Influence des tensioactifs dans la cristallisation du complexe photosynthétique RC-LH1-pufX de Rhodobacter blasticus

Laurie-Anne Barret

▶ **To cite this version:**

Laurie-Anne Barret. Influence des tensioactifs dans la cristallisation du complexe photosynthétique RC-LH1-pufX de Rhodobacter blasticus. Autre. Université d'Avignon, 2013. Français. NNT : 2013AVIG0250 . tel-01017895

HAL Id: tel-01017895
https://theses.hal.science/tel-01017895

Submitted on 3 Jul 2014

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.

ACADÉMIE D'AIX-MARSEILLE
UNIVERSITÉ D'AVIGNON ET DES PAYS DU VAUCLUSE

T H È S E

pour obtenir le diplôme de :
Docteur de l'Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse
école doctorale 536 "Sciences et Agrosciences"
Discipline : chimie

Influence des tensioactifs dans la cristallisation du complexe photosynthétique RC-LH1-pufX de *Rhodobacter blasticus*

Par
Laurie-Anne Barret

Soutenue devant le jury composé de :

MM. et Mmes		
Stéphane BRESSANELLI (CR)	LVMS-CNRS Gif-sur-Yvette	Examinateur
Christophe TRIBET (DR)	PASTEUR-UMR 8640 Paris	Rapporteur
Daniel PICOT (DR)	LBPCPM-UMR 7099 Paris	Rapporteur
Colette JUNGAS (Chercheur)	LBC-UMR 7265 St-Paul-lez-Durance	Co-directrice de thèse
Françoise BONNETE (CR)	CBSA-UMR 5247 Avignon	Co-directrice de thèse
Ange POLIDORI (PR)	CBSA-UMR 5247 Avignon	Directeur de thèse

Thèse préparée :

dans l'**Équipe de Chimie Bioorganique et des Systèmes Amphiphiles** (CBSA),
IBMM, UMR 5247 à l'université d'Avignon et des Pays du Vaucluse
et au **Laboratoire de Bio-énergétique cellulaire** (LBC),
IBEB-SBVME, UMR 7265 au CEA Cadarache

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à Christophe Tribet et Daniel Picot pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail, ainsi qu'à Stéphane Bressanelli pour avoir accepté de faire partie du jury. Je remercie aussi Olivier Dangles qui a participé à chacun de mes comités de suivi de thèse.

Cette thèse, financée par une bourse de la région Provence Alpes Côte d'Azur, via des fonds FEDER, a été réalisée au sein de deux laboratoires : l'équipe de Chimie Bioorganique et des Systèmes Amphiphiles (CBSA) de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM UMR 5247), à l'Université d'Avignon et de Pays du Vaucluse et le Laboratoire de Bioénergétique Cellulaire (LBC) de l'IBEB (UMR 7265) au CEA Cadarache.

Pour ce travail je tiens à remercier tout d'abord, mes trois directeurs de thèse qui ont choisi de coordonner leurs expertises scientifiques pour proposer ce sujet de thèse ambitieux. Je les remercie pour la confiance qu'ils m'ont témoignée en me demandant d'assurer l'interface de ce projet pluridisciplinaire et pour leur encadrement au cours de ces années :

- Je remercie Ange Polidori qui m'a apporté son savoir sur les tensioactifs et leurs synthèses. Merci pour ton soutien et ton aide, notamment par tes conseils techniques précieux lors de mes 7 mois de synthèse à Avignon. Merci aussi de m'avoir permis de me consacrer aux autres volets de cette thèse, en t'occupant de superviser la mise au point de la synthèse de FH-malt, que nous n'étions pas arrivés à finaliser dans le temps imparti.

- Je remercie Françoise Bonneté pour son encadrement plus particulier dans la partie physico-chimie. Merci pour ta disponibilité, ton investissement, tes réponses à mes nombreuses questions... et tes questions auxquelles on a essayé de répondre ensemble pour faire avancer les discussions. J'ai apprécié aussi ta franchise quand je venais te voir un peu désorientée entre les différentes volontés de mes trois directeurs.

- Je remercie Colette Jungas qui m'a encadrée plus spécialement sur la partie biochimie. Merci d'avoir partagé avec moi une partie de ton expérience des bactéries photosynthétiques, monde qui m'était jusqu'alors inconnu et de m'avoir formée à la manipulation des protéines membranaires. Merci aussi d'avoir su me laisser l'indépendance dont j'avais besoin pour continuer d'avancer dans ce projet sur les différentes parties en parallèle.

Je souhaiterais aussi remercier David Pignol pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour avoir pris en charge beaucoup de mes déplacements sur Avignon. J'ai toujours été rassurée de savoir que je pouvais compter sur ton œil externe et avisé dans ce projet.

J'adresse mes sincères remerciements à Bernard Pucci qui a grandement participé à la mise en place du projet et de mon recrutement. Votre dynamisme et vos nombreux conseils m'ont donné l'élan nécessaire à la réussite de cette thèse.

Je remercie vivement tous mes collègues de l'équipe CBSA et du CEA-Cadarache qui

ont participé activement à ce projet. Julien Dauvergne (CBSA) qui a réalisé la synthèse des tripodes que nous avons testés. Simon Raynal (CBSA) qui a repris la synthèse des FH-malt à mon départ d'Avignon et Cherone Barrot-Ivolot (CBSA) qui en est venu à bout lors de son stage. Grégory Durand (CBSA) pour son aide pour les mesures de CMC. Pierre Guillet (CBSA) pour ses conseils sur la rédaction sous LATEX. Marina Siponen (LBC) pour avoir testé nos cristaux au synchrotron. Frédéric Beisson, Yonghua Li et Stephan Cuiné (LB3M, CEA-Cadarache) qui m'ont guidée sur le volet lipodomique de cette thèse et permis d'accéder aux équipements de leur laboratoire.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à toutes les autres personnes qui ont collaboré à ce travail. Pierre Bernard-Savary (Chromacim SAS, Pommiers la Placette) dont l'expertise de l'HPTLC nous aura été d'une grande aide dans ce projet. Cécile Breyton et Aline Le Roy (IBS-Grenoble) pour les tests de stabilisation de la BR et leur accueil chaleureux à l'IBS lors de la mise en place de ces tests. Christine Ebel (IBS-Grenoble) pour la réalisation des tests d'ultra centrifugation analytique. Pierre Baudouin (ICS-Marcoule) qui m'a proposé de venir utiliser le densitomètre de son laboratoire. Didier Marcellin et Elisabeth Darrouzet (CEA-Marcoule) qui nous ont reçus à Marcoule pour des essais d'analyses de la protéine par SEC-MALLS. Petra Pernot et Adam Round, les "local contacts" de la ligne ID14-eh3 à l'ESRF, pour leur aide, leurs idées et leurs (nombreuses) explications. Louiza Zerrad et Vasile Heresanu pour m'avoir initiée, dans la bonne humeur, au pilotage des manipulations SAXS.

Enfin je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai pu rencontrer lors du GDR 3334 Assemblages Supramoléculaires et protéines membranaires, aux journées françaises de la photosynthèse, au GTbio, au club CCM ou aux JJC de la SCT et dont les discussions ont contribué à l'avancement de ce projet. Merci à Christine Contino-Pépin (CBSA) pour m'avoir fortement conseillée de participer aux JJC de la SCT ce qui m'a permis de gagner une invitation aux RICT 2013.

Et puis comme la réussite d'une thèse passe aussi par l'accomplissement personnel dans la vie au laboratoire et en dehors, j'adresse un grand merci à l'ensemble du personnel de l'équipe CBSA et du LBC que j'ai eu l'occasion de côtoyer en un peu plus de 3 ans. J'ajoute aussi le personnel du LB3M où j'ai passé de nombreuses journées entre l'HPTLC et l'extraction de lipide. Votre accueil, vos conseils et nos discussions auront été importants dans la réussite de ce projet. Je ne vais pas citer tous mes (désormais, ex-)collègues mais j'adresserai quand même quelques mentions spéciales à :

Simon, pour ta disponibilité, ton professionnalisme et tous tes conseils techniques aussi bien à la paillasse que sur le terrain de foot. Grâce à toi, j'ai (enfin) progressé en défense !

Anissa, une vraie grande sœur dans le labo ! Qui d'autre pour venir me tenir la lampe UV dans le seul endroit suffisamment obscur pour révéler mes plaques semi-prép : les toilettes ? !

Cindy, quand deux opposés s'attirent ça fait souvent des étincelles. Les nôtres ont pris des couleurs jaune Thalido, rose "Chimie Princesse Attitude", bleu schtroumpf et miel PW ! Et qui d'autre pour "pull-over-iser" d'un revers de manche, mes plaques semi-prép sur le mur ?

Fanny, c'est toujours rassurant d'avoir une guide dans le labyrinthe de l'université quand on débute une thèse.

Soumaya, parce qu'une thèse ne peux se vivre sans avoir une amie thésarde, elle aussi, avec qui partager son quotidien. Une dernière ligne droite et t'auras aussi le droit à ta photo avec le bandeau des thésards du LBC !

Josabel, une vraie mère pour tous les petits nouveaux du LBC. Merci pour ta gentillesse et tous ces agréables moments partagés que ce soit à la cantine du CEA ou dans les gradins des arènes d'Arles un soir de concert.

Benjamin, toujours là pour apaiser les coups de stress des thésards par tes petites attentions, ton aide scientifique ou ton humour. Et quel talent pour la déco de bureaux !

Ghassan, quelle déception pour moi que de ne pas avoir pu participer à ce tournoi épique avec l'équipe des Biogars !

