, voir Bernardi et al., 2006). La transition de perméabilité a longtemps été considérée comme une forme non-spécifique d'endommagement de la membrane, jusqu'à ce qu'il ait été montré qu'elle était réversible et inhibée par des concentrations nanomolaires de cyclosporine A (Crompton et al., 1988). De plus, des études d'électrophysiologie ont prouvé l'existence d'un canal de conductivité élevée dans la membrane interne, répondant aux mêmes activateurs et inhibiteurs que la transition de perméabilité et modulé par le potentiel de membrane mitochondrial. Cependant, que le PTP ait été étudié dans des mitochondries isolées, dans des cellules intactes ou dans des tissus, sa nature moléculaire réelle et ses propriétés précises sont aujourd'hui toujours inconnues (Zoratti et al., 2005).

#### I.D.2.2. Rôle du PTP ?

Principale forme de mort physiologique de la cellule, l'apoptose est un processus actif, très conservé parmi les êtres vivants. Il est fondamental chez l'embryon pendant les étapes d'organogenèse et nécessaire chez l'adulte pour le contrôle de la prolifération et de la différenciation des tissus. Caractérisé notamment par la contraction de la cellule et la fragmentation de la chromatine (pour revue, voir Allen et al., 1997), il se termine par la phagocytose de la cellule apoptotique. Il existe une voie de signalisation de l'apoptose dite mitochondriale : celle-ci est déclenchée par la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, qui induit la libération du cytochrome *c* et d'autres facteurs pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire vers le cytoplasme, entraînant l'activation en cascade de caspases et le clivage de substrats-clé de la cellule, ce qui mène à sa mort. Ceci montre que la mitochondrie, primordiale pour la vie de la cellule, joue aussi un rôle décisif dans la programmation de la mort cellulaire. Les mécanismes qui régulent la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale sont encore sujets à controverse, et il semble qu'ils soient différents suivant le type de cellule et la nature du stimulus apoptotique (pour revue, voir Gogvadze et al., 2006).

L'ouverture du PTP est l'une des deux grandes hypothèses actuelles (pour revue, voir Newmeyer et Ferguson-Miller, 2003). En effet l'ouverture du pore entraînerait l'effondrement du métabolisme énergétique de la cellule, la dépolarisation de la mitochondrie, et l'entrée dans la matrice d'eau et de molécules de faible masse moléculaire, induisant le gonflement de

la matrice puis la rupture mécanique de la membrane externe mitochondriale (Petit et al., 1998 ; cf Figure 10B). Cependant, ce mécanisme a été récemment remis en question, car il semble en effet fort peu probable qu'un événement aussi fondamental pour la cellule et régulé par autant d'effecteurs soit dépendant d'un événement aussi peu spécifique que la rupture d'une membrane. La transition de perméabilité n'est peut-être donc pas le mécanisme majeur impliqué dans l'apoptose, mais se pose alors la question de son rôle précis. Actuellement sont émises des hypothèses concernant une éventuelle implication du PTP dans la nécrose cellulaire (Nakagawa et al., 2005).

L'autre grande hypothèse s'attache au rôle des protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 qui, de fait, sont des régulateurs de l'apoptose (pour revue, voir Skommer et al., 2007). Les protéines pro-apoptotiques induiraient la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale en formant un pore permettant le passage du cytochrome *c*. De structure très proche de celle des domaines responsables de la formation de pores des toxines bactériennes (Muchmore et al., 1996), elles sont capables de s'associer pour former des homo- ou des hétéro-complexes. L'activité hémolytique de Bax, ainsi que sa capacité à former des pores dans des membranes artificielles, ont été démontrées (Antonsson et al., 1997). Quant aux cellules BAX<sup>-/-</sup>-BAK<sup>-/-</sup>, elles ne permettent pas la libération du cytochrome *c* et sont relativement résistantes à l'apoptose (Cheng et al., 2001), ce qui montre que Bax et Bak sont essentiels à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. Certaines études permettent quant à elles de rapprocher ces deux hypothèses principales. Elles ont ainsi montré que le PTP ne serait qu'un acteur indirect, qui recruterait et activerait la protéine pro-apoptotique Bax, qui serait alors elle-même responsable de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (De Giorgi et al., 2002). D'éventuelles interactions des protéines de la famille de Bcl-2 avec la porine VDAC, élément *a priori* constitutif du PTP, ont d'ailleurs été postulées.

### I.D.2.3. Nature du PTP.

L'idée de l'implication du transporteur d'ADP/ATP dans le PTP est apparue lorsque des expériences ont montré l'effet produit par ses ligands spécifiques sur la transition de perméabilité : en effet le carboxyatractyloside déclenche l'ouverture du pore tandis que l'acide bongkréique en provoque la fermeture. Cependant, le fait que ces ligands soient tous

deux de puissants inhibiteurs du transport montre qu'il n'y a absolument aucun lien entre l'activité du transporteur et l'état ouvert/fermé du PTP : seules des différences de conformation au niveau du transporteur peuvent éventuellement exercer un effet sur le fonctionnement de ce pore. De plus, l'absence du transporteur d'ADP/ATP dans des mitochondries de foie de souris, obtenue par invalidation génique, n'empêche pas les cellules d'entrer en apoptose, et montrent donc que celui-ci n'est pas essentiel pour le fonctionnement du pore (Kokoszka et al., 2004). Le transporteur pourrait donc avoir un rôle dans la régulation du fonctionnement du PTP, sans être impliqué dans la structure même de ce pore.

Quant à la porine VDAC, une fois reconstituée dans des bicouches lipidiques planes, elle forme des canaux de diamètre proche de 2,5-3 nm aux propriétés électrophysiologiques étonnamment similaires à celles du PTP. C'est majoritairement sur cette base logique qu'a été postulée son appartenance au PTP. Il manque encore des données convaincantes impliquant VDAC dans la formation du PTP dans un contexte physiologique *in vivo*. Malheureusement, l'inactivation simultanée de tous les isogènes de VDAC est impossible : chez les embryons de souris, l'élimination de VDAC2 est létale (Cheng et al., 2003). Cependant, dans des fibroblastes de souris *mVDAC1<sup>-/-</sup>/mVDAC3<sup>-/-</sup>* dans lesquels la protéine *mVDAC2* a été inactivée par des ARN interférents, la fonctionnalité du PTP est conservée malgré l'absence de toutes les isoformes de la porine (Baines et al., 2007). Ces résultats indiquent que la porine n'est probablement pas un élément essentiel du pore.

En revanche, des mitochondries ne contenant pas de cyclophiline D sont relativement résistantes au phénomène de transition de perméabilité. Ce résultat, obtenu de manière indépendante par trois équipes (Baines et al., 2005 ; Nakagawa et al., 2005 ; Schinzel et al., 2005), prouve que la cyclophiline D est un régulateur du PTP, dont l'action s'exerce en particulier lorsqu'elle lie la cyclosporine A (Basso et al., 2005), ce qui résulte en une inhibition du PTP.

De nombreuses autres protéines mitochondriales ont aussi été mises en cause dans la programmation de la mort cellulaire, mais il semble que la plupart d'entre elles ne soient finalement pas essentielles (Ekert et Vaux, 2005). Afin de tenter de rassembler en un consensus les conclusions divergentes exprimées à propos de la transition de perméabilité mitochondriale, l'existence de plusieurs PTP, de composition différente suivant les tissus et les circonstances métaboliques, a été suggérée. Il a aussi été mis en avant la possibilité de la

participation de protéines interchangeables. Ces deux hypothèses suggèrent toutes les deux que le PTP est constitué d'un édifice moléculaire de composition variable et qu'il est par conséquent très difficile à caractériser. De ce fait les mécanismes moléculaires de l'apoptose qui mettraient en jeu le PTP sont actuellement encore incompris : "Life is pleasant, death is peaceful. It's the transition that's troublesome" (Isaac Asimov).

## **I.E. Protéines membranaires et détergents : des difficultés.**

Alors que les séquençages de génomes indiquent que les protéines membranaires représentent entre 20 et 30% des protéines (Wallin et Von Heijne, 1998), à l'heure actuelle moins de deux cent structures de protéines membranaires ont été obtenues à haute résolution ([http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane\\_Proteins\\_xtal.html](http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html)), contre plus de 40000 structures de protéines solubles (<http://www.rcsb.org/pdb/statistics/holdings.do>). La cristallographie aux rayons X est la principale technique utilisée, mais il en existe également d'autres, comme la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la microscopie électronique (pour revue, voir Lacapère et al., 2007). Au laboratoire, notre collaboration avec l'équipe d'Eva Pebay-Peyroula, à l'IBS (Institut de Biologie Structurale, Grenoble), nous a poussé à préparer nos échantillons dans le but de les soumettre à des analyses de cristallographie aux rayons X, et c'est pourquoi nous n'avons pas tenté d'obtenir la structure de nos protéines grâce à d'autres méthodes de résolution de structure. Les obstacles rencontrés lors de l'étude structurale des protéines membranaires sont multiples, mais le problème majeur reste leur solubilisation dans un état fonctionnel.

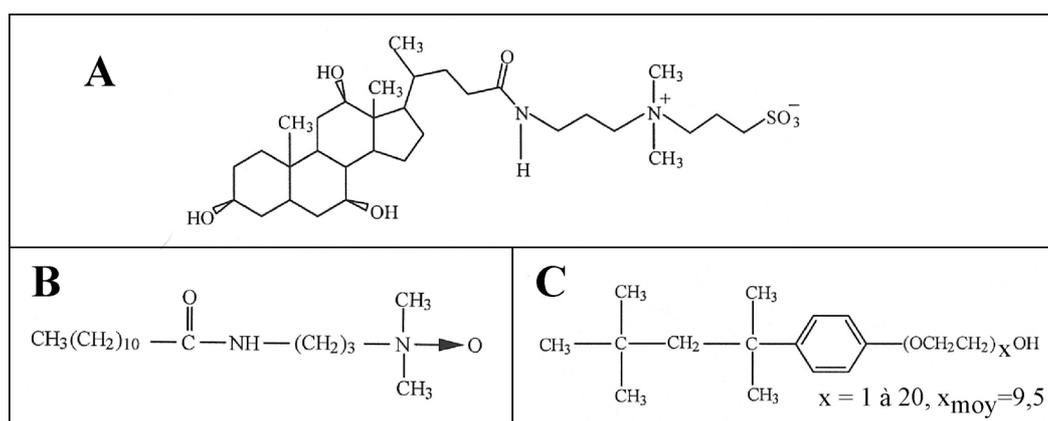
### **I.E.1. Choix du détergent pour la purification de protéines membranaires.**

Une protéine membranaire est une molécule amphiphile, d'une part enchâssée dans une membrane lipidique, d'autre part en contact avec un environnement aqueux hydrophile. Afin de la purifier sans la dénaturer, il est donc nécessaire de la solubiliser en présence de composés qui respectent son hydrophobicité. Pour cela sont généralement utilisés des détergents (pour revue, voir Le Maire et al., 2000) : ce sont des molécules qui possèdent une tête polaire et une queue hydrophobe, et qui sont capables de se regrouper en micelles au-delà

d'une certaine concentration appelée Concentration Micellaire Critique (CMC). Cependant, les détergents ne se substituent pas parfaitement aux phospholipides, déstabilisant fréquemment la protéine et la rendant alors inactive. Les détergents sont classés en trois grands groupes, suivant s'ils sont ioniques, non-ioniques ou zwitterioniques. Ces deux derniers cas regroupent ainsi les détergents qui présentent le moins de propriétés dénaturantes à l'égard des protéines. Ils peuvent être sous-classés en plusieurs familles selon leur nature chimique. Parmi elles se trouvent notamment les détergents polyoxyéthyléniques, les dérivés glycosidiques et les aminoxydes, dont respectivement le C<sub>8</sub>E<sub>4</sub>, le DDM et le βOG, et enfin le LDAO, qui sont tous les quatre les détergents qui ont permis la cristallisation de protéines membranaires avec le plus de succès. Pour une utilisation donnée, le choix des détergents appropriés fait intervenir l'efficacité de solubilisation, la préservation des propriétés fonctionnelles des protéines, mais aussi la valeur de la CMC du détergent et de la taille des micelles, paramètres qui, comme on le verra, conditionnent l'élimination de l'excès de détergent. De nombreuses études visent actuellement à améliorer les propriétés des détergents employés. Dans ce but ont également été créées de nouvelles classes de composés, notamment les 'amphiphiles tripodiques' (Yu et al., 2000), les 'amphipols' (Tribet et al., 1996), les 'lipopeptides' (McGregor et al., 2003) et les 'peptitergents' (Schafmeister et al., 1993).

Un détergent communément utilisé pour solubiliser des protéines membranaires est le Triton X-100, un détergent non-ionique de type polyoxyéthylénique. Il a par exemple été employé pour solubiliser le transporteur bovin d'ADP/ATP bAnc1, stabilisé sous la forme de complexes transporteur-CATR (Riccio et al., 1975a ; Riccio et al., 1975b) et transporteur-BA (Aquila et al., 1978). En revanche, le transporteur purifié sans inhibiteur en présence de Triton X-100 subit, hors de la membrane, des changements conformationnels irréversibles (Lorenz-Fonfria et al., 2003). La porine de levure yVDAC1 a elle aussi été isolée en présence de Triton X-100. Elle a été purifiée pour la première fois en 1987 (Forte et al., 1987), d'après un protocole établi pour la purification de la porine de *Neurospora crassa* (Freitag et al., 1982) utilisant une étape de préextraction des membranes mitochondriales par un détergent puis une chromatographie d'échange d'ions en présence de Triton X-100. Une autre méthode de purification a été proposée l'année suivante (Ludwig et al., 1988), basée cette fois-ci sur une chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite. Malheureusement, le Triton X-100 est un détergent qui n'est pas chimiquement défini (cf Figure 11C) et qui ne convient donc pas pour aborder des études structurales.

Le choix du détergent pour la purification est important car, hormis son efficacité de solubilisation des protéines membranaires, il peut, selon ses propriétés physico-chimiques, influencer de manière déterminante sur leurs états conformationnels. Ceci a été bien illustré dans le cas du transporteur d'ADP/ATP. En effet, le transporteur oscille entre des états conformationnels multiples, dont deux ont été caractérisés parce qu'ils reconnaissent et lient fortement les inhibiteurs CATR et BA. Ces états correspondent respectivement à des niveaux de basse et de haute fluorescence à 340 nm. L'étude des variations de fluorescence a montré que le transporteur d'ADP/ATP bovin bAnc1 purifié en présence de LAPAO (cf Figure 11B) adopte la conformation dite 'conformation-CATR' (Brandolin et al., 1985). Au contraire, la présence de CHAPS (cf Figure 11A), un autre détergent zwitterionique, favorise la conformation dite 'conformation-BA' (Block et Vignais, 1986).



**Figure 11 : Structure des détergents utilisés pour la purification des protéines membranaires bAnc1, yAnc2 et yVDAC1.**

A : CHAPS ; B : LAPAO ; C : Triton X-100, pour lequel il existe une distribution statistique du nombre d'unités oxyéthyléniques.

### **I.E.2. Concentration de protéines membranaires : problèmes posés par le détergent.**

La purification préalable des protéines, mais également leur obtention à une concentration supérieure à 5 mg de protéine /ml, sont les conditions requises pour les essais de cristallogenèse. La présence de détergent est une source notable de problèmes lors de la concentration des protéines purifiées. Ainsi, lors d'une étape de concentration dans un concentrateur qui possède un seuil de filtration trop élevé, les micelles de détergent vont

pouvoir passer au travers de la membrane, entraînant simultanément la précipitation de la protéine qui n'est plus en présence d'une quantité suffisante de molécules de détergent. Inversement, la concentration sur une membrane qui ne laisse pas passer les micelles de détergent amène d'autres inconvénients liés à la trop forte concentration en détergent. Ceci se traduit par l'obtention d'une fraction protéique extrêmement visqueuse, difficile à manipuler pour tenter des essais de cristallisation. Par ailleurs, on ne peut exclure que la structure de la protéine soit elle-même altérée. L'élimination de l'excès de détergent, soit par dialyse, soit par adsorption du détergent sur des résines hydrophobes, soit par chromatographie, peut être envisagée mais dépend des caractéristiques physico-chimiques du détergent (Seddon et al., 2004). Par exemple, lors de la purification du complexe bAnc1-CATR, l'excès de LAPAO a été réduit par absorption hydrophobe (Dahout-Gonzalez et al., 2003). En effet, comme la masse moléculaire d'une micelle de LAPAO est de 38 kDa environ, la concentration de la fraction collectée en sortie de colonne HTP grâce à une membrane de seuil de coupure égal à 30 kDa conduisait à la rétention au moins partielle des micelles de détergent. Le complexe bAnc1-CATR ne précipitait pas, et une concentration en protéine de 10 mg/ml avait ainsi pu être obtenue. Cependant l'excès de détergent empêchait la croissance de cristaux protéiques, et c'est la diminution de la quantité de détergent en solution par adsorption (Holloway, 1973) sur des billes Bio-Beads (Bio-Rad), préalablement à la concentration, qui a permis l'obtention de cristaux et la résolution de la structure du complexe bAnc1-CATR à 2,2 Å (Pebay-Peyroula et al., 2003).

## **I.F. Objectifs de ce travail.**

Au début de ma thèse, la structure tridimensionnelle du transporteur mitochondrial d'ADP/ATP bovin bAnc1 en complexe avec le carboxyatractyloside venait d'être résolue au laboratoire, grâce à une collaboration avec l'équipe d'Eva Pebay-Peyroula. L'objectif à long terme était donc de parvenir à obtenir des résultats similaires pour le transporteur stabilisé sous forme de complexe avec un autre de ses inhibiteurs, l'acide bongkrélique. En effet ceci nous aurait permis de visualiser les différences structurales existant entre les deux conformations dites 'extrêmes' adoptées par le transporteur durant le processus d'échange des nucléotides et d'approcher ainsi les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de son fonctionnement. Cependant, avant d'entreprendre la cristallogénèse du complexe bAnc1-BA,

phase connue pour être laborieuse, nous voulions nous assurer de la stabilité de la liaison de l'acide bongkréique au transporteur durant les différentes étapes de la purification et jusqu'à l'échantillon final obtenu en présence d'une concentration élevée en détergent. Au cours d'une phase initiale de mon travail, j'ai mis au point les conditions de purification et de caractérisation du complexe bAnc1-BA. Comme je l'exposerai, ce complexe s'est avéré trop instable, affectant la pertinence du projet de cristallogénèse.

Au cours de ma thèse s'est rapidement dessiné un autre projet : celui d'étudier les interactions du transporteur d'ADP/ATP avec des partenaires mitochondriaux. Pour cela nous avons choisi de travailler avec la levure *Saccharomyces cerevisiae*, un organisme qui se prête facilement aux approches de biologie moléculaire, et nous avons suivi deux démarches différentes. Dans un premier temps nous avons voulu prouver l'existence d'une interaction qui était supposée au laboratoire et n'avait pas été décrite jusque là dans la littérature, entre le transporteur de levure yAnc2-HT et une protéine de la membrane externe mitochondriale appelée yOm14, qui était co-purifiée avec le transporteur. A partir d'approches complémentaires d'ELISA et d'immunoprécipitation, nous avons démontré l'existence d'une interaction physique entre yAnc2-HT et yOm14. Dans un second temps, nous nous sommes penchés sur une interaction déjà beaucoup discutée dans la littérature, entre le transporteur yAnc2 et la porine de levure yVDAC1, qui seraient des composants majeurs du pore de transition de perméabilité mitochondrial. Nous voulions en particulier caractériser plus précisément, au niveau moléculaire, les possibles zones d'interaction entre les deux protéines. Cette étude, basée sur des approches structurales, demandait de supposer que les transporteurs d'ADP/ATP de bœuf et de levure sont repliés de façon similaire, mais nécessitait également de résoudre la structure tridimensionnelle de la porine, actuellement toujours inconnue. Le choix du système de la levure nous paraissait bien adapté à une telle étude : en effet, le PTP n'a pas été mis en évidence chez cet organisme, ce qui permettait d'explorer les interactions entre le transporteur et la porine dans un contexte simplifié, l'approche étant validée par le fait que ces deux protéines sont très conservées. Nous avons ainsi entrepris la purification de yVDAC1. Des problèmes de concentration de la fraction protéique, liés à la co-purification avec la porine d'un stérol présent en grande quantité dans la mitochondrie, nous ont amenés à développer de multiples stratégies de biochimie et de biologie moléculaire dans le but de disposer de porine purifiée utilisable pour des expériences de cristallogénèse.

# **Partie II**



## **Matériels & Méthodes**



# Partie II – Matériels & Méthodes

## II.A. Matériel biologique.

### II.A.1. Souches de levure et de bactéries.

Le génotype des souches de la levure *Saccharomyces cerevisiae* employées au cours de ce travail est présenté dans le Tableau 1. La souche JL1-3-ANC2HT dérive de la souche JL1-3-1B, dans laquelle les gènes *yANC1*, *yANC2* et *yANC3* codant les trois isoformes du transporteur mitochondrial d'ADP/ATP de la souche parentale W303-1B ont été respectivement interrompues par les cassettes d'auxotrophie LEU2, HIS3 et URA3. Quant à la souche  $\Delta$ Por, elle dérive de la souche parentale DBY 747 après interruption du gène *POR1* au moyen d'une cassette d'auxotrophie URA3. Ces deux dernières souches nous ont été gracieusement fournies par Monsieur Guy Lauquin, de l'IBGC (Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, Bordeaux).

Souche (Référence associée)	Génotype
<b>W303-1B</b>	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>his3-11</i> , <i>15</i> , <i>ade2-1</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-1</i> , <i>can1-100</i>
<b>JL1-3-1B</b> (Drgon et al., 1991)	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>his3-11</i> , <i>15</i> , <i>ade2-1</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-1</i> , <i>can1-100</i> , <i>anc1::LEU2</i> , <i>anc2::HIS3</i> , <i>anc3::URA3</i>
<b>JL1-3-ANC2HT</b> (Fiore et al., 2000)	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>his3-11</i> , <i>15</i> , <i>ade2-1</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-1</i> , <i>can1-100</i> , <i>anc1::LEU2</i> , <i>anc3::URA3</i> , <i>ANC2HIS</i>
<b>DBY 747</b>	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>his3-1</i> , <i>trp1-289</i> , <i>ura3-52</i>
<b>B5-10a</b> , notée $\Delta$ Por (Michejda et al., 1990)	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>his3-1</i> , <i>trp1-289</i> , <i>ura3-52</i> , <i>por1::URA3</i>

**Tableau 1 : Génotype des souches de levure employées.**

Les souches de la bactérie *Escherichia coli* employées au cours de ce travail sont les souches commerciales DH5 $\alpha$  et TOP10 utilisées pour l'amplification de plasmides, ainsi que

la souche C43(DE3) utilisée pour des essais de surexpression de yVDAC1-HT en système hétérologue. Leur génotype est présenté dans le Tableau 2.

Souche (Référence associée)	Génotype
<b>DH5<math>\alpha</math></b> (Invitrogen)	F <sup>-</sup> $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 <math>\lambda</math> thi-1 gyrA96 relA1</i>
<b>C43(DE3)</b> (Miroux et Walker, 1996)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal hsdSB</i> (r-B m-B) <i>dcm lon</i> DE3 pLys-S + deux mutations non caractérisées
<b>TOP10</b> (Invitrogen)	F <sup>-</sup> <i>mcrA <math>\Delta</math>(mrr-hsdRMS-mcrBC) <math>\phi</math>80lacZ<math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>lacX74 <i>recA1 ara<math>\Delta</math>139 <math>\Delta</math>(ara-leu)7697 galU galK rpsL</i> (Str<sup>R</sup>) <i>endA1 nupG</i></i>

**Tableau 2 : Génotype des souches de bactéries employées.**

### II.A.2. Milieux de culture des levures.

Les cellules de levure sont cultivées soit en milieu riche soit en milieu synthétique carencé. D'une manière générale, les milieux sont autoclavés pendant 20 min à 120°C sous une pression de 1 bar avant toute utilisation. Pour obtenir des milieux solides, il suffit d'ajouter 2% (m/v) de bacto-agar (BIO101) dans les milieux liquides correspondants, avant stérilisation : ils sont ensuite coulés à chaud dans des boîtes de Pétri, dans lesquelles ils se solidifient en refroidissant. La composition des milieux riches liquides YPD et YPL est donnée dans le Tableau 3.

	Milieux riches liquides	
	Milieu YPD	Milieu YPL
Bactopeptone (Difco)	2% (m/v)	2% (m/v)
Extrait de levures (Difco)	1% (m/v)	1% (m/v)
Glucose	2% (m/v)	x
Acide lactique	x	2% (m/v)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	x	1% (m/v)
KOH	x	Pour tamponner à pH 5,5

**Tableau 3 : Composition des milieux riches liquides de culture des levures.**

Les milieux synthétiques carencés sont aussi appelés milieux sélectifs, car ils sont utilisés pour sélectionner des clones possédant une cassette d'auxotrophie dans leur ADN nucléaire ou plasmidique. Au cours de ce travail, des milieux carencés en tryptophane ou en

uracile ont été utilisés. Ils sont préparés à partir du mélange minimum commercial YNB (BIO101), auquel il faut ensuite rajouter la source de carbone à 2% (m/v) sous forme d'acide lactique ou de glucose, ainsi qu'un mélange d'acides aminés dépourvu de celui que l'on souhaite (CSM-Trp et CSM-Ura, BIO101). Dans le cas d'un milieu solide contenant du glucose, la stérilisation est effectuée après avoir ajouté du bacto-agar ; en revanche, dans le cas où la source de carbone est l'acide lactique, le pH est ajusté à 5,5 avant stérilisation et le bacto-agar est autoclavé séparément pour éviter qu'il ne soit hydrolysé lors du chauffage.

Nous avons aussi eu besoin d'utiliser un milieu solide contenant de l'acide 5-fluoroorotique (5-FOA), afin de sélectionner des mutants ne possédant pas le gène URA3 (Boeke et al., 1984). En effet le 5-FOA est un analogue de l'acide orotique intervenant dans la biosynthèse de l'uracile : sa transformation par l'orotidine 5'-phosphate décarboxylase, enzyme codée par le gène URA3, mène à un produit toxique pour la levure, le 5-fluorouracile. Les levures possédant le gène URA3 ne se développeront donc pas sur un milieu contenant de l'acide 5-fluoroorotique. En revanche les mutants ne possédant pas le gène URA3 et donc déficients pour l'enzyme correspondante seront incapables d'utiliser le 5-FOA et de synthétiser le produit toxique qui en dérive : ils se développeront donc sur un tel milieu, si celui-ci contient de l'uracile. Ainsi le milieu utilisé est préparé à partir du mélange minimum commercial YNB (BIO101), auquel il faut ensuite rajouter 2% (m/v) glucose, le mélange d'acides aminés, de l'uracile à 75 mg/l, le 5-FOA à la concentration minimale de 0,5 g/l et enfin 2% (m/v) bacto-agar. Le 5-FOA est dissous dans le milieu minimum YNB à 60°C et cette solution est stérilisée par filtration pour éviter l'hydrolyse de l'acide 5-fluoroorotique. Elle est ajoutée au reste du milieu préalablement autoclavé. Le mélange est refroidi à 60°C avant de remplir les boîtes de Pétri.

### **II.A.3. Conditions de croissance des levures.**

Les levures, prélevées à partir d'une culture en phase exponentielle de croissance, sont conservées à -80°C dans 50% (v/v) de glycérol stérile. Afin de démarrer une nouvelle culture à partir du stock conservé à -80°C, les levures sont d'abord étalées sur milieu solide, et cultivées dans une étuve à 28°C. Les cultures sur boîtes de Pétri peuvent être conservées à 4°C pendant deux mois environ. Les clones sont cultivés en milieu liquide à 28°C sous agitation (160 tours/min) dans des erlenmeyers stériles bouchés à l'aide de coton cardé

(milieu aérobie). Le suivi de la croissance de *S. cerevisiae* en milieu liquide est effectué en mesurant la densité optique de la suspension de cellules de levure à 600 nm (ou à 540 nm) par spectrophotométrie, après avoir centrifugé un volume V de culture à 15000 g pendant 2 min, avoir repris le culot cellulaire dans un même volume V d'eau distillée, et l'avoir éventuellement dilué de manière à mesurer une densité optique toujours inférieure à 1. Dans le cas de cultures à plus grande échelle, c'est un fermenteur (New Brunswick) de 12 litres de culture qui estensemencé : la croissance des levures s'effectue alors à 28°C, sous une agitation mécanique de 300 tours/min, et sous aération forcée (4 bars). Dans le but d'isoler les mitochondries, la culture est arrêtée lors de la phase exponentielle de croissance, quand la densité optique (DO) atteint une valeur comprise entre 4 et 5.

Afin de pouvoir comparer visuellement la croissance de différentes souches de levure, des tests de croissance sur milieu solide ont été réalisés. Pour cela, des cellules cultivées en milieu liquide sont prélevées pendant la phase exponentielle de croissance puis diluées de manière à obtenir une densité optique finale égale à 0,1. Cette valeur correspond à une concentration d'environ  $2 \cdot 10^6$  cellules /ml, ce qui a été vérifié par numération cellulaire sur une lame de Malassez. Des dilutions successives au dixième permettent d'obtenir des cellules de levure aux concentrations de  $2 \cdot 10^6$ ,  $2 \cdot 10^5$ ,  $2 \cdot 10^4$  et  $2 \cdot 10^3$  cellules /ml, ce qui équivaut à déposer respectivement sur la boîte de culture 10000, 1000, 100 et 10 cellules pour des gouttes de 5 µl. Les boîtes sont ensuite incubées à 28 ou à 37°C et l'apparition des colonies est régulièrement contrôlée.

#### **II.A.4. Milieux de culture et conditions de croissance des bactéries.**

Les bactéries *E. coli*, conservées comme les levures à -80°C dans 50% (v/v) de glycérol stérile, sont cultivées dans du milieu de Luria Bertani (LB) composé de 0,5% (m/v) d'extrait de levures (Difco), de 1% (m/v) de bactotryptone (Difco) et de 0,5% (m/v) de NaCl. Le pH est ajusté à 7,5 à l'aide de soude, puis le milieu est autoclavé. Il est possible de préparer des milieux de culture solides en LB en ajoutant 2% (m/v) de bacto-agar avant stérilisation. Dans le cas de bactéries ayant intégré un plasmide contenant le marqueur de sélection à la kanamycine ou à l'ampicilline, ces antibiotiques sont ajoutés après la stérilisation des milieux, à la concentration finale de 50 µg/ml. Les bactéries sont cultivées à

37°C en milieu aérobie, et, dans le cas de cultures en milieu liquide, sous une agitation de 250 tours/min. Comme dans le cas des levures, le suivi de la croissance des bactéries en milieu liquide est effectué par spectrophotométrie à 600 nm. L'induction de l'expression plasmidique d'une protéine est effectuée lorsque les bactéries sont en pleine phase exponentielle de croissance, par ajout d'IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) à la concentration finale de 600  $\mu$ M.

## **II.B. Techniques de biologie moléculaire.**

### **II.B.1. Préparation et dosage d'ADN de levure.**

L'ADN nucléaire de levure purifié est dans notre cas le matériel de base pour la plupart des expériences menées en biologie moléculaire. Les levures sont cultivées dans 10 ml de milieu YPD à 28°C pendant la nuit. Lorsque la saturation est atteinte, les cellules sont centrifugées (1500 g, 10 min, TA), resuspendues dans 500  $\mu$ l d'eau distillée stérile, transférées dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 ml et centrifugées à nouveau (16000 g, 30 s, TA). Le surnageant est éliminé, puis le culot est agité dans le surnageant résiduel et resuspendu dans 200  $\mu$ l de solution de lyse composée de 0,01 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 2% (m/v) Triton X-100, 1% (m/v) SDS, à pH 8. Les parois des levures sont lysées en agitant fortement pendant 5 min la suspension de cellules en présence de 200  $\mu$ l du mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) et de 0,3 g de billes de verre préalablement lavées à l'acide. Une centrifugation (16000 g, 5 min, TA) permet de séparer le mélange en deux phases : une phase aqueuse (phase supérieure) contenant l'ADN nucléaire de levure, qui est transférée dans un nouveau tube Eppendorf stérile, et une phase organique qui peut éventuellement être extraite à nouveau par 200  $\mu$ l de tampon TE à pH 8. Afin de précipiter l'ADN, 1 ml d'éthanol pur est ajouté dans la phase aqueuse, et la solution est laissée pendant 1 h à -20°C. Après centrifugation (16000 g, 5 min, 4°C), le culot est resuspendu dans 400  $\mu$ l de tampon TE à pH 8 contenant de la ribonucléase A à la concentration de 30  $\mu$ g/ml. Après incubation à 37°C pendant 5 min, ajout de 18  $\mu$ l d'acétate d'ammonium à 5 M et de 1 ml d'éthanol pur, l'ADN nucléaire de levure est à nouveau précipité à -20°C pendant quelques heures. Après centrifugation (16000 g, 10 min, 4°C), le culot est repris dans un volume d'eau

stérile compris entre 20 et 50  $\mu$ l, et la concentration de l'ADN est déterminée en mesurant la densité optique de l'échantillon à 260 nm, sachant qu'une unité de DO correspond à environ 50  $\mu$ g/ml d'ADN double brin.

### **II.B.2. Amplification d'un fragment d'ADN par PCR.**

La sélection et l'amplification d'une séquence nucléotidique d'intérêt dans l'ADN nucléaire de levure, ou dans un fragment d'ADN de plus petite taille, est effectuée par PCR (Polymerase Chain Reaction). Cette technique est basée sur l'emploi d'une enzyme, l'ADN polymérase, capable de recopier une molécule d'ADN double brin en utilisant comme matrice cette molécule d'ADN après dénaturation (équivalente alors à deux molécules d'ADN simple brin) et comme amorces deux oligonucléotides de synthèse définis de manière à pouvoir s'hybrider spécifiquement sur les extrémités 3' de ces deux brins d'ADN.

Utilisation des amorces	N°	Séquence nucléotidique de l'amorce	T <sub>M</sub> (°C)
Amplifier <i>POR1</i> sans codon STOP (518846 – 517995)	F1	AGCTCATATGTCTCC TCCAGTTTACAGCGA	56,15
	R1	AGCTGCGGCCGCAGC GTCGAAGGACAAAGACC	59,3
Amplifier <i>POR1</i> + régions flanquantes (519157 – 517509)	F2	AACAAGATCTATGGT CAGAATGGGCGC	55,85
	R2	AACCAGATCTTGCAC TTGGTGCTGG	55,6
Introduire des mutations sur le fragment inséré dans TOPO-Blunt-II	F3	CTTCGACGCTGGAACGTACATATGTAA TATATATATGTTC	58
	R3	GAACATATATATATTACATATGTACGTT CCAGCGTCGAAG	58
Former une étiquette polyhistidine	F4	TACACCACCACCACCACCTGA	55,17
	R4	TATCAGTGGTGGTGGTGGTGGTG	55,17
Amplifier le gène codant pour yVDAC1-HT	F5	TAAGGCACGCGTATGTCTCCTCCAGTTT ACAGCGAT	56,26
	R5	ATCCCTAGGTCAGTGGTGGTGGTGGTG GTGCTCGAGT	64,54

**Tableau 4 : Amorces utilisées au cours de cette étude.**

Les chiffres indiqués entre parenthèses sous le gène indiquent précisément sa situation dans la séquence du chromosome XIV de *S. cerevisiae*. Les quelques nucléotides initiaux des amorces sont représentés en gris. Les sites de coupure des enzymes de restriction sont figurés en couleur : NdeI en rouge, NotI en vert, BglII en bleu, MluI en violet, BlnI en rose. L'amorce R3 est complémentaire à l'amorce F3 ; les amorces F4 et R4 peuvent également s'hybrider.

Le choix des amorces de PCR est très important. Celles qui ont été utilisées au cours de cette étude sont présentées dans le Tableau 4. Il faut noter que dans le cas de la protéine yVDAC1 (numéro d'accèsion P04840), la base de données [www.expasy.org](http://www.expasy.org) renvoie deux séquences d'ADN légèrement différentes. Cependant, comme les différences se trouvent dans la partie centrale des deux séquences, et que les extrémités sont identiques, cela n'est pas gênant pour l'amplification du gène *PORI* par PCR à partir d'ADN nucléaire de levure. Certaines amorces sont définies selon un même principe : elles sont constituées de quelques nucléotides, puis d'un site de restriction, et enfin de la partie capable de s'hybrider avec la séquence à amplifier. Il faut vérifier que les sites de restriction choisis ne se trouvent pas déjà dans la séquence nucléotidique à amplifier : ces cartes de restriction peuvent être obtenues grâce au logiciel NEBcutter.

Suivant le but recherché, nous avons utilisé quatre types d'ADN polymérase : la Taq polymérase pour les PCR de contrôle ; la Pfu polymérase ou la Taq polymérase Haute Fidélité lorsqu'il s'agit d'amplifier un gène pour un clonage car ces polymérases font moins d'erreurs que la précédente lors du recopiage de l'ADN ; et enfin la Pfu Ultra pour la mutagenèse ponctuelle dirigée. Afin d'augmenter les chances de réussite de la PCR, il faut utiliser du matériel stérile et tripliquer chacune des conditions de PCR. Classiquement, la réaction d'amplification est effectuée dans un volume total de 50 µl contenu dans un microtube Eppendorf. Entre 10 et 100 ng d'ADN purifié de levure sont mélangés à 20 pmol de chacune des deux amorces et à 0,8 mM d'un mélange de dNTP dans le tampon fourni par le fournisseur de l'ADN polymérase. Deux unités d'enzyme sont ajoutées en dernier au mélange réactionnel, puis le programme de PCR est mis en route. Son déroulement est décrit dans le Tableau 5. Il est également possible de réaliser une PCR à partir d'une colonie de bactéries. La seule différence réside dans le fait que l'ADN nucléaire de levure est remplacé par un prélèvement de colonie dilué dans 5 µl d'eau distillée stérile.

L'hybridation de deux amorces, que nous avons eu besoin d'effectuer pour préparer une cassette polyhistidine, peut être réalisée grâce à l'appareil de PCR, par dénaturation à 95°C pendant 5 min suivie d'un retour lent à température ambiante (15 h), dans un tampon stérile constitué de 100 mM Tris-HCl et de 500 mM NaCl, à pH 8.

Etapes	Temps	Température	Remarques
Dénaturation initiale	10 min	95°C	1 fois
Dénaturation	1 min	95°C	30 fois
Hybridation	1 min	< T <sub>m</sub> des amorces	
Elongation	Compter 30 s pour 500 paires de bases	72°C	
Elongation finale	10 min	72°C	1 fois

**Tableau 5 : Déroulement de l'amplification d'une séquence par PCR.**

Il faut noter que seuls 16 cycles de PCR ont été effectués dans le cas de la mutagenèse ponctuelle dirigée avec la Pfu Ultra, afin de minimiser les possibilités d'erreurs.

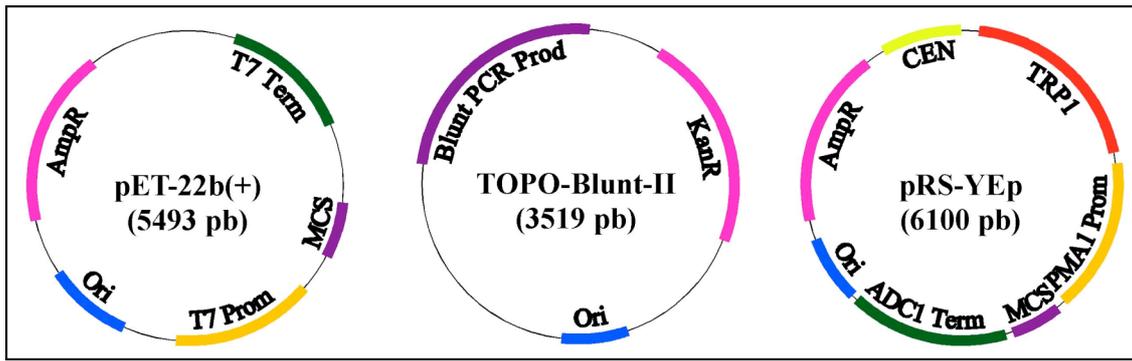
### **II.B.3. Purification d'un fragment d'ADN.**

La purification d'un fragment d'ADN double brin est effectuée par électrophorèse sur gel d'agarose, celui-ci étant constitué d'un mélange d'agarose à 0,8% (m/v) et de tampon TAE 0,5X (20 mM TrisBase, 1 mM EDTA et 10 mM acide acétique), coulé à chaud dans la cuve d'électrophorèse. Ce fragment peut être le produit d'une PCR, qu'il faut séparer de fragments indésirables éventuellement générés lors de cette étape. Dans ce cas, 50 µl du mélange contenu dans chaque microtube de PCR, mélangés à 5 µl de tampon de charge contenant du bleu de bromophénol (Fermentas), sont déposés sur le gel. Des fragments d'ADN de masse moléculaire connue appelés marqueurs (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Fermentas) sont également déposés : ils permettent de corrélérer la distance de migration des fragments d'ADN à leur taille (en paires de bases). Après migration, le gel est incubé pendant 15 min en présence de bromure d'éthidium dilué à 0,1% dans de l'eau, puis décoloré pendant 10 min par agitation dans de l'eau. Les différentes bandes nucléotidiques résultant de l'électrophorèse sont visibles sur le gel sous éclairage UV. Dans le cas d'une simple vérification du bon déroulement d'une PCR, le même protocole peut être appliqué, en partant seulement de quelques microlitres de produit de PCR. Si en revanche l'enjeu est la purification d'un seul produit de PCR, la bande d'intérêt est excisée du gel puis purifiée grâce au kit de purification High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). L'ADN présent dans la fraction purifiée est alors dosé par spectrophotométrie et sa séquence nucléotidique est contrôlée par le séquençage total de sa phase ouverte de lecture (Genome Express).

#### **II.B.4. Ligation d'un fragment d'ADN sur un plasmide.**

Afin de pouvoir insérer un fragment d'ADN double brin dans le site de clonage d'un plasmide, entre les sites de restriction choisis, il faut d'abord le digérer, ainsi que le plasmide, par les enzymes de restriction correspondantes. Toute digestion est réalisée par incubation à 37°C en suivant scrupuleusement les recommandations données par le fournisseur des endonucléases de restriction (Fermentas), notamment au niveau du choix du tampon de la réaction et des concentrations en enzyme. Les produits de digestion sont ensuite purifiés, le plasmide est éventuellement concentré par précipitation à l'éthanol, et l'ADN est dosé par spectrophotométrie. Dans le cas où deux enzymes de restriction différentes sont utilisées, ce traitement donne des extrémités asymétriques pouvant ensuite être aisément combinées par ligation. Dans le cas de l'utilisation d'une seule enzyme de restriction, des précautions supplémentaires sont nécessaires. En effet, s'il ne subit aucun traitement particulier, le plasmide pourra facilement se religaturer sur lui-même. Il faut donc le déphosphoryler et pour cela l'incuber à température ambiante pendant la nuit en présence de 2 unités de phosphatase alcaline (Boehringer Mannheim) dans le tampon vendu par le fournisseur. En parallèle, 1 µM du fragment d'ADN à insérer est phosphorylé à 37°C pendant 1h par 10 unités de polynucléotide kinase T4 (T4-PNK, Roche) en présence de 1 µM d'ATP stérile, dans le tampon fourni. Ces traitements favorisent la ligation du fragment d'ADN au vecteur. Une incubation pendant 3 h minimum à température ambiante, en présence de la ligase T4 (Promega), permet de joindre les extrémités 3'- et 5'-phosphate correspondantes des deux molécules d'ADN double brin et d'insérer le fragment d'ADN dans le plasmide. La réussite de cette étape dépend fortement du rapport gène inséré/vecteur utilisé, le rapport optimal pouvant varier de façon importante suivant leur taille respective (Revie et al., 1988). Les principaux plasmides utilisés au cours de cette étude sont présentés sur la Figure 12.