Séverine, pour ta bonne humeur, ta truffade et ton énergie ! Surtout lors des chorégraphies sur Shakira, Michel Telo, ou lors du concert de Bénabar.

Laurence, "The language of friendship is not words but meanings" (H. D. Thoreau).

Je tiens à remercier aussi mes proches qui m'ont logée le temps d'un déplacement, d'un congrès ou d'une formation. Vous avez été un soutien "logistique" très appréciable dans ce projet (Magali et Lionel à Marseille, Julien et Mélisa à Montpellier, Danièle, Simon et Elodie à Paris, Delphine à Grenoble, Cindy, Audeline, Florian et Hai à Avignon). Et je remercie mes coloc's qui m'ont supportée au quotidien pendant tout ce temps. Un peu plus de 3 ans, 3 appartements et au final 24 colocataires : ça en fait des rencontres, des moments de vie partagés et des amitiés qui se sont créées ! Agathe, Caro, Emilie, Flo, Aude, Lucile, Bruno et Jo, merci pour tous ces souvenirs, entre parties de trivial et quizz du jeudi (merci aussi Ingrid et Séverine). Et puis bien sûr, il y a "mon" Haï qui me suivait dans mes footing à 6h, me préparait des repas de fou tous les midis et m'emmenait à ses entraînements de foot le soir : un préparateur physique autant qu'un coach mental, un grand ami.

Et parce qu'en plus de gérer ma thèse, j'ai dû en même temps m'occuper d'un genou devenu récalcitrant suite à une mauvaise chute, je remercie mes amis lyonnais pour leur soutien pendant ces longs mois en béquilles. Merci au "staff médical" qui n'a jamais baissé les bras, notamment ma kiné d'Aix chez qui je courais (en boitant) dès que ma thèse me laissait un petit temps libre. Aujourd'hui, deux ans après, c'est grâce à vous que je peux enfin refaire du sport comme avant et c'est un soulagement ! Et un immense plaisir, alors je tiens aussi à remercier l'équipe féminine du SCSC, sa présidente, Célia et son coach, Matthieu, pour m'avoir laissé l'occasion de reprendre en douceur parmi eux. Même si vous me faites jouer milieu défensif (merci Simon !) vous êtes trop au top, sur et en dehors du terrain !

Enfin, je remercie ma famille, mes parents, mes frères et sœurs, mes belle-sœurs et mon beau-frère, parce que vous êtes là, malgré la distance. C'est une chance pour moi d'être entourée par autant de belles personnes. ≪*Je vous aime !*≫

Et "merci la vie !". (Hymne de la coloc rue Saint Guillaume)

Table des Matières

Liste des Figures **xiii**

Liste des Tableaux **xvii**

Nomenclature **xxi**

Avant Propos **xxiii**

Influence des tensioactifs dans la cristallisation du complexe photosynthétique RC-LH1-pufX de *Rhodobacter blasticus* 3

Introduction **3**

1 Les protéines membranaires (PM) 3

1.1 Description 3

1.2 Pourquoi les étudier ? 4

1.3 L'étude structurale des protéines membranaires 5

1.3.1 La cristallographie aux rayons X 5

1.3.2 La RMN 6

1.3.3 La microscopie électronique 6

1.3.4 La microscopie à force atomique 7

1.3.5 La modélisation moléculaire 7

2 La cristallisation des protéines membranaires 7

2.1 De la cellule au cristal : un chemin semé d'embûches 7

2.1.1 La production des PM 8

2.1.2 La solubilisation des PM 8
2.1.3 La purification des PM 12
2.1.4 La cristallisation des PM 12
2.2 Les alternatives à la cristallisation *in surfo* 14
2.2.1 La cristallisation en phase cubique 15
2.2.2 La cristallisation en bicelles 16
2.3 La cristallisation *in surfo* 17
2.3.1 Influence du détergent 17
2.3.2 Influence des lipides 19
2.3.3 Voie d'optimisation n°1 : réduire l'influence du détergent . 19
2.3.4 Voie d'optimisation n°2 : rationaliser la cristallisation des PM 21
3 Le complexe protéique RC-LH1-pufX 25
3.1 La photosynthèse bactérienne 25
3.1.1 Les bactéries photosynthétiques anoxygéniques 25
3.1.2 Les pigments photosynthétiques 26
3.1.3 La chaîne photosynthétique chez les bactéries pourpres . . 26
3.1.4 Organisation dans la membrane native 28
3.2 Structure du photosystème des bactéries pourpres 29
3.2.1 Les antennes 31
3.2.2 Le complexe RC-LH1 des bactéries pourpres 33
3.3 Le complexe RC-LH1-pufX 33
3.3.1 Le polypeptide pufX 33
3.3.2 Les différents modèles structuraux proposés 34
3.4 Pourquoi ce modèle ? 35
4 Les objectifs de l'étude 38

1 Les tensioactifs **41**
1 Généralités sur les tensioactifs 41
1.1 La concentration micellaire critique 42
1.1.1 Influence de la tête polaire 43
1.1.2 Influence de la partie hydrophobe 43
1.1.3 Influence de l'environnement physico-chimique 44
1.2 nombre d'agrégation et paramètre d'empilement 45
1.3 La balance hydrophile/lipophile 46
1.4 Le point de Kraft et le point de trouble (ou "cloud point") 46
1.5 Diagramme de phases des tensioactifs 47

2 Les nouveaux outils amphiphiles conçus pour la manipulation des protéines membranaires . . . 49
2.1 Les amphipols . . . 49
2.2 Les "tripodes amphiphiles" . . . 50
2.2.1 Les tripodes de Gellman . . . 50
2.2.2 Les tripodes amphiphiles faciaux . . . 52
2.3 Les dérivés du maltose-neopentyl glycol . . . 52
2.4 Les maltosides à chaînes ramifiées . . . 53
2.5 Les cymals . . . 54
2.6 Le PCC-malt . . . 54
2.7 Les tensioactifs fluorés . . . 55
3 Synthèse des tensioactifs . . . 58
3.1 Choix des tensioactifs pour cette étude . . . 58
3.2 Synthèse des F-TAC . . . 59
3.3 Synthèse du PCC-α-malt . . . 61
3.4 Synthèse des faiblement fluorés . . . 63
3.4.1 Synthèse du F_4H_5-malt . . . 63
3.4.2 Synthèse du F_2H_9-malt . . . 66

2 Caractérisation physico-chimique des tensioactifs en solution aqueuse 73
1 Mesure de la concentration micellaire critique . . . 73
1.1 Détermination de CMC par tensiométrie de surface : principe . . . 74
1.2 Résultats pour les tensioactifs étudiés . . . 76
1.3 Discussion . . . 78
2 La diffusion des rayonnements par la matière . . . 80
2.1 Principes généraux . . . 80
2.2 La diffusion dynamique de la lumière . . . 81
2.3 La diffusion statique de la lumière . . . 83
2.4 La diffusion des rayons X (SAXS) . . . 86
2.4.1 Amplitude et intensité de diffusion . . . 86
2.4.2 Diffusion par une solution monodisperse idéale (sans interaction) . . . 87
2.4.3 Diffusion par une solution monodisperse de particules en interactions . . . 93
2.4.4 La mesure des interactions de solutions de PM . . . 95
3 Études préliminaires à la diffusion des rayonnements . . . 103
3.1 Mesure des dn/dc par réfractométrie pour la diffusion de lumière . . . 103

3.2 Mesure des volumes partiels spécifiques par densitométrie pour le SAXS . . . 103
3.3 Calculs des densités électroniques . . . 105
3.4 Mesure de la taille par DLS (Rh) . . . 106
3.5 Mesure de la masse par SEC-MALLS . . . 108
4 Étude SAXS des micelles de tensioactifs . . . 109
4.1 Les tripodes faciaux . . . 109
4.1.1 Résultats . . . 109
4.1.2 Conclusion . . . 112
4.2 Le F_8TAC . . . 114
4.2.1 Facteur de forme . . . 114
4.2.2 Facteur de structure . . . 116
4.2.3 Conclusion . . . 116
4.3 Deux tensioactifs au comportement similaire : le DDM (β) et le PCC-malt (α) . . . 119
4.3.1 Évolution en concentration . . . 119
4.3.2 Masse et nombre d'agrégation . . . 120
4.3.3 Taille des micelles (Rg, Dmax) . . . 120
4.3.4 Les simulations SASfit . . . 121
4.3.5 Conclusion sur la relation structure/propriétés physico-chimiques . . . 127
4.4 Les FH-malt . . . 129
4.4.1 Étude du F_2H_9-malt . . . 130
4.4.2 Étude du F_6H_2-malt . . . 133
4.4.3 Conclusion . . . 135
5 Intérêt des tensioactifs étudiés pour la cristallisation des protéines membranaires . . . 137
5.1 La stabilité des micelles . . . 138
5.2 Test de stabilisation de protéines membranaires . . . 139
5.2.1 Principe . . . 139
5.2.2 Résultats . . . 139
5.2.3 Conclusion . . . 142
5.3 Les interactions . . . 142

3 Mise au point d'une méthode de dosage des tensioactifs par HPTLC 145
1 La technique HPTLC . . . 146
1.1 Principe . . . 146
1.2 Schéma de montage . . . 147