Dans le cas du vecteur commercial TOPO-Blunt-II, l'insertion d'un fragment d'ADN double brin aux bords francs ne nécessite pas de digestion préalable par les enzymes de restriction. En effet ce vecteur contient une topoisomérase, qui permet l'insertion facilitée d'un tel fragment d'ADN dans un site particulier du vecteur. La ligation est effectuée en 5 minutes à température ambiante en mettant en contact 4 µl de fragment d'ADN purifié, 1 µl de la solution saline conseillée (Invitrogen) et 1 µl de vecteur TOPO-Blunt-II.



**Figure 12 : Carte des principaux plasmides utilisés au cours de cette étude.**

En bleu l'origine de répllication bactérienne et en rose les gènes de résistance aux antibiotiques (AmpR = Ampicilline, KanR = Kanamycine). En jaune l'origine de répllication centromérique et en rouge la cassette d'auxotrophie tryptophane TRP1. En orangé les promoteurs, en vert les terminateurs, et en violet la cassette de clonage MCS (Multiple Cloning Site) ou le site d'insertion d'un produit de PCR aux bords francs.

### **II.B.5. Transformation de bactéries par de l'ADN plasmidique.**

La purification des plasmides contenant un gène inséré passe par une étape de transformation de bactéries. Soit celles-ci sont rendues compétentes par un traitement au chlorure de calcium (Dagert et Ehrlich, 1979), soit elles le sont déjà, ce qui est le cas des souches compétentes commerciales DH5 $\alpha$  (Invitrogen) et TOP-10 (Invitrogen) de *E. coli* utilisées. Après 30 min d'incubation à 0°C en présence de différents volumes de produit de ligation, un choc thermique à 42°C pendant 30 s permet de faire entrer l'ADN dans les cellules compétentes, puis celles-ci sont refroidies dans la glace. 250  $\mu$ l de milieu de culture stérile sont ajoutés, et la suspension de cellules est agitée à 37°C pendant 1h. 80  $\mu$ l de cette suspension sont étalés sur boîtes LB-antibiotique ; le reste est centrifugé, puis le culot est repris dans un minimum de milieu et 80  $\mu$ l sont à nouveau étalés. Les boîtes sont incubées sur la nuit à 37°C. Les clones qui se développent sur ce milieu possèdent donc tous au moins une copie du plasmide puisque le gène de résistance à l'antibiotique est inséré dans sa séquence (cf Figure 12). Cependant, ils peuvent contenir un plasmide sans gène inséré ou avec un gène inséré muté. Plusieurs clones différents sont donc prélevés et mis en culture à 37°C sous agitation. Les plasmides, dont le nombre a été amplifié lors des divisions successives des bactéries, sont ensuite récupérés et purifiés par Miniprep (Qiagen), puis l'ADN contenu dans l'échantillon est dosé. Une digestion par une enzyme de restriction choisie, dans les conditions données par le fournisseur, puis l'analyse des produits de digestion par

électrophorèse sur gel d'agarose, permettent d'en déterminer le nombre et la longueur en pb, et donc de voir la présence ou non du gène inséré dans le plasmide. Le séquençage des nucléotides contenus entre le promoteur et le terminateur du plasmide permet de vérifier la nature exacte du gène inséré et de savoir quels clones doivent être conservés en présence de glycérol 50% (m/v) afin d'être employés ultérieurement.

#### **II.B.6. Mutagenèse ponctuelle dirigée.**

Des mutations ont dû être introduites dans le gène inséré contenu par le vecteur TOPO-Blunt-II dans le but final de pouvoir ajouter l'étiquette polyhistidine à la suite de *POR1*. Cette étape de mutagenèse, réalisée d'après le protocole du QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), consiste en une amplification par PCR de la totalité du vecteur, avec des amorces qui introduisent la mutation voulue. L'ADN polymérase utilisée dans ce cas particulier est la Pfu Ultra, qui fait seulement  $4,3 \cdot 10^{-7}$  erreurs par paire de bases et par duplication. Afin de minimiser encore davantage les risques d'erreurs, seuls 16 cycles de PCR sont programmés. Avant transformation des cellules compétentes TOP-10 par les produits de PCR, le vecteur parental non muté est éliminé par digestion avec l'enzyme de restriction DpnI qui ne reconnaît que l'ADN méthylé.

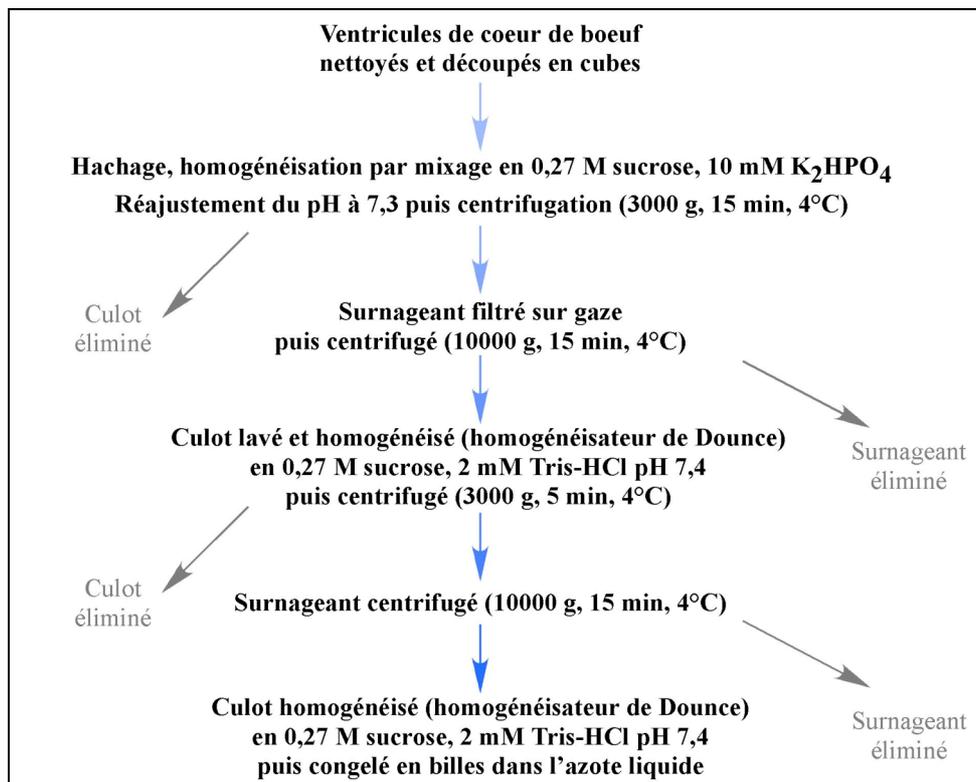
#### **II.B.7. Transformation de levures $\Delta$ Por par un fragment d'ADN.**

Cette étape est effectuée en suivant les recommandations du kit Alkali-Cation Yeast Transformation (Qbiogene). Les levures  $\Delta$ Por sont cultivées en milieu riche YPD à 28°C. Lorsqu'elles atteignent une densité optique à 600 nm d'environ 0,4, elles sont rendues compétentes par incubation à 28°C pendant 30 min dans un mélange lithium/acétate de césium. Elles sont ensuite transformées par choc thermique à 42°C pendant 10 min par 1-10  $\mu$ g d'ADN purifié en présence d'histamine et de 50  $\mu$ g de sperme de saumon dénaturé. Reprises dans 200  $\mu$ l de YPD liquide, elles sont étalées sur milieu riche solide YPD après dilutions au 1/100° et au 1/1000° afin de pouvoir observer sur les boîtes des clones isolés.

## **II.C. Techniques de biochimie.**

### **II.C.1. Préparation de mitochondries de cœur de bœuf.**

Les mitochondries de cœur de bœuf sont isolées à 4°C selon une méthode résumée dans la Figure 13 (Smith, 1967).



**Figure 13 : Principe de l'isolement des mitochondries de cœur de bœuf.**

### **II.C.2. Préparation de mitochondries de levure.**

Lorsque les levures sont en phase exponentielle de croissance (densité optique comprise entre 4 et 5), et après avoir contrôlé au microscope optique que la culture n'est pas contaminée, les cellules sont collectées par centrifugation (1500 g, 15 min, 20°C). Afin d'être lavées, elles sont resuspendues dans de l'eau distillée et centrifugées à nouveau (1500 g, 15

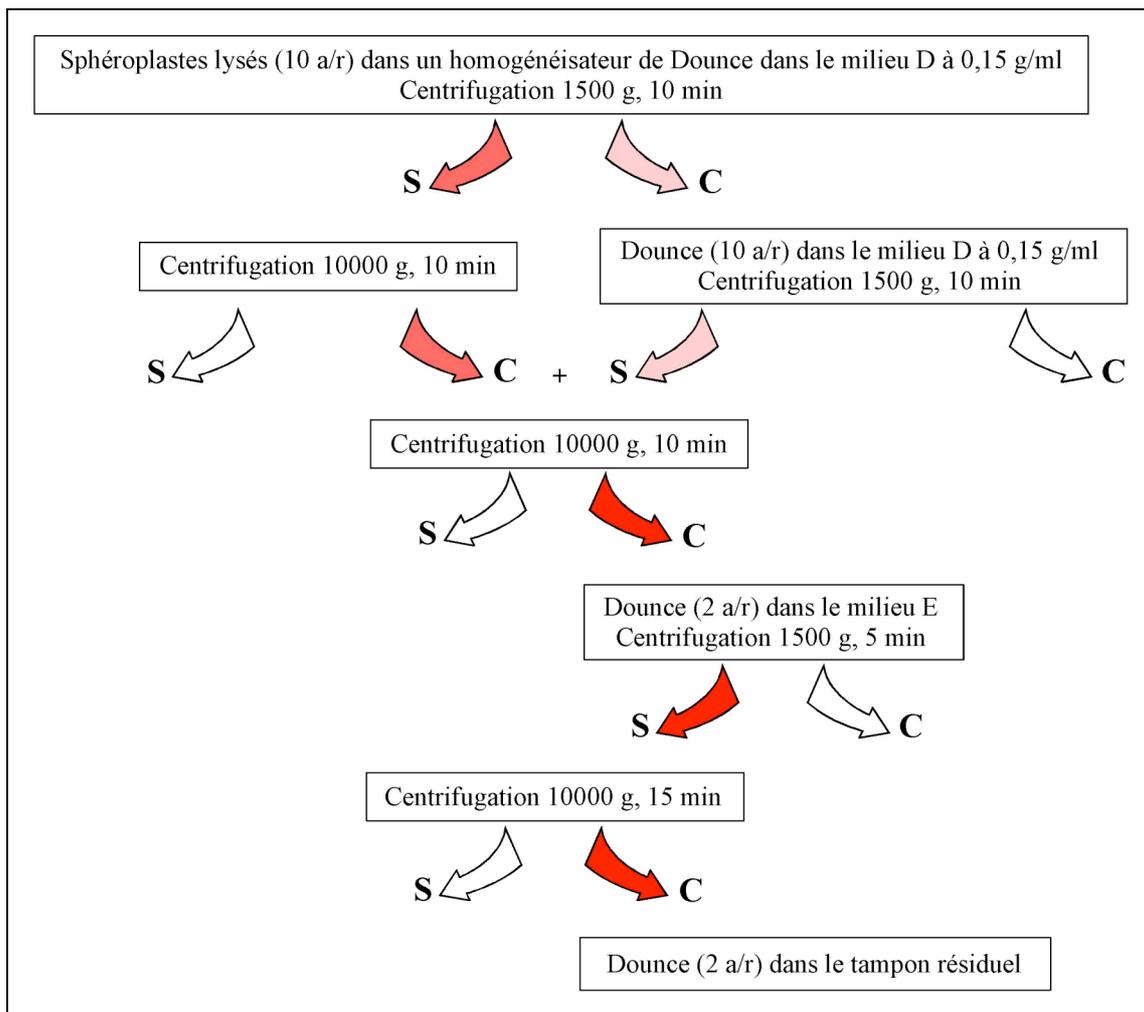
min, 20°C). L'isolement des mitochondries de ces cellules de levure s'effectue alors en deux étapes (Daum et al., 1982) : des sphéroplastes sont tout d'abord préparés à partir du culot de cellules, puis des centrifugations différentielles permettent d'en isoler les mitochondries. Les milieux utilisés tout au long du protocole sont présentés dans le Tableau 6.

Les parois des cellules sont d'abord fragilisées par une incubation (30 min, 30-60°C) à la concentration de 0,5 g de cellules /ml dans le milieu A. Après centrifugation (1500 g, 10 min, 20°C), les cellules sont lavées dans le milieu B. Elles sont ensuite resuspendues dans le milieu C, à la concentration de 0,3 g de cellules /ml. L'ajout de Zymolyase 20T (Seikagaku Corporation) à raison de 5 mg/g de cellules permet la lyse enzymatique de la paroi cellulaire et l'obtention de sphéroplastes. La cinétique de la lyse des sphéroplastes est suivie par le contrôle de leur éclatement dans l'eau, et donc au niveau expérimental par la lecture de la densité optique à 540 ou 600 nm après incubation (2 min, TA) de 20 µl de suspension prélevée et traitée par 2 ml d'eau distillée. Lorsque la valeur de la densité optique atteint 20% de sa valeur initiale, la lyse est stoppée par centrifugation (1500 g, 10 min, 20°C).

Milieu A	Milieu B	Milieu C	Milieu D	Milieu E
100 mM TrisBase 10 mM DTT pH ajusté à 9,4	1,2 M sorbitol	1,2 M sorbitol 20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH ajusté à 7,3	0,6 M mannitol 10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA 0,1% (m/v) BSA 1 mM PMSF pH ajusté à 7,3	0,6 M mannitol 10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH ajusté à 7,3

**Tableau 6 : Composition des milieux pour l'isolement des mitochondries.**

Les sphéroplastes obtenus sont ensuite lavés deux fois dans le milieu B, puis ils sont resuspendus à la concentration de 0,15 g de cellules /ml dans le milieu D et lysés mécaniquement par dix aller-retours de piston dans un homogénéisateur de Dounce, cette lyse étant facilitée par le traitement dans un milieu hypotonique à 0,6 M mannitol. Ces opérations, ainsi que les suivantes qui sont exposées dans la Figure 14, sont réalisées à 4°C. Les mitochondries isolées peuvent éventuellement être purifiées sur gradient de sucrose (Meisinger et al., 2000). Elles sont ensuite conservées sous forme de billes dans l'azote liquide, ce qui permet de ne prélever par la suite que la stricte quantité de mitochondries désirée pour une expérience donnée.



**Figure 14 : Principe de l'isolement des mitochondries de levure.**

Ce schéma est réalisé d'après Daum et al., 1982. Toutes les étapes représentées sont effectuées à 4°C. S, C et a/r signifient respectivement surnageant, culot et aller-retour. L'intensité croissante de la couleur des flèches figure l'enrichissement en mitochondries.

### **II.C.3. Dosage des protéines.**

Les protéines contenues dans un échantillon sont dosées par une technique colorimétrique faisant intervenir l'acide bicinchoninique (BCA). Cette méthode est basée sur la réactivité stoechiométrique des ions  $\text{Cu}^{2+}$  avec les liaisons peptidiques (Smith et al., 1985). Les ions  $\text{Cu}^+$  libérés lors de la réaction précédente vont à leur tour réagir avec l'acide bicinchoninique pour former un complexe stable de couleur violette dont le maximum d'absorption se situe à 562 nm. Au niveau pratique, 200  $\mu\text{l}$  de l'échantillon à doser, ainsi qu'une gamme étalon de BSA contenant entre 0 et 100  $\mu\text{g}$  de protéines dans un volume total

de 200  $\mu$ l, sont incubées à 30°C en présence de 2 ml de réactif constitué du mélange d'un volume de solution de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  à 4% (m/v) avec 50 volumes de la solution commerciale de BCA (Sigma-Aldrich). Lorsque la coloration s'est développée, la réaction est stoppée en plaçant les tubes dans la glace, puis l'absorption de chaque solution est mesurée par spectrophotométrie à 562 nm. La concentration en protéines de l'échantillon à doser est alors déterminée par comparaison avec la gamme de référence. Cette méthode de dosage est facile à mettre en œuvre mais il faut cependant noter que les ions  $\text{Cu}^{2+}$  ne réagissent pas seulement avec la liaison peptidique, ce qui la rend tout de même peu précise. Les méthodes de dosage dites de Lowry (Lowry et al., 1951) et de Bradford (Bradford, 1976), qui sont aussi couramment utilisées dans les laboratoires, rencontrent toutefois les mêmes limitations au niveau de leur précision. Il faut noter que le dosage des protéines mitochondriales totales est effectué après congélation/décongélation préalable des mitochondries, afin d'éviter les artefacts liés à leur état réduit après isolement.

#### **II.C.4. Extraction des mitochondries par le carbonate de sodium.**

Des mitochondries fraîchement isolées sont incubées pendant 30 min à 0°C en présence de 0,1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  puis la suspension est centrifugée (150000 g, 20 min, 4°C). Le surnageant et le culot qui en résultent, qui contiennent respectivement les protéines mitochondriales solubles ou liées aux membranes et les protéines membranaires, sont analysées par Western blot après une étape d'électrophorèse SDS-PAGE.

#### **II.C.5. Détermination de l'immunoréactivité de $\gamma\text{Om14}$ par ELISA.**

L'immunoréactivité de l'extrémité C-terminale de la protéine  $\gamma\text{Om14}$  a été étudiée par la méthode ELISA d'après le protocole décrit par Brandolin (Brandolin et al., 1989), avec quelques modifications. Toutes les étapes qui suivent sont réalisées à 25°C sous agitation, et tous les lavages des puits sont effectués pendant 10 min avec du tampon PBS-Tween (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05% (m/v) Tween 20). Des mitochondries fraîchement isolées, perméabilisées ou non par traitement aux ultrasons à 0°C pendant 5 min, sont diluées à différentes concentrations avec un milieu contenant 10 mM

Tris-HCl, 0,12 M KCl et 1 mM EDTA, à pH 7,2, puis sont adsorbées au fond des puits d'une plaque de microtitration de 96 puits par incubation pendant 2 h. Les sites de fixation non-spécifiques des puits sont saturés pendant la nuit avec de la BSA à 3% (m/v) dans du tampon PBS-Tween. Après lavage des puits, les anticorps  $\alpha$ -yOm14 dirigés contre l'extrémité C-terminale de la protéine yOm14, dilués dans du tampon PBS-Tween au 1:3000, sont déposés dans les puits. Après incubation pendant 2 h, puis lavage des puits à quatre reprises. Les anticorps  $\alpha$ -yOm14 fixés sur les mitochondries sont mis en contact avec la protéine A couplée à la peroxydase (Bio-Rad) diluée au 1:3000 et détectés par spectrophotométrie à 450 nm suite à une réaction colorimétrique d'oxydation (Brandolin et al., 1989).

#### **II.C.6. Titration des sites de liaison spécifiques des inhibiteurs.**

L'atractylate et l'acide bongkrélique sont deux inhibiteurs spécifiques du transporteur mitochondrial d'ADP/ATP qui se fixent respectivement sur la face de la protéine exposée du côté de l'espace intermembranaire et du côté matriciel, avec une stoechiométrie de une molécule d'inhibiteur par dimère de protéine. L'utilisation de l'ATR tritié permet de déterminer le nombre de sites de fixation de l'ATR dans un échantillon de mitochondries, et donc de quantifier le transporteur dans les membranes mitochondriales. La comparaison des résultats obtenus permet d'évaluer la qualité comparée des différentes préparations de mitochondries. Il en est de même dans le cas du BA, en utilisant du BA tritié.

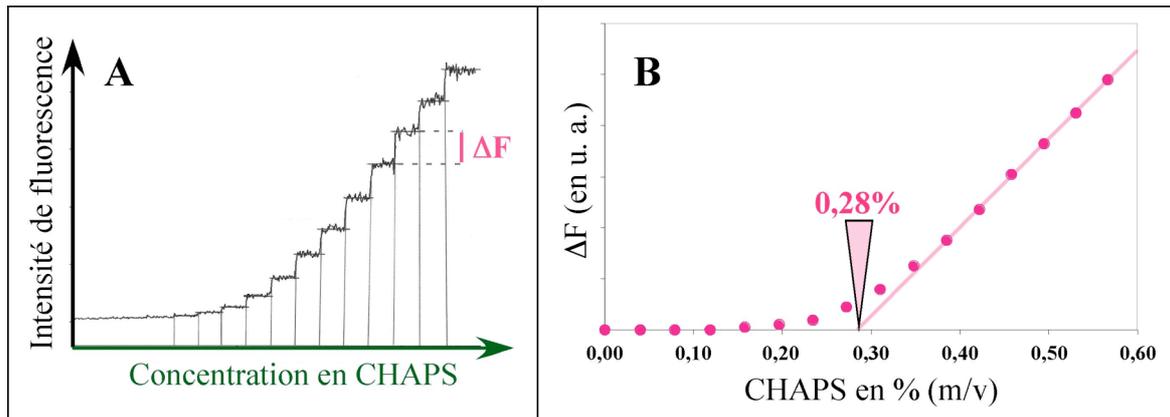
Les expériences sont réalisées dans les conditions décrites par Block (Block et al., 1981), avec cependant quelques modifications. Dans le cas de la titration des sites de liaison spécifiques de l'ATR, l'ATR tritié est préalablement préparé selon le protocole décrit par Brandolin (Brandolin et al., 1974). Des mitochondries fraîchement décongelées sont diluées à 0,5 mg de protéines totales /ml dans un tampon isotonique constitué de 10 mM Tris-HCl, 0,12 M KCl et 100  $\mu$ M EDTA, à pH 7,3, et en présence de concentrations croissantes d'ATR tritié variant entre 0,02 et 4  $\mu$ M. Le volume total de la suspension est égal à 1 ml. Après incubation à 0°C pendant 30 min, les suspensions mitochondriales sont centrifugées (18000 g, 10 min, 4°C). Le surnageant est éliminé puis les parois des tubes sont rapidement rincées par de l'eau distillée et les culots sont solubilisés par ajout de 500  $\mu$ l d'un tampon de lyse constitué de 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl et 5% (m/v) Triton X-100, à pH 7,3. Après transfert de leur contenu

dans un pot de scintillation, chaque tube est rincé par 500 µl d'eau distillée. Cette eau de rinçage est transférée dans le même pot de scintillation, et, après ajout de 10 ml de liquide de scintillation, la radioactivité totale contenue dans chaque pot est mesurée pendant 10 min au moyen d'un compteur à scintillation. La fixation spécifique de (<sup>3</sup>H)-ATR est déterminée après soustraction de sa fixation non-spécifique, mesurée dans une expérience parallèle en présence de 25 µM de CATR, qui bloque l'accès des sites du transporteur à l'ATR tritié par effet de compétition. La radioactivité d'une quantité connue de (<sup>3</sup>H)-ATR est mesurée dans l'un des pots de la série pour déterminer sa radioactivité spécifique, proche de 2 cpm/pmol, dans les mêmes conditions expérimentales. La fixation spécifique de (<sup>3</sup>H)-ATR est exprimée en pmol/mg de protéines. L'expérience est identique dans le cas de la titration des sites de liaison spécifiques du BA, si ce n'est que le tampon isotonique utilisé pour diluer les mitochondries est alors constitué de 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA et 10 mM MES pH 6,9, et que (<sup>3</sup>H)-ATR est remplacé par (<sup>3</sup>H)-BA purifié (Lauquin et Vignais, 1976) et dont la radioactivité spécifique mesurée est proche de 1 cpm/pmol. La fixation spécifique de (<sup>3</sup>H)-BA est déterminée là encore après soustraction de sa fixation non-spécifique, mesurée dans une expérience parallèle en présence de 25 µM de CATR.

#### **II.C.7. Détermination de la CMC du CHAPS.**

Les détergents sont employés au-delà de leur CMC pour la solubilisation de membranes lipidiques. Généralement, la CMC d'un détergent est donnée par son fournisseur, mais elle peut cependant varier légèrement suivant les conditions dans lesquelles le détergent est utilisé. Nous avons choisi de nous placer dans le tampon utilisé lors de la chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite, appelé 'tampon HTP' et constitué de 10 mM Tris-HCl, 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et 1 mM EDTA, à pH 7,3. La mesure de la CMC d'un détergent peut être effectuée par fluorimétrie (Abuin et al., 1997) : elle est basée sur l'emploi de 8-anilino-1-naphtalène-1-sulfonate (ANS), dont la fluorescence augmente en milieu hydrophobe, c'est-à-dire lorsque se forment les micelles de détergent. Dans une cuvette de fluorescence de 3 ml contenant un barreau aimanté et 2,5 ml de 'tampon HTP' est ajouté l'ANS à la concentration finale de 0,2 mM. La solution est placée sous agitation constante à température ambiante, et des additions successives de 10 µl de CHAPS (Sigma) à 10% (m/v) sont effectuées toutes les 30 s. Pendant tout le temps de l'expérience, la fluorescence est mesurée en continu à 490 nm après

excitation à 370 nm. Pour une meilleure précision, les mesures sont réitérées, avec cette fois-ci des additions de 20  $\mu\text{l}$  de CHAPS à 10% (m/v) toutes les 60 s. La différence des niveaux de l'intensité de fluorescence entre deux ajouts successifs de CHAPS est notée  $\Delta F$ . Le tracé de  $\Delta F$  en fonction de la concentration totale en détergent permet de déterminer, par extrapolation, la CMC du CHAPS (cf Figure 15).



**Figure 15 : Détermination de la CMC du CHAPS par fluorimétrie.**

A : Variation de l'intensité de fluorescence obtenue lors des additions successives de CHAPS. B : Tracé de la courbe représentant  $\Delta F$  en fonction de la concentration en CHAPS dans le milieu.

### **II.C.8. Purification des protéines.**

#### **II.C.8.1. Purification du complexe bAnc1-BA.**

L'acide bongkrélique est préalablement purifié (Lauquin et Vignais, 1976), puis la purification du complexe bAnc1-BA est effectuée d'après la méthode initialement décrite par Block (Block et Vignais, 1986), avec quelques modifications. Des mitochondries de cœur de bœuf fraîchement décongelées sont incubées pendant 10 min à 0°C à la concentration protéique de 10 mg/ml en présence de 20  $\mu\text{M}$  BA dans un tampon composé de 10 mM MES, 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DFP et d'un cocktail d'antiprotéases (antiprotéases Complete mini EDTA-free (Roche), 0,5  $\mu\text{g/ml}$  leupeptine, 1  $\mu\text{g/ml}$  pepstatine et 2  $\mu\text{g/ml}$  aprotinine), à pH 6,5. Après centrifugation (15000 g, 10 min, 10°C), le culot est repris dans un tampon salin à force ionique élevée, composé de 10 mM Tris-HCl, 200 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et 1 mM EDTA, à pH 7,3, puis solubilisé par ajout de 2% (m/v) final de CHAPS (Sigma). Après une

incubation de 10 min à 0°C, la suspension est déposée sur une colonne d'hydroxyapatite (HTP, Bio-Rad) préalablement équilibrée dans un milieu contenant 10 mM Tris-HCl, 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA et 0,4% (m/v) CHAPS, à pH 7,3, à raison de 1 ml de support décanté pour 2 mg de protéines totales. La fraction non-retenue sur la colonne, éluée immédiatement après le volume mort, est collectée. En effet elle contient le complexe bAnc1-BA, ce qui est contrôlé par la mesure continue de l'absorption UV à 280 nm en sortie de colonne. La purification du complexe bAnc1-BA par non-rétention sur colonne d'hydroxyapatite indique que les nombreuses charges du transporteur ne sont pas accessibles au support HTP : elles sont donc soit camouflées par le détergent, soit dirigées vers l'intérieur de la protéine.

#### II.C.8.2. Purification de $\gamma$ Anc2-HT.

Le transporteur d'ADP/ATP de levure fusionné à son extrémité C-terminale à une étiquette polyhistidine est purifié sous forme de complexe, soit avec le carboxyatractyloside, soit avec l'acide bongkréique, d'après un protocole initialement décrit par Fiore (Fiore et al., 2000), avec quelques modifications. Dans le cas du complexe transporteur étiqueté-CATR, des mitochondries fraîchement décongelées sont incubées pendant 10 min à 0°C à la concentration protéique de 10 mg/ml en présence de 20  $\mu$ M CATR (Sigma) dans un tampon composé de 10 mM Tris-HCl, 0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM DFP et du cocktail d'antiprotéases (cf partie II.C.8.1.), à pH 7,3. Dans le cas du complexe transporteur étiqueté-BA, les mitochondries sont préincubées pendant 10 min à 0°C à la concentration protéique de 10 mg/ml en présence de 20  $\mu$ M BA, dans un tampon composé de 10 mM Mops, 1 mM DFP et du cocktail d'antiprotéases, à pH 6,8. Après centrifugation (15000 g, 10 min, 10°C), le culot est repris dans un tampon composé de 10 mM Tris-HCl, 0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et 1 mM EDTA, à pH 7,3. Dans les deux cas, les membranes mitochondriales sont ensuite solubilisées par ajout de 1% (m/v) final d'Emulphogène BC720 (EM, GAF Corporation) purifié suivant le protocole décrit par Ashani (Ashani et Catravas, 1980) et de 1% (m/v) final de DDM (Calbiochem). Après 10 min d'incubation à 0°C, la suspension est déposée sur une colonne d'hydroxyapatite (Bio-Rad) préalablement équilibrée dans un milieu contenant 10 mM Tris-HCl, 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA et 0,1% (m/v) EM, à pH 7,3, à raison de 1 ml de support décanté pour 2 mg de protéines mitochondriales totales. La fraction non-retenue sur la colonne, qui contient le complexe transporteur étiqueté-inhibiteur, est collectée. Elle est

ensuite purifiée par chromatographie d'affinité IMAC sur colonne Ni-NTA (Qiagen) prééquilibrée dans un tampon constitué de 5 mM MgSO<sub>4</sub> (pour neutraliser l'EDTA), 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 0,1% (m/v) DDM, à pH 7,3. Après agitation pendant 1 h à 4°C de la suspension constituée de 100 µl de résine /mg de protéines totales mitochondriales, la résine est lavée à trois reprises à 4°C pendant 10 min par 10 volumes d'un tampon constitué de 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 0,1% (m/v) DDM, à pH 7,3, puis la protéine est éluée par 500 mM imidazole dans 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 0,1% (m/v) DDM, à pH 7,3. Après filtration, et afin de séparer l'imidazole, la fraction protéique est soumise à une chromatographie d'exclusion sur colonne AcA 202 (BIOSEPPRA) prééquilibrée dans le tampon précédemment utilisé pour les lavages de la résine Ni-NTA.

#### II.C.8.3. Purification de yVDAC1.

Des mitochondries fraîchement décongelées sont solubilisées à 0°C par 5% (m/v) Hécameg (VEGATEC) dans un tampon composé de 10 mM Tris-HCl, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 1mM DFP et du cocktail d'antiprotéases (cf partie II.C.8.1.), à pH 7,3. Après incubation pendant 10 min à 0°C à la concentration protéique de 10 mg/ml, la fraction mitochondriale est déposée sur une colonne d'hydroxyapatite (Bio-Rad) préalablement équilibrée dans un milieu contenant 10 mM Tris-HCl, 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA et 0,7% (m/v) Hécameg, à pH 7,3, à raison de 1 ml de support décanté pour 2 mg de protéines totales. La fraction non-retenue sur la colonne, qui contient la porine yVDAC1, est collectée.

#### II.C.8.4. Purification de yVDAC1-HT.

Dans un premier temps, la porine yVDAC1 étiquetée à son extrémité C-terminale est purifiée de manière strictement identique à yVDAC1, par solubilisation par de l'Hécameg 5% (m/v) suivie d'une chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite. Du DDM (Calbiochem) à la concentration finale de 2% (m/v) est alors ajouté dans la fraction protéique. L'ensemble est agité pendant 30 min à 4°C, puis yVDAC1-HT est purifiée par chromatographie d'affinité dans les mêmes conditions que la protéine yAnc2-HT (cf partie II.C.8.2.), si ce n'est que la fraction protéique est déposée sur la colonne Ni-NTA prééquilibrée dans un tampon dépourvu

de  $\text{MgSO}_4$ , à raison de seulement 50  $\mu\text{l}$  de résine /mg de protéines totales mitochondriales, que le tampon utilisé pour les lavages de la colonne contient 0,05% (m/v) de DDM, et que la protéine est éluée par 100 mM EDTA dans 40 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et 0,04% (m/v) DDM, à pH 7,3.

### **II.C.9. Observation des changements de conformation du transporteur isolé.**

La fixation des inhibiteurs (CATR ou BA) et des nucléotides (ADP ou ATP) sur le transporteur d'ADP/ATP bovin isolé en présence de détergent entraîne des changements de conformation de la protéine que l'on peut visualiser par fluorimétrie intrinsèque des tryptophanes (Brandolin et al., 1985 ; Block et Vignais, 1986). Pour cela le transporteur bAnc1 est purifié d'après le protocole précédemment décrit (cf partie II.C.8.1.), en présence ou non d'acide bongkrélique. Il est ensuite soumis à une chromatographie sur colonne Aca 202, équilibrée dans le même tampon que celui utilisé pour la colonne d'hydroxyapatite. Dans le cas du complexe bAnc1-BA, soit 2 ml de la solution de protéine collectée en sortie de colonne Aca 202 sont directement introduits dans une cuvette de fluorescence en quartz, thermostatée à 20°C, soit ces 2 ml sont concentrés puis redilués à un volume final de 2 ml par le tampon utilisé pour la colonne d'hydroxyapatite avant d'être introduits dans la cuvette de fluorescence. Dans le cas du transporteur purifié sans inhibiteur, 400  $\mu\text{l}$  de cette solution sont mélangés, dans la cuvette de fluorescence thermostatée à 10°C, à 1,6 ml d'une solution de glycérol à 136 mM ou bien à 1,6 ml d'une solution contenant 68 mM glycérol et 10% (m/v) CHAPS. La cuve est placée sous agitation permanente devant le faisceau de lumière d'excitation (lampe Xenon, 75 W) centrée à 297 nm et de bande passante 5 nm. L'intensité de la lumière émise est mesurée à 345 nm (avec une bande passante de 50 nm à 37,5% de transmission), perpendiculairement au faisceau incident. Après stabilisation du signal, des ajouts de petits volumes (variant entre 1 et 10  $\mu\text{l}$ ) de 0,7 mM ATP, de 1,4 mM BA ou de 2,5 mM CATR sont réalisés grâce à des seringues automatiques (Hamilton).

### **II.C.10. Analyse des protéines par SDS-PAGE.**

L'analyse des protéines est effectuée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE, Laemmli,

1970). Le gel de polyacrylamide est constitué de deux gels distincts, dont la composition est donnée dans le Tableau 7. Ils sont coulés l'un après l'autre entre deux plaques, l'une d'alumine, l'autre de verre, distantes de 0,75 mm.

	<b>Gel de séparation 12% (m/v)</b>	<b>Gel de concentration 4% (m/v)</b>
Acrylamide 30% (m/v) / Bis-acrylamide 0,8% (m/v) (Sigma)	2,5 ml	500 µl
Tris-HCl 3 M pH 8,8	975 µl	
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8		1 ml
Eau	2,65 ml	2,43 ml
SDS 10% (m/v)	60 µl	40 µl
Persulfate d'ammonium 10% (m/v)	45 µl	40 µl
TEMED	3 µl	4 µl

**Tableau 7 : Composition des gels de polyacrylamide.**

Dans le cas des protéines membranaires solubilisées en présence de détergent, les échantillons sont d'abord traités par 80% (v/v) d'acétone à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant au moins 2 h, afin de faire précipiter la protéine et les sels, et d'éliminer le détergent qui est soluble dans l'acétone. Puis les culots obtenus après centrifugation (13000 g, 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) sont resuspendus dans de l'eau distillée afin de dissoudre les sels présents. Une nouvelle centrifugation (13000 g, 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) permet de récupérer les protéines. Elles sont solubilisées à environ 1 mg/ml dans du 'tampon de dissociation'. La composition des tampons et solutions utilisés est récapitulée dans le Tableau 8. Les échantillons, de volume variant typiquement entre 5 et 20 µl, sont déposés dans les puits ménagés dans le gel de concentration. Des protéines de masse moléculaire connue appelées marqueurs (Rainbow molecular weight markers, Amersham ; ou Low Molecular Weight Calibration Kit, Pharmacia Biotech ; ou PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas) sont également déposées : elles permettent de corrélérer la distance de migration des protéines à leur masse moléculaire (en kDa). La migration est réalisée dans le 'tampon de migration' sous un courant d'ampérage constant fixé à 18 mA par gel, jusqu'à ce que le bleu de bromophénol sorte du gel.

Le gel obtenu peut être observé et photographié sous lumière ultra-violette si certains échantillons comportent une sonde fluorescente. Il peut également être coloré par un bain de 15 min à température ambiante sous agitation dans une solution de coloration contenant du bleu de Coomassie R250 (Diezel et al., 1972). Les protéines ne sont visibles qu'après

élimination de l'excès de colorant par une incubation prolongée du gel dans la 'solution de décoloration', à température ambiante et sous agitation.

	<b>Composition</b>
<b>Tampon de dissociation (2X)</b>	125 mM Tris-HCl, 20% (v/v) glycérol, 4% (m/v) SDS, 0,01% (m/v) bleu de bromophénol, à pH 6,8
<b>Tampon de migration</b>	50 mM Tris-HCl, 750 mM glycine, 0,1% (m/v) SDS, à pH 8,4
<b>Solution de coloration</b>	40% (v/v) éthanol, 10% (v/v) acide acétique, 0,25% (m/v) bleu de Coomassie
<b>Solution de décoloration</b>	5% (v/v) méthanol, 7% (v/v) acide acétique

**Tableau 8 : Tampons et solutions utilisés pour l'analyse des protéines par SDS-PAGE.**

### **II.C.11. Electrotransfert et immunodétection des protéines (Western blot).**

Le gel obtenu après SDS-PAGE peut être analysé par Western blot (Towbin et al., 1979). Les protéines, une fois séparées par électrophorèse, sont directement transférées sur une membrane de nitrocellulose. Pour cela, le gel est appliqué contre la membrane (Nitrocellulose Membrane, 0,2  $\mu$ m, Bio-Rad) dans un sandwich réalisé entre deux feuilles de papier Whatman 17 et maintenu dans une cassette. L'assemblage est réalisé après avoir trempé chaque élément dans une solution appelée 'tampon de transfert' constituée de 25 mM Tris-HCl, 375 mM glycine, 20% (v/v) éthanol et 0,05% (m/v) SDS, à pH 8,4. Le sandwich est ensuite placé dans une cuve remplie de ce même tampon, et l'électrotransfert est effectué à 4°C, pendant une heure, sous un ampérage constant fixé à 200 mA. Après cette étape, l'immunodétection de la membrane de nitrocellulose peut avoir lieu.

La membrane est tout d'abord rincée dans du tampon PBS-Tween (cf partie II.C.5.), puis incubée (1 h à TA ou 15 h à 4°C) sous agitation dans une solution de lait écrémé à 3% (m/v) dans le tampon PBS-Tween, afin de saturer la membrane par les protéines du lait, pour éviter la fixation aspécifique des anticorps sur celle-ci. Après trois lavages sous agitation (5 min, TA) dans le tampon PBS-Tween, la membrane est incubée en présence de l'anticorps primaire (1 h à TA ou 15 h à 4°C). Les différents anticorps primaires utilisés au cours de cette étude sont présentés dans le Tableau 9. L'incubation en présence de l'anticorps primaire est suivie de trois lavages sous agitation (5 min, TA) dans le tampon PBS-Tween, puis d'une

nouvelle incubation en présence de l'anticorps secondaire (1 h, TA). Dans le cas de l'anticorps  $\alpha$ -HT qui est monoclonal, la membrane est incubée en présence d'anticorps anti-souris produits chez la chèvre et couplés à la peroxydase (Bio-Rad) dilués au 1:3000. Dans les autres cas où l'anticorps primaire est polyclonal, l'incubation a lieu en présence de protéine A couplée à la peroxydase (Bio-Rad) diluée au 1:3000. Après trois lavages sous agitation (5 min, TA) dans le tampon PBS-Tween, la présence de la peroxydase est détectée grâce au kit ECL (Enhanced ChemioLuminescence, Amersham) : le luminol contenu dans l'une des deux solutions du kit est oxydé par la peroxydase, et émet un rayonnement chimioluminescent. Celui-ci est détecté par impression d'un film photographique (Hyperfilm ECL, Amersham). Cette technique permet ainsi d'identifier rapidement les bandes protéiques ayant spécifiquement fixé l'anticorps primaire choisi.

Nom de l'anticorps	Dilution finale	Détails	Références
$\alpha$ -bAnc1	1:2000	Polyclonaux de lapin préparés par injection de bAnc1 solubilisé en SDS	Boulay et al., 1986
$\alpha$ -yAnc2	1:2000	Polyclonaux de lapin préparés par injection de yAnc2 solubilisé en SDS	Fiore et al., 2000
$\alpha$ -yOm14	1:2000	Polyclonaux de lapin préparés par injection du peptide synthétique ISKKYYSRYDKK de la partie C-ter de yOm14 conjugué à l'ovalbumine	Fiore, 1998 (thèse de doctorat)
$\alpha$ -yAco	1:3000	Polyclonaux de lapin	De Marcos Lousa et al., 2002
$\alpha$ -yVDAC1	1:3000	Polyclonaux de lapin préparés par injection de yVDAC1 solubilisé en SDS	Lauquin (non publié)
$\alpha$ -HT	1:3000	Monoclonaux anti-pentahistidine commerciaux	Amersham

**Tableau 9 : Nature et dilution des anticorps primaires utilisés.**

Tous les anticorps non commerciaux sont conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  en présence de glycérol à 50% (m/v). Les dilutions sont effectuées dans du tampon PBS-Tween. Elles sont ensuite conservées à  $4^{\circ}\text{C}$  en présence de 0,05%  $\text{NaN}_3$ , et peuvent être réutilisées plusieurs fois.

### **II.C.12. Ultracentrifugation sur gradient de sucrose.**

Le gradient de sucrose est réalisé en déposant dans un tube d'ultracentrifugation des couches successives de solutions de sucrose, de concentrations croissantes de 2 en 2% (m/v) de la surface vers le fond du tube, chacune d'elles contenant 10 mM Tris-HCl à pH 7,3 et 0,7% (m/v) Hécameg. La fraction collectée en sortie de colonne HTP après purification dans les conditions standard est déposée à la surface du gradient, après avoir été concentrée. Les

tubes sont alors placés dans le rotor SW65 et ultracentrifugés à 10°C à une vitesse et une durée variables (cf partie V.C.2) dans une ultracentrifugeuse LE-80 (Beckman). La détermination de la répartition le long du gradient de la protéine et du stérol après centrifugation est effectuée après récupération de couches parallèles de gradient. Nous avons choisi d'utiliser des tubes Ultra-Clear (Beckman) dont le fond peut être facilement percé, ce qui permet la collecte au goutte-à-goutte des couches, de la plus dense à la moins dense.

### **II.C.13. Co-immunoprécipitation de $\gamma$ Anc2 et de $\gamma$ Om14.**

Des lysats mitochondriaux ou bien des fractions collectées en sortie de colonne d'hydroxyapatite ou après IMAC, contenant 5  $\mu$ g de transporteur  $\gamma$ Anc2-HT purifié sous forme de complexe avec le CATR ou le BA, sont incubés pendant 1 h à température ambiante en présence d'anticorps polyclonaux  $\alpha$ - $\gamma$ Anc2 (1:500) et  $\alpha$ - $\gamma$ Om14 (1:250) dans le 'tampon IP' composé de 10 mM Tris-HCl, 10 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 10% (v/v) glycérol et 0,1% (m/v) EM purifié, à pH 7,3. Des expériences de contrôle ont été menées de la même façon, en utilisant les sérums pré-immuns correspondant aux anticorps cités ci-dessus à la même concentration finale 1:250. Les complexes immuns formés sont ensuite adsorbés sur 10 mg de résine protéine A-Sépharose CL-4B (GE Healthcare) par incubation à TA pendant 1 h sous agitation douce. Après quatre lavages par 1 ml de 'tampon IP', les complexes immunoprécipités sont libérés de la protéine A par une incubation de 10 min à 37°C en présence de 'tampon de dissociation (2X)' (cf partie II.C.10.) et de 1% (v/v)  $\beta$ -mercaptoéthanol. Les protéines de chaque échantillon sont séparées par SDS-PAGE puis analysées par Western blot avec les anticorps primaires  $\alpha$ - $\gamma$ Anc2 et  $\alpha$ - $\gamma$ Om14 dilués au 1:2000 et les systèmes de détection déjà décrits.

### **II.C.14. Analyse des protéines par MALDI-TOF.**

Les expériences de protéolyse *in-gel* de la protéine  $\gamma$ Om14 ont été effectuées suivant le protocole mis au point pour le transporteur d'ADP/ATP (Dahout-Gonzalez et al., 2005), en utilisant l'endoprotéinase Lys-C (Roche) au lieu de la trypsine. L'isolement des peptides générés et les expériences de spectrométrie de masse ont eux aussi été réalisés de la même

façon que dans ces travaux, au laboratoire d'Etude de la Dynamique des Protéomes dirigé par Jérôme Garin.

#### **II.C.15. Dosage de l'Hécameg par la méthode à l'anthrone.**

Le dosage des sucres en solution peut être effectué par la méthode dite de l'anthrone (Jermyn, 1975). Comme l'Hécameg (VEGATEC), ou 6-*O*-(*N*-Heptylcarbamoyle)-methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, est un détergent glycosylé, sa concentration a été déterminée en utilisant cette méthode colorimétrique de dosage. Tous les échantillons à doser, ainsi qu'une gamme étalon contenant des quantités connues d'Hécameg allant de 0 à 100  $\mu$ g, sont amenés à un volume total de 400  $\mu$ l par addition d'eau distillée. Les réactifs suivants sont ensuite ajoutés dans cet ordre : 40  $\mu$ l d'acide formique, 400  $\mu$ l d'acide chlorhydrique concentré et 3,2 ml de réactif constitué d'anthrone à 0,2 g/l dans de l'acide sulfurique à 80% (v/v). Le mélange réactionnel est d'abord agité avec de grandes précautions, puis plus énergiquement dès que le dégagement gazeux a cessé. Il est ensuite chauffé dans de l'eau frémissante jusqu'à ce que la coloration vert-bleu des mélanges les plus concentrés apparaisse clairement. Après refroidissement dans un bain de glace, il est à nouveau agité puis laissé au repos pendant quelques minutes. La densité optique est ensuite mesurée à 630 nm contre un échantillon témoin ne contenant pas d'Hécameg. La concentration en Hécameg des échantillons à doser est alors déterminée par comparaison avec la gamme de référence réalisée en parallèle.

# **Partie III**



**Résultats : Purification  
du complexe bAnc1-BA en  
vue de sa cristallisation**



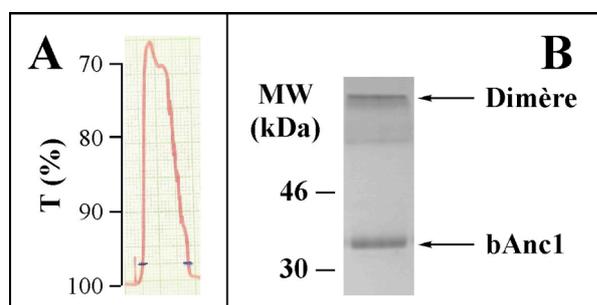
# Partie III – Résultats : Purification du complexe bAnc1-BA en vue de sa cristallisation

## III.A. Purification et concentration du complexe bAnc1-BA.

La cristallogenèse de bAnc1-BA nécessite que le complexe soit préalablement purifié et concentré à une concentration supérieure à 5 mg de protéine /ml. Comme le montre le gel d'électrophorèse de la Figure 16B, il est possible de purifier le transporteur par chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite, après solubilisation en présence de CHAPS (cf partie I.E.1.), à partir de mitochondries de cœur de bœuf préalablement incubées en présence de BA. Le tampon utilisé pour la colonne HTP doit contenir du CHAPS à une concentration supérieure à sa CMC. Nous avons donc choisi de travailler avec 0,4% (m/v) de CHAPS, puisque sa CMC dans ce tampon a été mesurée à environ 0,3% (m/v) par fluorimétrie (cf partie II.C.7.). La fraction protéique non retenue sur la colonne HTP (cf Figure 16A) ne contient que le transporteur mitochondrial d'ADP/ATP, de masse moléculaire voisine de 33 kDa. La bande de masse moléculaire plus élevée, détectée d'autre part par les anticorps  $\alpha$ -bAnc1 (1:2000), correspond vraisemblablement au dimère de transporteur.

Le degré de pureté du transporteur d'ADP/ATP après chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite semble donc tout à fait satisfaisant pour mener des essais de cristallisation. Cependant, comme sa concentration oscille entre 50 et 100  $\mu$ g/ml seulement, des essais de concentration ont été menés avec des concentrateurs ayant un seuil de coupure égal à 3, 10 ou 30 kDa. La protéine précipite très rapidement, colmatant la membrane, et ne permettant pas d'obtenir des concentrations protéiques supérieures à 2 mg/ml. Cet effet s'explique probablement par l'élimination lors de la concentration d'une partie du CHAPS sous la forme de micelles, dont la masse moléculaire est d'environ 6 kDa, mais également sous la forme de

monomères de ce détergent. Ceci entraîne probablement l'auto-association de monomères du transporteur d'ADP/ATP pour former des agrégats non-spécifiques, de manière irréversible.



**Figure 16 : Analyses de la fraction collectée en sortie de colonne HTP.**

A : Mesure continue de l'absorption UV à 280 nm en sortie de colonne. La fraction collectée correspond au pic d'absorption (entre les traits bleus). B : Electrophorèse de la fraction protéique sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Coloration au bleu de Coomassie.

### **III.B. Résistance de la liaison transporteur-BA au cours de la purification.**

#### **III.B.1. Remise en question de la stabilité du complexe transporteur-BA.**

Aux problèmes liés à l'obtention de fractions protéiques de concentration suffisamment élevée se sont ajoutées des difficultés concernant la stabilité du complexe. En effet, bien que la liaison de l'acide bongkrélique au transporteur d'ADP/ATP enchâssé dans la membrane interne mitochondriale soit très forte, avec une constante de dissociation proche de 10 nM (Lauquin et Vignais, 1976), rien ne permet d'affirmer *a priori* que le BA est toujours lié au transporteur dans la fraction finale riche en détergent. A cet égard, les essais préliminaires de cristallisation de bAnc1-BA en LAPAO semblent indiquer une éventuelle capacité de ce détergent à rompre la liaison transporteur-BA. En effet, dans le but de déterminer la structure de bAnc1-BA, ce complexe a été purifié en présence de LAPAO suivant la méthode décrite initialement par Krämer (Krämer et al., 1977) et améliorée ensuite par Block (Block et al., 1982) puis par Dahout-Gonzalez (Dahout-Gonzalez et al., 2003), soit directement après complexation dans la membrane mitochondriale, soit en ajoutant de l'acide bongkrélique à la fin de la purification du transporteur sans inhibiteur. Comme dans le cas du transporteur sans ligand, les essais de cristallisation qui ont été effectués à partir de ces préparations ont échoué, ce qui pourrait être la conséquence de la dissociation du complexe transporteur-BA (Dahout-Gonzalez, non publié). Ainsi ce qui est pris pour le complexe bAnc1-BA serait peut-être tout simplement le transporteur non lié à l'inhibiteur. Nous avons

donc décidé de contrôler si nos préparations contiennent effectivement le complexe transporteur-BA.

### **III.B.2. Détermination de la capacité du transporteur à lier l'acide bongkréique.**

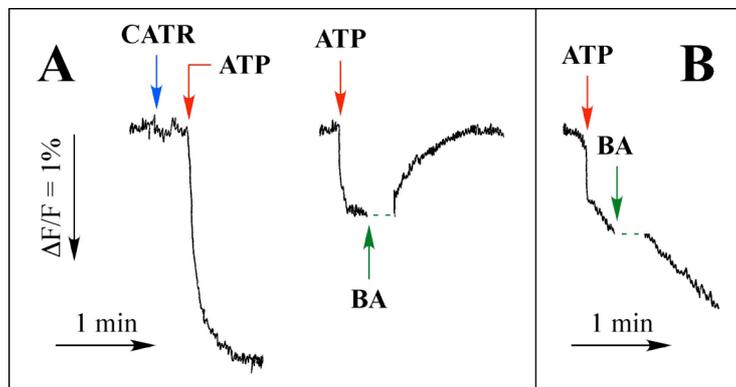
La qualité des mitochondries, ainsi que la capacité du transporteur enchâssé dans la membrane interne mitochondriale à lier l'acide bongkréique, ont tout d'abord été vérifiées. Les dosages des sites de liaison de l'atractylate et de l'acide bongkréique dans la membrane, par utilisation de (<sup>3</sup>H)-ATR et de (<sup>3</sup>H)-BA, ont prouvé que les mitochondries étaient capables de lier spécifiquement l'un et l'autre de ces inhibiteurs. Les valeurs des constantes d'affinité, anormalement élevées (cf Tableau 10), sont probablement dues à une mauvaise qualité des mitochondries à partir desquelles les dosages ont été réalisés. Cependant cette expérience n'a pas été reproduite une seconde fois, nos stocks de (<sup>3</sup>H)-BA étant limités.

	<sup>3</sup> H-ATR	<sup>3</sup> H-BA
Nb de sites (pmol /mg de protéine)	900	1000
K <sub>d</sub> (nM)	200	350

**Tableau 10 : Caractérisation des sites de fixation de l'ATR et du BA sur bAnc1 dans des mitochondries isolées.**

Des expériences de cinétique de changement de fluorescence, menées pour visualiser l'état de la protéine bAnc1 en solution après purification en présence de CHAPS et sa capacité à lier l'acide bongkréique, ont ensuite été mises en place (Block et Vignais, 1986). Elles ont été effectuées sur le transporteur purifié en l'absence d'inhibiteur. En présence de CHAPS, la conformation dite 'conformation BA' du transporteur est favorisée, et le transporteur se trouve donc dans un état de haute fluorescence. Si ses capacités de reconnaissance des ligands spécifiques sont préservées, l'ajout dans le milieu d'ATP et de CATR permettra de former le complexe bAnc1-CATR, qui, lui, se trouve dans un état de basse fluorescence. De la même manière, l'addition de BA permettra de retourner, après la décroissance de fluorescence observée après ajout d'ATP seul dans le milieu, à l'état de fluorescence élevée caractéristique du complexe bAnc1-BA. Ces expériences, réalisées après dilution de la protéine purifiée dans une solution de glycérol à une concentration finale égale à 1% (m/v), donnent les résultats

attendus, caractéristiques d'une protéine en solution dont la dynamique conformationnelle est au moins partiellement préservée (cf Figure 17A). En revanche, lorsque la protéine bAnc1 purifiée est diluée dans du glycérol à une concentration finale égale à 0,5% (m/v), en présence de CHAPS à une concentration finale égale à 8% (m/v), elle réagit encore à l'ajout d'ATP dans le milieu, mais plus à celui de BA. Il n'y a donc vraisemblablement plus formation du complexe bAnc1-BA en présence de concentrations élevées de CHAPS (cf Figure 17B). Cependant, on ne peut pas exclure que dans ces conditions le CHAPS empêche les mouvements des résidus tryptophane malgré la formation du complexe bAnc1-BA. Il semble en revanche que le site de liaison des nucléotides au transporteur soit préservé, ce qui est relativement étonnant. Cependant, étant donné les similarités de structure entre la base azotée de l'ADP et le motif diterpénique du CATR, des expériences de modélisation moléculaire ont pu être réalisées à partir de la structure du complexe bAnc1-CATR dans laquelle l'inhibiteur a été remplacé par l'ADP (Robinson et Kunji, 2006). Elles montrent que le site de liaison de l'ADP pourrait être le même que celui du CATR. Sachant que celui-ci est profondément enfoui dans la protéine (cf Figure 7B), il est probablement inaccessible aux molécules de détergent, ce qui explique qu'il puisse être préservé.



**Figure 17 : Expériences de changements de fluorescence intrinsèque menées sur le transporteur purifié en l'absence d'inhibiteur.**

Lorsque cela est indiqué sont ajoutés dans le milieu respectivement 1  $\mu$ l, 3  $\mu$ l et 5  $\mu$ l d'une solution de BA à 1,4 mM, de CATR à 2,5 mM et d'ATP à 0,7 mM. A : Cas où bAnc1 est dilué dans une solution ne contenant que du glycérol. B : Cas où bAnc1 est dilué dans une solution contenant du glycérol et 8% (m/v) CHAPS.

Cependant, étant donné que ces expériences se basent sur la réponse à l'acide bongkréique de la protéine bAnc1 purifiée sans inhibiteur, elles ne permettent pas d'évaluer la stabilité du complexe transporteur-BA, préformé dans la membrane interne mitochondriale, au cours des étapes de la purification. Elles laissent toutefois envisager le masquage ou la

destruction des sites de fixation de l'acide bongkrélique au transporteur en présence de concentrations élevées de détergent. Ces expériences ne soutiennent pas la possibilité de pouvoir cristalliser le complexe bAnc1-BA en purifiant dans un premier temps le transporteur sans inhibiteur, puis en ajoutant l'acide bongkrélique dans le milieu, juste avant les essais de cristallisation.

#### **III.B.3. Caractérisation du complexe bAnc1-BA.**

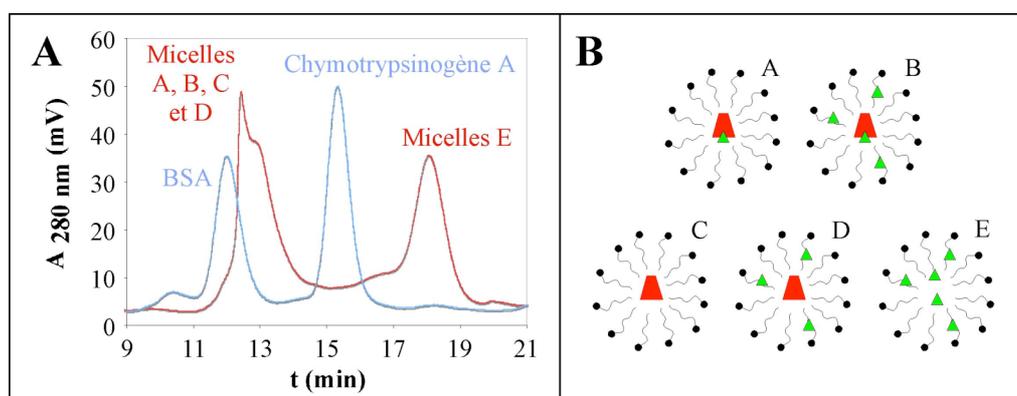
##### **III.B.3.1. Séparation de complexes détergent-protéine par FPLC.**

Pour déterminer la stabilité de la liaison transporteur-BA lors des étapes de purification en présence de CHAPS, nous avons tenté de caractériser les complexes détergent-protéine contenant le complexe bAnc1-BA dans la fraction obtenue après purification par chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite et concentration. La situation est rendue complexe par le fait que l'incubation des mitochondries est réalisée en présence d'un large excès d'acide bongkrélique par rapport au nombre de ses sites de fixation spécifiques, et que sa lipophilie entraîne sa liaison de manière non-spécifique aux membranes mitochondriales. Il reste alors bien entendu de l'acide bongkrélique libre en solution, mais ces molécules-là sont éliminées lors de la centrifugation qui suit l'incubation.

Ainsi, dans le cas où les lipides membranaires extraits eux aussi par le détergent ne sont pas pris en compte, la solubilisation du complexe bAnc1-BA par le CHAPS peut *a priori* engendrer cinq sortes de complexes détergent-protéine (cf Figure 18B) : quatre d'entre eux contiennent le transporteur (cas A, B, C ou D), avec ou sans acide bongkrélique lié (cas A et B à opposer aux cas C et D) ou libre (cas A et C à opposer aux cas B et D), et la cinquième sorte de micelle ne contient que de l'inhibiteur libre (cas E). Nous avons cherché à visualiser de manière sélective les complexes détergent-protéine de type A et B dans nos échantillons protéiques, et à les discriminer de ceux de type C, D et E.

Pour cela, la technique de chromatographie liquide FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) a été choisie, car elle permet habituellement des séparations efficaces sur le principe de la gel-filtration tout en étant relativement simple (analyses en ligne) et commode à

mettre en œuvre (travail sur de petits volumes, avec de la protéine concentrée ou pas). Deux colonnes ont été testées, après avoir été équilibrées dans un tampon salin contenant 0,4% CHAPS, identique à celui utilisé pour la chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite. Dans ces conditions, le transporteur n'est pas élué de la colonne TSK G3000SWXL. En revanche une bonne séparation entre les micelles de type E et les complexes détergent-protéine de type A, B, C et D est observée avec la colonne Superdex 75 HR 10/30, lors de l'analyse par spectrophotométrie d'absorption à 280 nm (cf Figure 18A). Cependant il est impossible de différencier les complexes détergent-protéine de type A et B de ceux de type C et D.



**Figure 18 : Analyses par FPLC de la fraction protéique purifiée en CHAPS.**

A : Chromatogrammes réalisés par injections sur la colonne Superdex 75 HR 10/30. B : Complexes détergent-protéine pouvant être obtenus après solubilisation du complexe bAnc1-BA par le CHAPS. Les monomères de CHAPS sont figurés en noir, le transporteur d'ADP/ATP par un trapèze rouge et les molécules d'acide bongkrélique par des triangles verts.

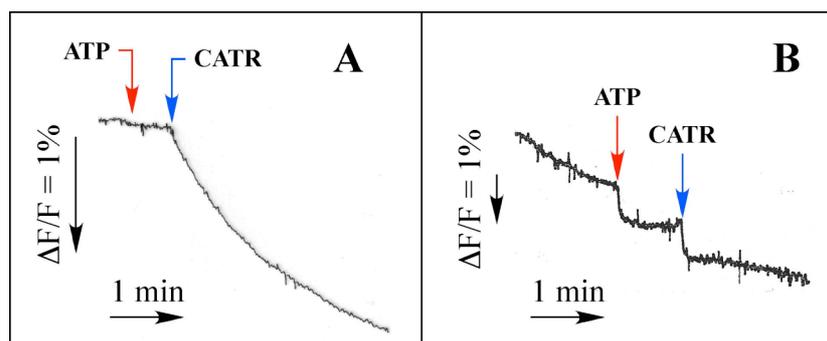
### III.B.3.2. Etude des différences entre chromatogrammes.

Dans des expériences complémentaires, il a été envisagé de chercher des différences entre chromatogrammes, provoquées par ajout de CATR à la fraction protéique, ou bien par dénaturation de cette fraction par chauffage à 60°C, ce qui devrait dans les deux cas avoir pour effet de libérer l'acide bongkrélique lié au transporteur. Malheureusement la présence non-spécifique d'inhibiteur au sein des complexes détergent-protéine de type B et D complique cette étude, du moins dans le cas de la comparaison des chromatogrammes obtenus avant et après dénaturation par chauffage, car il n'est pas possible d'exclure que l'acide bongkrélique libre observé puisse avoir été éventuellement relâché par ces complexes détergent-protéine. Mais comme de toute manière nous n'avons pas clairement observé de

libération d'acide bongkrékique, l'hypothèse selon laquelle la fraction purifiée est constituée de complexes détergent-protéine de type C et D, contenant le transporteur d'ADP/ATP sans inhibiteur, avec ou sans acide bongkrékique libre, est la plus probable. En revanche, une approche alternative, *a priori* risquée du fait de la longueur de l'expérience et de la fragilité de la protéine, aurait pu être la séparation par ultracentrifugation des micelles de CHAPS sans transporteur. Cependant, une expérience préliminaire réalisée en présence de Triton X-100 indique que, contrairement à la protéine bAnc1-CATR qui sédimente beaucoup plus vite que les micelles de détergent, la protéine bAnc1-BA ne peut être séparée de l'excès de Triton X-100 (Brandolin, non montré). Cette expérience devra être reproduite en présence de CHAPS.

#### III.B.3.3. Expériences de changement de fluorescence sur le complexe purifié.

N'ayant pas clairement observé par FPLC la libération de l'acide bongkrékique lié au transporteur d'ADP/ATP, nous avons tenté de mettre en évidence l'existence du complexe transporteur-BA par une autre méthode d'analyse. Il s'agit de la méthode de fluorimétrie intrinsèque des tryptophanes, déjà mise en œuvre précédemment (cf partie III.B.2.). Cette fois-ci, l'étude est réalisée en employant le transporteur purifié, en présence de CHAPS, sous forme de complexe préalablement formé dans la membrane interne mitochondriale avec l'acide bongkrékique. A partir de la cinétique de décroissance de la fluorescence observée après ajout dans le milieu d'ATP puis de CATR, jusqu'à atteindre l'état de basse fluorescence caractéristique du complexe bAnc1-CATR, il est possible de déduire la présence ou non de BA initialement lié au transporteur (Brandolin et al., 1985). Ainsi, après purification du complexe bAnc1-BA par chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite puis sur colonne AcA 202, la fraction présente une cinétique de décroissance de la fluorescence lente (cf Figure 19A), indiquant une formation lente du complexe bAnc1-CATR, et par conséquent une libération progressive de l'acide bongkrékique initialement lié au transporteur. Ce n'est plus le cas après concentration de la fraction protéique (cf Figure 19B) où, comme dans le cas du transporteur bAnc1 purifié sans inhibiteur en présence de CHAPS, on peut observer d'une part une réponse de la protéine à l'ATP (cf Figure 17), et d'autre part la réponse rapide de la protéine au CATR. Cela signifie donc qu'après concentration, le site de liaison de l'ATP au transporteur bAnc1 est préservé, mais qu'en revanche le complexe transporteur-BA est dissocié.



**Figure 19 : Expériences de changements de fluorescence intrinsèque menées sur le complexe bAnc1-BA.**

Lorsque cela est indiqué sont ajoutés dans le milieu respectivement 5  $\mu$ l et 10  $\mu$ l d'une solution d'ATP à 7,5 mM et de CATR à 2,5 mM. A : Cas du complexe bAnc1-BA purifié mais non concentré. B : Idem, après concentration puis dilution dans le tampon utilisé lors de la purification.

### **III.C. Bilan.**

Bien que l'acide bongkréique soit initialement lié avec une forte affinité par le transporteur d'ADP/ATP ancré dans la membrane interne mitochondriale, avec dans notre cas une constante de dissociation proche de 350 nM, les expériences de fluorimétrie intrinsèque décrites ci-dessus, ainsi que les analyses menées par HPLC, semblent indiquer la dissociation du complexe bAnc1-BA au cours de l'étape de concentration de la protéine purifiée en présence de CHAPS. La cristallisation du complexe bAnc1-BA semble donc compromise, du moins à partir de fractions protéiques obtenues dans les conditions de purification que nous avons initialement envisagées. Néanmoins, nous pouvons espérer y parvenir en modifiant chimiquement le transporteur bAnc1 au préalable, et en adaptant par la suite le protocole de purification du complexe bAnc1-BA. Ceci sera discuté plus en détail dans la partie VI.

# **Partie IV**



## **Résultats : Existence d'une interaction entre yAnc2 et yOm14**



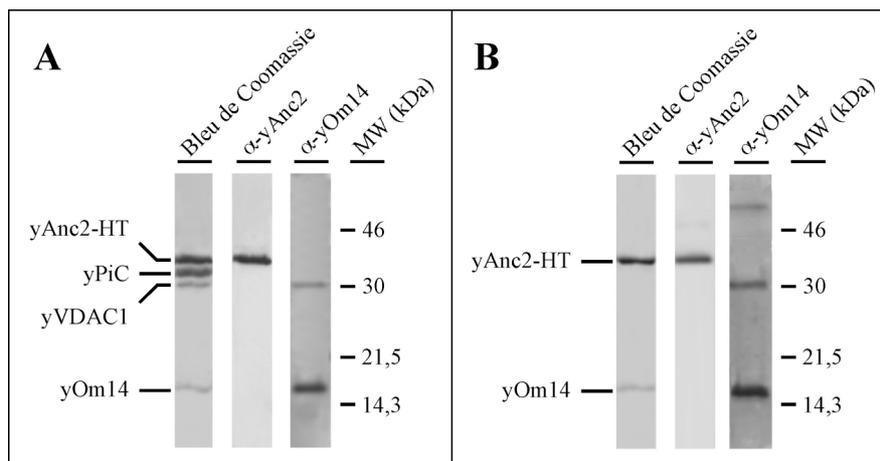
# Partie IV – Résultats : Existence d’une interaction entre yAnc2-HT et yOm14

## IV.A. Co-purification de yOm14 et de yAnc2-HT par IMAC.

Contrairement au transporteur bovin, le transporteur d’ADP/ATP de levure yAnc2 ne peut pas être purifié en une seule étape de chromatographie sur colonne d’hydroxyapatite. Dans le but d’en étudier la structure par cristallographie, ce qui requiert un grand degré de pureté, il est nécessaire de le soumettre à une seconde étape chromatographique. Pour cela, une approche par génie génétique a été mise en oeuvre par Christelle Fiore lors de sa thèse : une étiquette polyhistidine constituée de 6 résidus His a été fusionnée à l’extrémité C-terminale du transporteur yAnc2, permettant sa rétention sur colonne d’affinité IMAC. Cette technique de purification, utilisée pour la première fois en 1975 (Porath et al., 1975), est la méthode de choix pour purifier des protéines portant une étiquette polyhistidine car elle est basée sur l’interaction forte des chaînes latérales des résidus His avec un métal divalent comme le nickel. Parmi plusieurs types de résines, celle qui a été utilisée pour purifier la protéine yAnc2-HT est la résine Ni-NTA Agarose (Qiagen), dans laquelle l’ion  $Ni^{2+}$  est très fortement chélaté par le ligand tétradentate NTA (acide nitrilotriacétique), lui-même fixé sur des billes d’agarose.

La protéine yAnc2-HT peut donc être purifiée en deux étapes (Fiore et al., 2000) après solubilisation de mitochondries de levure en présence d’Emulphogène et de DDM. La première étape est une chromatographie sur colonne d’hydroxyapatite : l’analyse par SDS-PAGE de la fraction collectée à sa sortie indique qu’elle permet de pré-purifier yAnc2-HT en présence de trois autres protéines mitochondriales (cf Figure 20A). Deux d’entre elles sont la porine yVDAC1, identifiée par Western blot avec l’anticorps  $\alpha$ -yVDAC1 (1:3000), et le

transporteur de phosphate yPiC identifié par séquençage N-terminal. La troisième est une protéine inconnue de masse moléculaire proche de 15 kDa. Dans sa thèse de doctorat, Christelle Fiore a décrit les analyses qui lui ont permis d’identifier cette protéine : il s’agit d’analyses par MALDI-TOF des peptides issus de sa protéolyse *in-gel* par l’endoprotéase Lys-C. Celles-ci ont permis de déterminer que cette protéine est le produit du gène *YBR230c* de *S. cerevisiae* (P38325), un gène principalement exprimé lorsque la levure se développe sur milieu non-fermentescible (Ohlmeier et al., 2004). La masse moléculaire attendue pour cette protéine mitochondriale de fonction inconnue est égale à 14,6 kDa. Christelle Fiore a ensuite fait produire chez le lapin des anticorps polyclonaux  $\alpha$ -yOm14 dirigés contre un peptide synthétique mimant la partie C-terminale de cette protéine et conjugué à l’ovalbumine. Ces anticorps lui ont permis d’immunodétecter la protéine et d’observer la présence d’un dimère de cette protéine aux environs de 30 kDa, se confondant avec la porine lorsque le gel est coloré au bleu de Coomassie (cf Figure 20A).



**Figure 20 : Analyse des protéines co-purifiées avec yAnc2-HT.**

A : Analyses de la fraction collectée en sortie de colonne HTP par coloration au bleu de Coomassie, et par Western blot avec les anticorps  $\alpha$ -yAnc2 (1:2000) et  $\alpha$ -yOm14 (1:2000). B : Même analyses, menées sur la fraction collectée après chromatographie d’affinité sur résine Ni-NTA en présence de DDM.

La deuxième étape de la purification de yAnc2-HT est une chromatographie d’affinité sur résine Ni-NTA, en présence de DDM, qui permet d’éliminer les protéines contaminantes yVDAC1 et yPiC. En revanche la protéine de 14,6 kDa est toujours détectée dans la fraction collectée en sortie de colonne Ni-NTA (cf Figure 20B), ce qui indique qu’elle interagit soit avec la résine, soit avec la protéine yAnc2-HT. Cette dernière hypothèse est privilégiée car yOm14 est plus abondante dans le cas où le transporteur yAnc2-HT est sous forme de complexe avec le carboxyatractyloside que dans celui où l’inhibiteur employé est l’acide

bongkréique. Ceci suggère de surcroît une interaction dépendante de la conformation du transporteur d’ADP/ATP. Cependant, sans expérience complémentaire, il n’est pas possible d’exclure que sa rétention sur résine Ni-NTA soit indépendante du transporteur et soit due en particulier à la présence dans sa séquence primaire de l’enchaînement de trois résidus His. Des formes dimériques et tétramériques de  $\gamma$ Om14 ont également été immunodétectées dans la fraction collectée après chromatographie d’affinité (cf Figure 20B), ce qui montre sa tendance à s’agréger même après avoir été traitée dans des conditions réductrices et dénaturantes fortes. Ce phénomène suggère qu’elle forme peut-être des multimères à l’état natif, et que cela serait éventuellement lié à son rôle physiologique.

## **IV.B. Caractérisation biochimique de la protéine $\gamma$ Om14.**

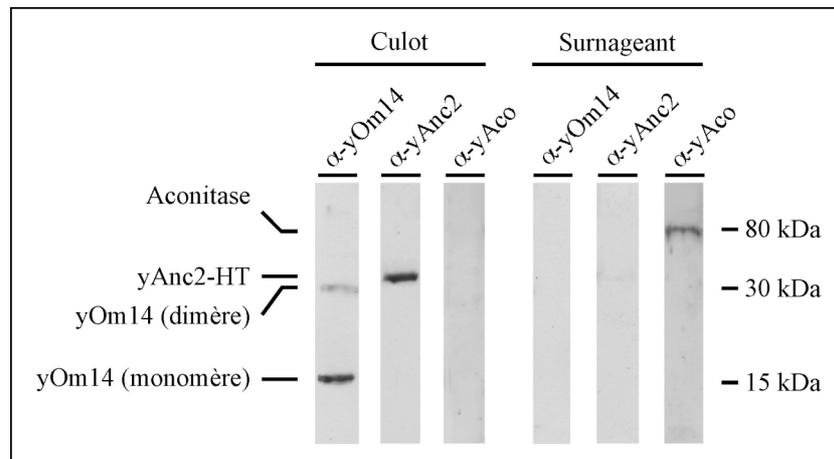
Sachant que cette protéine  $\gamma$ Om14 de fonction inconnue est mitochondriale, et disposant d’anticorps spécifiques dirigés contre son extrémité C-terminale, nous avons voulu la caractériser au niveau biochimique.

### **IV.B.1. Localisation de $\gamma$ Om14.**

Une étude récente (Burri et al., 2006) a montré, par des expériences d’extraction de membranes externes mitochondriales par le carbonate de sodium et par le détergent Triton X-114, mais également par des analyses par protéolyse des protéines de fusion GFP- $\gamma$ Om14 ou  $\gamma$ Om14-GFP, que la protéine résultant de l’expression du gène *YBR230c* est une protéine située dans la membrane externe des mitochondries. C’est pourquoi elle a été appelée  $\gamma$ Om14 par les auteurs. Cependant les extractions par le carbonate de sodium, qui permettent de séparer les protéines solubles ou liées aux membranes des protéines membranaires, indiquent la présence de  $\gamma$ Om14 à la fois dans le surnageant et dans le culot de l’extraction. Nous avons donc reproduit cette expérience (cf Figure 21), mais avons montré quant à nous la présence de  $\gamma$ Om14 exclusivement dans la fraction non-extraite par  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , comme c’est le cas pour le transporteur d’ADP/ATP pris ici comme référence. Quant à l’aconitase de levure, qui est une protéine soluble située dans la matrice mitochondriale, elle est bien retrouvée dans le

surnageant après extraction par Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Cette expérience nous donc permet de confirmer que yOm14 est bien une protéine membranaire de la mitochondrie.

La visualisation par microscopie de fluorescence de la co-localisation des protéines de fusion GFP-yOm14 ou yOm14-GFP avec le colorant spécifique des mitochondries Mitotracker (Burri et al., 2006) a permis de conclure à son absence dans d’autres membranes cellulaires, ou en d’autres termes à sa présence exclusive dans la membrane externe des mitochondries.



**Figure 21 : Extraction de mitochondries de levure par le carbonate de sodium.**

Les deux fractions résultantes (culot et surnageant) sont analysées par Western blot avec les anticorps  $\alpha$ -yOm14 (1:2000),  $\alpha$ -yAnc2 (1:2000) et  $\alpha$ -yAco (1:3000), après électrophorèse SDS-PAGE.

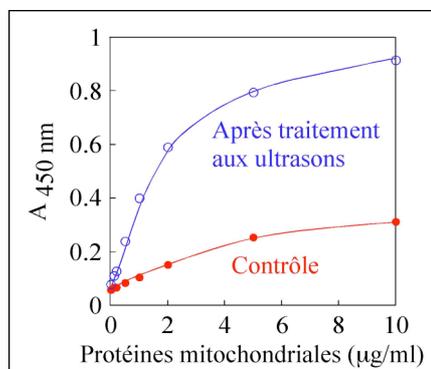
L’exploration de banques de données a permis d’identifier une dizaine d’homologues de la protéine yOm14 parmi différentes espèces de levure (Klein, non publié ; cf Tableau 11).

<b>Souche de levure</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Ashbya gossypii</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Candida albicans</i>
<b>N° dans les bases de données</b>	YBR230c	XP_445253.1	NP_982719.1	Q6CKL4	XP_718428.1
<b>Souche de levure</b>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
<b>N° dans les bases de données</b>	XP_456742.1	Q6C5W8	XP_748937.1	EAT87024.1	XP_001215538.1

**Tableau 11 : Identification des homologues de yOm14 parmi les espèces de levure.**

#### **IV.B.2. Immunoréactivité de $\gamma$ Om14.**

L’immunoréactivité de l’extrémité C-terminale de  $\gamma$ Om14 a été étudiée par la technique ELISA, en utilisant les anticorps  $\alpha$ - $\gamma$ Om14 dirigés contre cette partie de la protéine. Les mesures, effectuées sur des mitochondries fraîchement isolées puis perméabilisées ou non par traitement aux ultrasons (cf Figure 22), indiquent clairement que l’extrémité C-terminale de la protéine  $\gamma$ Om14 n’est accessible aux anticorps correspondants que si les mitochondries sont perméabilisées. Des résultats similaires sont d’ailleurs obtenus lorsque la perméabilisation est induite soit par des cycles de congélation-décongélation soit par choc osmotique. La fixation des anticorps sur les mitochondries perméabilisées augmente avec la quantité de protéines mitochondriales totales adsorbées dans les puits jusqu’à atteindre un plateau, ce qui montre bien la validité des mesures. La faible accessibilité résiduelle observée au niveau des mitochondries de contrôle, pourtant censées être intactes car fraîchement isolées, peut s’expliquer quant à elle par la perméabilisation de quelques-unes d’entre elles lors de leur isolement.

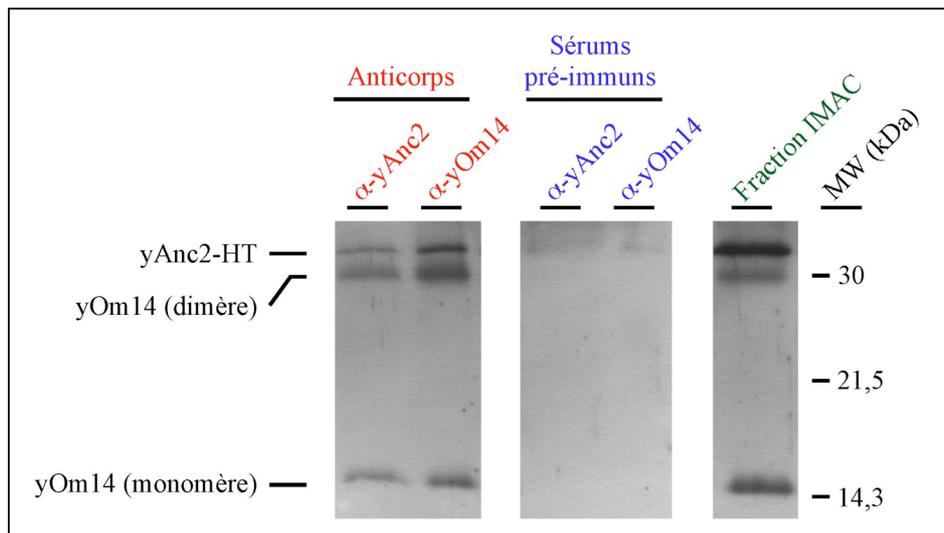


**Figure 22 : Immunoréactivité de l’extrémité C-terminale de  $\gamma$ Om14.**

Comme la protéine  $\gamma$ Om14 est située dans la membrane externe, l’ensemble de ces résultats indique que son extrémité C-terminale se trouve dans l’espace intermembranaire, ce qui est en accord avec les conclusions des études de protéolyse de la protéine de fusion  $\gamma$ Om14-GFP (Burri et al., 2006). Nous nous sommes également intéressés à l’effet de la conformation du transporteur d’ADP/ATP sur l’immunoréactivité de l’extrémité C-terminale de  $\gamma$ Om14. Quelques expériences, malheureusement non reproductibles, ont clairement montré une réponse différente de  $\gamma$ Om14 aux anticorps, selon que le transporteur  $\gamma$ Anc2-HT avait été préalablement incubé en présence de carboxyatractyloside ou d’acide bongkrélique.

### **IV.C. Interaction de yOm14 avec le transporteur yAnc2-HT.**

Nous avons voulu confirmer l’interaction entre les deux protéines yOm14 et yAnc2-HT, fortement suggérée par leur co-purification par chromatographie sur colonne d’hydroxyapatite et par chromatographie d’affinité sur résine Ni-NTA. Cette interaction physique a été prouvée par des expériences de co-immunoprécipitation (cf Figure 23), initiées par Christelle Fiore et menées à partir de lysats mitochondriaux ou bien de fractions protéiques collectées en sortie des deux étapes chromatographiques de purification de yAnc2-HT. Les fractions qui contiennent les protéines solubilisées par du détergent ont été mises en contact avec l’anticorps  $\alpha$ -yAnc2 (1:500) puis le complexe immun formé a été retenu sur des billes d’agarose sur lesquelles la protéine A est greffée. Son analyse par Western blot après SDS-PAGE a bien sûr permis de détecter la protéine yAnc2-HT, mais aussi yOm14 sous ses formes monomérique et dimérique. De la même manière, l’utilisation de l’anticorps  $\alpha$ -yOm14 (1:250) montre la présence d’un complexe immun formé de yOm14, mais aussi du transporteur yAnc2-HT. Lorsque sont utilisés les sérums pré-immuns au lieu des anticorps, aucune protéine n’est détectée par Western blot, ce qui prouve la validité des expériences de co-immunoprécipitation et donc la spécificité des interactions mises en évidence.



**Figure 23 : Co-immunoprécipitation de yOm14 et de yAnc2-HT.**

Dans le cas présent, le transporteur yAnc2-HT a été purifié sous forme de complexe avec le CATR, et la co-immunoprécipitation a été effectuée à partir de la fraction protéique collectée après chromatographie d’affinité IMAC. Les résultats sont identiques lorsque l’expérience est réalisée à partir de lysats mitochondriaux. Pour la détection par Western blot, un mélange des deux anticorps  $\alpha$ -yAnc2 (1:2000) et  $\alpha$ -yOm14 (1:2000) a été utilisé.

La recherche d’effets conformationnels sur ces interactions, imposés au transporteur yAnc2-HT par la présence de carboxyatractyloside ou d’acide bongkrékique, n’a pas abouti. Ce résultat ne confirme donc pas les observations de l’abondance variable de la protéine yOm14 dans les fractions enrichies en yAnc2-HT en fonction de la présence de l’un ou de l’autre de ces deux inhibiteurs.

#### **IV.D. Bilan.**

Les expériences présentées ci-dessus nous ont permis de prouver l’existence d’une interaction physique entre deux protéines mitochondriales co-purifiées lors de deux étapes chromatographiques : le transporteur d’ADP/ATP et la protéine de fonction inconnue yOm14, situés respectivement dans la membrane interne et dans la membrane externe de la mitochondrie (article actuellement en cours de soumission). Bien que ces expériences ne montrent pas clairement de lien entre la conformation de yAnc2-HT et l’intensité de son interaction avec yOm14, quelques immunodétections par ELISA, ainsi que les résultats préliminaires de co-purification, semblent quant à eux indiquer des différences d’interaction entre les deux partenaires suivant l’inhibiteur employé pour stabiliser le transporteur sous forme de complexe. Ces données, qui pourraient soutenir l’hypothèse d’un rôle de modulation de la protéine yOm14 sur l’activité d’échange du transporteur, doivent être confirmées et affinées. Le rôle probable de yOm14 sera discuté plus en détail dans la partie VI.



# **Partie V**



## **Résultats : Purification de la porine yVDAC1 de *S. cerevisiae***



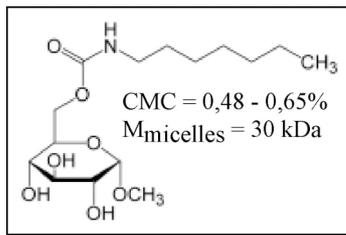
# Partie V – Résultats : Purification de la porine yVDAC1 de *S. cerevisiae*

## **V.A. Purification de la porine yVDAC1.**

Dans la membrane externe de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, il existe deux isoformes de VDAC, l'isoforme yVDAC1 étant la plus abondante, mais aussi la seule à avoir une fonction de pore (Blachly-Dyson et al., 1997). La structure primaire de yVDAC1, déduite de sa séquence nucléotidique (Mihara et Sato, 1985), consiste en une chaîne polypeptidique longue de 282 acides aminés, la méthionine initiale étant clivée dans la protéine mature. C'est donc une protéine de masse moléculaire proche de 30 kDa.