1.3 Pourquoi avoir choisi l'HPTLC ? . . . 147
2 Détermination du système chromatographique . . . 148
2.1 Détermination de la phase stationnaire . . . 148
2.1.1 Objectifs et choix possibles . . . 148
2.1.2 Résultats . . . 149
2.2 Détermination de la méthode de révélation . . . 149
2.2.1 La démarche adoptée . . . 149
2.2.2 Résultats et discussion . . . 150
2.3 Détermination de la méthode d'élution . . . 151
2.3.1 Détermination de la phase mobile . . . 151
2.3.2 Détermination des conditions de migration . . . 153
3 Optimisation des conditions d'utilisation du robot déposeur d'échantillons et de la reproductibilité . . . 155
3.1 Méthode de lavage de la seringue . . . 155
3.2 Méthode de prélèvement . . . 155
3.3 Méthode de dépôt des échantillons sur la plaque . . . 157
4 Résultats . . . 158
4.1 Tableau récapitulatif des conditions HPTLC . . . 158
4.2 Gamme étalon du DDM dans l'eau . . . 158
4.3 Influence des sels : gamme étalon du DDM dans les conditions d'élution du RC-LH1-puf X . . . 159
5 Conclusion . . . 160
5.1 Un exemple de dosage de la bouée de détergent . . . 160
5.1.1 Principe . . . 160
5.1.2 Résultats . . . 161
5.2 Comparatifs avec les autre méthodes de dosage de détergents . . . 162

4 Étude des lipides et tensioactifs liés au complexe RC-LH1-puf X de *Rb. blasticus* 165
1 Étude de la composition en lipides chez *Rb. blasticus* . . . 166
1.1 Les techniques utilisées pour l'étude des lipides . . . 166
1.1.1 L'HPTLC . . . 166
1.1.2 La GC-MS . . . 166
1.1.3 L'HPLC-MS . . . 167
1.2 Identification des lipides liés au RC-LH1-puf X de *Rb. blasticus* . . . 167
1.2.1 Analyse HPTLC d'extraits de dimères . . . 167
1.2.2 Analyse HPTLC d'extraits de membranes . . . 168
1.2.3 Analyse GC-MS . . . 170

1.2.4 Analyse HPLC-MS . . . 171
1.2.5 Identification des bandes HPTLC par HPLC-MS . . . 171
1.2.6 La question de la cinquième bande et l'absence de cardiolipine . . . 173
1.2.7 Discussion et choix des lipides analysés . . . 177
1.3 Quantification des PE, PG et MMPE dans les membranes de *Rb. blasticus* . . . 178
2 Étude de l'influence des conditions de purification sur la bouée de détergent du RC-LH1 puf X . . . 178
2.1 Principe de l'étude . . . 178
2.2 Résultats et discussion . . . 179
2.2.1 Tableau des résultats . . . 179
2.2.2 Quantité de protéine purifiée . . . 179
2.2.3 Quantité de DDM liés . . . 181
2.2.4 Quantité de lipides liés . . . 181
2.2.5 Essais de cristallisation . . . 182
2.2.6 Utilisation de Bio-Beads pour éliminer l'excès de détergent 182
2.3 Conclusion . . . 184
3 Étude de l'échange PCC-malt vs. DDM . . . 184
3.1 Principe de l'étude . . . 184
3.2 Résultats et discussion . . . 185
3.2.1 Suivi qualitatif de l'échange . . . 185
3.2.2 Caractérisation de la protéine solubilisée en PCC-malt . . 187
3.3 Conclusion . . . 189
4 Influence des tensioactifs sur la bouée de détergent du RC-LH1-pufX . . . 189
4.1 Principe de l'étude . . . 189
4.2 Résultats et discussion . . . 189
4.2.1 Détermination de la quantité de tensioactifs dans la bouée 189
4.2.2 Détermination de la quantité de lipides liés . . . 190
4.3 Conclusion . . . 191

5 La cristallisation du complexe RC-LH1-pufX 193
1 La cristallisation . . . 194
1.1 La nucléation . . . 194
1.2 Les méthodes expérimentales de cristallisation . . . 197
1.2.1 En "batch" . . . 197
1.2.2 Par dialyse . . . 198
1.2.3 Par diffusion de vapeur . . . 199

2 L'approche de la cristallisation par le A_2 200
2.1 La corrélation interactions/diagramme de phase 200
2.2 Les morphodromes des cristaux de RC-LH1-pufX 203
2.3 Quid de la diffraction des cristaux de RC-LH1-pufX ? 206

Conclusion générale **209**

Partie expérimentale **217**
1 Partie synthèse 217
2 Partie physico-chimie 223
3 Partie biochimie 224
4 Rapport AUC (Dr. Christine Ebel) 226

Bibliographie **231**

Communications **245**

Liste des Figures

1 Les différentes protéines membranaires 4
2 La structure des protéines 5
3 Représentation schématique d'un monomère de tensioactif 9
4 Les tensioactifs en solution et CMC 10
5 Solubilisation des membranes par le détergent 10
6 Structures des détergents classiques 11
7 Cristallisation des protéines membranaires 13
8 La bouée dans le cristal 14
9 Diagramme de phase et structures formées par un système monooléine/eau 16
10 Étapes hypothétiques de la formation de cristaux 3D *in méso* 16
11 Les bicelle lipides/détergents 17
12 Inactivation des protéines membranaires par le détergent 18
13 Effets du retrait du détergent lors de la cristallisation de PM 20
14 Diagramme de phases d'une protéine 22
15 Crystallization slot, solubilité et A_2 23
16 Second coefficient du viriel du complexe PDL et des micelles 24
17 Structure générique de la bactériochlorophylle a 27
18 Principaux caroténoïdes chez les bactéries pourpres 27
19 Schématisation de la chaîne photosynthétique 28
20 Morphologie des membranes invaginées 29
21 Diversité architecturale des photosystèmes 30
22 Organisation des membranes photosynthétiques 31
23 Structure de l'hétérodimère α/β et les pigment associés 32
24 Structure de l'antenne LH2 chez *Rps. acidophila* 32
25 Structure du RC-LH1 *Rps. palustris* 34
26 Modèle du RC-LH1-pufX (1) 35
27 Modèle du RC-LH1-pufX (2a) 36
28 Modèle du RC-LH1-pufX (2b) 36
29 Modèle du RC-LH1-pufX (3) 37
30 Cristaux de RC-LH1-puf X 38

1.1 Les différentes classes de tensioactifs 42
1.2 CMC des composés maltoside en fonction de la chaîne hydrophobe 44
1.3 Paramètre d'empilement des tensioactifs 45
1.4 Température de Kraft 47
1.5 Diagramme de phases des détergents non ioniques 48
1.6 Exemple de diagrammes de phase de détergent 49
1.7 Exemple de structure des amphipols 50
1.8 Exemple de structure de NAPols 51
1.9 Structures des "tripodes amphiphiles" de Gellman 51
1.10 Structure et configuration spatiale des tripodes amphiphiles faciaux 52
1.11 Structures des amphiphiles maltose-neopentyl glycol 53
1.12 Structures des maltosides ramifiés à 12 carbones 54
1.13 Structures des cymals 54
1.14 Schéma des contacts formés à l'interface de la région transmembranaire . . 55
1.15 Structure du PCC-malt 55
1.16 Structure des FTAC et HFTAC 56
1.17 Structure des tensioactifs hémifluorés à tête polaire sucre 57
1.18 Structure des tensioactifs fluorés modulables en terme d'hydrophobie à tête polaire de type glucose 58
1.19 Synthèse du F8TAC 60
1.20 Mécanisme de la télomérisation radicalaire 61
1.21 Les produits et sous-produits de la synthèse du PCC-malt 62
1.22 Synthèse du PCC-malt 63
1.23 Synthèse du F_4H_5-malt 64
1.24 Mécanisme d'addition radicalaire catalysée par le zinc 65
1.25 Mécanisme de réduction de l'iodure 65
1.26 Spectre ^{1}H-RMN du composé **17** 66
1.27 Mécanisme de glycosylation en présence de NIS 67
1.28 Synthèse du F_2H_9-malt 69
1.29 Spectre ^{1}H-RMN du composé **23** 70
1.30 Spectre ^{1}H-RMN du composé **25** 70
1.31 Spectre ^{1}H-RMN du composé **26** 71
1.32 Spectre ^{1}H-RMN du composé **27** 72

2.1 Mesure de la tension superficielle 75
2.2 Détermination de la CMC 76
2.3 Résultats des mesures de CMC 77
2.4 La diffusion de la lumière et des RX 80
2.5 Variation de l'intensité diffusée et courbes d'auto-corrélation 82
2.6 La diffusion statique de la lumière 83
2.7 Analyse SEC-MALLS de la BSA 85
2.8 Détermination du Rg et I(0,0) par SAXS 88
2.9 Courbes SAXS en fonction de la forme des particules 89
2.10 Détermination de la fonction de distribution des distances 89
2.11 Modélisation du lysozyme par différentes méthodes 90