### **V.A.1. Choix de l'Hécameg.**

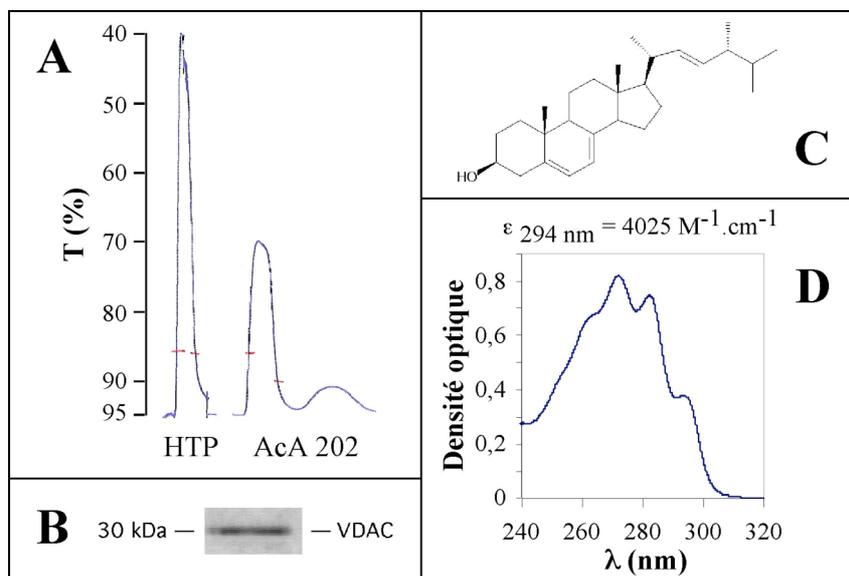
Au laboratoire, le criblage systématique de détergents a été couplé à des chromatographies sur colonne d'hydroxyapatite dans le but de solubiliser et d'isoler des transporteurs mitochondriaux de la levure *S. cerevisiae*. Ces travaux ont montré qu'en utilisant l'Hécameg, une seule protéine était présente dans la fraction non-retenue. Nous l'avons identifiée par immunodétection et par microséquençage comme étant la porine yVDAC1 de la membrane externe des mitochondries. Le 6-*O*-(*N*-Heptylcarbamoyle)-methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, appelé plus simplement Hécameg (Plusquellec et al., 1989), est distribué notamment par la société VEGATEC. C'est un détergent non-ionique qui présente une tête hydrophile de type glucoside et peut donc être dosé suivant la méthode colorimétrique dite de l'anthrone (Jermyn, 1975). Ses principales caractéristiques physico-chimiques sont résumées sur la Figure 24 : il faut noter sa haute CMC, qui devrait faciliter son élimination sous forme de monomères par dialyse ou grâce à un concentrateur adapté. Actuellement, au niveau d'approches structurales, seul le complexe III de la chaîne respiratoire a été cristallisé en présence d'Hécameg (Iwata et al., 1998).



**Figure 24 : Principales caractéristiques physico-chimiques de l'Hécameg.**

La CMC du détergent est déterminée par fluorimétrie (Begona Ruiz et al., 1994). La masse moléculaire des micelles est déduite du nombre d'agrégation micellaire  $N$ , obtenu par extinction de fluorescence résolue dans le temps (Aoudia et Zana, 1998).

Nous avons exploité et développé l'utilisation de l'Hécameg dans le but de tenter la cristallisation de la porine  $\gamma$ VDAC1. Ainsi, des mitochondries isolées à partir de cellules de *S. cerevisiae* (souche W303-1B) cultivées en milieu YPL sont lysées à froid dans un tampon salin par l'Hécameg à 5% (m/v), concentration finale permettant de solubiliser efficacement  $\gamma$ VDAC1. La fraction collectée après l'étape de chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite (cf Figure 25A), réalisée dans un tampon contenant 0,7% (m/v) Hécameg, ne contient que la porine  $\gamma$ VDAC1, apparaissant sous la forme d'une seule bande protéique vers 30 kDa sur un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes (cf Figure 25B). Ainsi  $\gamma$ VDAC1 peut être purifiée en une seule étape chromatographique.



**Figure 25 : Analyses menées sur la fraction purifiée contenant  $\gamma$ VDAC1.**

A : Mesure continue de l'absorption UV à 280 nm en sortie de colonne HTP puis de colonne AcA 202. Les fractions collectées correspondent aux pics d'absorption (entre les traits rouges). B : Après chromatographie sur colonne HTP, une seule bande est visible à 30 kDa sur un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes coloré au bleu de Coomassie. C : Structure chimique de l'ergostérol. D : Le spectre d'absorption de la fraction purifiée après chromatographie sur colonne AcA 202, caractéristique de l'ergostérol, indique la présence de ce lipide, à raison de 0,65 g/ g de  $\gamma$ VDAC1. La quantité d'ergostérol est déduite du spectre d'absorption, à 294 nm. Celle de  $\gamma$ VDAC1 est obtenue par dosage des protéines au BCA, car le pic d'absorption de la protéine à 280 nm est masqué par celui de l'ergostérol.

### **V.A.2. Présence d'ergostérol dans la fraction protéique purifiée.**

La fraction contenant la porine yVDAC1 purifiée renferme une quantité importante d'ergostérol, évaluée à 0,65 g/ g de protéine à partir du spectre d'absorption de ce lipide (cf Figure 25, C et D), ou encore à 50 mol/ mol de protéine. La concentration de yVDAC1, proche de 0,1 mg/ml en sortie de colonne d'hydroxyapatite, est trop faible pour entreprendre des essais de cristallisation, qui nécessitent habituellement une concentration minimale de 5 mg de protéine /ml. Malheureusement, yVDAC1 précipite en partie lors des étapes de concentration, effet qui a été attribué à l'élimination d'une partie du détergent lors de la concentration de yVDAC1 sur un concentrateur de seuil de coupure égal à 30 kDa. La précipitation est également observée lorsque la concentration est effectuée grâce à une membrane de seuil de coupure inférieur, égal à 10 kDa seulement, ce qui exclut que l'Hécameg soit éliminé sous forme de micelles. Le dosage de l'Hécameg dans les fractions concentrées indique qu'après concentration d'un facteur 180 en volume ou seulement 60 en concentration de protéine en raison des pertes protéiques importantes survenant lors de l'étape de concentration, celui-ci est à la concentration de 38% (m/v) environ, donnant un rapport massique détergent/protéine égal à 60 (équivalent également à un rapport molaire détergent/protéine supérieur à 5000). La quantité d'Hécameg est donc *a priori* suffisante pour maintenir en solution une protéine dépourvue d'ergostérol, puisque généralement le rapport massique détergent/protéine membranaire ne dépasse pas 4 (Moller et Le Maire, 1993). Mais lorsque la fraction contient des quantités d'ergostérol importantes, celui-ci précipite en entraînant simultanément la précipitation de la porine.

Ainsi toute concentration de la porine yVDAC1 après chromatographie est impossible sans éliminer une grande partie de l'ergostérol, même si les stérols semblent jouer un rôle primordial pour la fonction des porines (Popp et al., 1995). Il nous a donc fallu éliminer l'ergostérol de nos préparations protéiques purifiées. Dans ce but, nous avons testé tout un panel de méthodes, décrites tout au long de cette partie V. Pour plus de clarté, un tableau récapitulatif se trouve à la partie V.F.

## **V.B. Elimination de l'ergostérol par extraction.**

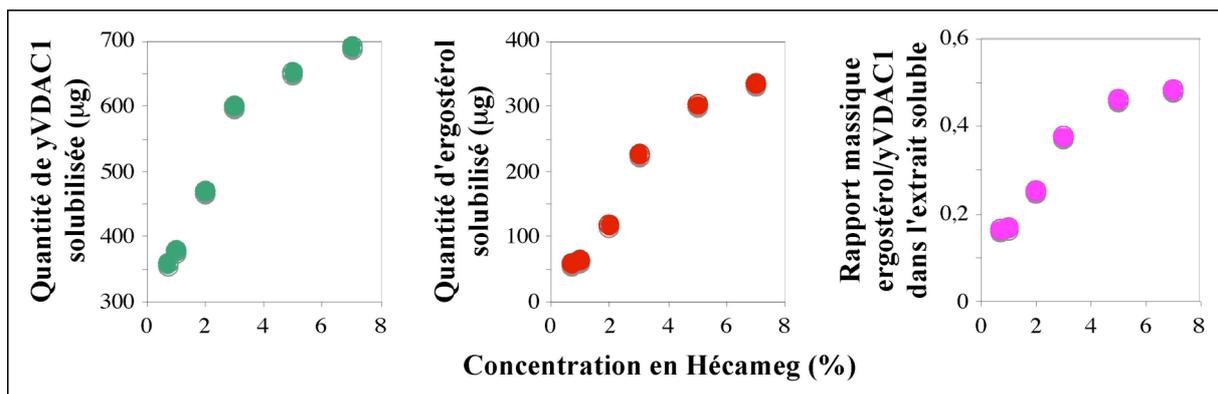
Les premières tentatives d'élimination de l'ergostérol ont été réalisées par différents types d'extraction, soit directement sur les membranes mitochondriales, avant solubilisation de yVDAC1 par l'Hécameg, soit sur la fraction obtenue après purification. Une partie de mes travaux a visé à rechercher des méthodes d'extraction efficaces, sachant que l'ergostérol est présent en très grande quantité dans les membranes mitochondriales. En effet, il est connu que les stérols représentent entre 1 et 10% du total des lipides de la levure *S. cerevisiae*, et que l'ergostérol est parmi eux le stérol majoritaire (Le Fur et al., 1999).

### **V.B.1. Extraction par un solvant organique.**

Les premières expériences d'extraction de l'ergostérol se sont focalisées sur l'utilisation d'un solvant organique, le méthanol. Les mitochondries fraîchement décongelées sont ainsi traitées par du méthanol puis sédimentées. Tandis que le culot est resuspendu dans de l'eau pour être à nouveau traité par du méthanol, le spectre d'absorption du surnageant est examiné afin de suivre l'efficacité de l'extraction méthanolique. Au bout de quatre extractions successives, alors que les spectres d'absorption montrent l'absence d'ergostérol dans les extraits, le culot est resuspendu dans le milieu de lyse et la purification de yVDAC1 se déroule de la même manière que décrit précédemment (cf partie V.A.1.). Après chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite, le spectre d'absorption de la fraction non-retenue montre que l'ergostérol n'a pas été entièrement extrait par le méthanol. De plus les dosages protéiques au BCA indiquent qu'il n'y a quasiment plus de protéine en fin de purification, ceci étant peut-être dû à une mauvaise solubilisation de yVDAC1 après les traitements drastiques au méthanol. Des essais similaires de traitement des mitochondries par un mélange méthanol-chloroforme (1:2) ont permis une meilleure extraction de l'ergostérol, mais là encore avec une perte de protéine importante. Cette voie de traitement des mitochondries a donc été rapidement abandonnée.

**V.B.2. Extraction différentielle par un détergent.**

Nous avons tenté une solubilisation différentielle de l'ergostérol, en employant, dans une première étape de solubilisation, une faible concentration de détergent. La protéine d'intérêt devait être solubilisée lors d'une seconde étape de lyse à une plus forte concentration de détergent. Nous avons ainsi mis en oeuvre une étape de préextraction des membranes mitochondriales par le  $\beta$ OG à 2% (m/v), identique à celle utilisée dans la méthode de purification de yVDAC1 proposée initialement (Forte et al., 1987). Malheureusement, dans ces conditions, il reste encore environ 22  $\mu$ g/ml d'ergostérol en sortie de colonne HTP, et la moitié de la protéine a été éliminée lors de l'étape de préextraction, ce qui donne une quantité de 0,57 g d'ergostérol /g de yVDAC1.



**Figure 26 : Solubilisation des membranes mitochondriales par l'Hécameg.**

Des mitochondries fraîchement décongelées sont solubilisées à 0°C par ajout d'Hécameg dans un tampon composé de 10 mM Tris-HCl, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 1mM DFP et du cocktail d'antiprotéases (cf partie II.C.8.1.), à pH 7,3.

Abandonnant le  $\beta$ OG, nous avons choisi, dans des essais complémentaires, d'utiliser un seul et unique détergent pour tout le protocole de purification de yVDAC1. En effet, lors de la purification de yVDAC1 en 1988 (Ludwig et al., 1988), le détergent utilisé lors de la préextraction des membranes mitochondriales était le même détergent que celui utilisé par la suite, mais à une concentration nettement inférieure. Avant de mettre en oeuvre une étape de préextraction par l'Hécameg, nous avons décidé dans un premier temps d'étudier les capacités d'extraction de l'ergostérol et de yVDAC1 par l'Hécameg. Pour cela les mitochondries ont été solubilisées, à la concentration protéique de 10 mg/ml, par différentes concentrations d'Hécameg allant de 0,7 à 7% (m/v), puis soumises à une chromatographie sur colonne

d'hydroxyapatite. Les fractions non-retenues ont ensuite été analysées (cf Figure 26) : les quantités d'ergostérol présent en fin de purification ont été comparées en mesurant la hauteur du pic caractéristique à 294 nm sur les spectres d'absorption, tandis que les concentrations protéiques ont été déterminées par dosage au BCA. Le tracé du rapport ergostérol/protéine indique qu'une préextraction des mitochondries par l'Hécameg conduirait à une perte importante de protéine. La préextraction des membranes mitochondriales par un détergent n'est donc pas une solution adaptée pour éliminer l'ergostérol.

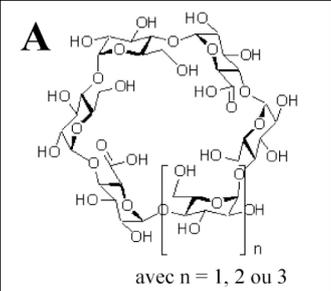
### **V.B.3. Extraction par la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine.**

Plusieurs composés sont connus pour interagir avec les stérols, notamment la digitonine (Paila et al., 2005) et certains antifongiques de la famille des macrolides polyéniques comme la filipine (Loura et al., 2001) et l'amphotericine B (Gabrielska et al., 2006), qui forment avec eux des complexes mais ne permettent malheureusement pas de les extraire des membranes. Au contraire, certaines molécules appartenant à la famille des cyclodextrines présentent cette propriété, et en particulier la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine.

#### **V.B.3.1. Principales caractéristiques des cyclodextrines.**

Les cyclodextrines (CDs) sont des oligosaccharides cycliques qui comptent à l'état naturel entre six et huit unités D-(+)-glucopyranose liées entre elles par des liaisons glucosidiques en  $\alpha$ -(1,4) : ce sont les  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -cyclodextrines (cf Figure 27A). En forme de tore, les cyclodextrines possèdent une cavité interne lipophile et une surface externe hydrophile, ce qui leur permet d'interagir avec de nombreuses molécules hydrophobes, voire insolubles, et de former ainsi des complexes solubles d'inclusion, non-covalents, avec une stoechiométrie 1:1. Elles sont notamment utilisées pour transporter et délivrer des médicaments (pour revue, voir Challa et al., 2005). De nombreuses études se sont focalisées sur la capacité des cyclodextrines à extraire le cholestérol ou à l'insérer dans des membranes lipidiques (Christian et al., 1997) : l'efficacité de ce phénomène est due à la possibilité d'un transfert direct du cholestérol, depuis les membranes vers les cyclodextrines et inversement, sans passer par des intermédiaires en phase aqueuse. Les cyclodextrines diffèrent par la taille

de leur cavité et par leur solubilité (cf Figure 27B) : ainsi la  $\beta$ -CD possède une grande affinité pour les stérols, mais sa solubilité en milieu aqueux est faible. Plusieurs dérivés ont donc été synthétisés pour améliorer ses propriétés physico-chimiques ainsi que ses capacités de formation de complexe avec les stérols, notamment la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine. C'est cette molécule que nous avons choisie pour extraire l'ergostérol des membranes mitochondriales.

A	B			
 <p>avec n = 1, 2 ou 3</p>	Type de CD	Diamètre de la cavité (Å)	Masse moléculaire (Da)	Solubilité (g/100 ml)
$\alpha$ -CD	4,7 - 5,3	972	14,5	
$\beta$ -CD	6,0 - 6,5	1135	1,85	
$\gamma$ -CD	7,5 - 8,3	1297	23,2	
$\delta$ -CD	10,3 - 11,2	1459	8,19	

**Figure 27 : Caractéristiques des cyclodextrines.**

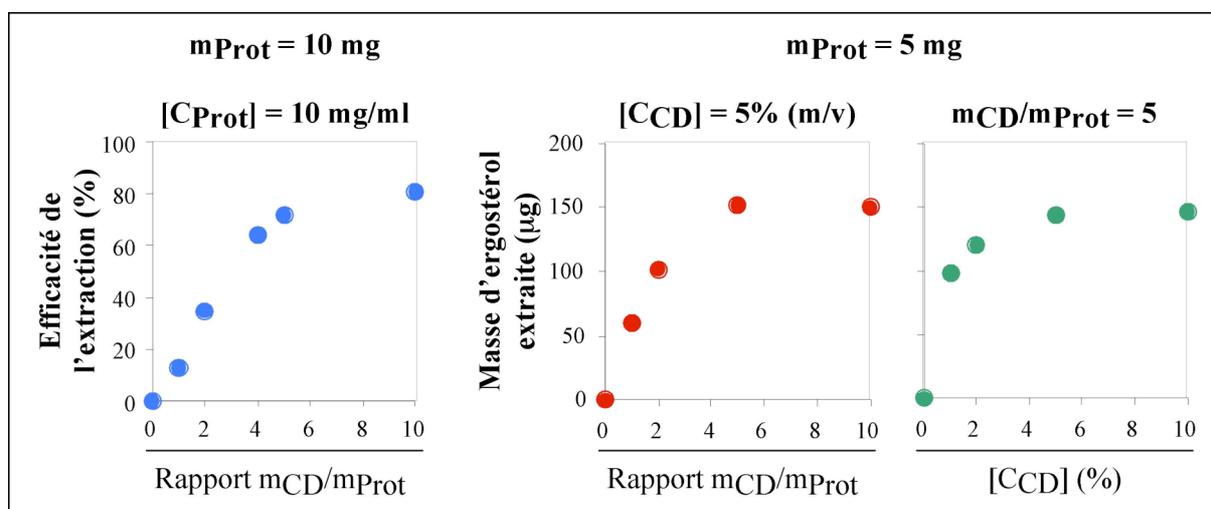
A : Structure chimique des trois cyclodextrines naturelles. B : Quelques caractéristiques physiques des cyclodextrines.

### V.B.3.2. Bilan des expériences d'extraction par la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine.

Après un choc osmotique hypotonique et une centrifugation destinée à éliminer dans le surnageant les nucléotides et autres molécules solubles contenues dans les mitochondries, le culot membranaire est extrait par la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine dans différentes conditions. Après une nouvelle centrifugation, les quantités d'ergostérol extrait sont comparées en mesurant la hauteur du pic caractéristique à 294 nm présent sur les spectres d'absorption du surnageant (cf Figure 28, panneaux de droite). Le culot peut quant à lui être solubilisé par 5% (m/v) Hécameg puis purifié sur colonne d'hydroxyapatite dans les conditions standard (cf partie II.C.8.3.) : les quantités d'ergostérol présent dans la fraction purifiée sont déterminées grâce au spectre d'absorption de celle-ci, et comparées au spectre obtenu dans le cas contrôle où le culot membranaire est extrait par de l'eau, en l'absence de méthyl- $\beta$ -cyclodextrine, ce qui permet de déterminer dans chaque cas l'efficacité de l'extraction surnageant (cf Figure 28, panneau de gauche).

Nous avons traité par la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine des échantillons contenant une masse constante de protéines totales mitochondriales, en faisant varier la concentration en protéines

totales mitochondriales ainsi que la masse et la concentration en méthyl- $\beta$ -cyclodextrine. En analysant l'évolution du rendement de l'extraction en fonction du rapport massique cyclodextrine/protéine noté  $m_{CD}/m_{Prot}$ , nous déterminons la masse de méthyl- $\beta$ -cyclodextrine optimale pour l'extraction de l'ergostérol en fonction de la masse de protéines totales mitochondriales de la fraction, qui est logiquement reliée à la masse d'ergostérol présent dans cette même fraction. Par ailleurs, en maintenant fixe le rapport massique  $m_{CD}/m_{Prot}$ , nous déterminons la concentration en méthyl- $\beta$ -cyclodextrine optimale pour l'extraction de l'ergostérol, et donc le volume total dans lequel doit avoir lieu l'extraction.



**Figure 28 : Etude systématique de l'extraction de l'ergostérol par la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine.**

Des mitochondries fraîchement décongelées sont diluées à  $0^\circ\text{C}$  dans un milieu hypotonique composé de 10 mM Tris-HCl, 1mM DFP et du cocktail d'antiprotéases (cf partie II.C.8.1.), à pH 7,3. Après ultracentrifugation (100000 g, 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ), le culot membranaire est extrait par la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine dans différentes conditions de volume et de concentration.  $m_{Prot}$  et  $m_{CD}$ ,  $[C_{Prot}]$  et  $[C_{CD}]$  sont respectivement les masses et les concentrations de protéines totales mitochondriales et de méthyl- $\beta$ -cyclodextrine.

Les résultats de cette étude systématique sont synthétisés à la Figure 28. Ils indiquent logiquement que des quantités croissantes de méthyl- $\beta$ -cyclodextrine dans le milieu, et donc des concentrations croissantes de ce composé, augmentent l'efficacité d'extraction de l'ergostérol. Cependant, pour des raisons de coût, notamment en vue de purifier massivement de la protéine destinée aux tests de cristallisation, nous avons choisi d'employer une concentration en méthyl- $\beta$ -cyclodextrine et un rapport massique cyclodextrine/protéine limités respectivement à 5% (m/v) et à 5. Nous avons donc réalisé des essais de purification de  $\gamma$ VDAC1 en incluant une étape d'extraction des membranes par la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine, dans les conditions choisies ci-dessus. Il est intéressant de noter que la perte de protéine est

négligeable par rapport au rendement total d'une purification standard. Malheureusement, la fraction en sortie de colonne HTP contient encore de l'ergostérol, ce qui a là encore pour conséquence la précipitation de  $\gamma$ VDAC1 lors de l'étape de concentration.

#### **V.B.4. Extraction par le charbon actif.**

L'extraction de l'ergostérol contenu dans les membranes mitochondriales étant insuffisante lorsqu'elle est effectuée directement sur la fraction mitochondriale avant solubilisation, nous avons tenté d'extraire l'ergostérol dans la préparation protéique collectée après purification par chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite, et ce par traitement au charbon actif. En effet, ce composé est connu pour adsorber préférentiellement les molécules aromatiques. Cependant, si l'ergostérol a été efficacement adsorbé sur le charbon, la protéine l'a été aussi, ce qui nous a fait renoncer à utiliser cette méthode.

#### **V.C. Séparation de l'ergostérol et de $\gamma$ VDAC1 dans la fraction purifiée.**

Après les tentatives infructueuses d'extraction de l'ergostérol, nous avons tenté de séparer le lipide de la protéine d'intérêt, ce qui a été mis en œuvre après purification de  $\gamma$ VDAC1 dans les conditions standard (cf partie II.C.8.3.).

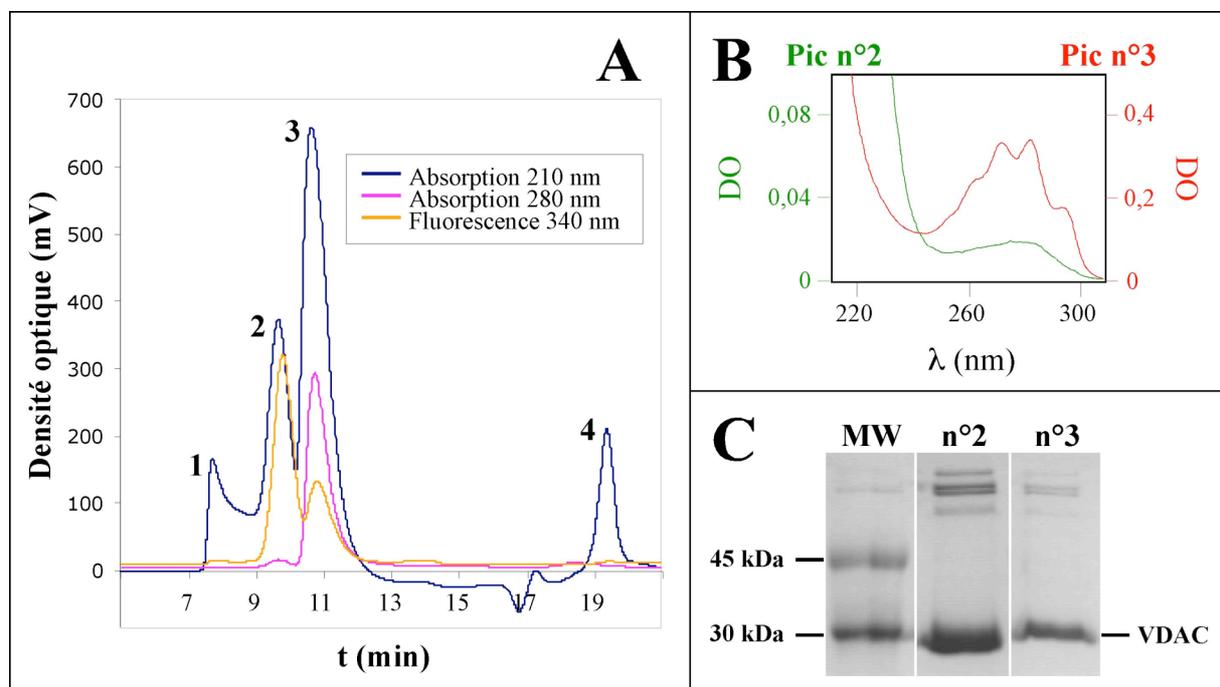
##### **V.C.1. Séparation par FPLC.**

###### **V.C.1.1. Principe de la méthode de séparation.**

Dans le but de séparer les constituants d'un mélange, la technique de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) s'avère souvent très efficace, comme cela a été décrit dans ce travail lors de la caractérisation du complexe transporteur-BA (cf partie III.B.3.). Nous avons utilisé la colonne Superdex 75 HR 10/30, équilibrée dans un tampon identique à celui utilisé pour la purification préalable de  $\gamma$ VDAC1 sur colonne d'hydroxyapatite, et contenant

donc 0,7% (m/v) Hécameg. L'analyse de la séparation est faite en ligne, la colonne étant reliée à un spectrophotomètre puis à un fluorimètre, ce qui nous permet d'obtenir un chromatogramme représentant l'évolution continue de l'absorption à 210 et 280 nm et de la fluorescence à 340 nm après excitation à 290 nm. Lors de mises au point préalables, n'ayant pas observé de différences majeures au niveau de la résolution en fonction du débit, nous avons décidé de fixer celui-ci à 1 ml/min.

### V.C.1.2. Caractérisation des pics du chromatogramme.



**Figure 29 : Séparation par FPLC et caractérisation des pics du chromatogramme.**

A : Chromatogramme obtenu après injection de protéine purifiée sur colonne Superdex 75 HR 10/30, présentant quatre pics principaux. La colonne est équilibrée dans le même tampon que celui utilisé pour la colonne d'hydroxyapatite. B : Analyse des pics n°2 et 3 par spectrométrie d'absorption. Le pic qui sera collecté est le pic n°2. C : Analyse des pics n°2 et 3 par électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes, après coloration au bleu de Coomassie. Les bandes de masse moléculaire élevée correspondent à des oligomères ou à des agrégats de  $\gamma$ VDAC1, ce qui a été vérifié par ailleurs par immunodétection. Elles ne sont pas détectées dans un lysat de mitochondries.

L'analyse de la fraction enrichie en  $\gamma$ VDAC1 obtenue après chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite nous permet de différencier quatre pics principaux, comme le montre la Figure 29A. Le premier, qui apparaît juste après le volume mort de la colonne, ainsi que le quatrième, sont détectés par absorption à 210 nm mais pas par fluorescence. Ils

correspondent probablement respectivement à l'Hécameg et aux nucléotides présents dans la fraction injectée, et ne présentent pas d'intérêt. En revanche les deux autres pics, relativement bien séparés, ont été collectés en sortie de FPLC puis caractérisés. Le pic n°2, de forte absorption à 210 nm, moindre à 280 nm, présente un niveau de fluorescence élevé. Son spectre d'absorption est caractéristique de protéine dépourvue d'ergostérol. L'analyse par électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes montrée sur la Figure 29C prouve qu'il s'agit de yVDAC1. Quant au troisième pic, il contient un mélange de porine et d'ergostérol : en effet son spectre d'absorption (cf Figure 29B) prouve la présence du lipide, responsable de l'importante absorption à 210 et à 280 nm, tandis que le gel d'électrophorèse indique que la fluorescence observée provient bien de yVDAC1, et plus particulièrement des deux résidus tryptophane que cette porine comporte.

#### V.C.1.3. Purification de yVDAC1 et caractérisation de la fraction purifiée.

La porine yVDAC1 contenue dans le second pic du chromatogramme, purifiée et dépourvue d'ergostérol, est collectée en sortie de colonne FPLC. Des dosages de la protéine avant et après FPLC indiquent qu'environ un tiers de la protéine injectée est perdue. Il s'agit pour une large part de la protéine qui se trouve dans le pic n°3, et qui n'est pas utilisable puisqu'elle est associée à l'ergostérol. Cependant, même si le rendement total de la purification s'en trouve affecté, la porine yVDAC1 peut ensuite être concentrée sans précipiter jusqu'à une concentration finale d'au moins 15 mg de protéines /ml, ce qui convient tout à fait pour des tests de cristallisation.

Au cas où cette méthode serait appliquée en routine, nous nous sommes posés la question de savoir quelle concentration d'Hécameg il vaudrait mieux employer lors de la solubilisation des mitochondries. En effet, le rendement protéique de la lyse est bien meilleur lorsque l'Hécameg est utilisé à 5% (m/v) plutôt qu'à seulement 2%, mais davantage d'ergostérol est simultanément solubilisé (cf Figure 26). Nous avons déterminé que, dans le cas d'une lyse à 5% Hécameg par rapport à une lyse à 2% Hécameg, bien que la proportion relative de protéine présente dans le pic n°2 par rapport au pic n°3 soit inférieure, la quantité totale de porine collectée dans le pic n°2 est supérieure en valeur absolue. Compte tenu de ces données, nous avons choisi d'opérer avec 5% Hécameg pour purifier yVDAC1 (cf partie II.C.8.3.).

Il convient de rappeler que la minimisation du rapport massique détergent/protéine a été un élément déterminant dans le cas de la cristallisation du complexe bAnc1-CATR en présence de LAPAO (Dahout-Gonzalez et al., 2003), les cristaux n'ayant pu être obtenus qu'au-dessous d'un rapport massique de 13 g de LAPAO /g de transporteur. Tandis que ce rapport est égal à 38 g d'Hécameg /g de porine dans la fraction protéique avant l'étape de chromatographie FPLC, il atteint 90 g /g de yVDAC1 dans la fraction correspondant au pic n°2, probablement à cause de la perte de protéine lors de la séparation et de l'apport d'Hécameg par le tampon de FPLC. Heureusement, lors de la concentration de la fraction protéique collectée en sortie de colonne FPLC, le rapport massique détergent/protéine diminue énormément. Le meilleur que nous ayons pu obtenir de cette manière est égal à 3, pour une concentration protéique de 6 mg/ml, ce qui est tout à fait correct. Cependant, pour une concentration plus élevée en yVDAC1, ce rapport est plutôt supérieur ou égal à 5.

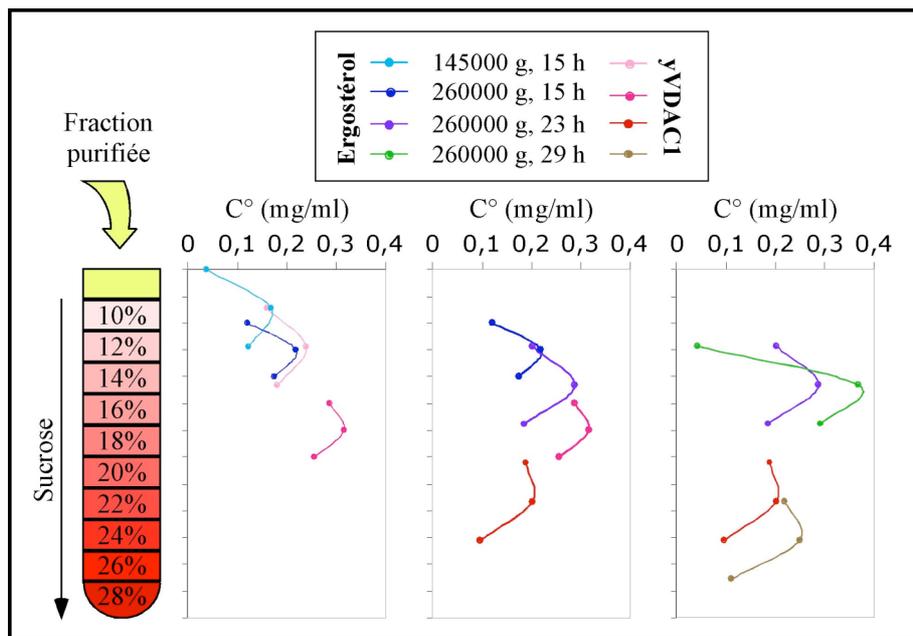
#### V.C.1.4. Limites de la méthode.

La méthode de séparation de l'ergostérol et de yVDAC1 par FPLC présente cependant des limites. En effet, bien que la fraction protéique collectée en sortie de colonne HTP soit préconcentrée avant cette étape, elle a encore un volume qui nécessite un grand nombre d'injections successives, puisqu'il ne peut être réduit en-dessous d'une valeur critique sous peine de perdre de la protéine soit directement par précipitation (du fait de la présence d'ergostérol) soit indirectement par diminution des capacités de résolution de la colonne. En effet, pour avoir une résolution optimale des pics n°2 et 3, il faut que le volume d'échantillon et que la quantité de protéine injectés soient les plus faibles possibles. L'utilisation d'une colonne de diamètre plus large (16 x 260 mm) permettrait certes d'injecter davantage de matériel mais avec le risque de séparations moins efficaces. En utilisant la colonne Superdex 75 HR 10/30, il est possible, à partir d'une culture de levures de 12 l (obtention d'environ 600 mg de protéines mitochondriales totales), de récupérer 5 mg de porine yVDAC1 purifiée et concentrée à 10 mg/ml, ce qui permettrait de tester environ 2500 conditions de cristallisation en gouttes de 200 nl grâce à un dispositif robotisé. Ce résultat est tout à fait convenable, mais comme une injection ne permet de collecter que 80 µg de porine, la purification de la totalité

de yVDAC1 nécessiterait environ 60 injections. Cette méthode de séparation apparaît donc trop lourde pour être appliquée à des purifications à grande échelle.

### V.C.2. Séparation par ultracentrifugation sur gradient de sucrose.

Les constituants d'un mélange en solution ont des caractéristiques physiques et hydrodynamiques différentes (masse moléculaire, densité, forme, etc...), ce qui fait que, soumis à un champ de force centrifuge, ils vont se déplacer à des vitesses différentes dans un milieu de densité donnée. C'est sur ce principe que repose la séparation par ultracentrifugation. L'utilisation d'un gradient de densité limite les phénomènes de diffusion par convection et par perturbations mécaniques. Nous avons employé cette méthode pour tenter de séparer efficacement yVDAC1 de l'ergostérol associé.



**Figure 30 : Séparation de yVDAC1 et de l'ergostérol par ultracentrifugation.**

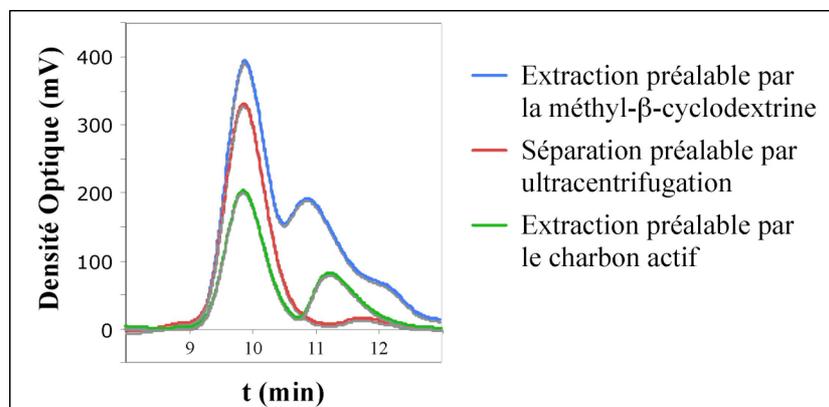
Chaque solution de sucrose contient 10 mM Tris-HCl à pH 7,3 et 0,7% (m/v) Hécameg. Les quantités de porine et d'ergostérol présentes dans les fractions provenant du gradient de densité sont déterminées respectivement par dosage des protéines et par mesure de la hauteur du pic caractéristique à 294 nm sur le spectre d'absorption. Pour des raisons de clarté, seuls les sommets des principaux pics sont représentés sur cette figure.

Après ultracentrifugation, les contenus des tubes sont fractionnés et les concentrations de yVDAC1 et d'ergostérol présents dans chaque fraction sont déterminées respectivement par dosage des protéines au BCA et par la mesure de la hauteur du pic caractéristique de

l'ergostérol à 294 nm. Dans le cas d'un gradient allant de 2 à 20% (m/v) de sucrose, l'ergostérol et la protéine sédimentent à la même vitesse. L'utilisation d'un gradient de densités plus élevées, contenant de 10 à 28% (m/v) de sucrose, permet de meilleures séparations, que nous avons cherché à optimiser en modifiant la vitesse de centrifugation puis sa durée (cf Figure 30). Les meilleurs résultats ont été obtenus après ultracentrifugation à 260000 g pendant 29 h. Cependant il est possible que la protéine ne supporte pas une telle durée de purification et perde tout ou partie de sa structure tertiaire avant d'être soumise aux tests de cristallisation.

### **V.C.3. Séparation par FPLC après élimination préalable de l'ergostérol.**

Nous avons tenté de combiner les méthodes d'élimination de l'ergostérol n'entraînant pas de perte importante de protéine, c'est-à-dire soit l'extraction par la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine, soit la séparation par ultracentrifugation sur gradient de sucrose, à la séparation additionnelle de ces constituants par FPLC.



**Figure 31 : Chromatogrammes obtenus après élimination partielle de l'ergostérol.**

Ces courbes représentent le suivi continu de la fluorescence à 340 nm en sortie de colonne FPLC, après injection de fractions préalablement purifiées et traitées dans le but d'éliminer partiellement l'ergostérol. Chacune d'elle correspond à des quantités comparables de protéines mitochondriales initiales (10 mg). Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites pour la Figure 29.

Les chromatogrammes montrant l'analyse par fluorescence à 340 nm des séparations obtenues sont représentés sur la Figure 31. Les fractions collectées en sortie de colonne Superdex 75 HR 10/30 sont analysées comme cela a déjà été décrit. A titre de comparaison figure aussi le chromatogramme obtenu après extraction préalable de l'ergostérol par le

charbon actif, qui met en évidence la perte en protéine qu'entraîne la mise en œuvre de cette méthode. L'élimination préalable d'ergostérol par la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine, et plus particulièrement celle par ultracentrifugation, permettent de récupérer, après FPLC, des quantités équivalentes de yVDAC1 purifiée et dépourvue d'ergostérol. Malheureusement, les limites de la méthode de séparation par FPLC exposées précédemment s'appliquent aussi dans le cas présent, ne permettant pas d'envisager des purifications de porine à grande échelle dans ces conditions.

#### **V.C.4. Rétention de yVDAC1 sur une colonne.**

Pouvoir retenir sélectivement la protéine yVDAC1 sur une colonne permettrait éventuellement de résoudre le problème de l'élimination de l'ergostérol, par lavage extensif de la colonne. Pour cela, nous avons tenté, mais sans succès, de retenir yVDAC1 en présence d'Hécameg sur plusieurs supports différents, comme une colonne Fractogel TSK AF-Red, ou des colonnes échangeuses d'ions CM52 et SP-Sepharose-FF. Dans une autre stratégie, nous avons purifié yVDAC1 par élution différentielle de la colonne HTP en employant successivement deux détergents différents. Les mitochondries, après solubilisation en présence d'un premier détergent, sont déposées sur colonne HTP équilibrée dans ce même détergent. Nous avons utilisé le LDAO, détergent de la famille des aminoxides déjà utilisé pour la purification de l'isoforme 1 de la porine bovine (De Pinto et al., 1989). Dans ces conditions, la fraction non-retenue ne contient pas de porine : celle-ci reste donc fixée sur la colonne, qui est alors lavée extensivement par le tampon d'équilibration afin d'éliminer l'ergostérol. Puis une solution contenant 5% (m/v) d'Hécameg, déposée à la surface de la colonne et ayant légèrement pénétré à l'intérieur de celle-ci, permet un échange de détergent *in gel*. La porine yVDAC1 purifiée est alors éluée par le tampon standard contenant 0,7% (m/v) Hécameg. Cependant, comme le montre le spectre de l'éluat, identique à celui de la Figure 25D, elle est toujours co-éluée avec de l'ergostérol, ce qui rend cette méthode d'élimination du lipide inadaptée.

L'échec des diverses méthodes biochimiques employées pour éliminer l'ergostérol des préparations de yVDAC1 nous a conduits à une approche par génie génétique. Nous avons adapté une méthode utilisée pour le transporteur mitochondrial d'ADP/ATP yAnc2 de la

levure *S. cerevisiae*, qui a été purifié par chromatographie d'affinité grâce à une étiquette polyhistidine (HT) greffée par génie génétique à son extrémité C-terminale (Fiore et al., 2000). Dans le cas du transporteur, il a été prouvé que l'ergostérol contenu dans la fraction collectée en sortie de colonne d'hydroxyapatite pouvait être totalement éliminé par cette étape de chromatographie d'affinité (cf partie IV.A.). Les chapitres suivants présentent les différentes méthodes employées pour la construction et la purification de la protéine yVDAC1-HT.

## **V.D. Expression de la porine yVDAC1-HT de *S. cerevisiae*.**

Au laboratoire, nous disposons de deux principaux organismes habituellement utilisés pour produire une protéine recombinante d'intérêt : la bactérie *Escherichia coli* et la levure *Saccharomyces cerevisiae*. La voie la plus classique est l'expression chez la bactérie, car c'est la plus facile à mettre en œuvre, malgré les problèmes posés par l'expression hétérologue de protéines membranaires (Laage et Langosch, 2001). C'est donc par elle que nous avons débuté les essais d'expression de la porine yVDAC1 fusionnée à une étiquette comportant 6 résidus His à son extrémité C-terminale.

### **V.D.1. Expression bactérienne de yVDAC1-HT.**

#### **V.D.1.1. Principe de la méthode.**

Le procédé que nous avons mis en œuvre consiste à insérer le gène *POR1* qui code pour yVDAC1 dans un plasmide adapté puis de le faire pénétrer dans la bactérie et d'induire la production de la protéine. Dans le cas de la porine yVDAC1-HT, il faut utiliser une souche de bactérie adaptée à la surexpression de protéines membranaires. En effet, après induction de l'expression d'une protéine membranaire qui lui est étrangère, une bactérie peut réagir de différentes manières : mourir rapidement si la protéine s'avère toxique, éliminer la protéine sous la forme de corps d'inclusion, ou tolérer cette protéine qui se trouvera alors insérée dans les membranes de la bactérie. Les deux derniers cas ne sont pas mutuellement exclusifs, la

protéine surproduite pouvant être retrouvée à la fois dans les membranes et dans les corps d'inclusion bactériens. Nous avons choisi d'utiliser la souche C43(DE3) de la bactérie *Escherichia coli*, spécifiquement sélectionnée pour sa capacité à accepter la surexpression de protéines membranaires, comme par exemple les transporteurs mitochondriaux bovins d'ADP/ATP et de phosphate (Miroux et Walker, 1996). Cette propriété peut être liée à la prolifération de membranes intracellulaires chez cette bactérie, observée notamment lors de la surexpression de la sous-unité membranaire b de l'ATP synthase de *E. coli*. Cette protéine pouvait alors représenter jusqu'à 80% du contenu protéique de ces membranes particulières (Arechaga et al., 2000).

#### V.D.1.2. Précédentes études d'expression de porines étiquetées.

Plusieurs équipes ont déjà décrit la construction et l'expression de porines fusionnées à une étiquette polyhistidine à leurs extrémités N- ou C-terminale. Les porines de *S. cerevisiae* et de *N. crassa* étiquetées en N-ter ont ainsi été construites, surexprimées sous la forme de corps d'inclusion par des bactéries BL21(DE3), renaturées, purifiées, et enfin reconstituées en bicouches lipidiques (Koppel et al., 1998). Leur analyse par dichroïsme circulaire a indiqué l'existence de différences entre les porines de différents organismes, suggérant la possibilité de structures secondaires modifiées. Leur caractérisation par des approches d'électrophysiologie, ainsi que celle de mutants chez lesquels manquent des fragments de séquence N-terminaux, montre la fonctionnalité des pores qu'elles forment dans les membranes artificielles et va dans le sens de l'existence d'une courte hélice  $\alpha$  transmembranaire à l'extrémité N-terminale (cf Figure 9B). Une approche similaire appliquée à la porine de *N. crassa* conclut quant à elle à un modèle topologique plus proche de celui présenté sur la Figure 9A (Popp et al., 1996). De plus, les auteurs remarquent que la porine ne semble guère sensible à la suppression de son extrémité C-terminale, ce qui est une indication favorable pour la construction d'une porine modifiée dans cette région peptidique. Ceci s'est vérifié avec la construction et la surexpression hétérologue en système bactérien de l'isoforme 1 de la porine humaine fusionnée à son extrémité C-terminale à une étiquette polyhistidine (Dolder et al., 1999). Cette étude a même permis d'obtenir des cristaux de protéine bidimensionnels, dont l'analyse par microscopie électronique indique que le diamètre du pore

est compatible avec un tonneau  $\beta$  formé de 12 à 16 brins  $\beta$ . C'est à partir de ces éléments prometteurs que nous avons entrepris l'expression bactérienne de yVDAC1-HT.

#### V.D.1.3. Construction et essais d'expression de yVDAC1-HT.

Le gène *PORI* codant spécifiquement pour la porine yVDAC1 est amplifié par PCR à partir de l'ADN nucléaire de la levure puis purifié. Outre une amplification, cette étape permet d'obtenir un gène dépourvu de codon STOP. Celui-ci est ensuite inséré par ligation aux sites de restriction NotI et NdeI du plasmide de surexpression commercial pET-22b(+) (Novagen, cf Figure 12), en aval du promoteur fort constitutif T7 des bactéries, et en amont de la séquence d'ADN codant pour une étiquette polyhistidine constituée de six résidus histidine. Ceci permettra de n'introduire dans la séquence protéique que quelques acides aminés entre l'extrémité C-terminale de yVDAC1 et l'étiquette HT, à savoir les résidus Ala-Ala-Ala-Leu-Glu. La transfection de la souche bactérienne DH5 $\alpha$  par ce vecteur conduit à des transformants sélectionnés sur milieu LB-ampicilline puis mis en culture et les plasmides qu'ils contiennent sont purifiés par Miniprep (Qiagen). Le séquençage des nucléotides contenus entre le promoteur T7 et le terminateur T7 confirme la présence du gène codant pour yVDAC1-HT.

Des bactéries C43(DE3), rendues compétentes par un traitement au chlorure de calcium, sont transformées par le vecteur codant pour la porine étiquetée. Les transformants d'abord sélectionnés sur milieu LB-ampicilline sont mis en culture dans le milieu LB-ampicilline liquide. Induite par ajout d'IPTG, l'expression plasmidique de la protéine est recherchée par Western blot à l'aide des anticorps  $\alpha$ -yVDAC1 (1:3000). La présence de yVDAC1-HT dans les bactéries n'a jamais pu être observée, malgré de nombreux essais faisant varier les conditions d'induction. L'utilisation d'un autre plasmide de surexpression, pET-15b(+), a conduit aux mêmes résultats négatifs. Il est intéressant de noter qu'un net ralentissement de la croissance bactérienne est observé après ajout d'IPTG dans le milieu, par comparaison avec la même souche transformée par le même plasmide dépourvu de gène inséré. Ceci indique que l'expression de la porine yVDAC1-HT est probablement toxique pour la bactérie. Nos essais n'ont pas été repris en changeant de souche bactérienne puisque

les bactéries C43(DE3), qui dérivent de la souche BL21(DE3), sont en principe les mieux adaptées à l'expression d'une protéine membranaire comme yVDAC1-HT.

### **V.D.2. Essais d'insertion génomique par recombinaison homologue.**

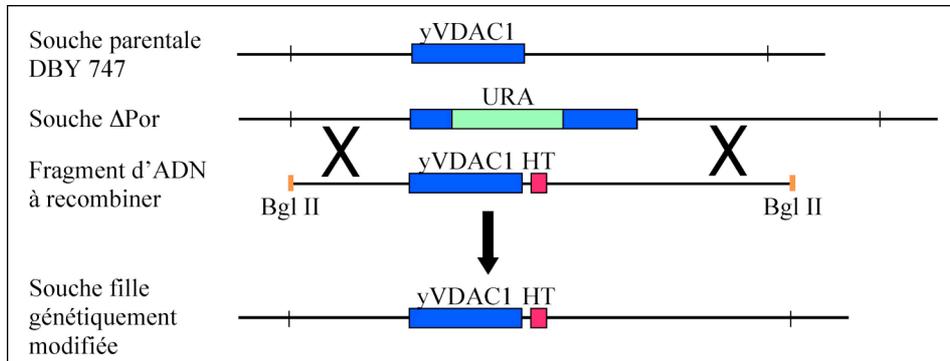
La porine yVDAC1-HT ne pouvant être exprimée chez la bactérie, probablement à cause de sa trop grande toxicité, il nous a fallu abandonner cette piste. Nous nous sommes donc tournés vers l'expression de yVDAC1-HT chez la levure *S. cerevisiae*.

#### **V.D.2.1. Principe de la recombinaison homologue.**

De même que la bactérie, la levure *S. cerevisiae* est un système classique d'expression de protéines, favorable dans notre cas puisqu'il s'agit d'un système d'expression homologue. Plutôt que d'employer un plasmide de surexpression, ce qui peut présenter quelques risques au niveau de la stabilité des souches dans le cas de la levure, nous avons préféré créer une nouvelle souche de levure génétiquement modifiée, stable. Cela nécessite d'insérer directement le gène codant pour yVDAC1-HT à la place de *PORI* dans le génome de *S. cerevisiae* par recombinaison homologue. Le principe de cette technique, utilisée de manière classique chez la levure, est rappelé sur la Figure 32.

Nous partons de la souche  $\Delta$ Por, qui dérive de la souche parentale DBY 747 dans laquelle le gène *PORI* a été interrompu par insertion d'une cassette d'auxotrophie URA3. Cette souche est transformée par le fragment d'ADN à recombinaison après avoir été rendue compétente. Pour favoriser la recombinaison homologue, celui-ci doit contenir au minimum les 250 paires de bases qui se trouvent de part et d'autre du gène d'intérêt et qui forment les régions dites flanquantes du gène. Dans notre cas, il n'est pas possible d'inclure plus de 310 pb du côté 5' du gène *PORI* à cause de la présence d'un transposon, mais en revanche la région flanquante peut s'étendre jusqu'à environ 500 pb du côté 3'. La recombinaison de l'ADN s'effectue au niveau de ces régions flanquantes, identiques dans le fragment à recombinaison et autour du gène *PORI* de la souche parentale. La nouvelle souche obtenue,

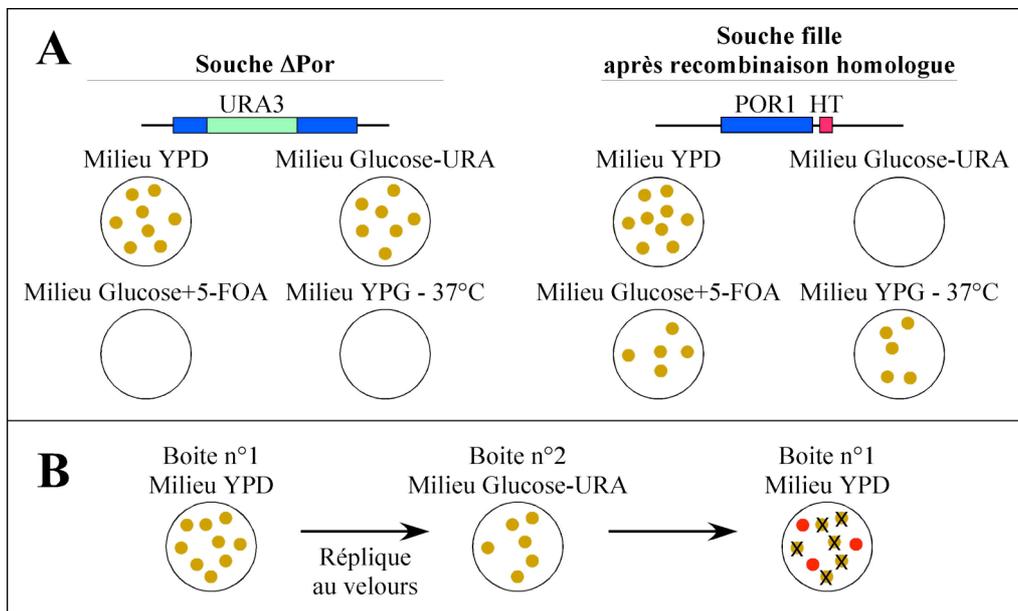
génétiquement modifiée, code pour yVDAC1-HT et ne possède plus la cassette d'auxotrophie URA3.



**Figure 32 : Principe de la recombinaison homologue.**

En bleu, en rose et en vert clair sont respectivement représentés le gène *POR1* codant pour yVDAC1, la séquence d'acides nucléiques codant pour l'étiquette polyhistidine et la cassette d'auxotrophie URA3.

V.D.2.2. Principe de la sélection des levures génétiquement modifiées.



**Figure 33 : Principe de la sélection des transformants.**

Sauf cas particulier précisé, les milieux solides sont incubés à 28°C. Les clones qui se développent sont figurés par des points de couleur ocre. A : Différences de croissance sur plusieurs milieux entre les souches avant et après recombinaison homologue. La sélection positive est donc possible sur milieu Glucose+5-FOA à 28°C et sur milieu YPG à 37°C. B : Principe de la sélection négative des transformants. Les clones à sélectionner sont représentés en rouge sur milieu YPD, les autres sont barrés car ils n'ont pas intégré le fragment inséré.

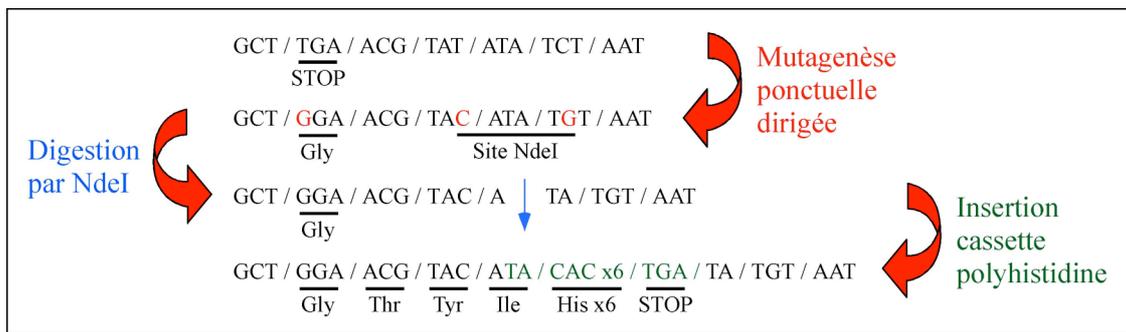
C'est sur la présence et l'absence de la cassette URA3, respectivement dans la souche parentale et dans la souche fille, qu'est basée la sélection des levures génétiquement modifiées après transformation par le fragment d'ADN à recombinaison. Il existe plusieurs méthodes de sélection (cf Figure 33). L'une, basée sur des répliques au velours d'un milieu riche vers un milieu carencé en uracile, est dite sélection négative. Les autres, qui permettent une sélection directe, soit sur milieu glucose contenant de l'acide 5-fluoroorotique (Glucose+5-FOA, cf partie II.A.2.) à 28°C (Boeke et al., 1984), soit sur milieu riche glycérol (YPG) à 37°C (Michejda et al., 1990), sont dites positives.

#### V.D.2.3. Construction en quatre étapes du fragment d'ADN à recombinaison.

Le fragment d'ADN à recombinaison est donc constitué du gène *POR1* suivi de nucléotides codant pour l'étiquette polyhistidine, le tout compris entre les régions flanquantes de *POR1*. Sa construction est entièrement réalisée dans le vecteur TOPO-Blunt-II (Invitrogen). L'amplification du gène *POR1* et ses régions flanquantes est effectuée par PCR à partir d'ADN nucléaire de levure. Les oligonucléotides sont choisis de manière à introduire deux sites de restriction BglIII de part et d'autre des domaines de recombinaison homologue. Le fragment résultant est inséré dans le plasmide TOPO-Blunt-II, avant de transférer des cellules commerciales TOP-10 (Invitrogen). Certains des transformants s'étant développés sur boîte LB-kanamycine ne possèdent que le vecteur vide, d'autres le vecteur contenant le gène inséré. Ils sont sélectionnés pour être contrôlés par séquençage.

Ce fragment doit être modifié dans le but de pouvoir insérer par la suite l'étiquette polyhistidine en aval de *POR1*, séparée par une séquence codant pour un bras espaceur de 4 acides aminés (cf Figure 34). Il faut donc introduire à la fois un nouveau site de restriction et éliminer le codon STOP, ce qui nécessite d'effectuer 3 mutations ponctuelles. Pour cela la totalité du vecteur est amplifiée par PCR selon le protocole du QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit, en présence de l'ADN polymérase Pfu Ultra. Après élimination de l'ADN parental méthylé et non muté par digestion par l'enzyme DpnI, le vecteur est utilisé pour transformer directement des cellules TOP-10. Les vecteurs contenus dans les transformants s'étant développés sur milieu LB-kanamycine sont purifiés et analysés : leur séquençage permet de vérifier la présence dans le gène inséré des seules mutations voulues.

Le vecteur muté est ensuite digéré par l'enzyme de restriction NdeI, puis déphosphorylé en présence de phosphatase alcaline pour éviter qu'il ne se religature sur lui-même. Simultanément est préparée la cassette polyhistidine par hybridation d'amorces adaptées puis phosphorylation du fragment d'ADN double brin qu'elles ont formé. Ceci permettra son insertion directe par ligation dans le vecteur linéarisé et purifié. En effet sa digestion n'est pas nécessaire car les amorces ont été choisies de façon à présenter d'emblée après hybridation le profil qu'elles auraient eu après digestion par NdeI.

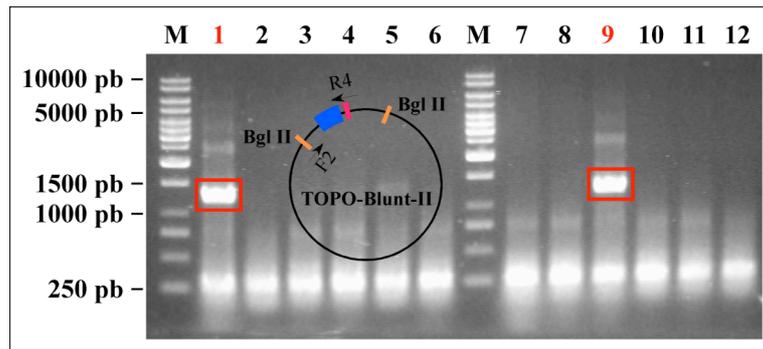


**Figure 34 : Principe des modifications effectuées sur le gène inséré.**

Un espacement suffisant de 4 acides aminés est introduit avant les 6 résidus His.

Des cellules DH5 $\alpha$  compétentes sont transformées par le produit de ligation, puis des PCR sur colonies sont effectuées en utilisant les amorces F2 et R4 (cf Tableau 4 et Figure 35). Ainsi, en cas de mauvaise orientation de la cassette polyhistidine, aucun fragment ne pourra être obtenu, tandis que dans le cas contraire, un fragment d'environ 1200 pb sera amplifié par la PCR. Cette analyse prouve que parmi les quelques transformants s'étant développés sur milieu LB-kanamycine, seuls deux d'entre eux possèdent la cassette polyhistidine insérée avec l'orientation attendue.

La séquence du gène inséré est à nouveau vérifiée par séquençage des plasmides, puis le fragment d'ADN à recombiner est libéré par digestion par BglIII et purification des fragments de digestion.



**Figure 35 : Analyse par électrophorèse sur agarose des produits de PCR sur colonies.**

Seuls les clones 1 et 9 possèdent la cassette polyhistidine insérée dans le bon sens. Le fragment à 250 pb observé dans tous les cas correspond probablement à des fragments d'ADN bactérien qui polluent la PCR et qui sont liés au mode de prélèvement choisi, c'est-à-dire à partir de colonies de bactéries. M : Marqueurs.

#### V.D.2.4. Bilan des différents essais de recombinaison homologue.

La sélection des transformants issus des premiers essais de recombinaison homologue a été réalisée sur le principe de sélection négative. Nous avons employé plusieurs boîtes de milieu riche, dans lesquelles ont été étalées à chaque fois peu de cellules, afin de pouvoir obtenir des clones isolés faciles à répliquer, et non des tapis cellulaires inadaptés à toute sélection. Malheureusement, tous les clones issus des répliques se sont développés sur milieu carencé en uracile, indiquant une absence de recombinaison homologue.

Cette méthode de sélection étant peu aisée à mettre en œuvre d'un point de vue pratique, nous avons pratiqué des sélections positives sur milieux Glucose+5-FOA à 28°C et YPG à 37°C. sur lesquels seules les cellules ayant intégré le fragment d'ADN introduit peuvent se développer. La compétence des cellules utilisées pour la recombinaison homologue est vérifiée en transformant en parallèle des cellules, issues du même lot, par un vecteur contenant une cassette d'auxotrophie TRP1 et qui vont donc se développer sur milieu carencé en tryptophane si elles ont inséré le plasmide. L'absence de clones sur les milieux Glucose+5-FOA à 28°C et YPG à 37°C indique qu'il n'y a pas eu recombinaison homologue.

Le protocole a donc été modifié pour exclure à chacune des étapes tout biais expérimental : les cellules sont rendues compétentes lorsque leur DO à 600 nm atteint 0,2 et non plus 0,4 ; le sperme de saumon utilisé pour la transformation est fraîchement dénaturé à

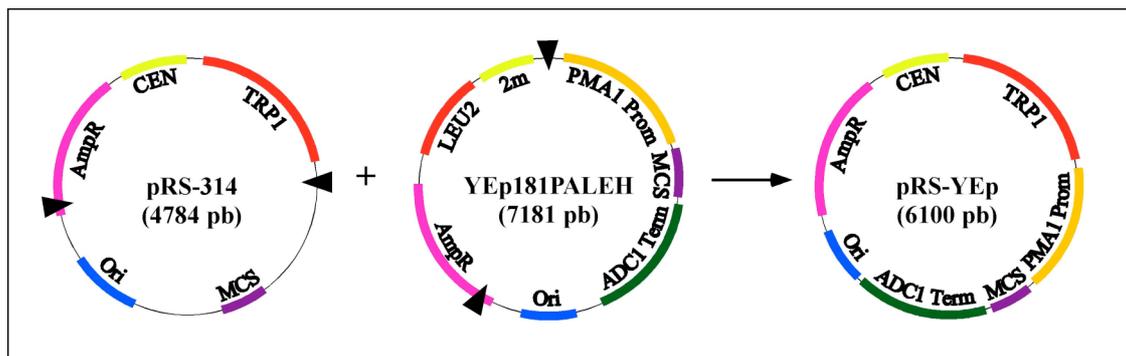
95°C avant d'être stocké à 4°C ; les levures sont transformées directement par le produit de digestion du vecteur TOPO-Blunt-II contenant le gène inséré, sans purification préalable, pour avoir davantage de matériel ; la digestion du vecteur TOPO-Blunt-II contenant le gène inséré est effectuée par deux enzymes, soit BglIII et AatII, soit BglIII et PvuI, afin d'éviter que le plasmide ne se reforme ; les cellules sont laissées sous agitation à 28°C pendant 3 h avant étalement. Cependant, aucune de ces nouvelles conditions n'a permis d'obtenir des clones ayant recombiné. Un dernier essai de co-transformation avec pRS424 n'a donné aucun clone capable de se développer sur milieu carencé en tryptophane. Etant donné que nos tentatives de recombinaison homologue, pourtant décrites comme étant relativement aisées chez *S. cerevisiae*, ont échoué, nous nous sommes finalement orientés vers l'expression plasmidique de yVDAC1-HT chez cette levure. Nous pouvons cependant supposer que cette méthode aurait peut-être porté ses fruits si nous avions étalé le plus grand nombre possible de cellules afin d'augmenter les chances d'observer le double événement de croisement conduisant à la recombinaison homologue.

### **V.D.3. Expression plasmidique de yVDAC1-HT chez *S. cerevisiae*.**

De nombreuses études ont utilisé une souche de levure dans laquelle le gène *POR1* a été interrompu pour exprimer des porines mitochondriales, que ce soient des porines humaines (Blachly-Dyson et al., 1993), de souris (Xu et al., 1999), ou du blé (Elkeles et al., 1997). Les gènes codant pour ces porines ont été insérés dans le vecteur de surexpression centromérique pSEYC58 adapté à la levure, sous le contrôle du promoteur natif de yVDAC1. Après transformation, ces porines permettent de restaurer la croissance de levures étalées à 37°C sur milieu non fermentescible, ce qui montre qu'elles se substituent très bien à la porine yVDAC1 au niveau fonctionnel. De manière inexplicée, cela n'est pas le cas ni pour la porine de *Drosophila melanogaster* (Ryerse et al., 1997) ni pour celles de la pomme de terre (Heins et al., 1994).

### V.D.3.1. Construction des lignées V-HT et pRS.

Afin d'exprimer yVDAC1-HT dans la souche  $\Delta$ Por de la levure *S. cerevisiae*, nous avons choisi d'utiliser un plasmide de surexpression centromérique possédant un promoteur fort, ce qui nous paraissait mieux adapté pour l'expression d'une protéine membranaire qu'un plasmide multicopies possédant également un promoteur fort. Ce plasmide devait posséder une cassette d'auxotrophie différente de URA3 (déjà utilisée pour l'interruption du gène *PORI*). Nous avons construit le plasmide nommé pRS-YEp (cf Figure 36) par ligation aux sites de restriction BglII de deux fragments d'ADN provenant de deux autres plasmides qui nous ont été fournis par P. Catty (LCBM, iRTSV, Grenoble). Dans le premier plasmide, pRS314 (Sikorski et Hieter, 1989), nous avons conservé l'origine de répllication centromérique, la cassette d'auxotrophie TRP1 et une partie du gène AmpR de résistance à l'ampicilline. Dans le second, le plasmide 2 $\mu$  YEp181PALEH, nous avons sélectionné le promoteur fort constitutif PMA1 de la H<sup>+</sup>-ATPase de la membrane plasmique de levure, la cassette de clonage, le terminateur ADC1 ainsi que le fragment complémentaire du gène AmpR et l'origine de répllication bactérienne. En effet, nous nous sommes basés sur la reconstitution du gène AmpR pour sélectionner sur milieu LB-ampicilline les transformants ayant intégré le vecteur résultant de la ligation dans le bon sens des deux fragments de plasmides.



**Figure 36 : Construction du plasmide pRS-YEp.**

Les têtes de flèches représentent les sites de restriction BglII auxquels les deux plasmides pRS-314 et YEp181PALEH ont été coupés pour ensuite former pRS-YEp par ligation. En bleu l'origine de répllication bactérienne et en rose le gène de résistance à l'ampicilline. En jaune les origines de répllication centromérique ou 2 $\mu$  de la levure et en rouge les cassettes d'auxotrophie (TRP1 = Tryptophane, LEU2 = Leucine). En orangé le promoteur PMA1, en vert le terminateur ADC1, et en violet la cassette de clonage MCS (Multiple Cloning Site).

Le gène codant pour yVDAC1-HT a été amplifié par PCR à partir du vecteur qui avait été construit pour l'expression bactérienne de la porine étiquetée (vecteur pET-22b(+)) dans lequel a été inséré le gène *POR1*). Des sites de restriction BlnI et MluI ont été ajoutés de part et d'autre du gène codant pour yVDAC1-HT grâce aux amorces de PCR. Après digestion par les endonucléases correspondantes, il a été inséré par ligation sur le vecteur pRS-YEp et sa présence a été confirmée par séquençage des bases entre le promoteur et le terminateur du plasmide. Des cellules  $\Delta$ Por ont alors été transformées par pRS-YEp, avec ou sans gène inséré, pour obtenir des transformants capables de se développer sur milieu glucose carencé en tryptophane, mais exprimant ou non yVDAC1-HT. Ces deux lignées de levures, toujours conservées sur un milieu sélectif afin d'éviter qu'elles ne perdent leur plasmide, sont respectivement nommées V-HT et pRS dans ce travail.

#### V.D.3.2. Croissance des souches de levure sur milieu solide.

La croissance de V-HT et pRS à partir de gouttes déposées sur milieux solides YPD et YPL, à 28 et à 37°C, a été comparée à celle des souches DBY 747 et  $\Delta$ Por dont elles dérivent, cultivées dans les mêmes conditions (cf Tableau 12). Toutes les précultures ont été réalisées à 28°C dans un milieu non-sélectif YPD ou YPL.

A 28°C, que le milieu soit fermentescible ou non, la croissance des levures est rapide. Les clichés, pris après 2 jours (YPD) ou 3 jours (YPL) d'incubation, montrent seulement de faibles différences de croissance entre les quatre souches. Qu'une souche dépourvue de porine puisse se développer dans ces conditions est déjà très surprenant, étant donné que la porine est présente en grande quantité dans les mitochondries et qu'elle est associée au contrôle du métabolisme énergétique de la cellule et peut-être également au phénomène d'apoptose. Il est encore plus étonnant que la présence ou l'absence de la porine n'induisse pas de différences dans les cinétiques de croissance des levures. Ce phénomène peut peut-être s'expliquer par la formation d'un autre pore en l'absence de yVDAC1. Celui-ci a été observé par électrophysiologie après reconstitution en bicouche lipidique en présence d'un lysat de membranes externes mitochondriales par du détergent (Dihanich et al., 1989), mais la ou les protéines qui forment ce pore n'ont pour l'instant pas été identifiées.

T (°C)	Souches	YPD				YPL			
		Nombre de cellules déposées							
		10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10
28°C	DBY 747								
	ΔPor								
	pRS								
	V-HT								
37°C	DBY 747					X			
	ΔPor								
	pRS								
	V-HT								

**Tableau 12 : Comparaison de la vitesse de croissance sur milieu solide des souches de levure utilisées dans cette étude.**

La présence du plasmide dans les souches pRS et V-HT en fin d'expérience est vérifiée par étalement sur milieu solide carencé en tryptophane. Cependant ceci signifie seulement que, parmi les cellules étalées, certaines ont conservé leur plasmide, mais aucunement que toutes le contiennent encore.

A 37°C, la croissance des levures est très lente. Dans le cas du milieu YPL, elle n'est pas détectable, même au bout de 15 jours de culture. Sur milieu YPD, le cliché pris après 7 jours d'incubation montre l'apparition de clones seulement dans le cas des souches exprimant yVDAC1 avec ou sans étiquette polyhistidine. Ce phénotype de thermosensibilité des mutants dépourvus de porine yVDAC1 avait déjà été décrit auparavant (Michejda et al., 1990), mais rien ne permet actuellement de réellement l'expliquer. Ce phénomène est d'autant plus étonnant qu'à haute température les membranes sont plus fluides et plus perméables à des solutés, ce qui devrait paradoxalement diminuer le rôle de la porine. Il est envisageable que la biosynthèse de la protéine responsable de la formation d'un autre pore en l'absence de yVDAC1 soit stoppée à des températures trop élevées.

#### V.D.3.3. Croissance des souches de levure en milieu liquide.

L'étude des cinétiques de croissance des souches utilisées dans ce travail a également été effectuée en milieu liquide, mais seulement à 28°C du fait du phénotype de

thermosensibilité connu pour  $\Delta$ Por et pRS à 37°C, que ce soit en milieu YPD ou YPL. Quant à V-HT, nous avons observé qu'elle ne se développe pas non plus en milieu YPL liquide à 37°C. Les temps de doublement des différentes souches à 28°C en milieu YPD et YPL ont en revanche été déterminés avec précision (cf Tableau 13).

La première remarque est que ces temps de doublement sont toujours beaucoup plus courts pour des croissances en milieu fermentescible qu'en milieu non-fermentescible. Par ailleurs, si l'on compare d'une part souche parentale et souche fille (cas de DBY 747 et  $\Delta$ Por) et d'autre part souches ayant ou non un gène inséré dans leur plasmide de surexpression (cas de V-HT et pRS), on constate que la croissance des levures est légèrement ralentie en l'absence de la porine, ce qui montre que cette protéine joue un rôle certain dans le métabolisme de la cellule. En ce qui concerne la souche pRS cultivée en milieu YPL, le temps de doublement obtenu, relativement long, pourrait être dû à une mutation induite par la transformation elle-même des levures  $\Delta$ Por par le plasmide vide. Il faut aussi noter que la présence du plasmide freine la croissance des cellules aussi bien en milieu YPL qu'en milieu YPD (souches pRS et V-HT à comparer aux souches  $\Delta$ Por et DBY 747, respectivement). Ce phénomène est très probablement dû au surcoût énergétique lié à la conservation et au traitement du plasmide par la cellule.

		DBY 747	$\Delta$ Por	V-HT	pRS
Milieu YPD	Temps de doublement	135 min	180 min	165 min	210 min
	DO du plateau	14	12	14	10
Milieu YPL	Temps de doublement	230 min	260 min	280 min	520 min
	DO du plateau	17	16	14	13

**Tableau 13 : Caractérisation de la croissance des souches de levure utilisées, en milieu liquide, à 28°C.**

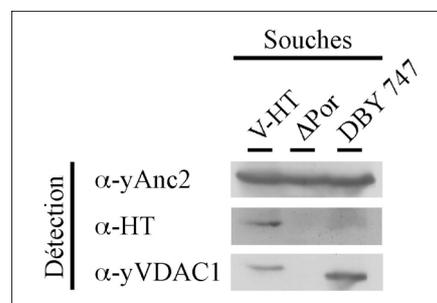
De même que lors des mesures de croissance sur milieu solide, la présence du plasmide en fin d'expérience a été vérifiée.

#### V.D.3.4. Expression de yVDAC1-HT par la lignée V-HT.

L'expression de la protéine yVDAC1-HT par la lignée V-HT en milieu YPL à 28°C est vérifiée par Western blot avec des anticorps dirigés contre la porine et contre l'étiquette polyhistidine qu'elle porte à son extrémité C-terminale. Une bande protéique, située

légèrement au-dessus de 30 kDa, est bien révélée sur le gel. Cette analyse permet également de comparer les niveaux d'expression des protéines pour les différentes souches cultivées dans les mêmes conditions : celui de yVDAC1-HT dans la souche V-HT apparaît plus faible que celui de la porine yVDAC1 dans la souche parentale DBY 747 (cf Figure 37).

Le promoteur PMA1, qui est pourtant fortement activé durant la phase exponentielle de croissance en milieu non fermentescible (Fernandes et Sa-Correia, 2003), ne permet donc pas de surexprimer la porine étiquetée. Un résultat similaire a été obtenu au laboratoire dans un travail auquel j'ai participé et qui se rapporte à l'expression homologue de la protéine chimérique yAnc2-Cyc1-HT sous contrôle du promoteur PMA1 (Rey et al., 2007). Cela indique probablement une limitation due à la machinerie d'import des protéines dans la mitochondrie, peut-être liée à la charge négative élevée de l'étiquette polyhistidine. Il n'est pas non plus exclu que ce faible niveau d'expression soit lié à la perte du plasmide par certaines des cellules, qui, en l'absence de pression de sélection, redeviennent alors des cellules de type  $\Delta$ Por et n'expriment plus de porine. Pour éviter ce problème, il faudrait cultiver la souche V-HT en milieu sélectif lactate carencé en tryptophane. Malheureusement, ceci est difficile car les cellules de la souche V-HT forment des agrégats dans ce milieu. Quoiqu'il en soit, le coût de tels milieux est prohibitif pour des cultures de levure à grande échelle.



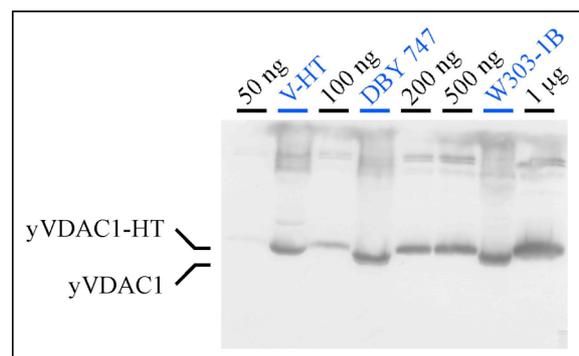
**Figure 37 : Comparaison des niveaux d'expression de yVDAC1 et yVDAC1-HT.**

Des mitochondries, isolées à partir de cellules des souches DBY 747,  $\Delta$ Por et V-HT, cultivées en milieu YPL à 28°C, ont été solubilisées en présence de SDS. Des quantités équivalentes de protéines totales ont été soumises à une électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes. Les protéines ont ensuite été immunodétectées par les anticorps  $\alpha$ -yVDAC1 (1:3000) et  $\alpha$ -HT (1:3000). Pour une comparaison correcte, le transporteur d'ADP/ATP a été pris comme référence interne (anticorps  $\alpha$ -yAnc2 (1:2000)). Il faut noter l'absence attendue de la porine dans la souche  $\Delta$ Por.

Il est important de noter que, pour une même souche de *S. cerevisiae*, les cellules cultivées sur un milieu fermentescible contiennent moins de mitochondries que celles qui se développent sur un milieu non-fermentescible. Un meilleur taux d'expression est donc attendu

en milieu YPL plutôt qu'en milieu YPD, et c'est pourquoi nous avons comparé les niveaux d'expression de la porine étiquetée (souche V-HT) et de la porine native (souche parentale DBY 747 et souche W303-1B) dans des cellules de ces trois souches cultivées sur milieu YPL. Pour cela, nous avons évalué la quantité de porine dans les lysats mitochondriaux correspondants par immunodécoration, en utilisant l'anticorps  $\alpha$ -yVDAC1 comme anticorps primaire (cf Figure 38). Dans le but de quantifications plus précises, nous avons également tenté le marquage chimique de yVDAC1-HT par le DCCD radiomarqué ( $[^{14}\text{C}]$ -dicyclohexylcarbodiimide), comme cela a été rapporté pour la porine de rat (Nakashima et al., 1986). Malheureusement, nous n'avons pas mis en évidence ce marquage dans le cas de la porine de levure.

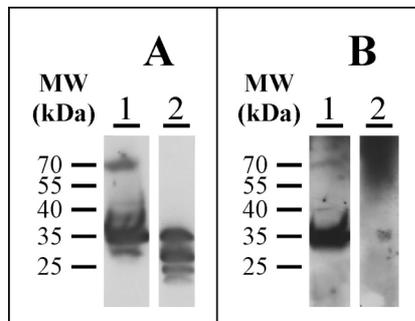
Il ressort des expériences d'immunodécoration que la quantité de porine étiquetée produite dans les mitochondries provenant de la souche V-HT représente environ 0,5% des protéines mitochondriales totales tandis qu'elle est proche de 1% et de 2% respectivement pour la porine mitochondriale des souches DBY 747 et W303-1B. Etant donné que la souche W303-1B exprime davantage de porine que la souche DBY 747, et qu'elle se prête bien à la recombinaison homologue, il serait envisageable de construire un mutant  $\Delta$ Por à partir de la souche W303-1B puis d'insérer dans son génome le gène codant pour yVDAC1-HT par recombinaison homologue, afin d'obtenir la porine étiquetée en plus grandes quantités.



**Figure 38 : Evaluation quantitative par immunodécoration de la quantité de porine présente dans les lysats mitochondriaux.**

Sur le gel d'électrophorèse ont été déposés 30  $\mu\text{g}$  de protéines mitochondriales totales de chacune des trois souches (en bleu). Des quantités connues de porine yVDAC1-HT, purifiée suivant le protocole établi et décrit à la partie V.E., ont été déposées : elles forment une gamme étalon de référence. Le résultat est analysé par Western blot, avec l'anticorps primaire  $\alpha$ -yVDAC1 dilué au 1:30000.

Afin de contrôler si la porine yVDAC1-HT peut, dans les cellules de levure de la souche V-HT, être observée dans d'autres organites que les mitochondries, nous avons effectué l'analyse par Western blot du surnageant provenant de la lyse des sphéroplastes par la Zymolyase 20T (Seikagaku Corporation). Ceci ne nous a pas permis d'observer de localisation extramitochondriale de yVDAC1-HT, rapportée pour d'autres types cellulaires et au centre de polémiques (Bathori et al., 2000). En revanche, de grandes quantités de protéine yAnc2 largement fragmentée ont été visualisées après immunodécoration. Il pourrait s'agir de protéine issue de la dégradation du transporteur, ou bien, plus probablement, de la reconnaissance non-spécifique d'une protéine non-mitochondriale par l'anticorps  $\alpha$ -yAnc2, dont la spécificité n'a été vérifiée qu'au niveau des mitochondries et qui a de plus été utilisé à des concentrations peut-être trop importantes.



**Figure 39 : Présence extramitochondriale de yVDAC1-HT ?**

Analyse par Western blot, avec les anticorps  $\alpha$ -yAnc2 (1:2000, A) et  $\alpha$ -yVDAC1 (1:3000, B), de mitochondries solubilisées par du SDS (1) et de surnageant provenant de la lyse des sphéroplastes par la Zymolyase 20T, après ultracentrifugation, et solubilisation du culot résultant dans du SDS (2).

### **V.E. Purification de la porine yVDAC1-HT exprimée chez *S. cerevisiae*.**

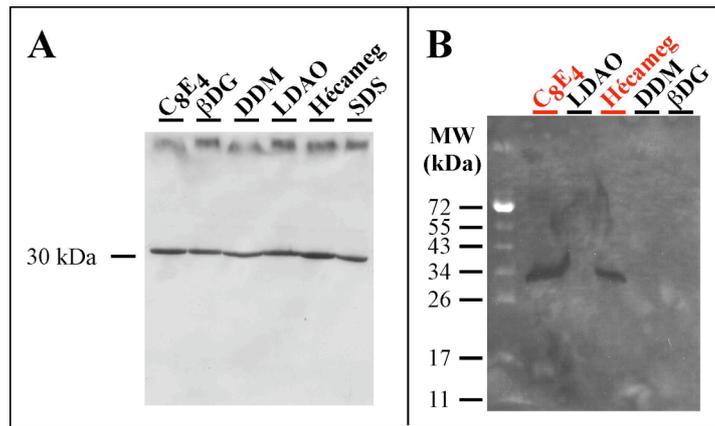
Etant donné qu'en présence d'Hécameg, la purification de la protéine yVDAC1 peut être effectuée en une seule étape de chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite, nous avons recherché les conditions permettant d'obtenir une efficacité de purification semblable pour yVDAC1-HT. Dans ce but, nous avons testé plusieurs détergents pour leur capacité à extraire la porine étiquetée des membranes mitochondriales et à permettre sa purification en une étape chromatographique unique sur colonne HTP : le tétraéthylène glycol monoocetyl éther (C<sub>8</sub>E<sub>4</sub>), l'Hécameg, le  $\beta$ DG, le LDAO et le DDM.

### **V.E.1. Solubilisation de yVDAC1-HT.**

La souche V-HT est cultivée sur milieu YPL, à 28°C, dans un fermenteur de 12 l. Pour l'étude de la lyse des mitochondries de cette souche V-HT, nous avons choisi de fixer arbitrairement la concentration en protéines mitochondriales totales à 10 mg/ml et la concentration en détergent à 2% (m/v), concentration bien supérieure à la CMC des détergents testés. La quantité de protéine pouvant être extraite lors de la lyse des mitochondries en présence de 2% (m/v) du détergent ionique SDS a été prise comme référence. Tous les échantillons ont été traités dans les mêmes conditions de pH et de force ionique. Après addition de SDS, le même volume de chacun d'entre eux a été déposé sur gel de polyacrylamide. Après migration, les protéines séparées par SDS-PAGE ont été analysées par Western blot (cf Figure 40A) : les cinq détergents testés semblent tous solubiliser la protéine yVDAC1-HT avec la même efficacité que le SDS.

### **V.E.2. Purification de yVDAC1-HT sur colonne HTP.**

Après solubilisation, chaque échantillon a été soumis à une chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite. Dans chacun des cinq cas, le tampon est constitué d'une solution saline identique à celle utilisée pour la purification standard de yVDAC1, à laquelle sont ajoutés les différents détergents à des concentrations supérieures à leur CMC : Hécameg 0,7% (m/v), LDAO 0,1% (m/v), DDM 0,1% (m/v), C<sub>8</sub>E<sub>4</sub> 0,3% (m/v) et βDG 0,1% (m/v). De même que pour l'étude de la solubilisation de yVDAC1-HT, les échantillons sont tous traités de manière identique puis déposés sur gel de polyacrylamide en vue d'une analyse par Western blot des bandes séparées au préalable par SDS-PAGE. La Figure 40B présente les résultats de cette analyse. Elle montre que la purification de yVDAC1-HT sur colonne d'hydroxyapatite en une seule étape est possible en présence de deux détergents : le C<sub>8</sub>E<sub>4</sub> et l'Hécameg. Comme il était attendu, et comme dans le cas de la purification de yVDAC1, la fraction protéique purifiée contient de l'ergostérol en grande quantité, ce qui peut être visualisé en examinant son spectre d'absorption, identique à celui de la Figure 25D.



**Figure 40 : Solubilisation et purification sur colonne HTP de  $\gamma$ VDAC1-HT.**

Analyses par Western blot avec l'anticorps  $\alpha$ - $\gamma$ VDAC1 (1:3000). A : Essais de solubilisation. B : Analyse des fractions non retenues sur colonne HTP. Plusieurs détergents ont été employés. En rouge, le  $C_8E_4$  et l'Hécameg, les deux détergents nous ayant permis de purifier  $\gamma$ VDAC1-HT.

### **V.E.3. Purification de $\gamma$ VDAC1-HT par chromatographie IMAC.**

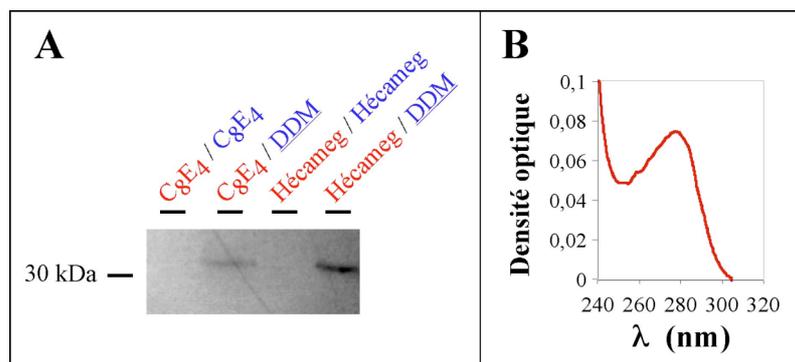
La chromatographie par affinité en présence d'ions  $Ni^{2+}$  immobilisés (cf partie IV.A.) permet de purifier les protéines portant une étiquette polyhistidine. Elle a déjà été utilisée avec succès au laboratoire pour purifier la protéine  $\gamma$ Anc2-HT (Fiore et al., 2000) et la chimère  $\gamma$ Anc2-Cyc1-HT (Dassa et al., 2005).