2.12 Intensité diffusée pour des sphères pleines 91
2.13 Facteur de structure et interactions 94
2.14 Effet des sels et de la température 100
2.15 Modèle simple de la déplétion 101
2.16 Effet de PEG 102
2.17 Détermination des incréments d'indices de réfraction des tensioactifs 104
2.18 Détermination des volumes partiels spécifiques 105
2.19 Courbes d'auto-corrélation obtenue par diffusion dynamique de la lumière du DDM 107
2.20 Distribution de taille des micelles de DDM et PCC-malt 107
2.21 Comparaison des tailles de micelles de PCC-malt et DDM 109
2.22 Courbes SAXS du C3Glu3, C4Glu3 et C5Glu3 en fonction de la concentration 110
2.23 Fonction de distribution de pair du C5Glu3 111
2.24 q.I(q)=f(g^2) pour le C5Glu3 112
2.25 Structure 3D du C3Glu3 113
2.26 Profils de diffusion du F8TAC en tampon Tris/HCl 20 mM pH8 114
2.27 Fonction de distribution de pair du F8TAC 115
2.28 Modèle *ab initio* de la micelle de F_8TAC 116
2.29 Évolution du facteur de structure du F_8TAC 117
2.30 Courbes SAXS du DDM et du PCC-malt dans l'eau 120
2.31 Fonction de distribution de pair pour le DDM et le PCC-malt 121
2.32 Définition des paramètres SASfit 121
2.33 Simulations SASfit du DDM et du PCC-malt 123
2.34 A_2 des micelles de DDM et de PCC-malt en fonction de la concentration en PEG 125
2.35 Influence du tampon sur le A_2 de la micelle de DDM 126
2.36 Influence de la variation en sel sur le A_2 de la micelle de DDM 127
2.37 Profils SAXS des différents tensioactifs dans l'eau 129
2.38 Résultats SAXS de l'étude des FH-malt 131
2.39 Simulation SASfit pour la micelle de F_2H_9-malt 132
2.40 Détermination de la forme cylindrique des micelles de F_6H_2-malt 134
2.41 Détermination de la forme cylindrique des micelles de F_4H_5-malt 135
2.42 Profils AUC des micelles de F_2H_9-malt 136
2.43 Profils AUC des micelles de F_4H_5-malt 136
2.44 Stabilité du cytochrome b_6f en DDM et PCC-malt 140
2.45 Migration de la bactériorhodopsine en gradient de sucrose 140
2.46 Migration de la bactériorhodopsine en gradient de sucrose 142

3.1 Appareillage de l'HPTLC 148
3.2 Mise au point de la méthode de révélation des tensioactifs sur plaques HPTLC 150
3.3 Les groupes de sélectivité des solvants selon le triangle de Snyder 151
3.4 Détermination de la phase mobile selon le principe du triangle de Snyder . 152
3.5 Optimisation des conditions de migration HPTLC 154
3.6 Paramètres HPTLC pour la méthode de dosage des tensioactifs 158

3.7 Gamme étalon et plaques HPTLC obtenues pour des standards de DDM dans l'eau ou en tampon 159
3.8 Principe du dosage de la bouée par HPTLC 160
3.9 Dosage de la bouée de détergent du RC-LH1-Puf X 161

4.1 Analyse des lipides par GC-MS *vs.* HPLC-MS 167
4.2 Identification des lipides par variation de la phase mobile sur HPTLC . . . 168
4.3 Plaque HPTLC de l'analyse des lipides chez *Rb. blasticus* 169
4.4 Résultats de l'analyse GC-MS 170
4.5 Résultats HPLC-MS de l'analyse de membranes de *Rb. blasticus* 172
4.6 Analyse par HPLC-MS de la bande 2 de l'HPTLC 173
4.7 Identification des bandes de lipides sur plaque HPTLC 174
4.8 HPTLC des lipides des membranes de *Rhodobacter* 176
4.9 Plaque HPTLC pour le couplage masse 177
4.10 Cinétique de retrait du détergent par les Biobeads 183
4.11 Suivi qualitatif de l'échange du DDM par le PCC-malt 186
4.12 Profils d'élution de complexe de RC-LH1 puf X en PCC-malt et DDM . . . 187
4.13 Spectres d'absorbance du complexe RC-LH1-pufX en DDM et PCC-malt . 188
4.14 Gel natif du RC-LH1 puf X en DDM et en PCC-malt 188

5.1 Diagramme de phases d'une protéine pour la cristallisation 195
5.2 Cristallisation en "batch" 198
5.3 Cristallisation par dialyse 198
5.4 Cristallisation par diffusion de vapeur 199
5.5 Diagrammes de phases du DDM et du PCC-malt 201
5.6 Courbes de diffusion de solutions de DDM à fortes concentrations en PEG 202
5.7 Morphodrome du RC-LH1-puf X en DDM 204
5.8 Morphodrome du RC-LH1-puf X en PCC-malt 205
5.9 Clichés de diffractions de cristaux de RC-LH1pufX en DDM et PCC-malt . 206

Liste des Tableaux

2.1 Exemples de tensions superficielles liquide/air 74
2.2 Mesure des CMC par tensiométrie de surface 76
2.3 CMC d'après la littérature 77
2.4 Mesure des incréments d'indice de réfraction 103
2.5 Mesure des volumes partiels spécifiques 105
2.6 Table des densités électroniques des tensioactifs 106
2.7 Table des densités électroniques pour une structure cœur/couronne 106
2.8 Mesure des tailles de micelles par DLS 108
2.9 Caractéristiques de la micelle de C5Glu3 en fonction de la concentration . 112
2.10 Résultats des simulations SASfit 3D pour le DDM et le PCC-malt 123
2.11 Paramètres des simulations SASfit pour le F_2H_9-malt 133

3.1 Comparatif des méthodes de dosage des détergents en routine 162

4.1 Composition lipidique relative des membranes de *Rb. blasticus* 178
4.2 Influence des conditions de purification sur la bouée du RC-LH1 puf X . . 180
4.3 Composition en tensioactif du complexe PDL 190
4.4 Influence du tensioactif sur la quantité de lipide 190

Nomenclature

γ	tension interfaciale
μ	potentiel chimique
β	sursaturation
Δ	enthalpie de la réaction
$\frac{dn}{dc}$	incrément d'indice de réfraction
λ	longueur d'onde
μ	moment dipolaire
ρ^{e-}	densité électronique
θ	angle de diffusion
ε_0	permittivité du vide
ε_s	facteur de correction de la permitivité en fonction du solvant
Blc.	*Blastochloris*
D	diamètre de l'objet
Rb.	*Rhodobacter*
Rps.	*Rhodopseudomonas*
A_2 ou B_{22}	second coefficient du viriel
AFM	microscopie à force atomique
AIBN	α,α-azo-bis(isobutyronitrile)
AUC	ultracentrifugation analytique
Bchl	bactériochlorophylle
Bchl a	bactériochlorophylle a
BR	bactériorhodopsine
BSA	Bovin Serum Albumin
c	concentration
CL	cardiolipine

CMC concentration micellaire critique

complexe PDL complexe protéine/détergent/lipide

D coefficient de diffusion

D_{max} distance maximale de l'objet

DBU 1,8-Diazabicycloundec-7-ene

DDM dodecylmaltoside

DLS diffusion de la lumière dynamique

DPn degré de polymérisation moyen

F(r) force d'interaction

GC-MS chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectromètrie de masse

HPLC-MS chromatographie en phase liquide couplée à la spectromètrie de masse

HPTLC High Performance Thin Layer Chromatographie

I(c,q) intensité diffusée

I(q,0) ou P(q) facteur de forme

k_B constante de Boltzmann

M_w masse molaire

MALLS diffusion de lumière laser multi-angle

MMPE monométhyl PE

N^{e-} nombre d'électrons

N_{agg} nombre d'agrégation

OG octylglucoside

p(r) fonction de distribution des distances

PC Phosphatidylcholine

PE Phosphatidylethanolamine

PEG polyethylène glycol

PG Phosphatidylglycerol

PM protéines membranaires

ppm partie par million

q vecteur de diffusion

R rayon de la sphère

R_g rayon de giration

R_h rayon hydrodynamique

RMN Résonance Magnétique Nucléaire

RX rayons X

S(c,q) facteur de structure

SAXS diffusion des rayons X aux petits angles

SEC size exclusion chromatography, ou chromatographie par exclusion de taille

THAM Tris(hydroxymethyl)acrylamidomethane

THF tetrahydrofurane

U(r) potentiel d'interaction

V_M volume molaire

V_m volume moléculaire

v_p volume partiel spécifique

Avant Propos

Les protéines membranaires jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus d'échanges cellulaires, pourtant il est encore très complexe d'obtenir des informations sur leurs structures et sur les détails de leurs mécanismes moléculaires. En effet, leur caractère amphiphile ainsi que l'absolue nécessité d'utiliser des tensioactifs capables de les maintenir en solution sans induire leur dénaturation constituent un véritable frein à leur cristallisation. Aujourd'hui les protéines membranaires représentent moins de 2% des structures résolues référencées dans la Protein Data Bank, alors qu'elles représentent environ 30% des génomes, et plus de 50% des cibles thérapeutiques. Ce déficit structural peut s'expliquer par plusieurs difficultés inhérentes à ces systèmes membranaires : difficulté d'expression et de production en quantités suffisantes pour la réalisation des études biochimiques, biophysiques et structurales ; difficulté de stabilisation en solution dans les détergents avec lesquels elles sont solubilisées et purifiées ; risque d'inactivation des protéines membranaires par les détergents, qui peut alors empêcher leur cristallisation ou la diffraction haute résolution des cristaux obtenus. Finalement ces obstacles traduisent un manque de connaissances des propriétés physicochimiques et structurales que doivent posséder les tensioactifs pour maintenir les protéines membranaires stables et actives et qui permettrait de rationaliser le choix des outils chimiques adaptés pour la réalisation d'études biochimiques ou structurales.

Ce constat a permis d'établir que les quelques critères moléculaires existant dans la conception et dans la sélection des tensioactifs pour la cristallisation avaient été définis de façon empirique, suite à l'accumulation d'expérience dans le domaine des protéines membranaires. Afin de mieux comprendre les phénomènes qui favorisent la stabilisation des protéines membranaires et leur cristallisation, les rôles joués par les tensioactifs (nature de taille et de la tête polaire, structure de la chaine hydrophobe, structure des micelles, etc) méritent d'être étudiés d'un point de vue fondamental, pour définir des critères de sélection sur la base de paramètres physico-chimiques fiables.