#### **V.E.3.1. Choix du détergent pour la chromatographie IMAC après HTP.**

Comme exposé précédemment, les analyses préalables effectuées sur  $\gamma$ VDAC1-HT ont permis de distinguer deux détergents en présence desquels la porine peut être purifiée sur colonne d'hydroxyapatite en une seule étape : le  $C_8E_4$  et l'Hécameg. Nous avons donc étudié les possibilités de purification de la protéine par chromatographie sur résine Ni-NTA en présence de l'un ou l'autre de ces détergents, après purification préalable par chromatographie sur colonne HTP. Dans ces conditions,  $\gamma$ VDAC1-HT n'est pas retrouvée lors de l'élution finale de la résine Ni-NTA par une solution contenant 100 mM d'EDTA, un ligand compétiteur du ligand NTA, qui permet de détacher de la résine l'ion métallique auquel la protéine est liée. En revanche, l'utilisation de DDM pendant l'étape de chromatographie

d'affinité, après la chromatographie sur HTP réalisée indifféremment en présence de C<sub>8</sub>E<sub>4</sub> ou d'Hécameg, permet de purifier et d'éluer efficacement yVDAC1-HT (cf Figure 41A). Le détergent C<sub>8</sub>E<sub>4</sub> étant coûteux (90 euros pour 1g), il semble difficile de l'utiliser en routine pour la purification de la protéine à l'échelle préparative. Nous avons donc décidé de choisir l'Hécameg pour la première étape de purification de la protéine par chromatographie sur colonne HTP, ce qui revient à purifier yVDAC1-HT de la même façon que yVDAC1. Pour l'étape suivante de purification par IMAC, du DDM est ajouté à la fraction protéique obtenue, de manière à obtenir une concentration finale égale à 2% (m/v), tandis que la résine Ni-NTA est prééquilibrée en DDM 0,1% (m/v). Il faut noter que pour chacune des combinaisons de détergents employées, à savoir C<sub>8</sub>E<sub>4</sub> uniquement, C<sub>8</sub>E<sub>4</sub> puis DDM, Hécameg uniquement, et Hécameg puis DDM, l'analyse des fractions non-retenues sur la colonne Ni-NTA ne montre jamais la présence de la protéine, ce qui signifie que yVDAC1-HT est efficacement retenue par le support. Cette rétention est non-spécifique en présence d'Hécameg ou de C<sub>8</sub>E<sub>4</sub> puisque la protéine ne peut pas être éluée en présence d'EDTA. Dans le cas de l'Hécameg, cela a effectivement été vérifié puisque les mêmes analyses menées par la suite sur la fraction obtenue après élution en présence de SDS 1% (m/v) montrent la présence de porine.

Le spectre d'absorption de la fraction purifiée dans les conditions de purification décrites ci-dessus, avec la combinaison de détergents Hécameg / DDM, est caractéristique des protéines et montre l'absence d'ergostérol (cf Figure 41B). Ceci valide l'approche de la modification de yVDAC1 par génie génétique.

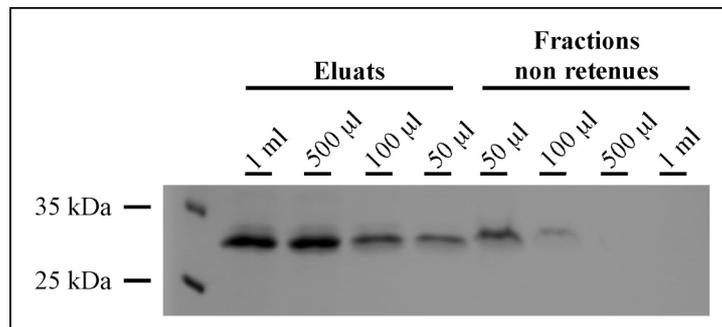


**Figure 41 : Purification de yVDAC1-HT en deux étapes chromatographiques.**

A : Effet des combinaisons de détergents pour les deux étapes de chromatographie. Analyse par SDS-PAGE des fractions purifiées. Révélation par coloration au bleu de Coomassie. En rouge est figuré le détergent utilisé lors de l'étape de chromatographie sur colonne HTP, suivi en bleu de celui employé pour la chromatographie sur résine Ni-NTA. B : Spectre d'absorption de la porine yVDAC1-HT purifiée, après une étape supplémentaire de chromatographie d'exclusion sur résine AcA 202.

V.E.3.2. Purification directe de yVDAC1-HT sur Ni-NTA.

Etant donné que le DDM semble être un détergent de choix pour la purification de yVDAC1-HT sur résine Ni-NTA, nous avons essayé de purifier directement la porine étiquetée par IMAC en présence de ce détergent, sans passer par l'étape préalable de purification par chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite en présence de  $C_8E_4$  ou d'Hécameg. Malheureusement, dans ces conditions, l'analyse par SDS-PAGE et coloration du gel au bleu de Coomassie de l'éluat de la résine montre une distribution protéique identique à celle de la fraction initialement déposée sur la colonne. Cette méthode ne convient donc pas pour purifier yVDAC1-HT.

V.E.3.3. Détermination du volume optimal de résine Ni-NTA à utiliser.

**Figure 42 : Optimisation de l'étape de chromatographie d'affinité.**

Analyse par SDS-PAGE et coloration du gel au bleu de Coomassie des fractions obtenues après IMAC pour différentes valeurs du volume de résine Ni-NTA. Les fractions éluées et non-retenues déposées sur le gel d'électrophorèse correspondent respectivement à 1 mg et à 3 mg de protéines mitochondriales initiales.

La fraction protéique obtenue en sortie de colonne d'hydroxyapatite est divisée, après ajout de DDM à une concentration finale de 2% (m/v), en quatre fractions égales correspondant chacune à 10 mg de protéines totales mitochondriales, qui sont mises en contact avec des volumes respectifs de 50 µl, 100 µl, 500 µl et 1 ml de résine Ni-NTA. Après les lavages, la résine est éluée par une solution contenant 100 mM EDTA. L'analyse des fractions éluées, présentée sur la Figure 42, indique clairement que lorsque la colonne est de trop petite taille, la rétention de yVDAC1-HT est incomplète. En revanche, au-delà d'un

volume de 500 µl de résine pour 10 mg de protéines totales, il n'y a pas de perte apparente de protéine. Nous avons donc décidé d'employer 50 µl de résine Ni-NTA /mg de protéines mitochondriales.

#### V.E.3.4. Rendement de la purification de yVDAC1-HT.

La purification de yVDAC1-HT est réalisée à une échelle préparative en suivant les conditions de purification mises au point dans ce travail. Après élution de la résine Ni-NTA par un tampon contenant 100 mM EDTA, la fraction protéique est filtrée, concentrée, puis soumise à une chromatographie d'exclusion sur colonne AcA 202. Le calcul de la concentration en protéine à partir du spectre d'absorption de la fraction purifiée nécessite de connaître le coefficient d'extinction molaire de yVDAC1-HT à 280 nm. Celui-ci est obtenu d'après la formule  $\epsilon = n_w \times 5500 + n_Y \times 1490 + n_{SS} \times 125$ , où  $n_w$ ,  $n_Y$  et  $n_{SS}$  sont respectivement les nombres de résidus tryptophane, de résidus tyrosine et de ponts disulfure (Pace et al., 1995). Pour yVDAC1-HT,  $n_w = 2$ ,  $n_Y = 9$ , et  $n_{SS} = 0$ , ce qui conduit à un coefficient d'extinction molaire de  $24410 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . La valeur de la concentration en protéines calculée par cette méthode est confirmée par dosage des protéines au BCA, indiquant un rendement massique global de purification de yVDAC1-HT égal à 0,3%, relativement aux protéines mitochondriales totales. Un tel rendement permet la purification de 2 mg de porine yVDAC1-HT à partir d'une culture de levures de 12 l puisqu'une telle culture permet d'obtenir environ 600 mg de protéines mitochondriales. Cette production est tout à fait compatible avec les moyens du laboratoire dans une échelle de temps d'une semaine. Elle offre le moyen de tester environ 1000 conditions de cristallisation en gouttes de 200 nl grâce à un dispositif robotisé.

#### **V.F. Bilan.**

Dans le Tableau 14 sont récapitulées les différentes méthodes envisagées lors ce travail afin d'éliminer l'ergostérol des préparations protéiques. Figurent également les résultats obtenus suite à la mise en œuvre de ces méthodes, à savoir les concentrations en protéine, en ergostérol et en détergent, ainsi que les rapports massiques qui peuvent en être déduits.

Cas	Fraction et son traitement		Protéine (mg/ml)	Détergent (%)	Ergostérol (mg/ml)	Dét/Prot (g/g)	Ergo/Prot (g/g)	Partie			
1	HTP	Ø	yVDAC1	Hécameg	0,1	1 (?)	0,065	100	0,65	V.A.2.	
2	ou AcA	C° poussée			6,3	38	Précipitation (nd)	60	nd	V.A.2.	
3	HTP	Après extraction solvant organique			Perte importante (nd)	nd	Pas totalement extrait (nd)	nd	nd	V.B.1.	
4		Après extraction par 2% $\beta$ OG			0,04	1 (?)	0,022	250	0,55	V.B.2.	
5		Ø			0,1	1 (?)	0,046	100	0,46	V.B.2.	
6		Après extraction Me $\beta$ CD			Perte négligeable (nd)	nd	Pas totalement extrait (nd)	nd	nd	V.B.3.	
7		Après extraction charbon actif			Perte importante (nd)	nd	Pas totalement extrait (nd)	nd	nd	V.B.4.	
8		HTP			C° légère	2,4	9	nd	38	nd	V.C.1.
9		FPLC			Ø	0,08	0,72	0	90	0	V.C.1.
10	C° moyenne				6	1,7	0	3	0	V.C.1.	
11	C° poussée				12,3	5,7	0	5	0	V.C.1.	
12	HTP	Ultracentrifugation	Perte sensible (nd)	nd	Très bien extrait (nd)	nd	nd	V.C.2.			
13		Rétention de la protéine sur colonne	Perte négligeable (nd)	nd	Pas totalement extrait (nd)	nd	nd	V.C.4.			
14	AcA	Ø	yVDAC1-HT	DDM	0,09	0,15	0	17	0	V.E.	
15		C° poussée (projection)			9 (?)	15 (?)	0	17 (?)	0	V.E..	

**Tableau 14 : Concentrations et rapports massiques dans les fractions collectées, après différents traitements.**

C°, Me $\beta$ CD et nd signifient respectivement concentration, méthyl- $\beta$ -cyclodextrine et non déterminé. (?) signifie que la concentration indiquée est supposée mais non vérifiée expérimentalement. Les cas n°1 et n°5 sont équivalents et devraient donc donner des résultats identiques. Cependant, il existe une variation du rapport massique ergostérol/protéine, certainement due aux erreurs expérimentales, la valeur de 0,65 g d'ergostérol/ g de protéine obtenue pour le cas n°1 correspondant d'ailleurs à la moyenne de plusieurs expériences.

Un des objectifs à long terme de ce travail était d'entreprendre la cristallisation de la porine  $\gamma$ VDAC1 de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, en particulier pour étudier au niveau moléculaire son interaction avec le transporteur d'ADP/ATP, dont nous connaissons déjà la structure tridimensionnelle dans un état conformationnel défini. Les tests de cristallisation de protéines nécessitent de la protéine purifiée et de concentration supérieure à 5 mg/ml. Alors

que la purification de  $\gamma$ VDAC1, très similaire dans son principe à celle du transporteur  $\gamma$ Anc2, a pu être réalisée en une seule étape de chromatographie, sa concentration s'est avérée impossible à cause de la présence d'ergostérol. Nous avons consacré beaucoup de nos efforts à la recherche d'une méthode d'élimination de ce stérol, majoritaire chez la levure, et contaminant nos préparations, et avons dans ce but mis en œuvre de nombreuses techniques biochimiques, soit d'extraction de l'ergostérol, soit de séparation de ce stérol et de la protéine. Nous sommes ainsi parvenus à purifier la porine  $\gamma$ VDAC1, en l'absence d'ergostérol, par chromatographie FPLC sur colonne Superdex HR 10/30 en présence d'Hécameg. Malheureusement, bien que cette méthode présente un rendement élevé, elle est coûteuse et surtout très lourde à mettre en œuvre en routine.

Nous avons décidé de nous tourner vers une approche différente impliquant la modification génique de la porine, de manière à pouvoir employer des techniques d'IMAC pour sa purification sur colonne. Pour cela, nous avons placé une étiquette polyhistidine à son extrémité C-terminale. La construction de la porine étiquetée  $\gamma$ VDAC1-HT, son expression plasmidique chez la levure, puis sa purification en deux étapes chromatographiques, dont une chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA en présence de DDM, ont permis d'obtenir la porine pure, dépourvue d'ergostérol. Cette seconde méthode a certes un rendement moindre que la première, mais elle est plus simple à utiliser, même si elle nécessite un changement de détergent.

Ce travail a permis de mettre au point deux méthodes de purification de la porine, intervenant après une étape préalable de chromatographie sur colonne HTP en présence d'Hécameg, qui permettent toutes deux d'obtenir de la protéine dépourvue d'ergostérol. Cependant la concentration en détergent dans la fraction protéique concentrée à 10 mg/ml après purification reste élevée, supérieure à 50 mg/ml. Ainsi, avant d'envisager les premiers tests de cristallisation de la porine, il faudra peut-être parvenir à diminuer la concentration en détergent, et ce par adsorption des monomères sur des billes Bio-Beads. De même il serait bon de vérifier l'état fonctionnel de la porine purifiée, soit par dichroïsme circulaire, soit par électrophysiologie après reconstitution en bicouches lipidiques. En effet une étude récente a montré que la porine humaine hVDAC1 purifiée à partir de corps d'inclusion bactériens se trouve partiellement dénaturée en présence de DDM, introduisant des hétérogénéités structurales peu propices à la cristallisation (Shanmugavadivu et al., 2007). Bien que notre protocole de purification soit très éloigné de ce dernier, permettant entre autres une probable

purification de la porine en présence de lipides endogènes des membranes de *Saccharomyces cerevisiae*, la cristallisation 3D de yVDAC1 se trouve également confrontée aux problèmes récurrents de la cristallisation des protéines membranaires, liés plus particulièrement à la présence de détergents.



# **Partie VI**



## **Discussion générale & Perspectives**



# Partie VI – Discussion générale & Perspectives

Les travaux présentés ici insistent à plusieurs reprises sur les difficultés techniques rencontrées lorsqu'il s'agit de travailler avec des protéines membranaires. Leur fragilité en solution, ainsi que la présence de détergents, ajoutent notamment de la complexité à toutes les expériences, à toutes les analyses. Cependant, étant donné que les protéines membranaires représentent entre 20 et 30% des protéines d'un organisme, elles demeurent un très large domaine d'études, pour lequel l'intérêt des scientifiques ne fait que croître. Le transporteur mitochondrial d'ADP/ATP est depuis longtemps étudié au laboratoire. Nous avons voulu nous placer dans la continuité des études entreprises sur cette protéine membranaire fondamentale pour la vie de la cellule eucaryote, en nous focalisant d'une part sur des aspects structuraux relatifs au transporteur bovin en complexe avec l'acide bongkrélique, et d'autre part sur la recherche de partenaires membranaires mitochondriaux du transporteur d'ADP/ATP de levure.

## **VI.A. Le complexe bAnc1-BA : sera-t-il possible de le cristalliser ?**

En 2003, le transporteur d'ADP/ATP, isolé de mitochondries de cœur de bœuf, a été cristallisé en présence de carboxyatractyloside, et sa structure obtenue à haute résolution (Pebay-Peyroula et al., 2003). Si celle-ci a permis de nombreuses avancées sur l'organisation spatiale de la protéine et sur l'élucidation du site de fixation du CATR, elle n'a pas permis d'expliquer le mécanisme moléculaire du transport d'ADP/ATP et a même amené de nouveaux débats, notamment en ce qui concerne l'état oligomérique du transporteur *in vivo*. Ceci souligne les difficultés que l'on peut rencontrer pour parvenir à connaître l'état natif d'une protéine membranaire ancrée dans la membrane, à partir d'une structure obtenue pour cette protéine bloquée par un inhibiteur, isolée dans un milieu non physiologique, soumise à des étapes de purification et enfin figée dans un cristal. C'est également la raison pour

laquelle la dynamique du transport est très difficile à approcher de cette manière. L'obtention d'une autre structure du transporteur, bloqué dans un autre état conformationnel, permettrait une comparaison directe de deux des conformations prises par le transporteur lors du processus d'échange des nucléotides, et pourrait probablement apporter des indices pour comprendre son fonctionnement.

Le fait que le complexe *bAnc1*-CATR puisse être aisément formé par ajout de carboxyatractyloside au complexe *bAnc1*-BA purifié en présence de détergent, et que le contraire ne soit pas vrai, est un premier indice en faveur d'un complexe transporteur-BA relativement instable. Ce constat a été établi, et simultanément confirmé, dès la première purification de *bAnc1*-BA, en présence du détergent Triton X-100 (Aquila et al., 1978). En effet, les auteurs avaient également observé une libération irréversible de BA lors de la purification du complexe, notamment lors de la concentration de la fraction protéique purifiée, ainsi qu'une sensibilité aux protéases endo- et exogènes accrue par rapport au complexe *bAnc1*-CATR purifié dans les mêmes conditions. Les analyses effectuées dans ce travail ont montré la dissociation probable, lors de l'étape de concentration, du complexe *bAnc1*-BA purifié en CHAPS. Cela serait très probablement dû au détergent, dont la concentration augmente, lors de cette étape, simultanément à celle du complexe *bAnc1*-BA purifié, et qui aurait donc un effet extrêmement défavorable sur la stabilité du complexe transporteur-BA. L'hypothèse privilégiée est celle d'un site de fixation de l'acide bongkrélique au transporteur relativement périphérique, et donc accessible aux molécules de détergent, contrairement à celui du carboxyatractyloside, qui se trouve profondément enfoui dans la protéine. Par ailleurs, la nature chimique de l'inhibiteur doit aussi être prise en compte. En effet l'acide bongkrélique est un lipide qui traverse les membranes mitochondriales avant de se fixer sur le transporteur, et il a certainement une grande affinité pour les micelles de détergent dont le cœur est hydrophobe, ce qui déplace l'équilibre  $bAnc1 + BA \leftrightarrow bAnc1 - BA$  dans le sens de la dissociation du complexe. Il est probable que cet effet s'accroît parallèlement à l'augmentation de la concentration du détergent, donnant une proportion plus élevée de micelles contenant du BA libre.

La cristallisation du complexe *bAnc1*-BA dans les conditions initialement envisagées me semble donc impossible. Deux solutions peuvent être avancées pour parvenir à purifier et à concentrer ce complexe. La première méthode consisterait à réussir à maintenir l'acide bongkrélique dans son site de fixation sur le transporteur d'ADP/ATP. A cet égard, un projet

en collaboration a été mis en place au sein de notre équipe : il vise à synthétiser des dérivés photoactivables de l'acide bongkréique capables de se fixer de manière covalente au transporteur. Ce serait la solution la plus directe et probablement la plus simple à mettre en œuvre, mais elle implique un investissement considérable en synthèse chimique fine avec des équipes spécialisées. La seconde serait de parvenir à verrouiller la conformation dite 'conformation-BA', prise par le transporteur après fixation de l'acide bongkréique, en faisant intervenir des marquages chimiques réalisés directement sur les membranes mitochondriales. Le *p*-chloromercuribenzenesulfonate et le *p*-chloromercuribenzoate sont deux dérivés mercuriels qui protègent le complexe bAnc1-BA de la dégradation par des protéases exogènes et empêchent la formation du complexe bAnc1-CATR en absence de DTT (Aquila et Klingenberg, 1982). Ils permettent donc bien de stabiliser le transporteur dans un état figé. Cependant, étant donné que leur fixation au transporteur favorise la libération de l'acide bongkréique préalablement lié (Aquila et al., 1978), il est probable que le complexe soit bloqué dans une autre conformation que celle prise par le transporteur ayant fixé le BA. En revanche, le N-éthylmaléimide est un réactif de thiols qui se fixe de manière covalente au résidu cystéine 56 de bAnc1, mais également de bAnc1-BA, avec un rendement d'environ 70% seulement, et qui bloque alors de façon irréversible le transporteur dans la conformation dite 'conformation-BA' (Boulay et Vignais, 1984). Après réaction avec le NEM, le transporteur bAnc1 peut encore lier l'acide bongkréique, dont la présence est par ailleurs nécessaire à la purification sur colonne d'hydroxyapatite en présence de Triton X-100 du transporteur marqué au NEM (Aquila et al., 1982).

La poursuite des études menées sur le complexe bAnc1-BA en vue de sa cristallisation me paraît donc nécessiter des modifications chimiques préalables de la protéine et probablement aussi une adaptation du protocole de purification. Il semble ainsi envisageable de marquer de manière irréversible le complexe bAnc1-BA avec le N-éthylmaléimide, puis de le purifier par chromatographie en présence de CHAPS, comme cela a été fait en présence de Triton X-100. Le transporteur devrait être maintenu dans la conformation dite 'transporteur-BA' durant les étapes de purification et de concentration du complexe, et ce jusque dans un éventuel cristal obtenu suite à des essais de cristallisation.

## **VI.B. Les partenaires de yAnc2 : quelle part de mythe dans la réalité ?**

Dans le but d'étudier les partenaires du transporteur d'ADP/ATP mitochondrial, nous nous sommes placés dans le système de la levure. En effet, c'est un organisme eucaryote bien connu, qu'il est relativement simple d'employer, et pour lequel des outils d'analyse ont été développés au laboratoire depuis plusieurs années. Nous nous sommes focalisés sur deux protéines membranaires de *S. cerevisiae*, toutes deux situées dans la membrane externe mitochondriale : la protéine yOm14 et la porine yVDAC1.

### **VI.B.1. La protéine yOm14 : une interaction directe clairement démontrée.**

Nous nous sommes intéressés à la protéine yOm14, car elle était co-purifiée avec le transporteur d'ADP/ATP yAnc2-HT lors de deux étapes chromatographiques. Les travaux présentés ici, et en particulier les co-immunoprécipitations croisées de ces deux protéines, ont démontré de façon très claire, et pour la première fois, l'interaction directe de cette protéine et du transporteur de levure yAnc2. Etant donné que la topographie de la protéine yOm14 dans la membrane externe mitochondriale n'est pas connue avec précision, les régions peptidiques mises en jeu dans l'interaction avec le transporteur n'ont pas encore été identifiées. Selon une organisation de la protéine yOm14 déduite de la prédiction de trois hélices transmembranaires et de l'orientation de l'extrémité C-terminale de yOm14 dans l'espace intermembranaire (Burri et al., 2006), il pourrait s'agir d'une boucle peptidique située dans l'espace intermembranaire et correspondant aux résidus 54-71. L'extrémité C-terminale de yOm14, pourtant également située dans l'espace intermembranaire, ne participe probablement pas directement à l'interaction, car, lors des expériences de co-immunoprécipitation de yOm14 avec le transporteur d'ADP/ATP, elle est correctement détectée par les anticorps  $\alpha$ -yOm14 dirigés contre elle. La purification de yOm14 en vue de sa cristallisation pourrait être envisagée, afin de caractériser au niveau moléculaire son interaction avec le transporteur mitochondrial d'ADP/ATP.

Etant donné que yAnc2 est l'isoforme du transporteur d'ADP/ATP de *S. cerevisiae* sans laquelle la levure ne peut se développer sur milieu non-fermentescible, une interaction

avec cette protéine peut indiquer un rôle physiologique majeur de la protéine partenaire pour le fonctionnement de la cellule. Cette hypothèse est soutenue par le fait que la protéine yOm14 est l'une des protéines majoritaires de la membrane externe mitochondriale, et qu'elle est presque exclusivement exprimée lorsque la levure se développe sur milieu non-fermentescible (Ohlmeier et al., 2004). Le rôle physiologique de yOm14 pourrait ainsi être éventuellement un rôle de modulation de l'activité d'échange du transporteur, puisque quelques expériences, que nous nous attacherons à confirmer, ont indiqué un lien entre la conformation du transporteur et l'intensité de son interaction avec yOm14. A l'opposé de cette possibilité, étant donné que seules une dizaine de souches de levure contiennent une protéine homologue à yOm14, celle-ci ne paraît pas jouer un rôle physiologique essentiel, ce qui concorde avec l'absence de phénotype observé pour les levures dans lesquelles le gène codant pour yOm14 a été invalidé (Burri et al., 2006). La plupart des remarques ci-dessus peuvent également s'appliquer à la protéine yOm45 qui, elle aussi, est une protéine majoritaire de la membrane externe mitochondriale, qui est principalement exprimée dans des conditions de métabolisme respiratoire, et dont l'invalidation d'entraîne pas de phénotype particulier des cellules de levure (Ohlmeier et al., 2004 ; Yaffe et al., 1989). En revanche, il n'existe actuellement aucune preuve de son éventuelle interaction avec le transporteur yAnc2. Les deux protéines yOm14 et yOm45 jouent donc très probablement un rôle régulateur dans le métabolisme global de la cellule de levure cultivée sur milieu non-fermentescible, notamment yOm14 puisqu'elle serait co-régulée avec des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale (Lascaris et al., 2002). Cependant, leur rôle précis au sein de la cellule reste encore à définir.

### **VI.B.2. La porine yVDAC1 : difficile de conclure quant à son interaction avec le transporteur.**

Au début de ma thèse, l'interaction de la porine et du transporteur d'ADP/ATP mitochondrial était une idée largement diffusée, notamment par des publications faisant état de leur rôle majeur dans le pore de transition de perméabilité (pour revue, voir (Vyssokikh et Brdiczka, 2003)). Cependant, cette hypothèse était principalement basée sur des résultats de co-purification en présence d'autres protéines : soit la cyclophiline D (Crompton et al., 1998), soit le récepteur périphérique des benzodiazépines (McEnery et al., 1992 ; Slocinska et al., 2004), soit encore l'hexokinase et la créatine kinase mitochondriale (Beutner et al., 1996).

Cependant, ce dernier résultat doit être remis en cause étant donné que la solubilisation des protéines membranaires a été effectuée par seulement 0,5% (m/v) Triton X-100 et que la colonne échangeuse d'anions utilisée lors du protocole de purification a été équilibrée en l'absence de détergent, ce qui a probablement eu pour conséquence d'analyser par la suite des mélanges complexes de protéines provenant de mitochondries partiellement lysées. Par ailleurs, les expériences mentionnées ci-dessus ne démontrent pas des interactions directes entre la porine et le transporteur. En réalité, étant donné que le PTP est modulé par la cyclosporine A, principal ligand de la cyclophiline D, et par les ligands du transporteur et du PBR, le concept de l'interaction du transporteur et de la porine a été progressivement introduit et généralisé, sur la base de la possible implication de ces protéines dans le PTP. Cela a également été favorisé par le fait qu'elles sont toutes deux présentes en grande quantité dans les mitochondries, et qu'elles sont très conservées parmi les espèces. Quoiqu'il en soit, l'interaction entre le transporteur et la porine, du moins dans le cadre du PTP, est désormais fortement remise en question par les résultats d'études récentes, qui indiquent à la fois que le transporteur (Kokoszka et al., 2004) et la porine (Baines et al., 2007) ne sont pas nécessaires à l'échafaudage protéique qui constituerait le PTP. Cependant, cela ne prouve pas une absence totale d'interaction entre ces deux protéines. Quelques rares publications ont tenté de prouver une interaction directe entre porine et transporteur. Ainsi l'existence d'hétérodimères de ces deux protéines dans la fraction éluée d'une colonne d'hydroxyapatite en présence de n-octylglucopyranoside a été montrée, par SDS-PAGE suivie d'une analyse par spectroscopie de masse (Bühler et al., 1998). Il est cependant relativement étonnant de voir, sur le gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes présenté dans ces travaux, que le complexe, qui pourtant semble fragile puisqu'il n'a jamais été observé par d'autres équipes, n'est pas dissocié en présence de SDS. De plus, sur ce même gel, il n'est pas possible de distinguer de bande protéique correspondant au transporteur, contrairement à ce qui est présenté dans la publication prise pour référence (De Pinto et al., 1989). Quant aux expériences de co-immunoprécipitation récemment publiées (Verrier et al., 2004), elles doivent être invalidées puisqu'elles n'ont pas été réalisées dans des conditions satisfaisantes, en utilisant en particulier des anti-séra dilués au 1:6.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, le PTP n'a pas été mis en évidence, ce qui est un atout pour explorer les interactions entre le transporteur et la porine, protéines toutes deux très conservées chez les eucaryotes, dans un contexte simplifié. Nous nous sommes donc tournés vers l'étude de la porine yVDAC1 de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Notre but était de

la cristalliser afin de pouvoir étudier les bases moléculaires de son interaction avec le transporteur d'ADP/ATP. Comme cela a été exposé dans ce travail, nous sommes parvenus à la purifier sous deux formes différentes, une forme native et une forme portant une étiquette polyhistidine à l'extrémité C-terminale. Un inconvénient majeur dans la mise en œuvre de yVDAC1-HT est que cette protéine pourrait présenter des caractéristiques différentes de celles de la porine native, et en particulier un repliement spatial modifié. Comme ces deux porines ont en commun une première étape de purification par chromatographie, il serait intéressant de pouvoir effectuer des analyses comparatives afin de noter toute différence de comportement, et ce avant la mise en œuvre des tests de cristallisation. Cela pourrait être réalisé par électrophysiologie après reconstitution en bicouches lipidiques. Possédant désormais des outils plus perfectionnés pour l'étude et la purification efficace de la porine, les essais de cristallisation, ainsi que la recherche de preuves de son interaction avec le transporteur mitochondrial d'ADP/ATP va pouvoir être poursuivie au laboratoire, probablement par des techniques de fluorescence (FRET). On notera cependant que, lors des essais de purification respectifs de la porine et du transporteur, la porine yVDAC1 est co-purifiée avec le transporteur de levure étiqueté lors de l'étape de chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite, alors que le résultat réciproque n'est pas vérifié puisque la protéine yAnc2 n'est pas co-purifiée avec la porine étiquetée lors d'une étape chromatographique semblable effectuée en présence d'Hécameg. Cette non-réciprocité apparaît aussi lors des expériences de co-immunoprécipitation VDAC-Anc réalisées à partir des protéines de foie de rat, puisque seul a été montré l'entraînement de la porine par les anticorps anti-transporteur (Verrier et al., 2004). De ce fait, il n'est pas possible de conclure formellement à l'existence d'une interaction physique entre la porine et le transporteur mitochondrial d'ADP/ATP, ni chez la levure, ni chez les mammifères. Nos propres essais de co-immunoprécipitation, effectués cette fois-ci à partir de mitochondries de levure, ne nous ont pas apporté davantage d'éléments décisifs puisque, dans nos conditions, le transporteur yAnc2 et la porine yVDAC1 n'ont pas été co-immunoprécipités. Les hypothèses pour expliquer ce résultat sont nombreuses, à commencer évidemment par l'absence effective d'interaction entre ces deux protéines membranaires. Mais comme cela peut tout aussi bien être relié au détergent employé pour l'expérience, ou à un masquage des sites de reconnaissance des anticorps lors de l'interaction, ce résultat ne nous permet pas, là encore, de conclure avec certitude.

Bien que le PTP n'ait jamais été observé chez *Saccharomyces cerevisiae*, il existe également chez la levure un canal de grande conductivité, non-sélectif. Cependant celui-ci est

très différent du PTP observé chez les mammifères, puisqu'il est par exemple insensible à l'accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie et à la cyclosporine A (Jung et al., 1997), principal ligand de la cyclophiline D qui est l'une des protéines qui constituent le PTP (Schinzel et al., 2005). La composition de ce canal chez la levure est inconnue, mais il semblerait que ni la porine ni le transporteur de nucléotides ne soient nécessaires, puisque ce pore peut s'ouvrir en l'absence respective de chacune de ces deux protéines (Roucou et al., 1997). De même, il n'y a pas non plus de PTP dans les mitochondries de la levure *Endomyces magnusii*, qui possède pourtant, contrairement à de nombreuses autres espèces de levures, un uniporteur permettant l'import régulé du calcium (Deryabina et al., 2004). L'absence de PTP chez la levure pourrait être reliée à l'absence du complexe I de la chaîne respiratoire, qui, chez les mammifères, joue un rôle important dans la régulation du PTP et en serait même peut-être un constituant (Fontaine et Bernardi, 1999). Une interaction spécifique pourrait donc logiquement être attendue entre le complexe I et la cyclophiline D, mais elle n'a pas été démontrée à ce jour. Par ailleurs, il semblerait que le complexe III de la chaîne respiratoire soit également un régulateur du PTP (Armstrong et al., 2004), associé aux complexes I et IV chez les mammifères pour former un réseau d'assemblages supramoléculaires appelé respirasome (Schagger et Pfeiffer, 2000). Il est intéressant de noter à ce propos qu'une interaction, dont le rôle physiologique doit encore être défini, a été démontrée entre la cytochrome *c* oxydase (complexe IV) et la porine (Roman et al., 2005). Puisque la structure de la cytochrome *c* oxydase a été résolue à 2,8 Å (Tsukihara et al., 1996), l'obtention de la structure tridimensionnelle de yVDAC1 permettrait, là encore, de préciser les bases moléculaires de cette interaction.

# **Partie VII**



## **Bibliographie**



# Partie VII – Bibliographie

- Abrecht, H., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J. M. et Homble, F.** (2000) Structure and orientation of two voltage-dependent anion-selective channel isoforms. An attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy study. *J Biol Chem*, **275** (52): 40992-40999
- Abuin, E. B., Lissi, E. A., Aspee, A., Gonzalez, F. D. et Varas, J. M.** (1997) Fluorescence of 8-anilinonaphthalene-1-sulfonate and properties of sodium dodecyl sulfate micelles in water-urea mixtures. *J Colloid Interface Sci*, **186** (2): 332-338
- Albrecht, R., Rehling, P., Chacinska, A., Brix, J., Cadamuro, S. A., Volkmer, R., Guiard, B., Pfanner, N. et Zeth, K.** (2006) The Tim21 binding domain connects the preprotein translocases of both mitochondrial membranes. *EMBO Rep*, **7** (12): 1233-1238
- Allen, R. T., Hunter, W. J., 3rd et Agrawal, D. K.** (1997) Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods*, **37** (4): 215-228
- Andersson, S. G., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U. C., Podowski, R. M., Naslund, A. K., Eriksson, A. S., Winkler, H. H. et Kurland, C. G.** (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*, **396** (6707): 133-140
- Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermod, J. J., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R. et Martinou, J. C.** (1997) Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science*, **277** (5324): 370-372
- Aoudia, M. et Zana, R.** (1998) Aggregation behavior of sugar surfactants in aqueous solutions : effects of temperature and the addition of nonionic polymers. *J Colloid Interface Sci*, **206** (1): 158-167
- Aquila, H., Eiermann, W., Babel, W. et Klingenberg, M.** (1978) Isolation of the ADP/ATP translocator from beef heart mitochondria as the bongkrekate-protein complex. *Eur J Biochem*, **85** (2): 549-560
- Aquila, H., Eiermann, W. et Klingenberg, M.** (1982) Incorporation of N-ethylmaleimide into the membrane-bound ADP/ATP translocator. Isolation of the protein labeled with N-[<sup>3</sup>H]ethylmaleimide. *Eur J Biochem*, **122** (1): 133-139
- Aquila, H. et Klingenberg, M.** (1982) The reactivity of -SH groups in the ADP/ATP carrier isolated from beef heart mitochondria. *Eur J Biochem*, **122** (1): 141-145
- Arco, A. D. et Satrustegui, J.** (2005) New mitochondrial carriers : an overview. *Cell Mol Life Sci*, **62** (19-20): 2204-2227
- Ardail, D., Gasnier, F., Lerme, F., Simonot, C., Louisot, P. et Gateau-Roesch, O.** (1993) Involvement of mitochondrial contact sites in the subcellular compartmentalization of phospholipid biosynthetic enzymes. *J Biol Chem*, **268** (34): 25985-25992
- Arechaga, I., Miroux, B., Karrasch, S., Huijbregts, R., De Kruijff, B., Runswick, M. J. et Walker, J. E.** (2000) Characterisation of new intracellular membranes in *Escherichia coli* accompanying large scale over-production of the b subunit of F(1)F(0) ATP synthase. *FEBS Lett*, **482** (3): 215-219
- Armstrong, J. S., Yang, H., Duan, W. et Whiteman, M.** (2004) Cytochrome *bc<sub>1</sub>* regulates the mitochondrial permeability transition by two distinct pathways. *J Biol Chem*, **279** (48): 50420-50428

- Ashani, Y. et Catravas, G. N.** (1980) Highly reactive impurities in Triton X-100 and Brij 35 : partial characterization and removal. *Anal Biochem*, **109** (1): 55-62
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Purcell, N. H., Blair, N. S., Osinska, H., Hambleton, M. A., Brunskill, E. W., Sayen, M. R., Gottlieb, R. A., Dorn, G. W., Robbins, J. et Molkentin, J. D.** (2005) Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*, **434** (7033): 658-662
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Sheiko, T., Craigen, W. J. et Molkentin, J. D.** (2007) Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol*: sous presse
- Bamber, L., Harding, M., Butler, P. J. et Kunji, E. R.** (2006) Yeast mitochondrial ADP/ATP carriers are monomeric in detergents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103** (44): 16224-16229
- Basso, E., Fante, L., Fowlkes, J., Petronilli, V., Forte, M. A. et Bernardi, P.** (2005) Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of cyclophilin D. *J Biol Chem*, **280** (19): 18558-18561
- Bathori, G., Parolini, I., Szabo, I., Tombola, F., Messina, A., Oliva, M., Sargiacomo, M., De Pinto, V. et Zoratti, M.** (2000) Extramitochondrial porin : facts and hypotheses. *J Bioenerg Biomembr*, **32** (1): 79-89
- Begona Ruiz, M., Prado, A., Goni, F. M. et Alonso, A.** (1994) An assessment of the biochemical applications of the non-ionic surfactant Hecameg. *Biochim Biophys Acta*, **1193** (2): 301-306
- Benz, R.** (1994) Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes : review on mitochondrial porins. *Biochim Biophys Acta*, **1197** (2): 167-196
- Bernardi, P., Krauskopf, A., Basso, E., Petronilli, V., Blachly-Dyson, E., Di Lisa, F. et Forte, M. A.** (2006) The mitochondrial permeability transition from *in vitro* artifact to disease target. *FEBS J*, **273** (10): 2077-2099
- Beutner, G., Ruck, A., Riede, B., Welte, W. et Brdiczka, D.** (1996) Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. *FEBS Lett*, **396** (2-3): 189-195
- Bisaccia, F., Zara, V., Capobianco, L., Jacobazzi, V., Mazzeo, M. et Palmieri, F.** (1996) The formation of a disulfide cross-link between the two subunits demonstrates the dimeric structure of the mitochondrial oxoglutarate carrier. *Biochim Biophys Acta*, **1292** (2): 281-288
- Blachly-Dyson, E., Peng, S., Colombini, M. et Forte, M.** (1990) Selectivity changes in site-directed mutants of the VDAC ion channel : structural implications. *Science*, **247** (4947): 1233-1236
- Blachly-Dyson, E., Zambronicz, E. B., Yu, W. H., Adams, V., McCabe, E. R., Adelman, J., Colombini, M. et Forte, M.** (1993) Cloning and functional expression in yeast of two human isoforms of the outer mitochondrial membrane channel, the voltage-dependent anion channel. *J Biol Chem*, **268** (3): 1835-1841
- Blachly-Dyson, E., Song, J., Wolfgang, W. J., Colombini, M. et Forte, M.** (1997) Multicopy suppressors of phenotypes resulting from the absence of yeast VDAC encode a VDAC-like protein. *Mol Cell Biol*, **17** (10): 5727-5738
- Block, M. R., Lauquin, G. J.-M. et Vignais, P. V.** (1981) Chemical modifications of atractyloside and bongkreic acid binding sites of the mitochondrial adenine nucleotide carrier. Are there distinct binding sites? *Biochemistry*, **20** (9): 2692-2699
- Block, M. R., Zaccai, G., Lauquin, G. J.-M. et Vignais, P. V.** (1982) Small angle neutron scattering of the mitochondrial ADP/ATP carrier protein in detergent. *Biochem Biophys Res Commun*, **109** (2): 471-477
- Block, M. R., Lauquin, G. J.-M. et Vignais, P. V.** (1983) Use of 3'-O-naphthoyl-adenosine 5'-diphosphate to probe distinct conformational states of membrane-bound adenosine 5'-diphosphate/adenosine 5'-triphosphate carrier. *Biochemistry*, **22** (9): 2202-2208

- Block, M. R. et Vignais, P. V.** (1984) Substrate-site interactions in the membrane-bound adenine-nucleotide carrier as disclosed by ADP and ATP analogs. *Biochim Biophys Acta*, **767** (2): 369-376
- Block, M. R. et Vignais, P. V.** (1986) Dependence of the conformational state of the isolated adenine nucleotide carrier protein on the detergent used for solubilization. *Biochemistry*, **25** (2): 374-379
- Boeke, J. D., LaCroute, F. et Fink, G. R.** (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast : 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet*, **197** (2): 345-346
- Boulay, F. et Vignais, P. V.** (1984) Localization of the N-ethylmaleimide reactive cysteine in the beef heart mitochondrial ADP/ATP carrier protein. *Biochemistry*, **23** (20): 4807-4812
- Boulay, F., Lauquin, G. J.-M. et Vignais, P. V.** (1986) Localization of immunoreactive regions in the beef heart adenine nucleotide carrier using rabbit antisera against the carboxyatractyloside-liganded and the sodium dodecyl sulfate denaturated carrier forms. *Biochemistry*, **25** (23): 7567-7571
- Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**: 248-254
- Brandolin, G., Meyer, C., Defaye, G., Vignais, P. M. et Vignais, P. V.** (1974) Partial purification of an atractyloside-binding protein from mitochondria. *FEBS Lett*, **46** (1): 149-153
- Brandolin, G., Dupont, Y. et Vignais, P. V.** (1985) Substrate-induced modifications of the intrinsic fluorescence of the isolated adenine nucleotide carrier protein : demonstration of distinct conformational states. *Biochemistry*, **24** (8): 1991-1997
- Brandolin, G., Boulay, F., Dalbon, P. et Vignais, P. V.** (1989) Orientation of the N-terminal region of the membrane-bound ADP/ATP carrier protein explored by antipeptide antibodies and an arginine-specific endoprotease. Evidence that the accessibility of the N-terminal residues depends on the conformational state of the carrier. *Biochemistry*, **28** (3): 1093-1100
- Brandolin, G., Le Saux, A., Trézéguet, V., Lauquin, G. J.-M. et Vignais, P. V.** (1993) Chemical, immunological, enzymatic, and genetic approaches to studying the arrangement of the peptide chain of the ADP/ATP carrier in the mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr*, **25** (5): 459-472
- Brdiczka, D. et Schumacher, D.** (1976) Iodination of peripheral mitochondrial membrane proteins in correlation to the functional state of the ADP/ATP carrier. *Biochem Biophys Res Commun*, **73** (3): 823-832
- Brdiczka, D. G., Zorov, D. B. et Sheu, S. S.** (2006) Mitochondrial contact sites : their role in energy metabolism and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, **1762** (2): 148-163
- Buchanan, B. B., Eiermann, W., Riccio, P., Aquila, H. et Klingenberg, M.** (1976) Antibody evidence for different conformational states of ADP, ATP translocator protein isolated from mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73** (7): 2280-2284
- Bühler, S., Michels, J., Wendt, S., Ruck, A., Brdiczka, D., Welte, W. et Przybylski, M.** (1998) Mass spectrometric mapping of ion channel proteins (porins) and identification of their supramolecular membrane assembly. *Proteins, Suppl 2*: 63-73
- Burri, L., Vascotto, K., Gentle, I. E., Chan, N. C., Beilharz, T., Stapleton, D. I., Ramage, L. et Lithgow, T.** (2006) Integral membrane proteins in the mitochondrial outer membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Febs J*, **273** (7): 1507-1515
- Casadio, R., Jacoboni, I., Messina, A. et De Pinto, V.** (2002) A 3D model of the voltage-dependent anion channel (VDAC). *FEBS Lett*, **520** (1-3): 1-7
- Challa, R., Ahuja, A., Ali, J. et Khar, R. K.** (2005) Cyclodextrins in drug delivery : an updated review. *AAPS PharmSciTech*, **6** (2): E329-357