Le travail rapporté dans ce mémoire vise donc à mieux comprendre la relation entre

la structure et les propriétés des tensioactifs dans les mécanismes de stabilisation et de cristallisation des protéines membranaires, en s'intéressant aussi bien aux aspects physico-chimiques que biochimiques, grâce à l'utilisation d'une protéine membranaire modèle d'intérêt biologique : le complexe RC-LH1-pufX issu d'une bactérie photosynthétique pourpre.

Ce projet soutenu par la région PACA a été initié en décembre 2009 suite à la mise en place d'une collaboration pluridisciplinaire entre trois partenaires scientifiques aux domaines d'expertises complémentaires :

- L'équipe de Chimie Bioorganique et des Systèmes Amphiphiles (CBSA), à l'université d'Avignon (dirigé par le Pr. Ange Polidori), développe depuis une vingtaine d'années de nouveaux agents tensioactifs utilisables pour le maintien en solution de protéines membranaires. L'unité dispose ainsi d'une large bibliothèque des molécules amphiphiles et du matériel nécessaire à leurs synthèses et leurs caractérisations physicochimiques.
- Dr. Françoise Bonneté est spécialisée dans l'étude des interactions faibles pour la cristallogenèse et de la croissance cristalline des biomolécules. Ses compétences ont permis l'étude structurale des assemblages en solution (structure, interactions faibles et transitions de phases) grâce notamment à la diffusion des rayonnements (X et lumière).
- Dr. Colette Jungas du Laboratoire de Bioénergétique Cellulaire (LBC) au CEA Cadarache travaille sur l'étude des systèmes bioénergétiques des bactéries photosynthétiques. Elle a apporté son expertise en biochimie des protéines membranaires et son expérience dans la manipulation de la protéine modèle choisie.

L'objectif de cette thèse était donc de synthétiser de nouveaux tensioactifs et d'étudier leurs propriétés physico-chimiques afin de mieux définir les paramètres clés pour la manipulation des protéines membranaires et pour l'étape cruciale de la cristallisation.

Dans l'introduction nous ferons un état des lieux de la cristallisation des protéines membranaires réalisée grâce aux techniques *in meso* et *in surfo*. Et nous développerons particulièrement cette dernière en présentant les limites des détergents classiques pour la cristallisation des protéines membranaires (inactivation, déstabilisation, influence de la bouée de détergent, influence des lipides résiduels) et les contraintes liées aux tensioactifs lors de la croissance cristalline. Nous ressituerons ainsi nos objectifs dans leur contexte et présenterons le système biologique modèle utilisé pour ce travail : le complexe photosynthétique bactérien, RC-LH1-pufX de *Rhodobacter blasticus*.

Le chapitre 1 sera consacré au choix des tensioactifs étudiés avec les explications de leur design initial et les détails de leur synthèse. Dans le chapitre 2, nous étudierons ces tensioactifs en solution en les comparant au dodécyl-β-maltoside (DDM), détergent classique de la cristallisation des protéines membranaires. Nous essayerons ainsi de mieux comprendre l'influence de la structure des tensioactifs sur leurs propres propriétés

physico-chimiques et conclurons sur le potentiel des amphiphiles étudiés à mener à la cristallisation des protéines membranaires. Le meilleur candidat et le DDM seront alors testés sur la protéine modèle afin de déterminer leur influence sur l'environnement de la protéine en solution. Pour cela nous verrons, dans le chapitre 3, comment nous avons développé une méthode de dosage des tensioactifs par HPTLC et le chapitre 4 présentera l'étude de la bouée en terme de quantité de lipides et de tensioactifs liés à la protéine modèle. Enfin, le dernier chapitre reliera notre approche fondamentale physico-chimique aux résultats expérimentaux biochimiques.

La démarche adoptée a été de choisir plusieurs tensioactifs, de les synthétiser et de déterminer leurs propriétés physicochimiques afin d'avoir une meilleure compréhension des phénomènes physiques qui participent à la cristallisation des protéines membranaires mises en solution. L'originalité du projet réside dans la possibilité que nous avons eu, ensuite, de pouvoir tester l'influence de ces tensioactifs sur une protéine membranaire modèle en caractérisant la quantité de lipides et tensioactifs qui lui sont associés.

Influence des tensioactifs dans la cristallisation du complexe photosynthétique RC-LH1-pufX de *Rhodobacter blasticus*

Introduction

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre général de la cristallisation des protéines membranaires (PM), domaine d'étude pluridisciplinaire alliant la biochimie, la physique, la chimie et la physico-chimie. Nous allons, dans cette introduction, rappeler l'importance de l'étude structurale des protéines membranaires et les différentes techniques qui lui sont associées. Ensuite nous ciblerons notre présentation sur la cristallographie qui représente à ce jour la stratégie la plus utilisée pour l'obtention de structures à haute résolution, en introduisant les multiples difficultés encore rencontrées lors des essais de cristallisation et les différentes stratégies d'optimisation existantes dont s'inspire notre travail. Nous présenterons alors le complexe RC-LH1-pufX, protéine membranaire impliquée dans le cycle photosynthétique des bactéries pourpres, sur lequel nous avons réalisé les tests biochimiques de notre étude et préciserons nos objectifs.

1 Les protéines membranaires (PM)

1.1 Description

Les protéines membranaires (PM), macromolécules situées au niveau de la membrane cellulaire, présentent une très grande diversité structurale et fonctionnelle. Comme toutes protéines, les PM sont des polymères d'acides aminés, reliés entre eux par des liaisons peptidiques. Il existe deux catégories de PM en fonction de leur localisation *in vivo* (figure 1) :

– les protéines membranaires intégrales (ou intrinsèques) qui s'insèrent dans la bicouche lipidique de la membrane. Ces protéines ont en fait des propriétés amphiphiles puisqu'elles sont constituées d'une partie hydrophobe qui vient interagir avec les chaînes aliphatiques des lipides de la membrane. Elles peuvent être complètement enchâssées dans la membrane ou posséder des domaines extra-membranaires. C'est par exemple le cas des protéines transmembranaires qui servent à la fixation

de ligands, au transport de métabolites, ou à la transduction d'énergie.
- les protéines périphériques (ou extrinsèques) qui n'interagissent pas avec la partie hydrophobe de la membrane, mais avec la partie polaire des lipides de la bicouche ou d'une protéine intégrale. Elles sont impliquées en particulier dans les mécanismes d'adhésion cellulaire, de fusion et fission membranaire ou encore de signalisation cellulaire.

Les protéines membranaires intégrales auxquelles nous nous intéressons dans ce manuscrit, se différencient donc des protéines solubles par leur caractère amphiphile. La présence d'une partie hydrophobe dans leur structure les rend insolubles dans l'eau (elles se dénaturent) et impose lors de leur manipulation, d'utiliser des composés amphiphiles pour les maintenir en solution : les tensioactifs ou détergents.

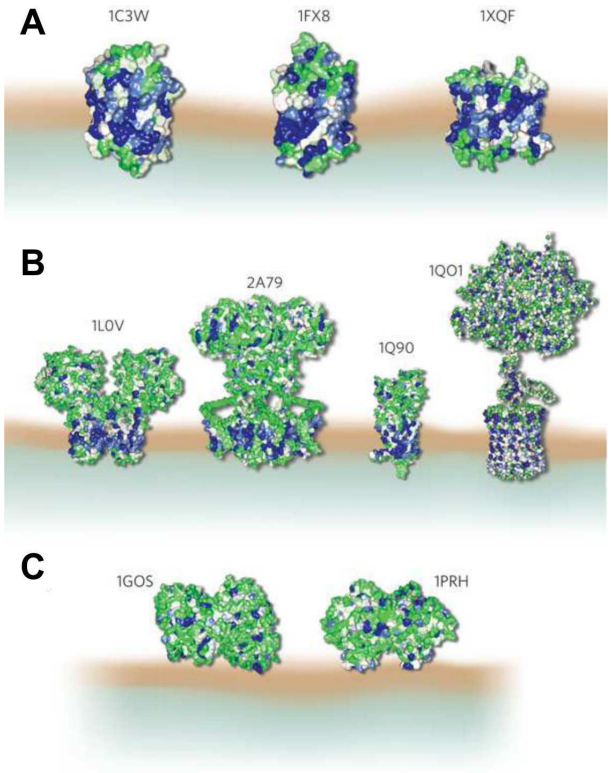


Figure 1 – Les différentes protéines membranaires. Extrait de [1]. A : protéines intrinsèques. B : protéines intrinsèques à larges domaines extra-membranaires. C : protéines extrinsèques. Les codes PDB sont mentionnés pour chaque protéine.

1.2 Pourquoi les étudier ?

L'intérêt pour les protéines membranaires ne cesse de grandir au fur et à mesure de la découverte de leur implication dans divers processus biologiques essentiels. On estime par exemple qu'environ 50% des médicaments mis sur le marché interagissent avec des

protéines membranaires. Elles représentent à ce titre la cible thérapeutique privilégiée des médicaments de demain. Cependant, depuis les travaux sur les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) [2] à la fin des années 80, qui ont valu le prix Nobel de Chimie 2012 à Robert Lefkowitz et Brian Kobilka, les progrès sur la compréhension des mécanismes de fonctionnement des protéines membranaires restent limités.

L'étude fonctionnelle des protéines, qu'elles soient solubles ou membranaires, passe par la détermination de leur structure tertiaire ou quaternaire à haute résolution (figure 2). Pourtant malgré leur importance, les protéines membranaires représentent moins de 2% des structures cristallographiques résolues recensées dans la Protein Data Bank (PDB). Ce chiffre est d'autant plus surprenant lorsqu'on sait que 20 à 30 % du génome code pour des protéines membranaires chez l'homme ou *E. coli* [3].

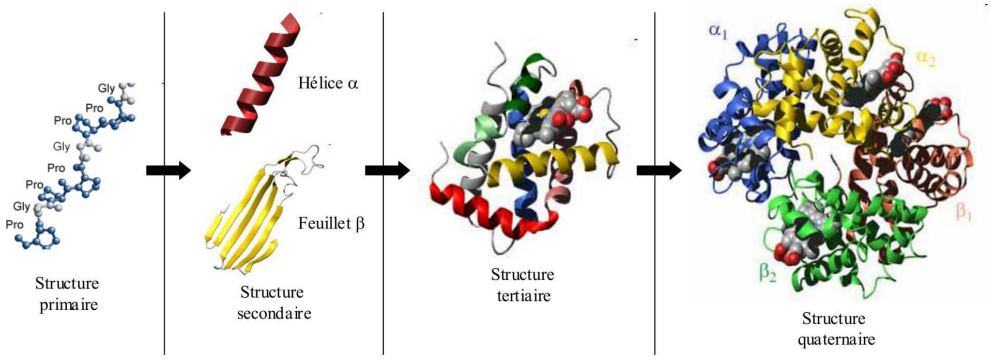


Figure 2 – La structure des protéines. *La structure primaire* correspond à la séquence formée par l'enchaînement des résidus d'acide aminés. *La structure secondaire* décrit le repliement local de la chaîne de la protéine, il peut s'agir d'hélices, de feuillets, de coudes ou de régions non structurées. *La structure tertiaire* est définie par l'agencement des structures secondaires dans l'espace dans la conformation native et fonctionnelle. *La structure quaternaire* est l'association, par des liaisons faibles, d'au moins deux chaînes polypeptidiques.

1.3 L'étude structurale des protéines membranaires

Il existe plusieurs techniques pour obtenir la structure des protéines : la cristallographie aux rayons X, la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) et la microscopie électronique avec la microscopie à force atomique (AFM) ou la cryomicroscopie.

1.3.1 La cristallographie aux rayons X

La détermination de la première structure 3D de protéine membranaire par cristallographie date des années 80 [4]. Depuis, cette technique est de loin celle ayant permis d'obtenir le plus grand nombre de succès en biologie structurale. Sa principale limitation

réside dans la nécessité d'obtenir des cristaux de protéines de grande qualité, comme nous le verrons au paragraphe 2.

Le cristal est un état solide ordonné : il est constitué d'un nombre très élevé de molécules identiques (de l'ordre de 10^{12}-10^{15}) disposées de façon répétée et périodique dans l'espace. L'interaction d'un faisceau de rayons X avec le cristal va produire un signal diffracté caractéristique de la géométrie du réseau cristallin. La position et l'intensité des rayons diffractés par le cristal est enregistrée par un détecteur sous forme de tâches de diffraction. La transformée de Fourier de l'intensité et des phases des ondes diffractées permet d'obtenir la densité électronique au sein du cristal et ainsi de construire le modèle protéique.

1.3.2 La RMN

L'étude structurale par RMN (résonance magnétique nucléaire) permet de convertir les propriétés magnétiques des noyaux des atomes en informations géométriques de la molécule et remonter ainsi par calcul à la structure 3D de la protéine. Il existe deux méthodologies qui se basent sur l'analyse des spins de l'hydrogène ^{1}H, du carbone ^{13}C et de l'azote ^{15}N pour l'analyse des protéines : la RMN en phase liquide et la RMN en phase solide. Le grand avantage de la RMN du liquide est qu'elle nécessite moins de préparation de l'échantillon que d'autres techniques de caractérisation structurale puisqu'elle utilise des protéines solubilisées et purifiées en micelles de détergent [5]. Les échantillons analysés doivent cependant être en concentration extrêmement élevée.

La première structure de protéine membranaire obtenue par RMN a été déposée dans la PDB en 1997 [6]. Depuis la technique s'est développée mais reste souvent limitée aux assemblages protéine/détergent/lipide de petites tailles (<30 kDa).

1.3.3 La microscopie électronique

La microscopie électronique a été utilisée pour la première fois par De Rosier et Klug en 1968 pour obtenir une structure 3D d'un échantillon biologique [7]. Elle requiert l'obtention d'un grand nombre de clichés 2D de l'objet étudié sous différentes orientations. En regroupant informatiquement les images d'une même orientation, le rapport signal sur bruit est augmenté et permet d'obtenir une image 2D précise de la particule. En procédant ainsi sur toutes les orientations, il est alors possible d'obtenir une structure 3D de la protéine.

La préparation des échantillons se fait généralement par congélation flash, on parle alors de cryomicroscopie. Les protéines en solution sont plongées dans l'azote liquide, l'eau du solvant est ainsi congelée sous forme de glace amorphe qui n'endommage pas la forme des protéines qu'elle contient. La structure de la bactériorhodopsine a pu être obtenue à haute résolution [8] par cette technique mais dans la plupart des cas la résolution reste moyenne (5 à 10 Å) comme par exemple pour le complexe Sec YEG [9].

1.3.4 La microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie à force atomique permet de visualiser des images de membranes natives *ex cellula*, conservées dans un tampon proche des conditions physiologiques [10]. Elle repose sur l'analyse point par point de la surface de l'objet étudié par un balayage avec une pointe qui va suivre le relief de l'objet. Les récents progrès technologiques rendent cette technique capable d'observer des détails nanométriques et d'étudier la dynamique des protéines [11]. Cependant, les différents traitements utilisés pour observer les membranes par cette technique peuvent modifier "l'état natif" des membranes. [12, 13].

1.3.5 La modélisation moléculaire

A la frontière entre la biologie structurale et la bio-informatique, la modélisation moléculaire se sert de calculs informatiques pour effectuer des prédictions de structures tertiaires. Elle repose souvent sur des homologies de séquences avec des protéines dont la structure est résolue ou sur la description des forces moléculaires subies par les atomes pour trouver des conformations d'énergie minimale.

Cet outil est aussi de plus en plus utilisé pour réaliser des simulations de dynamique moléculaire sur les structures connues pour étudier les mouvements des protéines au cours de leur activation physiologique. Il est ainsi possible d'obtenir, par modélisation, des informations sur la fonction de la protéine en réalisant, par exemple, l'étude d'une protéine au cours d'un cycle catalytique. Les principales protéines étudiées de cette façon sont les canaux ioniques, les aquaporines, et les différents transporteurs. Ces simulations permettent notamment de tenir compte de l'environnement de la protéine membranaire (bicouche lipidique, présence d'eau, et d'ions...) [14].

2 La cristallisation des protéines membranaires

La cristallographie des rayons X est, parmi toutes ces méthodes, celle qui est la plus utilisée en biologie structurale. Toutefois, la résolution de structures de protéines membranaires connait des succès beaucoup moins fréquents que pour les protéines solubles. Ce retard s'explique en grande partie par la difficulté à obtenir des cristaux de protéine membranaire. En nous appuyant sur les ouvrages de So Iawata [15] et de Ducruix et Giegé [16] ainsi que la revue de A. Seddon [17], nous allons dans ce paragraphe, présenter plus en détails l'étape, au combien délicate, de la cristallisation des protéines membranaires.

2.1 De la cellule au cristal : un chemin semé d'embûches

La présence d'une partie hydrophobe au sein de la structure des protéines membranaires complique fortement leur cristallisation par rapport aux protéines solubles mais les difficultés rencontrées ne se situent pas uniquement au niveau de la cristallogénèse :

les étapes préliminaires de production et de purification des protéines membranaires sont tout autant critiques.

2.1.1 La production des PM

Les études structurales et fonctionnelles des protéines nécessitent de très fortes concentrations en protéine. Différents systèmes de production de protéines membranaires existent mais aucun ne permet la production systématique et à grande échelle de protéines membranaires fonctionnelles [18].

L'approche, classiquement utilisée pour les protéines solubles, par surexpression en cellules hôtes existe pour les protéines membranaires, notamment dans *Escherichia coli*, mais elle se heurte à deux problèmes majeurs :

- La surface de la membrane disponible chez la cellule hôte pour l'expression de protéine recombinante est limitée
- Les étapes d'adressage et d'insertion de la protéine dans la membrane nécessitent des processus de translocation particuliers que doit posséder la cellule hôte.

Il en résulte que les protéines membranaires se retrouvent souvent sous forme de corps d'inclusion insolubles dans le cytosol de l'organisme hôte. Ils correspondent à des formes dénaturées et précipitées de la protéine et entraînent une toxicité pour la cellule. Ces corps d'inclusion peuvent toutefois être récupérés et leur renaturation par différents traitements biochimiques est parfois possible. La faible quantité de protéine pouvant être exprimée à cause de la toxicité pour la cellule hôte doit alors être compensée par l'augmentation des quantités cultivées, ce qui n'est pas toujours aisé.

Pour s'affranchir des contraintes liées à la cellule hôte, il existe une autre voie de production de protéines par la technique de synthèse *in vitro*. Dans ce cas, la synthèse de la protéine a lieu, hors de la cellule, à partir de sa séquence d'ARNm mise en présence de toute la machinerie cellulaire nécessaire à la transcription/traduction. Mis au point pour les protéine solubles [19], ce procédé commence à connaitre quelques succès pour la synthèse de protéines membranaires [20, 21] au prix d'une mise au point spécifique pour chaque les protéines.

Ces raisons expliquent pourquoi beaucoup d'études de protéines membranaires se sont concentrées à ce jour, sur des protéines naturellement surexprimées dans des organismes facilement cultivables comme les bactéries.