- Chappell, J. B. et Crofts, A. R.** (1965) The effect of atractylate and oligomycin on the behaviour of mitochondria towards adenine nucleotides. *Biochem J*, **95**: 707-716
- Chen, C., Ko, Y., Delannoy, M., Ludtke, S. J., Chiu, W. et Pedersen, P. L.** (2004) Mitochondrial ATP synthasome : three-dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with carriers for Pi and ADP/ATP. *J Biol Chem*, **279** (30): 31761-31768
- Cheng, E. H., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T. et Korsmeyer, S. J.** (2001) BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*, **8** (3): 705-711
- Cheng, E. H., Sheiko, T. V., Fisher, J. K., Craigen, W. J. et Korsmeyer, S. J.** (2003) VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science*, **301** (5632): 513-517
- Christian, A. E., Haynes, M. P., Phillips, M. C. et Rothblat, G. H.** (1997) Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res*, **38** (11): 2264-2272
- Claude, A. et Fullam, E. F.** (1945) An electron microscope study of isolated mitochondria. *J Exp Med*, **81**: 51-62
- Colombini, M.** (1979) A candidate for the permeability pathway of the outer mitochondrial membrane. *Nature*, **279** (5714): 643-645
- Colombini, M.** (2004) VDAC : the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol Cell Biochem*, **256-257** (1-2): 107-115
- Cowan, S. W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R. A., Jansonius, J. N. et Rosenbusch, J. P.** (1992) Crystal structures explain functional properties of two E. coli porins. *Nature*, **358** (6389): 727-733
- Crompton, M., Ellinger, H. et Costi, A.** (1988) Inhibition by cyclosporin A of a Ca<sup>2+</sup>-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J*, **255** (1): 357-360
- Crompton, M., Virji, S. et Ward, J. M.** (1998) Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem*, **258** (2): 729-735
- Dagert, M. et Ehrlich, S. D.** (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*, **6** (1): 23-28
- Dahout-Gonzalez, C., Brandolin, G. et Pebay-Peyroula, E.** (2003) Crystallization of the bovine ADP/ATP carrier is critically dependent upon the detergent-to-protein ratio. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **59** (Pt 12): 2353-2355
- Dahout-Gonzalez, C., Ramus, C., Dassa, E. P., Dianoux, A. C. et Brandolin, G.** (2005) Conformation-dependent swinging of the matrix loop m2 of the mitochondrial *Saccharomyces cerevisiae* ADP/ATP carrier. *Biochemistry*, **44** (49): 16310-16320
- Dahout-Gonzalez, C., Nury, H., Trézéguet, V., Lauquin, G. J.-M., Pebay-Peyroula, E. et Brandolin, G.** (2006) Molecular, functional, and pathological aspects of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Physiology (Bethesda)*, **21**: 242-249
- Dassa, E. P., Dahout-Gonzalez, C., Dianoux, A. C. et Brandolin, G.** (2005) Functional characterization and purification of a *Saccharomyces cerevisiae* ADP/ATP carrier-iso 1 cytochrome *c* fusion protein. *Protein Expr Purif*, **40** (2): 358-369
- Daum, G., Bohni, P. C. et Schatz, G.** (1982) Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome *c* peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J Biol Chem*, **257** (21): 13028-13033

- De Giorgi, F., Lartigue, L., Bauer, M. K., Schubert, A., Grimm, S., Hanson, G. T., Remington, S. J., Youle, R. J. et Ichas, F.** (2002) The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *Faseb J*, **16** (6): 607-609
- De Marcos Lousa, C., Trézéguet, V., Dianoux, A. C., Brandolin, G. et Lauquin, G. J.-M.** (2002) The human mitochondrial ADP/ATP carriers : kinetic properties and biogenesis of wild-type and mutant proteins in the yeast *S. cerevisiae*. *Biochemistry*, **41** (48): 14412-14420
- De Marcos Lousa, C., Sideris, D. P. et Tokatlidis, K.** (2006) Translocation of mitochondrial inner-membrane proteins : conformation matters. *Trends Biochem Sci*, **31** (5): 259-267
- De Pinto, V., Ludwig, O., Krause, J., Benz, R. et Palmieri, F.** (1987) Porin pores of mitochondrial outer membranes from high and low eukaryotic cells : biochemical and biophysical characterization. *Biochim Biophys Acta*, **894** (2): 109-119
- De Pinto, V., Benz, R. et Palmieri, F.** (1989) Interaction of non-classical detergents with the mitochondrial porin. A new purification procedure and characterization of the pore-forming unit. *Eur J Biochem*, **183** (1): 179-187
- De Pinto, V. D. et Palmieri, F.** (1992) Transmembrane arrangement of mitochondrial porin or voltage-dependent anion channel (VDAC). *J Bioenerg Biomembr*, **24** (1): 21-26
- Deryabina, Y. I., Isakova, E. P., Shurubor, E. I. et Zvyagilskaya, R. A.** (2004) Calcium-dependent nonspecific permeability of the inner mitochondrial membrane is not induced in mitochondria of the yeast *Endomyces magnusii*. *Biochemistry (Mosc)*, **69** (9): 1025-1033
- Dianoux, A. C., Noël, F., Fiore, C., Trézéguet, V., Kieffer, S., Jaquinod, M., Lauquin, G. J.-M. et Brandolin, G.** (2000) Two distinct regions of the yeast mitochondrial ADP/ATP carrier are photolabeled by a new ADP analogue: 2-azido-3'-O-naphthoyl-[b-<sup>32</sup>P]ADP. Identification of the binding segments by mass spectrometry. *Biochemistry*, **39** (37): 11477-11487
- Diezel, W., Kopperschlager, G. et Hofmann, E.** (1972) An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomassie Brilliant Blue. *Anal Biochem*, **48** (2): 617-620
- Dihanich, M., Schmid, A., Oppliger, W. et Benz, R.** (1989) Identification of a new pore in the mitochondrial outer membrane of a porin-deficient yeast mutant. *Eur J Biochem*, **181** (3): 703-708
- Dolce, V., Scarcia, P., Iacopetta, D. et Palmieri, F.** (2005) A fourth ADP/ATP carrier isoform in man : identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution. *FEBS Lett*, **579** (3): 633-637
- Dolder, M., Zeth, K., Tittmann, P., Gross, H., Welte, W. et Wallimann, T.** (1999) Crystallization of the human, mitochondrial voltage-dependent anion-selective channel in the presence of phospholipids. *J Struct Biol*, **127** (1): 64-71
- Drgon, T., Sabova, L., Nelson, N. et Kolarov, J.** (1991) ADP/ATP translocator is essential only for anaerobic growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **289** (2): 159-162
- Duyckaerts, C., Sluse-Goffart, C. M., Fux, J. P., Sluse, F. E. et Liebecq, C.** (1980) Kinetic mechanism of the exchanges catalysed by the adenine-nucleotide carrier. *Eur J Biochem*, **106** (1): 1-6
- Ekert, P. G. et Vaux, D. L.** (2005) The mitochondrial death squad : hardened killers or innocent bystanders? *Curr Opin Cell Biol*, **17** (6): 626-630
- Elkeles, A., Breiman, A. et Zizi, M.** (1997) Functional differences among wheat voltage-dependent anion channel (VDAC) isoforms expressed in yeast. Indication for the presence of a novel VDAC-modulating protein? *J Biol Chem*, **272** (10): 6252-6260

- Fernandes, A. R. et Sa-Correia, I.** (2003) Transcription patterns of PMA1 and PMA2 genes and activity of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* during diauxic growth and stationary phase. *Yeast*, **20** (3): 207-219
- Fiore, C., Trézéguet, V., Roux, P., Le Saux, A., Noël, F., Schwimmer, C., Arlot, D., Dianoux, A. C., Lauquin, G. J.-M. et Brandolin, G.** (2000) Purification of histidine-tagged mitochondrial ADP/ATP carrier : influence of the conformational states of the C-terminal region. *Protein Expr Purif*, **19** (1): 57-65
- Fontaine, E., Eriksson, O., Ichas, F. et Bernardi, P.** (1998) Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation by electron flow through the respiratory chain complex I. *J Biol Chem*, **273** (20): 12662-12668
- Fontaine, E. et Bernardi, P.** (1999) Progress on the mitochondrial permeability transition pore: regulation by complex I and ubiquinone analogs. *J Bioenerg Biomembr*, **31** (4): 335-345
- Fontanesi, F., Palmieri, L., Scarcia, P., Lodi, T., Donnini, C., Limongelli, A., Tiranti, V., Zeviani, M., Ferrero, I. et Viola, A. M.** (2004) Mutations in AAC2, equivalent to human adPEO-associated ANT1 mutations, lead to defective oxidative phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae* and affect mitochondrial DNA stability. *Hum Mol Genet*, **13** (9): 923-934
- Forte, M., Adelsberger-Mangan, D. et Colombini, M.** (1987) Purification and characterization of the voltage-dependent anion channel from the outer mitochondrial membrane of yeast. *J Membr Biol*, **99** (1): 65-72
- Fraser, F. et Zammit, V. A.** (1998) Enrichment of carnitine palmitoyltransferases I and II in the contact sites of rat liver mitochondria. *Biochem J*, **329** (Pt 2): 225-229
- Freitag, H., Neupert, W. et Benz, R.** (1982) Purification and characterisation of a pore protein of the outer mitochondrial membrane from *Neurospora crassa*. *Eur J Biochem*, **123** (3): 629-636
- Gabrielska, J., Gagos, M., Gubernator, J. et Gruszecki, W. I.** (2006) Binding of antibiotic amphotericin B to lipid membranes : a <sup>1</sup>H NMR study. *FEBS Lett*, **580** (11): 2677-2685
- Gogvadze, V., Orrenius, S. et Zhivotovsky, B.** (2006) Multiple pathways of cytochrome *c* release from mitochondria in apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, **1757** (5-6): 639-647
- Guo, X. W., Smith, P. R., Cognon, B., D'Arcangelis, D., Dolginova, E. et Mannella, C. A.** (1995) Molecular design of the voltage-dependent, anion-selective channel in the mitochondrial outer membrane. *J Struct Biol*, **114** (1): 41-59
- Hackenberg, H. et Klingenberg, M.** (1980) Molecular weight and hydrodynamic parameters of the adenosine 5'-diphosphate-adenosine 5'-triphosphate carrier in Triton X-100. *Biochemistry*, **19** (3): 548-555
- Hackenbrock, C. R.** (1968) Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **61** (2): 598-605
- Heins, L., Mentzel, H., Schmid, A., Benz, R. et Schmitz, U. K.** (1994) Biochemical, molecular, and functional characterization of porin isoforms from potato mitochondria. *J Biol Chem*, **269** (42): 26402-26410
- Henderson, P. J. et Lardy, H. A.** (1970) Bongkreki acid. An inhibitor of the adenine nucleotide translocase of mitochondria. *J Biol Chem*, **245** (6): 1319-1326
- Holloway, P. W.** (1973) A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. *Anal Biochem*, **53** (1): 304-308
- Hoppel, C., Kerner, J., Turkaly, P., Minkler, P. et Tandler, B.** (2002) Isolation of hepatic mitochondrial contact sites : previously unrecognized inner membrane components. *Anal Biochem*, **302** (1): 60-69
- Huizing, M., Ruitenbeek, W., Thinnis, F. P. et DePinto, V.** (1994) Lack of voltage-dependent anion channel in human mitochondrial myopathies. *Lancet*, **344** (8924): 762

- Hunter, D. R., Haworth, R. A. et Southard, J. H.** (1976) Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem*, **251** (16): 5069-5077
- Indiveri, C., Tonazzi, A. et Palmieri, F.** (1991) Characterization of the unidirectional transport of carnitine catalyzed by the reconstituted carnitine carrier from rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, **1069** (1): 110-116
- Indiveri, C., Giangregorio, N., Iacobazzi, V. et Palmieri, F.** (2002) Site-directed mutagenesis and chemical modification of the six native cysteine residues of the rat mitochondrial carnitine carrier : implications for the role of cysteine-136. *Biochemistry*, **41** (27): 8649-8656
- Israelson, A., Abu-Hamad, S., Zaid, H., Nahon, E. et Shoshan-Barmatz, V.** (2007) Localization of the voltage-dependent anion channel-1  $\text{Ca}^{2+}$ -binding sites. *Cell Calcium*, **41** (3): 235-244
- Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T. A., Ramaswamy, S. et Jap, B. K.** (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome  $bc_1$  complex. *Science*, **281** (5373): 64-71
- Jermyn, M. A.** (1975) Increasing the sensitivity of the anthrone method for carbohydrate. *Anal Biochem*, **68** (1): 332-335
- Jiang, F., Ryan, M. T., Schlame, M., Zhao, M., Gu, Z., Klingenberg, M., Pfanner, N. et Greenberg, M. L.** (2000) Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J Biol Chem*, **275** (29): 22387-22394
- Jormakka, M., Tornroth, S., Byrne, B. et Iwata, S.** (2002) Molecular basis of proton motive force generation : structure of formate dehydrogenase-N. *Science*, **295** (5561): 1863-1868
- Joseph-Horne, T., Hollomon, D. W. et Wood, P. M.** (2001) Fungal respiration : a fusion of standard and alternative components. *Biochim Biophys Acta*, **1504** (2-3): 179-195
- Jung, D. W., Bradshaw, P. C. et Pfeiffer, D. R.** (1997) Properties of a cyclosporin-insensitive permeability transition pore in yeast mitochondria. *J Biol Chem*, **272** (34): 21104-21112
- Klingenberg, M.** (1980) The ADP-ATP translocation in mitochondria, a membrane potential controlled transport. *J Membr Biol*, **56** (2): 97-105
- Kokoszka, J. E., Waymire, K. G., Levy, S. E., Sligh, J. E., Cai, J., Jones, D. P., MacGregor, G. R. et Wallace, D. C.** (2004) The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*, **427** (6973): 461-465
- Kolarov, J., Kolarova, N. et Nelson, N.** (1990) A third ADP/ATP translocator gene in yeast. *J Biol Chem*, **265** (21): 12711-12716
- Koppel, D. A., Kinnally, K. W., Masters, P., Forte, M., Blachly-Dyson, E. et Mannella, C. A.** (1998) Bacterial expression and characterization of the mitochondrial outer membrane channel. Effects of N-terminal modifications. *J Biol Chem*, **273** (22): 13794-13800
- Kotaria, R., Mayor, J. A., Walters, D. E. et Kaplan, R. S.** (1999) Oligomeric state of wild-type and cysteine-less yeast mitochondrial citrate transport proteins. *J Bioenerg Biomembr*, **31** (6): 543-549
- Krämer, R., Aquila, H. et Klingenberg, M.** (1977) Isolation of the unliganded adenosine 5'-diphosphate, adenosine 5'-triphosphate carrier-linked binding protein and incorporation into the membranes of liposomes. *Biochemistry*, **16** (23): 4949-4953
- Krämer, R. et Klingenberg, M.** (1980) Modulation of the reconstituted adenine nucleotide exchange by membrane potential. *Biochemistry*, **19** (3): 556-560

- Krämer, R.** (1982) Cholesterol as activator of ADP-ATP exchange in reconstituted liposomes and in mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, **693** (2): 296-304
- Kunji, E. R.** (2004) The role and structure of mitochondrial carriers. *FEBS Lett*, **564** (3): 239-244
- Laage, R. et Langosch, D.** (2001) Strategies for prokaryotic expression of eukaryotic membrane proteins. *Traffic*, **2** (2): 99-104
- Lacapère, J.-J., Pebay-Peyroula, E., Neumann, J.-M. et Etchebest, C.** (2007) Determining membrane protein structures : still a challenge! *Trends Biochem Sci*, **32** (6): 259-270
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** (5259): 680-685
- LaNoue, K., Mizani, S. M. et Klingenberg, M.** (1978) Electrical imbalance of adenine nucleotide transport across the mitochondrial membrane. *J Biol Chem*, **253** (1): 191-198
- Lascaris, R., Bussemaker, H. J., Boorsma, A., Piper, M., Van der Spek, H., Grivell, L. et Blom, J.** (2002) Hap4p overexpression in glucose-grown *Saccharomyces cerevisiae* induces cells to enter a novel metabolic state. *Genome Biol*, **4** (1): R3
- Lauquin, G. J.-M. et Vignais, P. V.** (1976) Interaction of (3H) bongkreic acid with the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Biochemistry*, **15** (11): 2316-2322
- Lauquin, G. J.-M., Duplaa, A. M., Klein, G., Rousseau, A. et Vignais, P. V.** (1976) Isobongkreic acid, a new inhibitor of mitochondrial ADP-ATP transport : radioactive labeling and chemical and biological properties. *Biochemistry*, **15** (11): 2323-2327
- Le Fur, Y., Maume, G., Feuillat, M. et Maume, B. F.** (1999) Characterization by gas chromatography/mass spectrometry of sterols in *Saccharomyces cerevisiae* during autolysis. *J Agric Food Chem*, **47** (7): 2860-2864
- Le Maire, M., Champeil, P. et Moller, J. V.** (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim Biophys Acta*, **1508** (1-2): 86-111
- Le Saux, A., Roux, P., Trézéguet, V., Fiore, C., Schwimmer, C., Dianoux, A. C., Vignais, P. V., Brandolin, G. et Lauquin, G. J.-M.** (1996) Conformational changes of the yeast mitochondrial adenosine diphosphate/adenosine triphosphate carrier studied through its intrinsic fluorescence. 1. Tryptophanyl residues of the carrier can be mutated without impairing protein activity. *Biochemistry*, **35** (50): 16116-16124
- Ledesma, A., De Lacoba, M. G. et Rial, E.** (2002) The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biol*, **3** (12): REVIEWS3015
- Linden, M. et Gellerfors, P.** (1983) Hydrodynamic properties of porin isolated from outer membranes of rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, **736** (1): 125-129
- Lodi, T., Bove, C., Fontanesi, F., Viola, A. M. et Ferrero, I.** (2006) Mutation D104G in ANT1 gene : complementation study in *Saccharomyces cerevisiae* as a model system. *Biochem Biophys Res Commun*, **341** (3): 810-815
- Lorenz-Fonfria, V. A., Villaverde, J., Trézéguet, V., Lauquin, G. J.-M., Brandolin, G. et Padros, E.** (2003) Structural and functional implications of the instability of the ADP/ATP transporter purified from mitochondria as revealed by FTIR spectroscopy. *Biophys J*, **85** (1): 255-266
- Loura, L. M., Castanho, M. A., Fedorov, A. et Prieto, M.** (2001) A photophysical study of the polyene antibiotic filipin. Self-aggregation and filipin-ergosterol interaction. *Biochim Biophys Acta*, **1510** (1-2): 125-135
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et Randall, R. J.** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193** (1): 265-275

- Ludwig, O., Krause, J., Hay, R. et Benz, R.** (1988) Purification and characterization of the pore forming protein of yeast mitochondrial outer membrane. *Eur Biophys J*, **15** (5): 269-276
- Majima, E., Ikawa, K., Takeda, M., Hashimoto, M., Shinohara, Y. et Terada, H.** (1995) Translocation of loops regulates transport activity of mitochondrial ADP/ATP carrier deduced from formation of a specific intermolecular disulfide bridge catalyzed by copper-o-phenanthroline. *J Biol Chem*, **270** (49): 29548-29554
- Mannella, C. A. et Bonner, W. D., Jr.** (1975) Biochemical characteristics of the outer membranes of plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, **413** (2): 213-225
- Mannella, C. A., Marko, M. et Buttle, K.** (1997) Reconsidering mitochondrial structure : new views of an old organelle. *Trends Biochem Sci*, **22** (2): 37-38
- Mannella, C. A.** (1998) Conformational changes in the mitochondrial channel protein, VDAC, and their functional implications. *J Struct Biol*, **121** (2): 207-218
- Mannella, C. A.** (2006) Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta*, **1763** (5-6): 542-548
- Marty, I., Brandolin, G., Gagnon, J., Brasseur, R. et Vignais, P. V.** (1992) Topography of the membrane-bound ADP/ATP carrier assessed by enzymatic proteolysis. *Biochemistry*, **31** (16): 4058-4065
- Mayinger, P., Winkler, E. et Klingenberg, M.** (1989) The ADP/ATP carrier from yeast (AAC-2) is uniquely suited for the assignment of the binding center by photoaffinity labeling. *FEBS Lett*, **244** (2): 421-426
- McEneaney, M. W., Snowman, A. M., Trifiletti, R. R. et Snyder, S. H.** (1992) Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor : association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89** (8): 3170-3174
- McGregor, C. L., Chen, L., Pomroy, N. C., Hwang, P., Go, S., Chakrabartty, A. et Prive, G. G.** (2003) Lipopeptide detergents designed for the structural study of membrane proteins. *Nat Biotechnol*, **21** (2): 171-176
- Meisinger, C., Sommer, T. et Pfanner, N.** (2000) Purification of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria devoid of microsomal and cytosolic contaminations. *Anal Biochem*, **287** (2): 339-342
- Michejda, J., Guo, X. J. et Lauquin, G. J.-M.** (1990) The respiration of cells and mitochondria of porin deficient yeast mutants is coupled. *Biochem Biophys Res Commun*, **171** (1): 354-361
- Mihara, K. et Sato, R.** (1985) Molecular cloning and sequencing of cDNA for yeast porin, an outer mitochondrial membrane protein : a search for targeting signal in the primary structure. *EMBO J*, **4** (3): 769-774
- Miroux, B. et Walker, J. E.** (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli* : mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol*, **260** (3): 289-298
- Mitchell, P.** (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, **191**: 144-148
- Moller, J. V. et Le Maire, M.** (1993) Detergent binding as a measure of hydrophobic surface area of integral membrane proteins. *J Biol Chem*, **268** (25): 18659-18672
- Monne, M., Robinson, A. J., Boes, C., Harbour, M. E., Fearnley, I. M. et Kunji, E. R.** (2007) The mimivirus genome encodes a mitochondrial carrier that transports dATP and dTTP. *J Virol*, **81** (7): 3181-3186
- Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettlesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S. L., Ng, S. L. et Fesik, S. W.** (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*, **381** (6580): 335-341

- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T. et Tsujimoto, Y.** (2005) Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*, **434** (7033): 652-658
- Nakashima, R. A., Mangan, P. S., Colombini, M. et Pedersen, P. L.** (1986) Hexokinase receptor complex in hepatoma mitochondria : evidence from N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-labeling studies for the involvement of the pore-forming protein VDAC. *Biochemistry*, **25** (5): 1015-1021
- Newmeyer, D. D. et Ferguson-Miller, S.** (2003) Mitochondria : releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*, **112** (4): 481-490
- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. et Kinosita, K., Jr.** (1997) Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature*, **386** (6622): 299-302
- Nury, H., Dahout-Gonzalez, C., Trézéguet, V., Lauquin, G. J.-M., Brandolin, G. et Pebay-Peyroula, E.** (2005) Structural basis for lipid-mediated interactions between mitochondrial ADP/ATP carrier monomers. *FEBS Lett*, **579** (27): 6031-6036
- Nury, H., Dahout-Gonzalez, C., Trézéguet, V., Lauquin, G. J.-M., Brandolin, G. et Pebay-Peyroula, E.** (2006) Relations between structure and function of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Annu Rev Biochem*, **75**: 713-741
- Ohlmeier, S., Kastaniotis, A. J., Hiltunen, J. K. et Bergmann, U.** (2004) The yeast mitochondrial proteome, a study of fermentative and respiratory growth. *J Biol Chem*, **279** (6): 3956-3979
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. et Gray, T.** (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci*, **4** (11): 2411-2423
- Paila, Y. D., Pucadyil, T. J. et Chattopadhyay, A.** (2005) The cholesterol-complexing agent digitonin modulates ligand binding of the bovine hippocampal serotonin 1A receptor. *Mol Membr Biol*, **22** (3): 241-249
- Palmieri, F.** (1994) Mitochondrial carrier proteins. *FEBS Lett*, **346** (1): 48-54
- Palmieri, F.** (2004) The mitochondrial transporter family (SLC25) : physiological and pathological implications. *Pflugers Arch*, **447** (5): 689-709
- Papadopoulos, V. et Brown, A. S.** (1995) Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **53** (1-6): 103-110
- Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trézéguet, V., Lauquin, G. J.-M. et Brandolin, G.** (2003) Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature*, **426** (6962): 39-44
- Pebay-Peyroula, E. et Brandolin, G.** (2004) Nucleotide exchange in mitochondria : insight at a molecular level. *Curr Opin Struct Biol*, **14** (4): 420-425
- Peng, S., Blachly-Dyson, E., Colombini, M. et Forte, M.** (1992) Determination of the number of polypeptide subunits in a functional VDAC channel from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bioenerg Biomembr*, **24** (1): 27-31
- Petit, P. X., Gubern, M., Diolez, P., Susin, S. A., Zamzami, N. et Kroemer, G.** (1998) Disruption of the outer mitochondrial membrane as a result of large amplitude swelling : the impact of irreversible permeability transition. *FEBS Lett*, **426** (1): 111-116
- Pfaff, E. et Klingenberg, M.** (1968) Adenine nucleotide translocation of mitochondria. 1. Specificity and control. *Eur J Biochem*, **6** (1): 66-79
- Plusquellec, D., Chevalier, G., Talibart, R. et Wroblewski, H.** (1989) Synthesis and characterization of 6-O-(N-heptylcarbamoyl)-methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, a new surfactant for membrane studies. *Anal Biochem*, **179** (1): 145-153

- Popp, B., Schmid, A. et Benz, R.** (1995) Role of sterols in the functional reconstitution of water-soluble mitochondrial porins from different organisms. *Biochemistry*, **34** (10): 3352-3361
- Popp, B., Court, D. A., Benz, R., Neupert, W. et Lill, R.** (1996) The role of the N and C termini of recombinant *Neurospora* mitochondrial porin in channel formation and voltage-dependent gating. *J Biol Chem*, **271** (23): 13593-13599
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. et Belfrage, G.** (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, **258** (5536): 598-599
- Postis, V., De Marcos Lousa, C., Arnou, B., Lauquin, G. J.-M. et Trézéguet, V.** (2005) Subunits of the yeast mitochondrial ADP/ATP carrier : cooperation within the dimer. *Biochemistry*, **44** (45): 14732-14740
- Rauch, G. et Moran, O.** (1994) On the structure of mitochondrial porins and its homologies with bacterial porins. *Biochem Biophys Res Commun*, **200** (2): 908-915
- Rehling, P., Brandner, K. et Pfanner, N.** (2004) Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5** (7): 519-530
- Reichert, A. S. et Neupert, W.** (2002) Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria - role in protein transport. *Biochim Biophys Acta*, **1592** (1): 41-49
- Revie, D., Smith, D. W. et Yee, T. W.** (1988) Kinetic analysis for optimization of DNA ligation reactions. *Nucleic Acids Res*, **16** (21): 10301-10321
- Rey, M., Brazzolotto, X., Clemenccon, B., Afchain, A., Brandolin, G. et Pelosi, L.** (2007) The *Saccharomyces cerevisiae* ADP/ATP carrier-iso 1 cytochrome *c* fusion protein : one-step purification and functional analysis *in vitro*. *Biochimie*: accepté pour publication
- Riccio, P., Aquila, H. et Klingenberg, M.** (1975a) Solubilization of the carboxyatractylate binding protein from mitochondria. *FEBS Lett*, **56** (1): 192-132
- Riccio, P., Aquila, H. et Klingenberg, M.** (1975b) Purification of the carboxyatractylate binding protein from mitochondria. *FEBS Lett*, **56** (1): 133-138
- Robinson, A. J. et Kunji, E. R.** (2006) Mitochondrial carriers in the cytoplasmic state have a common substrate binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103** (8): 2617-2622
- Roman, I., Figys, J., Steurs, G. et Zizi, M.** (2005) *In vitro* interactions between the two mitochondrial membrane proteins VDAC and cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry*, **44** (39): 13192-13201
- Roucou, X., Manon, S. et Guerin, M.** (1997) Conditions allowing different states of ATP- and GDP-induced permeability in mitochondria from different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, **1324** (1): 120-132
- Runke, G., Maier, E., Summers, W. A., Bay, D. C., Benz, R. et Court, D. A.** (2006) Deletion variants of *Neurospora* mitochondrial porin : electrophysiological and spectroscopic analysis. *Biophys J*, **90** (9): 3155-3164
- Ryerse, J., Blachly-Dyson, E., Forte, M. et Nagel, B.** (1997) Cloning and molecular characterization of a voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) from *Drosophila melanogaster*. *Biochim Biophys Acta*, **1327** (2): 204-212
- Saier, M. H., Jr.** (2000) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64** (2): 354-411
- Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I., Yanagida, T., Wada, Y. et Futai, M.** (1999) Mechanical rotation of the *c* subunit oligomer in ATP synthase (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>) : direct observation. *Science*, **286** (5445): 1722-1724

- Saraste, M. et Walker, J. E.** (1982) Internal sequence repeats and the path of polypeptide in mitochondrial ADP/ATP translocase. *FEBS Lett*, **144** (2): 250-254
- Schafmeister, C. E., Miercke, L. J. et Stroud, R. M.** (1993) Structure at 2.5 Å of a designed peptide that maintains solubility of membrane proteins. *Science*, **262** (5134): 734-738
- Schagger, H. et Pfeiffer, K.** (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J*, **19** (8): 1777-1783
- Schein, S. J., Colombini, M. et Finkelstein, A.** (1976) Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from *Paramecium* mitochondria. *J Membr Biol*, **30** (2): 99-120
- Schinzel, A. C., Takeuchi, O., Huang, Z., Fisher, J. K., Zhou, Z., Rubens, J., Hetz, C., Danial, N. N., Moskowitz, M. A. et Korsmeyer, S. J.** (2005) Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102** (34): 12005-12010
- Schroers, A., Burkovski, A., Wohlrab, H. et Krämer, R.** (1998) The phosphate carrier from yeast mitochondria. Dimerization is a prerequisite for function. *J Biol Chem*, **273** (23): 14269-14276
- Schulz, G. E.** (2002) The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1565** (2): 308-317
- Seddon, A. M., Curnow, P. et Booth, P. J.** (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta*, **1666** (1-2): 105-117
- Shanmugavadivu, B., Apell, H. J., Meins, T., Zeth, K. et Kleinschmidt, J. H.** (2007) Correct folding of the beta-barrel of the human membrane protein VDAC requires a lipid bilayer. *J Mol Biol*, **368** (1): 66-78
- Shi, Y., Jiang, C., Chen, Q. et Tang, H.** (2003) One-step on-column affinity refolding purification and functional analysis of recombinant human VDAC1. *Biochem Biophys Res Commun*, **303** (2): 475-482
- Shoshan-Barmatz, V. et Gincel, D.** (2003) The voltage-dependent anion channel : characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death. *Cell Biochem Biophys*, **39** (3): 279-292
- Shoshan-Barmatz, V. et Israelson, A.** (2005) The voltage-dependent anion channel in endoplasmic/sarcoplasmic reticulum : characterization, modulation and possible function. *J Membr Biol*, **204** (2): 57-66
- Sikorski, R. S. et Hieter, P.** (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122** (1): 19-27
- Skommer, J., Wlodkowic, D. et Deptala, A.** (2007) Larger than life : mitochondria and the Bcl-2 family. *Leuk Res*, **31** (3): 277-286
- Slocinska, M., Szewczyk, A., Hryniewiecka, L. et Kmita, H.** (2004) Benzodiazepine binding to mitochondrial membranes of the amoeba *Acanthamoeba castellanii* and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biochim Pol*, **51** (4): 953-962
- Smith, A. L.** (1967) Preparation, properties and conditions for assay of mitochondria : slaughterhouse material, small-scale. *Methods Enzymol*, **10**: 81-86
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. et Klenk, D. C.** (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, **150** (1): 76-85
- Song, J. et Colombini, M.** (1996) Indications of a common folding pattern for VDAC channels from all sources. *J Bioenerg Biomembr*, **28** (2): 153-161

- Song, J., Midson, C., Blachly-Dyson, E., Forte, M. et Colombini, M.** (1998) The topology of VDAC as probed by biotin modification. *J Biol Chem*, **273** (38): 24406-24413
- Speer, O., Back, N., Buerklen, T., Brdiczka, D., Koretsky, A., Wallimann, T. et Eriksson, O.** (2005) Octameric mitochondrial creatine kinase induces and stabilizes contact sites between the inner and outer membrane. *Biochem J*, **385** (Pt 2): 445-450
- Stanislas, E. et Vignais, P.** (1964) [On the principal toxins of *Atractylis gummifera* L.]. *C R Hebd Seances Acad Sci*, **259**: 4872-4875
- Taylor, R. D. et Pfanner, N.** (2004) The protein import and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *Biochim Biophys Acta*, **1658** (1-2): 37-43
- Thuswaldner, S., Lagerstedt, J. O., Rojas-Stutz, M., Bouhidel, K., Der, C., Leborgne-Castel, N., Mishra, A., Marty, F., Schoefs, B., Adamska, I., Persson, B. L. et Spetea, C.** (2007) Identification, expression and functional analyses of a thylakoid ATP/ADP carrier from *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, **282** (12): 8848-8859
- Towbin, H., Staehelin, T. et Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76** (9): 4350-4354
- Trézéguet, V., Le Saux, A., David, C., Gourdet, C., Fiore, C., Dianoux, A., Brandolin, G. et Lauquin, G. J.-M.** (2000) A covalent tandem dimer of the mitochondrial ADP/ATP carrier is functional *in vivo*. *Biochim Biophys Acta*, **1457** (1-2): 81-93
- Tribet, C., Audebert, R. et Popot, J. L.** (1996) Amphipols : polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93** (26): 15047-15050
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. et Yoshikawa, S.** (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. *Science*, **272** (5265): 1136-1144
- Verrier, F., Deniaud, A., Lebras, M., Metivier, D., Kroemer, G., Mignotte, B., Jan, G. et Brenner, C.** (2004) Dynamic evolution of the adenine nucleotide translocase interactome during chemotherapy-induced apoptosis. *Oncogene*, **23** (49): 8049-8064
- Vignais, P. V., Vignais, P. M. et Defaye, G.** (1971) Gummiferin, an inhibitor of the adenine-nucleotide translocation. Study of its binding properties to mitochondria. *FEBS Lett*, **17** (2): 281-288
- Vyssokikh, M. Y. et Brdiczka, D.** (2003) The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. *Acta Biochim Pol*, **50** (2): 389-404
- Wallin, E. et Von Heijne, G.** (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci*, **7** (4): 1029-1038
- Werkheiser, W. C. et Bartley, W.** (1957) The study of steady-state concentrations of internal solutes of mitochondria by rapid centrifugal transfer to a fixation medium. *Biochem J*, **66** (1): 79-91
- Xu, X., Decker, W., Sampson, M. J., Craigen, W. J. et Colombini, M.** (1999) Mouse VDAC isoforms expressed in yeast : channel properties and their roles in mitochondrial outer membrane permeability. *J Membr Biol*, **170** (2): 89-102
- Yaffe, M. P., Jensen, R. E. et Guido, E. C.** (1989) The major 45-kDa protein of the yeast mitochondrial outer membrane is not essential for cell growth or mitochondrial function. *J Biol Chem*, **264** (35): 21091-21096
- Yehezkel, G., Hadad, N., Zaid, H., Sivan, S. et Shoshan-Barmatz, V.** (2006) Nucleotide-binding sites in the voltage-dependent anion channel : characterization and localization. *J Biol Chem*, **281** (9): 5938-5946

**Yernool, D., Boudker, O., Jin, Y. et Gouaux, E.** (2004) Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature*, **431** (7010): 811-818

**Yu, S. M., McQuade, D. T., Quinn, M. A., Hackenberger, C. P., Krebs, M. P., Polans, A. S. et Gellman, S. H.** (2000) An improved tripod amphiphile for membrane protein solubilization. *Protein Sci*, **9** (12): 2518-2527

**Zalk, R., Israelson, A., Garty, E. S., Azoulay-Zohar, H. et Shoshan-Barmatz, V.** (2005) Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome *c* release from mitochondria. *Biochem J*, **386** (Pt 1): 73-83

**Zoratti, M., Szabo, I. et De Marchi, U.** (2005) Mitochondrial permeability transitions : how many doors to the house? *Biochim Biophys Acta*, **1706** (1-2): 40-52

# **Partie VIII**



## **Annexe : Article publié**





# The *Saccharomyces cerevisiae* ADP/ATP carrier-iso 1 cytochrome *c* fusion protein: One-step purification and functional analysis *in vitro*

Martial Rey, Xavier Brazzolotto, Benjamin Cléménçon, Agathe Afchain,  
Gérard Brandolin, Ludovic Pelosi\*

Laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés (BBSI), Institut de Recherches en Technologies et Sciences du Vivant (iRTSV),  
UMR 5092 CNRS-CEA-Université Joseph Fourier (UJF), CEA-Grenoble, 17 Avenue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France

Received 14 December 2006; accepted 30 March 2007

## Abstract

Genetic expression versus plasmidic overexpression of a functional recombinant fusion protein combining the yeast *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial ADP/ATP carrier (Anc2p) and the iso-1-cytochrome *c* (Cyc1p) has been investigated, with the main aim of increasing the polar surface of the carrier to improve its crystallization properties. The gene encoding the his6-tagged fusion protein was expressed in yeast under the control of the regulatory sequences of *ScANC2* or under the control of the strong yeast *PMA1* promoter. In both cases, the chimeric carrier, Anc2-Cyc1(His6)p, was able to restore growth on a non-fermentable carbon source of a yeast strain devoid of functional ADP/ATP carrier, demonstrating its transport activity. Nevertheless, when the expression vector was used, the level of expression of Anc2-Cyc1(His6)p was no greater than that of the chimeric carrier obtained in yeast mitochondria after homologous recombination. Optimal conditions to extract and to purify Anc2-Cyc1(His6)p were determined. A series of detergents was screened for their ability to extract and to preserve *in vitro* the chimeric carrier. A rapid, single step purification of Anc2-Cyc1(His6)p was developed, using *n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside (DoDM) as the best detergent to solubilize the chimeric protein. Carboxyatractyloside- (CATR-) and nucleotide-binding sites were preserved in the purified protein. Moreover, the Cyc1p moiety of Anc2-Cyc1(His6)p-CATR complex solubilized in DoDM was still able to interact *in vitro* with the cytochrome *c* oxidase (COX), with the same affinity as yeast Cyc1p. Improved production and purification of Anc2-Cyc1(His6)p-CATR complex opens up new possibilities for the use of this protein in crystallographic approaches to the yeast ADP/ATP carrier. Furthermore, Anc2-Cyc1(His6)p may be an useful molecular tool to investigate *in vivo* interactions between components of the respiratory chain complexes such as COX and the proteins implicated in ATP biogenesis, such as the ATP/ADP carrier.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** ADP/ATP carrier; ADP/ATP translocase; Cytochrome *c*; Mitochondria; Expression vector; *Saccharomyces cerevisiae*; Carboxyatractyloside; Bongkrekic acid

**Abbreviations:** ATR, atractyloside; CATR, carboxyatractyloside; BA, bongkrekic acid; isoBA, isobongkrekic acid; N-ATR, 6'-*O*-naphthoyl-atractyloside; N-ADP, 6'-*O*-naphthoyl-ADP; DFP, di-isopropyl fluorophosphate; IMAC, immobilized metal-ion affinity chromatography; Ni-NTA, nickel-nitrilotriacetic acid; PMSE, phenylmethylsulfonyl fluoride; HRP, horseradish peroxidase; LAPAO, 3-laurylamido-*N,N*-dimethylpropylaminooxide; LDAO, lauryl-*N,N*-dimethyl-aminooxide; VDAC, voltage dependent anion channel; BSA, bovine serum albumin; COX, cytochrome *c* oxidase.

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 38 78 34 76.

E-mail address: [ludovic.pelosi@cea.fr](mailto:ludovic.pelosi@cea.fr) (L. Pelosi).

## 1. Introduction

The ADP/ATP carrier is a protein of the inner mitochondrial membrane, which in energized mitochondria exclusively catalyzes the one-to-one exchange of cytosolic ADP for ATP generated in the matrix space by oxidative phosphorylation [1]. This transport system can be blocked by specific inhibitors which bind to the carrier with high affinity and belong to two different families: atractyloside (ATR) and carboxyatractyloside (CATR) on the one hand, and bongkrekic acid (BA) and

isobongkreic acid (isoBA) on the other. These inhibitors recognize two pre-existing conformations of the carrier protein, referred to as the CATR and BA conformations, and stabilize the carrier as the CATR- and BA-carrier complexes, which exhibit different chemical, biochemical and immunochemical reactivities. It has been suggested that the transition between the CATR and BA conformations is involved in the ADP/ATP transport mechanism [2]. Therefore, high resolution structural analysis of these two complexes would be invaluable in understanding the nucleotide transport process at the molecular level.

Recently, the 3D structure of the bovine heart ADP/ATP carrier isoform 1 (AAC1) complexed to CATR has been solved at 2.2 Å resolution [3]. Despite this progress, the molecular mechanisms in which this enzyme family is involved are still poorly understood and remain largely debated [4,5]. New structural data using mutant proteins will be necessary to establish which residues of the ADP/ATP carrier are critical for transport activity. In this respect, the *Saccharomyces cerevisiae* ADP/ATP carrier isoform 2 (Anc2p) has been the most studied [6] and therefore is the main candidate for a combination of mutagenesis and structural approaches. However, up to now, attempts to crystallize this protein have failed, probably due to the lack of hydrophilic surfaces which impairs the crystallization process [7]. To overcome this problem, we have recently engineered in our laboratory a protein (Fig. 1) resulting from the fusion at the C-terminal end of the *S. cerevisiae* Anc2p of mitochondrial iso-1-cytochrome *c* (Cyc1p) [8], a highly hydrophilic protein of known 3D structure [9] which in addition is colored and therefore suitable for crystallization attempts, including the use of lipidic cube phase [10]. Nevertheless, several problematic points were highlighted. Firstly, it was found that the amount of the resulting chimeric protein Anc2-Cyc1(His6)p produced in *S. cerevisiae* was half that of Anc2(His6)p that bears only a six-histidine tag (His6) at the C-terminal extremity [11]. Secondly, the purification procedure, which included several steps of ion exchange and affinity chromatography, was lengthy and needed to be shortened to preserve the binding capacity of the isolated carrier. Finally, other detergents were tested regarding the binding properties of the carrier since LAPAO, used previously to

purify Anc2-Cyc1(His6)p [8] and to crystallize AAC1 [3], is not able to preserve efficiently the structure of the nucleotide and inhibitor binding sites in the chimeric carrier (see this work).

In this paper, we describe the optimized conditions used to produce and to purify Anc2-Cyc1(His6)p with a view to large-scale production. Genetic expression and plasmidic overexpression of the chimeric protein were investigated, and the data obtained are discussed and compared with results from the literature. We then tested a series of detergents for their ability to extract efficiently Anc2-Cyc1(His6)p. Finally, a rapid single-step purification of Anc2-Cyc1(His6)p in the presence of DoDM was set up. Under these conditions, the purified chimeric protein was stable and was able to interact *in vitro* with cytochrome *c* oxidase (COX). These findings provide the first indication that Anc2-Cyc1(His6)p may be a high-potential tool for structural analyses of the yeast ADP/ATP carrier and for investigating the organization in the mitochondrial inner membrane of putative macromolecular multienzymatic complexes implicated in energy production [12,13].