2.1.2 La solubilisation des PM

Pour pouvoir être étudiées, les protéines membranaires doivent être extraites de la membrane cellulaire par un détergent qui permet ensuite de les maintenir en solution hors de leur environnement lipidique natif. Ces détergents sont des tensioactifs, ou molécules amphiphiles : leur structure est composée d'une partie hydrophile, aussi appelée tête polaire, et d'une partie hydrophobe, dite queue hydrophobe ou lipophile (figure 3). Cette particularité structurale fait des détergents des agents de surface qui se placent aux

interfaces, leurs têtes polaires s'orientant vers la phase aqueuse et leurs parties hydrophobes vers l'autre milieu (huile, air, solvant organique ou composé hydrophobe). Leur comportement en solution est gouverné par l'effet hydrophobe.

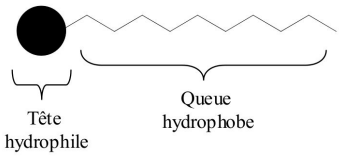


Figure 3 – Représentation shématique d'un monomère de tensioactif

Seuls en solution, les tensioactifs sont capables de s'auto-associer à partir d'une concentration particulière, appelée concentration micellaire critique (CMC). En effet pour minimiser les contacts chaines hydrophobes-eau, entropiquement défavorables par rapport aux contacts eau-eau, les tensioactifs, à faible concentration, se placent à l'interface air-eau (figure 4 B et C). Leurs têtes polaires s'orientent alors dans la phase liquide et leurs chaînes hydrophobes du coté de l'air en formant une monocouche de tensioactifs adsorbée à l'interface eau-air [22] [23]. Lors de l'ajout de tensioactif dans de l'eau, la quantité de surfactants adsorbée à l'interface augmente jusqu'à atteindre une saturation de la surface. Au delà de cette concentration, l'addition de nouveaux tensioactifs entraîne la formation de micelles dans la solution [24], comme représenté sur la figure 4 D. Dans ces assemblages, les tensioactifs exposent leurs parties polaires à l'eau et regroupent leurs parties hydrophobes au cœur de la micelle dans l'optique de minimiser les interactions eau-chaînes hydrophobes. La CMC est plus exactement une plage de concentration sur laquelle se forme les premières micelles. Elle dépend de la structure du tensioactif mais aussi des conditions physico-chimiques de la solution (température, pH, force ionique, etc.). Les formes de ces agrégats structurés sont très variées (micelle sphérique, ellipsoïdale, cylindrique, phase lamellaire, phase hexagonale, vésicule). Pour donner un ordre de grandeur de leur taille, on peut dire que les micelles sphériques des détergents classiques ont des diamètres d'une dizaine de nanomètres. Mais il faut garder à l'esprit que ces systèmes sont très dynamiques, il y a un équilibre permanent du tensioactif entre sa forme monomérique et sa forme micellaire, avec un turn over de l'ordre de 10^4-10^5 s^{-1}.

Au contact de la membrane, le détergent déstabilise les lipides et s'insère petit à petit dans la bicouche lipidique jusqu'à être majoritaire. Il y a alors solubilisation de la membrane avec formation de micelles mixtes détergent/lipide et de complexes protéine/détergent [25] (figure 5). Dans ce complexe le détergent mime la bicouche lipidique en recouvrant la surface hydrophobe de la protéine, ce qui permet de la maintenir en solution, d'où le terme de "bouée" pour désigner cette quantité de détergent associée à la protéine. Il faut noter que certains lipides natifs restent liés à la protéine après l'extraction, d'où l'utilisation de la dénomination complexe PDL pour désigner le complexe protéine/détergent/lipide.

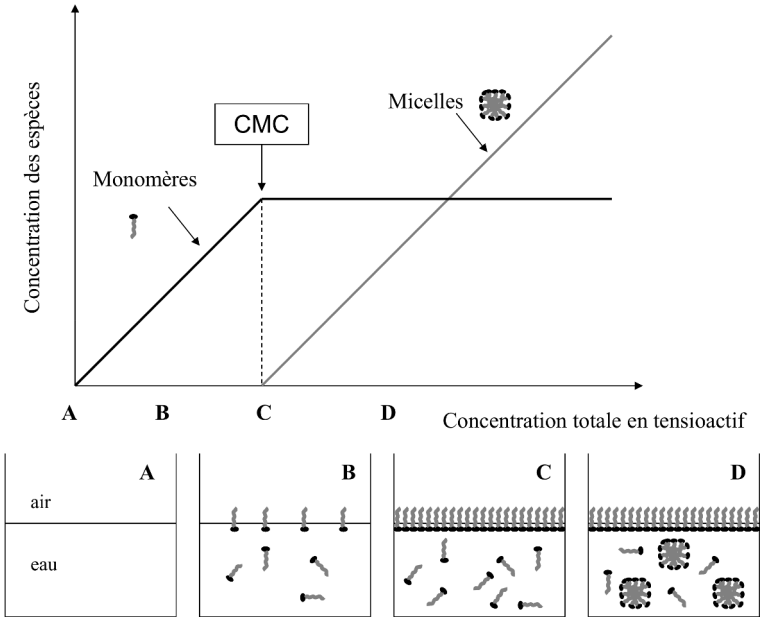


Figure 4 – Schéma du comportement des tensioactifs en solution et CMC : Évolution de la concentration en monomères (noir) et micelles (gris) lors de l'ajout de tensioactif dans l'eau et représentation schématique de leur comportement en solution.

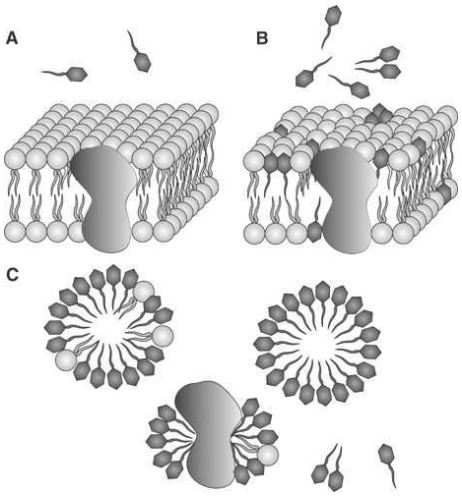


Figure 5 – Solubilisation des membranes par le détergent. A : La protéine membranaire est insérée dans la bicouche lipidique (gris clair) avec les molécule de détergent dans la solution (gris foncé) B : Partition du détergent dans la membrane ; C : solubilisation totale de la membrane, formation de micelles, micelles mixtes et complexes protéiques.

La solubilisation est une étape cruciale pour l'obtention de protéines membranaires qui dépend grandement du choix du détergent. Celui-ci doit permettre un bon rendement d'extraction et conserver la stabilité structurale et fonctionnelle de la protéine. La plupart

des détergents utilisés en biochimie sont soit non-ioniques (têtes polaires de type sucre) soit zwitterioniques et possèdent des longueurs de chaînes généralement relativement courtes (maximum 12 carbones linéaires). Les détergents "historiques" de la cristallisation des protéines membranaires peuvent être classés en 5 familles (figure 6).

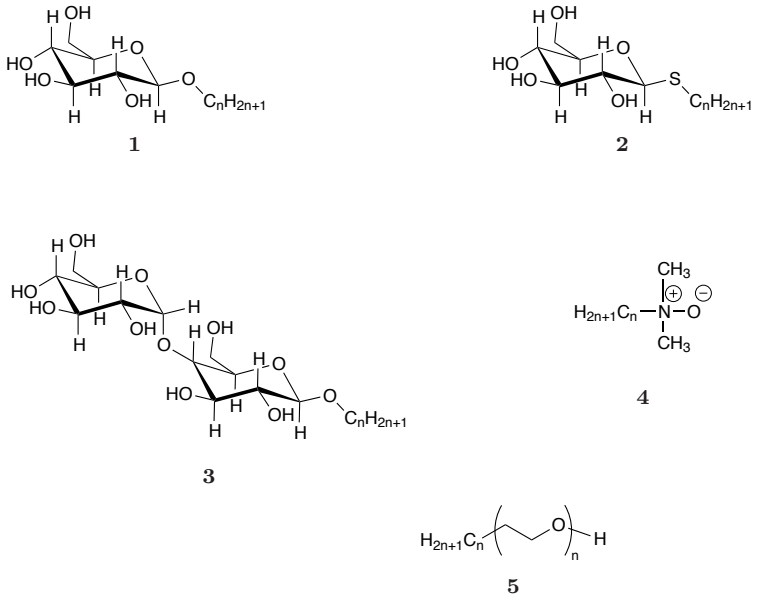


Figure 6 – Structures des détergents classiques

1. Les *n-alkyl-β-glucosides (C_nGlu)* **1** : l'octylglucoside (OG), C_8Glu, est certainement le plus fréquemment utilisé de cette famille. C'est un détergent doux même s'il peut dénaturer certaines protéines. Sa CMC relativement haute (22.1 mM) et ses micelles plutôt petites font de lui un composé de choix en vue d'un échange du détergent par dialyse.
2. Les *n-alkyl-β-thioglucosides($C_n$thioGlu)* **2** : Ils présentent l'avantage d'être moins sensibles à l'hydrolyse que les C_nGlu en raison de la plus haute stabilité de la fonction thioacétal. Ce sont donc des composés plus stables que leur équivalents oxygénés.
3. Les *n-alkyl-maltosides (C_nMalt)* **3** : Le décylmaltoside et le dodécylmaltoside (DDM), respectivement C_{10}Malt et C_{12}Malt, dont les micelles sont un peu plus grosses que celles des glucosides, ont permis la cristallisation de plusieurs protéines membranaires. Leurs CMC sont respectivement de 1,7 et 0,17 mM.
4. Les *n-alkyl-diméthylaminoxides (C_n-DAO)* **4** : Ces détergents sont particulièrement stables. Le composé en C12 (LDAO) est sans doute le plus utilisé de cette famille. Cationique à des pH inférieurs à 3, il est zwitterionique au dessus de cette valeur. Ces micelles sont d'une taille comparable à celles de l'octyl-glucoside mais sa CMC est plus basse (1,4 mM).