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals and immunochemicals

The protein concentration was determined using the BCA (bicinchoninic acid) reagent kit from Sigma [14]. The ECL reagent kit was from Amersham Biosciences. Ni-NTA-agarose was purchased from Qiagen. N-ATR was synthesized as described previously [15]. The detergents used for Anc2-Cyc1(His6)p extraction were from Anatrace, Sigma and Vegatec. Anatrace: *n*-octyl- $\beta$ -D-maltoside (OM), *n*-nonyl- $\beta$ -D-maltoside (NM), *n*-decyl- $\beta$ -D-maltoside (DM), *n*-undecyl- $\beta$ -D-maltoside (UnDM), *n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside (DoDM), *n*-tridecyl- $\beta$ -D-maltoside (TriDM), *n*-tetradecyl- $\beta$ -D-maltoside (TetraDM), *n*-dodecyl- $\beta$ -D-glucoside (DoDG), *n*-dodecyl- $\beta$ -D-sucrose (DoDS), decanoyl-*N*-methylglucamide (Mega-10) and ANAPOE-C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>. Sigma: Emulphogen BC 720, LDAO. Vegatec: Hecameg. LAPAO was synthesized as described by Brandolin et al. [16]. Rabbit polyclonal antibodies against yeast SDS-treated-Cyc1p and yeast SDS-treated-VDAC were generously provided, by Fred Sherman (University of Rochester School of Medicine and Dentistry, Rochester, NY, USA) and by Guy Lauquin (Laboratoire de Physiologie Moléculaire et Cellulaire, Université Bordeaux 2, Bordeaux, France), respectively. The polyclonal Anc2p antibodies used were generated in rabbits against a 14-residue peptide corresponding to the C-terminal sequence (YDQLQMILFGKKFK) of Anc2p or against HTP-purified Anc2p after SDS treatment. Polyclonal antibodies against His6-tag were from US-Biological (Euromedex).

### 2.2. Bacterial and yeast strains and media

The *Escherichia coli* strain used in this work was JM109: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (*r*<sub>K</sub><sup>-</sup>, *m*<sub>K</sub><sup>+</sup>), *relA1*, *supE44*, *D(lac-proAB)*, [*F'*, *traD36*, *proAB*, *lacI<sup>q</sup>ZΔM15*]

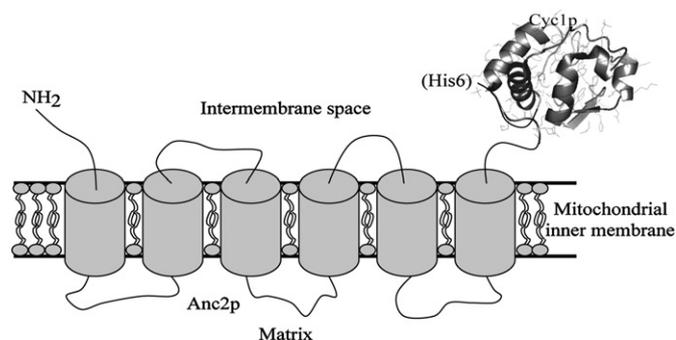


Fig. 1. Schematic representation of the postulated arrangement of Anc2-Cyc1(His6)p in the mitochondrial inner membrane deduced from the 3D structure of ANT1 [3].



### 2.7. SDS–PAGE and Western blotting

The protein concentrations were determined using a BCA protein assay kit (Sigma) and BSA as a standard. Detergents were removed from protein fractions by overnight precipitation at  $-20^{\circ}\text{C}$  in 80% (v/v) acetone and salts by subsequent washings of pellets with water. Proteins were then solubilized in SDS dissociation buffer and separated by SDS–PAGE using 12.5% polyacrylamide gels according to the Laemmli's protocol [24]. Proteins were either stained with Coomassie brilliant blue R-250 or electrotransferred onto a nitrocellulose sheet, as described previously [25]. Antibodies were used at the following dilutions: anti-Anc2p-C-ter, 1/3000; anti-SDS-treated Anc2p, 1/5000; anti-SDS-treated VDAC, 1/2000; anti-SDS-treated Cyc1p, 1:2000; and Anti-His6-tag, 1:2000. Immunorevelation of blots was performed using HRP-coupled protein A. Blots were revealed using the ECL enhanced chemiluminescence system (Amersham).

### 2.8. Redox properties of Anc2-Cyc1(His6)p and COX assays

The presence of heme in Anc2-Cyc1(His6)p-CATR complex was assessed in a UV-visible Shimadzu Spectrophotometer UV-1605 by measuring reduced versus oxidized visible spectra of the purified fraction treated by sodium dithionite and potassium ferricyanide, respectively. Cytochrome *c* oxidase (COX) activity was assayed according to the method described by Smith [26], in which the rate of oxidation of cytochrome *c* was monitored by a decrease in absorbance ( $\alpha$  band) at 550 nm. Assays were performed in 200  $\mu\text{l}$  reaction volume containing 40  $\mu\text{M}$  of yeast Cyc1p (Sigma) or purified Anc2-Cyc1(His6)p, 30 mM phosphate buffer, pH 7.4 and 1 mM EDTA. They were routinely obtained by sonication of frozen yeast mitochondria as described by Beyer [27] with few modifications [28]. Sub-mitochondrial particles SMP were diluted with a buffer containing 1% (v/v) Triton X-100, 1 mM EDTA and 1 mM  $\text{NaHCO}_3$ . The Cyc1p oxidation was initiated by addition of 10  $\mu\text{g}$  of total protein from SMP.

## 3. Results

### 3.1. Genomic expression versus plasmidic overexpression of Anc2-Cyc1(His6)p

The *ANC2::CYCIHT* fusion gene was constructed as described previously [8]. The corresponding gene product is a protein of 438 amino acids with a predicted molecular weight of 47.7 kDa, in which the Cyc1p is attached to the C-terminal extremity of Anc2p:Anc2-Cyc1(His6)p (Fig. 1). The fusion gene *ANC2::CYCIHT* was introduced into the genome of *JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^-$*  strain by homologous recombination at the *ANC2* locus (*JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^-$  ANC2::CYCIHT*) and was therefore under the control of its native promoter [8]. In another approach, in an effort to increase the amount of Anc2-Cyc1(His6)p produced in mitochondria, we tried to overexpress the chimeric protein in *Escherichia coli* BL21

DE3 C43, but these attempts failed (Pelosi et al., unpublished data). A *S. cerevisiae* overexpression system was therefore tested by cloning the *ANC2::CYCIHT* fusion gene in a centromeric vector (*pRS314-*PMAI-ADC1**) which is usually present at 1 or 2 copies per cell. This vector, which is derived from *pRS314* and *YEpl81PALEH*, bears the auxotrophy selectivity gene *TRP1*. The strong yeast *PMA1* promoter, used efficiently in yeast for heterologous expression of membrane-bound proteins, controls the foreign gene [29,30]. The resulting construction *pRS314-*PMAI-ADC1-ANC2::CYCIHT** was used to transform the *JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^-$*  strain. The ADP/ATP transport activity of Anc2-Cyc1(His6)p was assessed by its ability to rescue the growth of the *JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^-$*  strain in a non-fermentable carbon source (YPL). We checked in control experiments that the *JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^-$*  strain transformed by empty vector *pRS314-*PMAI-ADC1** was unable to grow on YPL (data not shown). The results of all complementation experiments (genomic or plasmidic) in the *JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^-$*  strain demonstrated that cells grew with lactate as the only carbon source. Interestingly, two types of clone (small- and large-sized) were obtained in solid media after transformation of the cells by the plasmid *pRS314-*PMAI-ADC1-ANC2::CYCIHT**. The large clones tested grew in YPL with a doubling time of approximately 4 h (data not shown), whereas both the small clones and *JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^-$  ANC2::CYCIHT* strain presented a doubling time of 7 h when cultured in the same media (data not shown). Both approaches (genomic expression or plasmidic overexpression) demonstrated that the protein expressed from *ANC2::CYCIHT* fusion gene was functional, enabling growth in lactate of an initially deficient strain.

### 3.2. The Anc2-Cyc1(His6)p fusion protein content of yeast mitochondria

Western blot analysis was carried out on isolated mitochondrial fractions to check whether the difference in the growth rates of Anc2-Cyc1(His6)p producing cells was related to the amount of the corresponding ADP/ATP carrier (Fig. 2). In mitochondria isolated from *JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^-$  ANC2::CYCIHT* strain, a band was detected with anti-Anc2p, anti-Cyc1p and anti-His6-tag antibodies (Fig. 2A–C, lane 1) with an apparent molecular weight (MW) of about 47 kDa, consistent with the expected molecular weight of Anc2-Cyc1(His6)p. Similar results were obtained from the mitochondrial fraction deriving from the small clones of *JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^-$*  strain harboring *pRS314-*PMAI-ADC1-ANC2::CYCIHT** (Fig. 2A–C, lane 2). An additional band migrating at approximately 13–14 kDa MW, most probably corresponding to endogenous Cyc1p, was detected in both samples with the anti-Cyc1p antibodies (Fig. 2B, lanes 1 and 2). Immunodetected VDAC was used as a control to establish that these strains produced approximately the same content of Anc2-Cyc1(His6)p (Fig. 2A and D, lanes 1 and 2). Surprisingly, the Western blot analysis of mitochondrial extracts prepared from the large clones of *JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u $^-$*  strain harboring *pRS314-*PMAI-ADC1-ANC2::CYCIHT** shows that only peptides of 35 kDa and 13–14 kDa were mainly recognized by anti-Anc2p and anti-Cyc1p

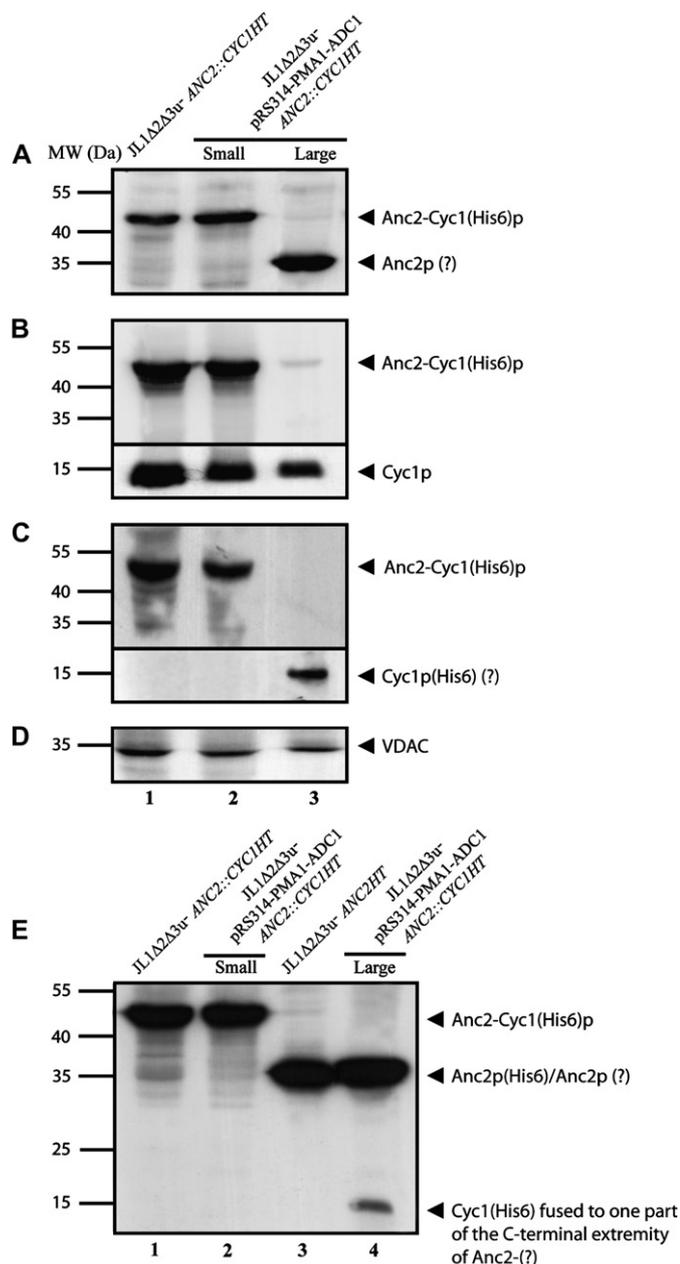


Fig. 2. Analysis of yeast mitochondria lysates by SDS–12.5% PAGE and Western blot. 20  $\mu$ g of proteins were loaded. Immunodetection of interesting polypeptides in each aliquot by polyclonal antibodies directed against (A), Anc2p, (B), Cyc1p, (C), His6-tag or (E), anti-Anc2p-C-ter (see Section 2). As a standard, a quantification of VDAC porin using polyclonal anti-VDAC antibodies (D) was performed. A to D, Genomic expression (lane 1) versus plasmidic expression (lane 2, small clone and lane 3, large clone) of Anc2-Cyc1(His6)p in JL1Δ2Δ3u<sup>-</sup> strains. (E) Genomic expression (lane 1) versus plasmidic expression (lane 2, small clone and lane 4, large clone); immunostaining of Anc2(His6)p produced from JL1Δ2Δ3u<sup>-</sup>ANC2HT was used as a control (lane 3). Immune complexes were detected with ECL as described in Section 2. Polypeptides identified are indicated by arrowheads. MW, molecular weight.

antibodies, respectively (Fig. 2A and 2B, lane 3). A significant immunodetection signal was also recorded at 15 kDa with the anti-His6-tag antibodies (Fig. 2C lane 3). Unexpectedly, the apparent MW of this ADP/ATP carrier corresponds to that of Anc2p without Cyc1p and the His6-tag. In addition, we

observed that the intensity corresponding to this band was approximately twice that of the band revealed at 47 kDa, indicating a higher expression level of the cleaved chimera. The overexpression vector was extracted from the yeast strain and sequenced again. No stop codon between ANC2 and CYC1 genes was identified. We have checked that the presence of the cleaved chimera did not result from a homologous recombination of ANC2::CYC1HT gene carried by the plasmid with the corresponding disrupted ANC2 gene of the JL1Δ2Δ3u<sup>-</sup> strain (data not shown). Similar immunodetection patterns were obtained using antibodies directed against the C-terminal extremity of Anc2p (Fig. 2E, lanes 1–4). Immunodetection of Anc2(His6)p was used as a control (Fig. 2E, lane 3). Therefore, all forms of ADP/ATP carriers detected in this study carried the C-terminal extremity epitope. However, only the sample containing the cleaved chimeric protein (Fig. 2E, lane 4) exhibited a second significant signal near 15 kDa corresponding to a fragment of the chimeric protein carrying both the Cyc1p and the C-terminal extremity epitope of Anc2p. This finding is not yet understood and will be discussed later.

CATR-binding sites were determined in a fluorometric assay carried out with N-ATR used as a probe on isolated mitochondria from the two strains (JL1Δ2Δ3u<sup>-</sup> strain harboring pRS314-PMA1-ADC1-ANC2::CYC1HT, large or small clones and JL1Δ2Δ3u<sup>-</sup> ANC2::CYC1HT), thus allowing more accurate quantification of ADP/ATP carrier (see Section 2). The number of CATR-binding sites assayed was estimated to 110 pmol CATR/mg total mitochondrial protein for the strains producing Anc2-Cyc1(His6)p, showing that the amount of ADP/ATP carrier reached a similar level whatever the biosynthetic way of the chimeric protein. Concerning the strain producing a cleaved protein, binding sites amounted to 280 pmol CATR/mg total mitochondrial protein, confirming the higher expression level of this polypeptide. Taken together, these results demonstrate that the Anc2-Cyc1(His6)p has retained CATR binding properties. Interestingly, its expression level was not modified by the presence of the strong and consecutive PMA1 promoter. Due to the lack of evidence for plasmidic overexpression, we decided to use the JL1Δ2Δ3u<sup>-</sup> ANC2::CYC1HT strain in the following experiments.

### 3.3. Extraction of Anc2-Cyc1(His6)p by detergents

A series of detergents was screened for their ability to extract and to preserve the CATR-binding capacity of the isolated chimeric carrier Anc2-Cyc1(His6)p. Mitochondrial membrane-bound proteins were solubilized in the presence of 2% (w/v) detergent at a protein concentration of 10 mg/ml and binding experiments were carried out with N-ATR and N-ADP (data not shown) in the detergent-extracts. Detergents such as MEGA-10 (glucamide family), ANAPOE-C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> and Emulphogen BC 720 (polyoxyethylene family), LAPAO and LDAO (aminoxide family) and Hecameg (alkylglucoside family) solubilized the polypeptide (data not shown) but were unable to preserve the CATR-binding sites of the chimeric carrier (Fig. 3A). As observed previously for Anc2(His6)p

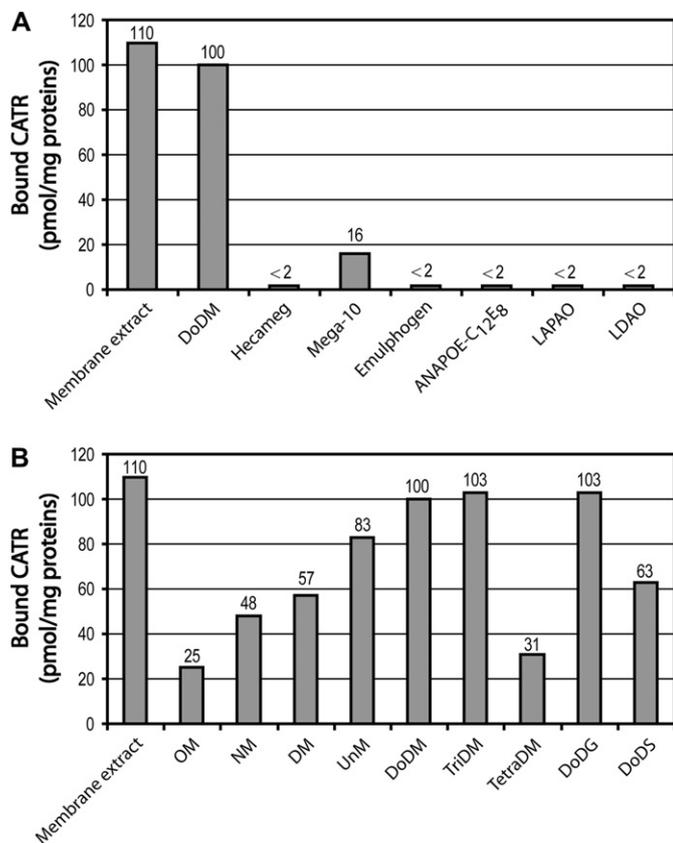


Fig. 3. (A) Screening of a series of detergents belonging to different families for their ability to extract and preserve the CATR binding capacity of Anc2-Cyc1(His6)p. (B) Screening of a series of alkylglycosides: investigation of the optimal number of carbons in the aliphatic chain and test of several kinds of hydrophilic glycosidic heads. CATR-binding was assayed in the supernatant obtained after extraction of membrane-bound proteins with various detergents tested at a final concentration of 2% (w/v). Specific binding of CATR on mitochondrial lysates is expressed as pmol of CATR fixed per mg of proteins. CATR-binding was assessed in the mitochondrial membrane extract as a standard.

[8,11], DoDM (alkylglycoside family) efficiently solubilized Anc2-Cyc1(His6)p. Recognition of specific ligands was retained since 91% of the CATR binding sites were recovered in mitochondrial lysates. Based on these results, and in order to optimize the extraction conditions, the effect of the length of the aliphatic chain and of the nature of the hydrophilic glycosidic head in detergent molecules were tested by following the number of CATR-binding sites (Fig. 3B). Interestingly, within the alkylmaltoside family with aliphatic chains extending from 8 to 14 carbon atoms, the best results were obtained with DoDM and TriDM which have a longer side chains (12 and 13 carbon atoms, respectively). The length of the alkyl chain is therefore critical to recover the highest amount of CATR-binding sites. In the same way, the most efficient of the detergents of the dodecylglycoside family that were tested in this work (DoDG and DoDM) are both characterized by a hydrophilic head with a reducing glucosidic residue carrying the alkyl chain. In contrast, the presence of a non-reducing disaccharide head, such as sucrose in DoDS, did not allow a full recovery of CATR binding sites (Fig. 3B). Due to their poor solubility at low temperature, DoDG and TriDM were

excluded from this work and DoDM was therefore used as the more suitable detergent in the following experiments.

### 3.4. One-step purification of Anc2-Cyc1(His6)p

In a previous study, purification of Anc2-Cyc1(His6)p was performed by combining ion-exchange chromatography and IMAC in LAPAO [8]. This experimental procedure proved to be unsuitable, since we showed in this work that LAPAO is not effective in conserving the functional structure of the chimeric carrier *in vitro*. A one-step IMAC procedure, using DoDM as the detergent, was therefore developed (see Section 2). The optimal ratio of Ni-NTA resin-to-total DoDM-extracted mitochondrial proteins was very high (1 ml of Ni-NTA resin to 15 mg of total proteins), as also observed for Anc2(His6)p [11]. The results obtained are presented in Fig. 4. Purification of fusion carrier was monitored by SDS-PAGE and Western blot. A single band of approximately 47 kDa corresponding to the expected size for Anc2-Cyc1(His6)p was detected either after protein staining (Fig. 4, lane 2) or by immunodetection using antibodies directed against either Anc2p (Fig. 4, lane 3) or Cyc1p (Fig. 4, lane 4). Some high molecular aggregates appeared in Fig. 2, lane 2, probably due to incomplete solubilization of proteins. Isolated, unliganded, IMAC-purified Anc2-Cyc1(His6)p was unable to bind CATR. Nevertheless, much better recovery of binding sites was obtained when the chimeric protein was solubilized and purified in the presence of N-ATR, which seems to play a role in the stabilization and protection of CATR binding sites of Anc2-Cyc1(His6)p during the IMAC purification step. Similar results were obtained using an N-ADP probe (data not

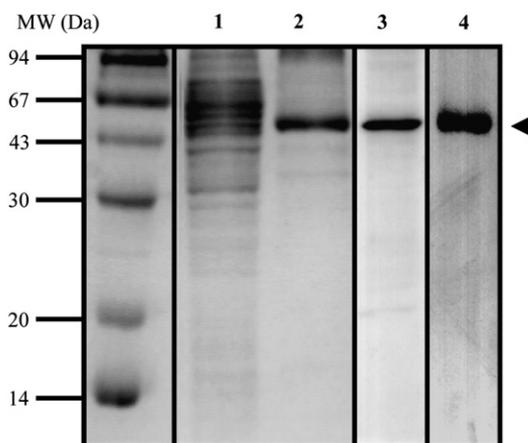


Fig. 4. Purification of Anc2-Cyc1(His6)p. The Anc2-Cyc1(His6)p complexed with CATR or N-ATR was solubilized from mitochondria with DoDM and chromatographed on Ni-NTA resin. The protein fractions were analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining (lanes 1 and 2) or immunoblotting, using anti-Anc2p (lane 3) or anti-Cyc1p (lane 4) antibodies. 10  $\mu$ g of protein was loaded in each lane as judged by the BCA assay of the samples. Immune complexes were detected with ECL as described in Section 2. Lane 1, crude mitochondrial extract; lanes 2–4, fraction eluted from Ni-NTA resin by competition with 500 mM EDTA. The arrowhead corresponds to Anc2-Cyc1(His6)p. MW, molecular weights.

shown). These results suggest that the presence of the Cyc1 moiety did not restrict the accessibility of the CATR- and nucleotide-binding sites in isolated Anc2-Cyc1(His6)p. The purification yield of the Anc2-Cyc1(His6)p or Anc2-Cyc1(His6)p-CATR complex was approximately 90–95% with respect to the amount of carrier evaluated according to the number of CATR-binding sites in mitochondrial extracts, assuming that one CATR molecule binds/carrier dimer and according to the protein assay (BCA) in the purified fraction.

### 3.5. Redox properties of the purified Anc2-Cyc1(His6)p

The presence of heme in the chimeric protein-CATR complex purified under our conditions was assessed by spectrophotometry. In the reduced state, the visible spectrum of the isolated chimeric protein displayed  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$  absorption bands characteristic of Cyc1p, centered at 550, 520, 416 and 315 nm, respectively (Fig. 5). Upon oxidation, in the presence of micromolar concentrations of potassium ferricyanide, the absorption of the  $\alpha$  and  $\beta$  bands decreased significantly, which is consistent with the lower values of the corresponding molar extinction coefficients in the oxidized state [31]. This effect was in agreement with the shift in the maximum absorption of the  $\gamma$  and  $\delta$  bands from 416 and 315 nm to 410 and 360 nm, respectively [31] (Fig. 5). The heme content of the purified Anc2-Cyc(His6)p fusion protein was estimated. The Cyc1p-to-Anc2-Cyc(His6)p molar ratio in the isolated fusion protein gave a value equal to 0.9 on the basis of Cyc1p content calculated from the absorbance of the  $\gamma$  band (in the reduced state) and from the protein content determined by BCA quantification. This result is in agreement with the values obtained previously by Dassa et al. (2005).

The redox properties of the isolated Anc2-Cyc1(His6)p p-CATR complex in DoDM demonstrate the proper folding of the Cyc1p moiety. In addition, we checked that the latter was also able to interact and thus be oxidized by the COX

prepared from beef sub-mitochondrial particles (SMP). It is well known that COX enzymatic activity is activated by high concentrations of DoDM [32], so oxidation of yeast Cyc1p by SMP was therefore assayed as a standard in presence of DoDM (see Section 2). Both proteins were tested at similar concentrations. With Cyc1p or Anc2-Cyc1(His6)p as substrates, the COX presented a specific activity corresponding to  $1.03 \pm 0.08$  or  $1.42 \pm 0.11$  nmol of oxidated Cyc1p/min/mg of SMP, respectively. Therefore, the enzymatic oxidation mechanism of Cyc1p in the chimeric protein solubilized in DoDM was not affected, demonstrating that the presence of Anc2p moiety did not restrict the accessibility of Cyc1p to the COX. Moreover, the oxidation rate of Cyc1(His6)p in Anc2-Cyc1(His6)p was comparable to that of pure Cyc1p measured in the presence of equivalent concentration of DoDM.

## 4. Discussion

The recent elucidation of the 3D structure of the bovine mitochondrial ADP/ATP carrier has shed some light on features of the nucleotide transport and CATR inhibition processes [3]. However, additional data are required to determine the conformational changes of the carrier occurring during nucleotide transport. In this way, structural determination of the yeast mitochondrial ADP/ATP carrier is of major interest as a tool to define the critical role of strategic residues by genetic engineering approaches. Isoform 2 of yeast ADP/ATP carrier (Anc2p) has been the most studied carrier, but 3D crystallography attempts with Anc2p have so far failed. In order to improve the crystallization ability of Anc2p, we have recently produced a chimeric protein, Anc2-Cyc1(His6)p, which has increased hydrophilic domains, thus providing more potential crystallization contacts [8].

In a previous study, we showed that the yield of recovered Anc2-Cyc1(His6)p in mitochondria was lower than that of Anc2(His6)p when the fusion gene *ANC2::CYC1HT* was introduced into the genome of JL1 $\Delta$ 2 $\Delta$ 3u<sup>-</sup> strain by homologous recombination at the *ANC2* locus [8]. A possible explanation is that the *ANC2* promoter was not strong enough under conditions of respiratory metabolism. In order to increase the amount of chimeric protein, a plasmidic overexpression system was developed based on another strong promoter, the yeast *PMA1* promoter, which has already been used with success to express in yeast several membrane-bound proteins such as the mitochondrial arginine–ornithine carrier from *Arabidopsis thaliana* [29]. The lactococcal expression system has not been followed up. Indeed, the yeast ADP/ATP carrier Anc2p is not better expressed due to several reasons: firstly, its N-terminal region is not adapted to the membrane insertion process of *Lactococcus lactis* [33]; secondly, the low usage of codons, such as AGA (Arg) and ACC (Thr) which are present in *ANC2* gene, is another potential limitation of the lactococcal expression system [34]. In summary, yeast ADP/ATP carrier was expressed in lactococcal membranes to levels similar to those observed for the carrier in native yeast mitochondria [35]. Unfortunately, despite obtaining several clones from

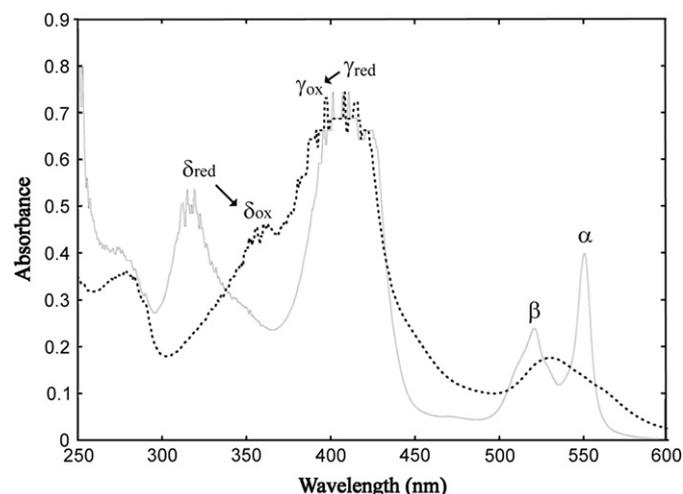


Fig. 5. Spectra of IMAC-purified Anc2-Cyc1(His6)p in the oxidized state (dashed line) and in the reduced state (solid line). The protein concentration was estimated to be 40  $\mu$ M.

the JL1Δ2Δ3u<sup>-</sup> strain carrying the plasmid pRS314-*PMAI-ADC1-ANC2::CYC1HT*, we were unable to increase significantly the amount of chimeric carrier in the mitochondrial extracts. Interestingly, despite the use of two types of strong promoter (native or *PMAI*) which present different strengths (see <http://www.yeastgenome.org/>), the same content of Anc2-Cyc1(His6)p was expressed according to the Western blot analysis (Fig. 2, lanes 1 and 2) and to the number of CATR-binding sites calculated from the mitochondrial extracts (110 pmol CATR/mg total mitochondrial protein for the both samples). The expression of the chimera was thus independent of the type of promoter used. The protein import machinery of mitochondria is therefore probably directly involved in this limitation. Several steps in this pathway may be involved, including the following: the binding of the chimeric carrier precursor to cytosolic chaperones which prevent aggregation in the cytosol of the hydrophobic carrier proteins of the inner membrane [36]; its translocation across the outer mitochondrial membrane catalyzed by the translocase of the outer membrane (TOM) complex [36]; its association by a complex of small Tim proteins in the intermembrane space; and finally, its delivery to the protein insertion machinery of the inner membrane [36]. The import of Anc2p seems to be directly correlated to its hydrophilic character, since a covalent tandem dimer of Anc2p and the heterochimeric Anc2p-phosphate carrier were imported in the mitochondria in a similar fashion to Anc2p [37]. Indeed, Anc2p is more efficiently imported than its His6-tagged form [11]. Coupling of the Cyc1(His6)p to the carrier decreased by two thirds the amount of carrier imported into mitochondria [8] despite the use of an overexpression system (this work). Furthermore, the import of Cyc1p into the mitochondrial intermembrane space is not well understood at a mechanistic level. Although the precursor apoCyc1p can insert into protein-free lipid bilayers [38], it requires the purified TOM complex to be translocated into proteoliposomes [39]. The complexity of import mechanisms makes it difficult to identify which is the limiting step of the import machinery for the chimeric ATP/ADP carrier.

In one family of clones obtained after transformation of JL1Δ2Δ3u<sup>-</sup> strain with pRS314-*PMAI-ADC1-ANC2::CYC1HT*, we observed a cleaved chimeric protein, the size of which corresponded roughly to that of Anc2p without the Cyc1(His6)p. The most likely explanation for this is that the chimeric protein is actually toxic to cells. This would lead to selective pressure for secondary chromosomal mutations in transformed strains, such as mutations in protease encoding genes, leading to cleavage. Due to the homogeneity of the 15 kDa bands observed with the anti-Anc2p-C-ter and the anti-His6-tag antibodies (see Fig. 2C and E, respectively), only one site of cleavage is expected. It would be located within the C-terminal region of Anc2p, since peptides of 35 kDa and 15 kDa were immunodetected in the mitochondrial extracts with anti-Anc2p-C-ter antibodies. The portion of the cleaved protein corresponding to the ATP/ADP carrier was more efficiently imported into the inner membrane, confirming that the addition of hydrophilic segments impairs the import of the carrier. Concerning the large clones harboring

pRS314-*PMAI-ADC1-ANC2::CYC1HT*, we suggest that the inner membrane-bound localization of Cyc1p in the chimeric protein might enhance its N-terminal degradation due to the amphipathic structure of Anc2-Cyc1(His6)p. Indeed, when the dispensable N-terminus of the holo-form of Cyc1p is replaced by hydrophobic peptides, a rapid degradation of the correspondingly modified Cyc1p occurs [40]. The authors of that work suggested that the resulting new amphipathic structures led to a stronger association of the Cyc1p with the inner mitochondrial membrane, which in turn made the protein more accessible to membrane-associated mitochondrial proteases such as the AAA proteases. These proteases regulate the biogenesis of respiratory chain complexes and prevent the accumulation of non-assembled subunits [41]. According to this model, we can expect that in such clones, the chimeric protein localized in the inner membrane would be more sensitive to the respiratory chain complex-associated proteases, possibly due to a secondary chromosomal mutation. The C-terminal region of Anc2p would be therefore recognized in these conditions and hydrolyzed. Identification of the cleavage sites is in progress in our laboratory.

In this study, optimal conditions to extract and to purify Anc2-Cyc1(His6)p were determined. DoDM was found to be a better compromise to preserve and to solubilize efficiently the chimeric protein. DoDM is also one of the best detergents, with *n*-octyl-β-D-glucoside and LDAO, for crystallizing membrane-bound proteins (see Membrane Protein Data Bank, <http://www.mpdb.ul.ie/>). Rapid, one-step purification of the Anc2-Cyc1(His6)p-N-ATR complex was achieved. Additionally, the yield of purification was increased from 50% [8] to approximately 95%. We have proved, using N-ATR or N-ADP probes, that the CATR- and nucleotide-binding sites are preserved in the purified protein. Moreover, we have demonstrated that the Cyc1p moiety of the Anc2-Cyc1(His6)p-CATR complex solubilized in DoDM was still able to interact *in vitro* with COX over the same range of affinity as Cyc1p and was thus not masked by the detergent. In summary, the purification of Anc2-Cyc1(His6)p was much improved and will allow us to attempt the crystallization of the Anc2-Cyc1(His6)p-CATR complex.

Protein–protein interactions between ATP/ADP carrier and VDAC in mammal mitochondria have been shown to occur [42], and *in vitro* interactions between VDAC from yeast and subunit I of human COX have also been demonstrated [43]. Nevertheless, there is currently no evidence for protein–protein interactions between Anc2p and yeast COX. For this purpose, Anc2-Cyc1(His6)p will be used as a tool to investigate these putative interactions *in vivo* and will open interesting perspectives in studying the dynamic structure of the outer- and inner-membrane enzymatic complexes in yeast mitochondria [13] via the crystal junctions [12].

## Acknowledgments

We thank Patrice Catty (Laboratoire de Biophysique Moléculaire et Cellulaire, CEA de Grenoble, France) for assistance in yeast molecular biology and for the generous gift of

the YEplac181PALEH plasmid. M.R., X.B. and A.A. are supported by fellowships from the Université Joseph Fourier (UJF), the French Centre National de Recherche Scientifique (CNRS) and the Commissariat à l'Étude Atomique (CEA), respectively. This work was supported by grants from the UJF, CNRS and CEA.

## References

- [1] C. Dahout-Gonzalez, H. Nury, V. Trezeguet, G.J. Lauquin, E. Pebay-Peyroula, G. Brandolin, Molecular, functional, and pathological aspects of the mitochondrial ADP/ATP carrier, *Physiology*, Bethesda, 2006, 21242–249.
- [2] G. Brandolin, A. Le Saux, V. Trezeguet, G.J. Lauquin, P.V. Vignais, Chemical, immunological, enzymatic, and genetic approaches to studying the arrangement of the peptide chain of the ADP/ATP carrier in the mitochondrial membrane, *J. Bioenerg. Biomembr.* 25 (1993) 459–472.
- [3] E. Pebay-Peyroula, C. Dahout-Gonzalez, R. Kahn, V. Trezeguet, G.J. Lauquin, G. Brandolin, Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside, *Nature* 426 (2003) 39–44.
- [4] H. Nury, C. Dahout-Gonzalez, V. Trezeguet, G.J. Lauquin, G. Brandolin, E. Pebay-Peyroula, Relations between structure and function of the mitochondrial ADP/ATP carrier, *Annu. Rev. Biochem.* 75 (2006) 713–741.
- [5] L. Bamber, M. Harding, P.J. Butler, E.R. Kunji, Yeast mitochondrial ADP/ATP carriers are monomeric in detergents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103 (2006) 16224–16229.
- [6] C. Fiore, V. Trezeguet, A. Le Saux, P. Roux, C. Schwimmer, A.C. Dianoux, F. Noel, G.J. Lauquin, G. Brandolin, P.V. Vignais, The mitochondrial ADP/ATP carrier: structural, physiological and pathological aspects, *Biochimie* 80 (1998) 137–150.
- [7] C. Ostermeier, H. Michel, Crystallization of membrane proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7 (1997) 697–701.
- [8] E.P. Dassa, C. Dahout-Gonzalez, A.C. Dianoux, G. Brandolin, Functional characterization and purification of a *Saccharomyces cerevisiae* ADP/ATP carrier-iso 1 cytochrome *c* fusion protein, *Protein Expr. Purif.* 40 (2005) 358–369.
- [9] G.V. Louie, G.D. Brayer, High-resolution refinement of yeast iso-1-cytochrome *c* and comparisons with other eukaryotic cytochromes *c*, *J. Mol. Biol.* 214 (1990) 527–555.
- [10] P. Nollert, J. Navarro, E.M. Landau, Crystallization of membrane proteins in cubo, *Methods Enzymol.* 343 (2002) 183–199.
- [11] C. Fiore, V. Trezeguet, P. Roux, A. Le Saux, F. Noel, C. Schwimmer, D. Arlot, A.C. Dianoux, G.J. Lauquin, G. Brandolin, Purification of histidine-tagged mitochondrial ADP/ATP carrier: influence of the conformational states of the C-terminal region, *Protein Expr. Purif.* 19 (2000) 57–65.
- [12] R.W. Gilkerson, J.M. Selker, R.A. Capaldi, The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation, *FEBS Lett.* 546 (2003) 355–358.
- [13] H. Schagger, K. Pfeiffer, Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria, *EMBO J.* 19 (2000) 1777–1783.
- [14] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85.
- [15] F. Boulay, G. Brandolin, G.J. Lauquin, P.V. Vignais, Synthesis and properties of fluorescent derivatives of atractyloside as potential probes of the mitochondrial ADP/ATP carrier protein, *Anal. Biochem.* 128 (1983) 323–330.
- [16] G. Brandolin, J. Doussiere, A. Gulik, T. Gulik-Krzywicki, G.J. Lauquin, P.V. Vignais, Kinetic, binding and ultrastructural properties of the beef heart adenine nucleotide carrier protein after incorporation into phospholipid vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* 592 (1980) 592–614.
- [17] S.N. Cohen, A.C. Chang, L. Hsu, Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 69 (1972) 2110–2114.
- [18] T. Drgon, L. Sabova, N. Nelson, J. Kolarov, ADP/ATP translocator is essential only for anaerobic growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.* 289 (1991) 159–162.
- [19] C. De Marcos Lousa, V. Trezeguet, A.C. Dianoux, G. Brandolin, G.J. Lauquin, The human mitochondrial ADP/ATP carriers: kinetic properties and biogenesis of wild-type and mutant proteins in the yeast, *S. cerevisiae*, *Biochemistry* 41 (2002) 14412–14420.
- [20] D. Gietz, A. St Jean, R.A. Woods, R.H. Schiestl, Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells, *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 1425.
- [21] R.S. Sikorski, P. Hieter, A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* 122 (1989) 19–27.
- [22] R.D. Gietz, A. Sugino, New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites, *Gene* 74 (1988) 527–534.
- [23] G. Daum, P.C. Bohni, G. Schatz, Import of proteins into mitochondria. Cytochrome *b2* and cytochrome *c* peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 13028–13033.
- [24] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [25] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76 (1979) 4350–4354.
- [26] L. Smith, Spectrophotometric assay of cytochrome *c* oxidase, *Methods Biochem. Anal.* 2 (1955) 427–434.
- [27] R.E. Beyer, D.L. Crankshaw, J.M. Kuner, Induction of respiratory control in submitochondrial particles by dicyclohexylcarbodiimide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28 (1967) 758–763.
- [28] G.J. Lauquin, C. Villiers, J.W. Michejda, L.V. Hryniewiecka, P.V. Vignais, Adenine nucleotide transport in sonic submitochondrial particles. Kinetic properties and binding of specific inhibitors, *Biochim. Biophys. Acta* 460 (1977) 331–345.
- [29] E. Catoni, M. Desimone, M. Hilpert, D. Wipf, R. Kunze, A. Schneider, U.I. Flugge, K. Schumacher, W.B. Frommer, Expression pattern of a nuclear encoded mitochondrial arginine-ornithine translocator gene from *Arabidopsis*, *BMC Plant Biol.* 3 (2003) 1.
- [30] U. Romer, H. Schrader, N. Gunther, N. Nettelstroth, W.B. Frommer, L. Eling, Expression, purification and characterization of recombinant sucrose synthase 1 from *Solanum tuberosum*, L. for carbohydrate engineering, *J. Biotechnol.* 107 (2004) 135–149.
- [31] R. Lemberg, J. Barrett, *Cytochromes*, Academic Press, London, New York, 1973.
- [32] P. Rosevear, T. VanAken, J. Baxter, S. Ferguson-Miller, Alkyl glycoside detergents: a simpler synthesis and their effects on kinetic and physical properties of cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry* 19 (1980) 4108–4115.
- [33] E.R. Kunji, K.W. Chan, D.J. Slotboom, S. Floyd, R. O'Connor, M. Monne, Eukaryotic membrane protein overproduction in *Lactococcus lactis*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 16 (2005) 546–551.
- [34] A. Fuglsang, Lactic acid bacteria as prime candidates for codon optimization, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312 (2003) 285–291.
- [35] E.R. Kunji, D.J. Slotboom, B. Poolman, *Lactococcus lactis* as host for overproduction of functional membrane proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1610 (2003) 97–108.
- [36] N. Wiedemann, A.E. Frazier, N. Pfanner, The protein import machinery of mitochondria, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 14473–14476.
- [37] V. Postis, C. De Marcos Lousa, B. Arnou, G.J. Lauquin, V. Trezeguet, Subunits of the yeast mitochondrial ADP/ATP carrier: cooperation within the dimer, *Biochemistry* 44 (2005) 14732–14740.
- [38] M.E. Dumont, *Mitochondrial Import of Cytochrome c*, JAI Press, Greenwich, CT, 1996, 103–126.
- [39] N. Wiedemann, V. Kozjak, T. Prinz, M.T. Ryan, C. Meisinger, N. Pfanner, K.N. Truscott, Biogenesis of yeast mitochondrial cytochrome *c*: a unique relationship to the TOM machinery, *J. Mol. Biol.* 327 (2003) 465–474.

- [40] X. Chen, R.P. Moerschell, D.A. Pearce, D.D. Ramanan, F. Sherman, Enhanced mitochondrial degradation of yeast cytochrome *c* with amphipathic structures, *Curr. Genet.* 47 (2005) 67–83.
- [41] H. Arlt, G. Steglich, R. Perryman, B. Guiard, W. Neupert, T. Langer, The formation of respiratory chain complexes in mitochondria is under the proteolytic control of the m-AAA protease, *EMBO J.* 17 (1998) 4837–4847.
- [42] F. Verrier, A. Deniaud, M. Lebras, D. Metivier, G. Kroemer, B. Mignotte, G. Jan, C. Brenner, Dynamic evolution of the adenine nucleotide translocase interactome during chemotherapy-induced apoptosis, *Oncogene* 23 (2004) 8049–8064.
- [43] I. Roman, J. Figys, G. Steurs, M. Zizi, *In vitro* interactions between the two mitochondrial membrane proteins VDAC and cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry* 44 (2005) 13192–13201.