5. Les *n-alkyl-oligoethylene glycol-monoether (C_nE_m)* **5** : ils sont souvent nommés C_nE_m où n correspond au nombre de carbone de la chaîne et m le nombre de groupement éthylenoxyde. Les plus classiques pour les applications en cristallographie sont les C_8E_4, C_8E_5 et $C_{12}E_9$ seuls, ou en mélange avec l'octyl-glucoside. Mais les solutions aqueuses de ces composés ne sont pas stables et aboutissent à la formation de peroxydes et aldéhydes lorsqu'ils sont stockés à l'air ambiant.

2.1.3 La purification des PM

La protéine, une fois extraite et solubilisée en solution aqueuse par le détergent, doit ensuite être purifiée. Parmi les impuretés les plus fréquemment rencontrées, celles qui correspondent aux protéines tronquées, donc pratiquement indiscernables de la protéine d'intérêt, rendent les étapes de purification encore plus délicates. Au cours de la croissance cristalline, ces impuretés vont, en s'insérant dans le réseau cristallin, augmenter le nombre de défauts de ce dernier, voire même éventuellement stopper la croissance des cristaux. La probabilité d'obtenir des cristaux est donc plus faible et leur niveau de pureté est moins bon.

Les méthodes de purification des protéines membranaires sont les mêmes que pour les protéines solubles et se basent souvent sur des techniques chromatographiques. Cependant les PM ont tendance à interagir plus fortement avec les phases stationnaires des colonnes, à cause de leur caractère hydrophobe, ce qui diminue l'efficacité des purifications. La chromatographie d'affinité est souvent privilégiée lorsque celle-ci est possible (présence d'un TAG histidine, par exemple).

En théorie il faudrait travailler avec une protéine la plus pure possible afin d'avoir une préparation homogène pour augmenter les chances d'obtention de cristaux diffractant à haute résolution. Mais en fait une purification excessive peut être un problème à la cristallisation, en particulier pour les gros complexes de protéines membranaires. Ceux-ci ont souvent besoin pour leur stabilité de conserver des sous-unités, co-facteurs, ou lipides qui agissent comme des composants structuraux indispensables. Une purification excessive peut entraîner une dissociation et leur élimination et causer la dénaturation de la protéine. On préfèrera donc parler d'un critère d'homogénéité des complexes protéiques purifiés.

2.1.4 La cristallisation des PM

Une fois la protéine solubilisée et purifiée sous forme native, les essais de cristallisation peuvent être réalisés. En considérant les difficultés que nous venons d'évoquer il n'est pas illogique de se demander comment des protéines membranaires peuvent même cristalliser. Pourtant environ 250 succès de cristallisation de protéines membranaires ont été obtenus à ce jour.

La formation du cristal résulte de la création de contacts cristallins entre les parties hydrophiles des molécules. La cohésion du cristal est alors assurée par des interactions de

van der Waals, des ponts salins ou des liaisons hydrogène qui se forment entre les parties polaires de la protéine. L'espace résiduel du cristal est, lui, comblé par le solvant (eau, tampon etc.) et éventuellement par des impuretés (autres composés chimiques ou formes dégradées du composé d'intérêt). En fonction de la façon dont se forme le cristal trois grandes catégories de cristaux de protéines membranaires peuvent être définies (figure 7).

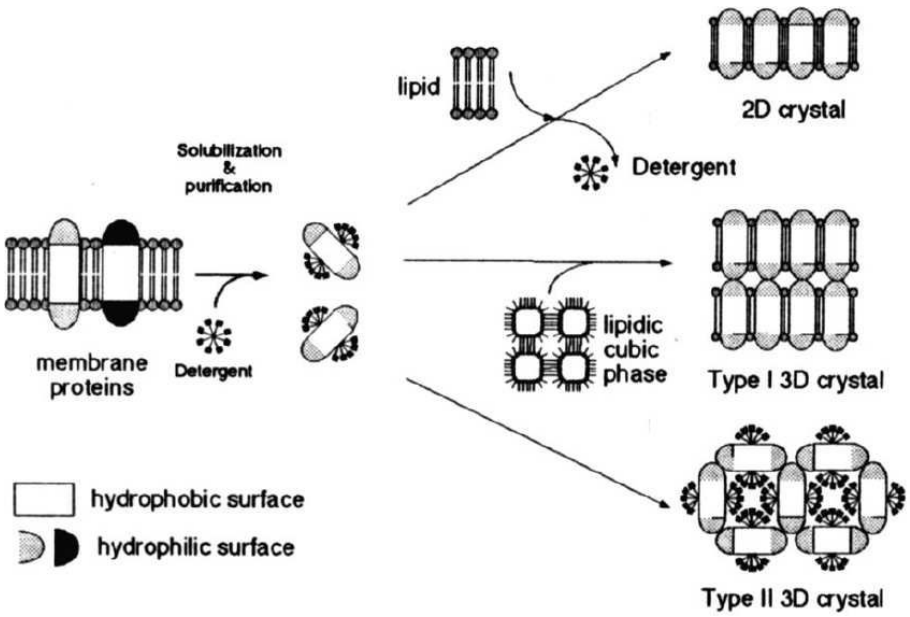


Figure 7 – Cristallisation des protéines membranaires. Extrait de [15]

Les cristaux 2D correspondent à la ré-insertion de la protéine dans une membrane lipidique. Ce cristal est stabilisé par les interactions hydrophobes de la membrane reconstituée et peut être analysé par microscopie électronique. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés qu'aux cristaux susceptibles d'être analysés par diffraction aux rayons X : les cristaux 3D. Il en existe deux formes "théoriques", nommées type I et type II.

Les cristaux de type I correspondent à un empilement dans la troisième direction de cristaux 2D qui est généré grâce aux interactions entre les parties polaires des protéines. Ils présentent l'avantage de permettre l'interaction directe entre les surfaces hydrophobes de la protéine. Cette configuration minimise aussi la quantité de solvant dans le cristal, ce qui en général est bénéfique pour la qualité diffractante du cristal. Ils sont souvent obtenus par la technique de cristallisation en phase cubique.

Les cristaux de type II sont obtenus à partir des complexes PDL solubilisés, en utilisant les techniques classiques de la cristallisation, à savoir l'ajout d'agents précipitants (PEG, sels,...) pour engendrer une transition de phase. La bouée de détergent fait donc partie intégrante du réseau cristallin, comme l'a montrée Eva Pebay-Peroula, par l'étude par diffraction des neutrons, d'un cristal de protéine membranaire (figure 8). C'est pourquoi ces cristaux contiennent souvent une grande quantité de solvant (environ 65 à 80 %) et

très peu de contacts protéine/protéine.

Figure 8 – La bouée dans le cristal. Extrait de [26]. Localisation par diffraction des neutrons de la bouée de détergent dans un cristal de porine OmpF (protéine trimérique). Le détergent non-organisé n'est pas visible par diffraction des RX. La diffraction des neutrons avec variations de contraste permet cependant de localiser les zones du cristal occupées par la protéine, le solvant et le détergent.

En conclusion, l'obtention de cristaux de protéines est donc sous la dépendance de multiples facteurs aussi bien physiques (degré de sursaturation, température, pression, temps, méthode de cristallisation, vibration, agitation, etc.) que chimiques (pH, force ionique, nature et quantité des agents cristallisants et contaminants non macromoléculaires, etc.) ou biochimiques (effets des paramètres physico-chimiques sur la protéine, présence d'impuretés macromoléculaires, vieillissement et dégradation des échantillons, fixation de ligands, micro-hétérogénéités de séquences ou conformationnelles, etc.). Par ailleurs les cristaux de protéines sont généralement beaucoup plus fragiles et de moins bonne qualité diffractante que les cristaux inorganiques. Ceci s'explique tout d'abord par l'importante quantité de solvant qui se retrouve au sein même du cristal de protéine. Une autre raison est que les macromolécules réalisent des contacts cristallins, d'énergie comparable, mais moins fréquents que les molécules inorganiques [27]. Enfin la grande taille et la complexité structurale des macromolécules biologiques font qu'elles peuvent développer différents types de contacts et s'orienter de multiples façons les unes par rapport aux autres dans le cristal.

2.2 Les alternatives à la cristallisation *in surfo*

Bien que notre étude porte sur la cristallisation *in surfo* (en détergent ou tensioactif), nous allons rapidement exposer dans ce paragraphe les techniques alternatives qui ont été développées pour contourner les difficultés de la cristallisation en détergent et obtenir des cristaux de type I. Ces méthodes partent du principe qu'une protéine membranaire

devrait cristalliser plus facilement dans un environnement similaire à son milieu naturel. Elles utilisent donc des lipides qui vont soit s'auto-associer en mésophase, méthode *in méso* ou *in cubo*, soit former des bicelles en présence de détergent.

2.2.1 La cristallisation en phase cubique

La cristallisation des protéines membranaires en phase cubique a été introduite par le groupe de Rosenbusch dans le courant des années 90 [28]. Elle se base sur des mésophases constituées de lipides de type monoacylglycerols (comme la monooléine) et d'eau. Les phases cubiques ainsi constituées sont des matériaux structurés qui se présentent d'un point de vue macroscopique, sous la forme de fluide très visqueux, transparent et non-biréfringeant. Elles contiennent typiquement 50-80% (w/w) de lipides et 50-20% d'eau.

Il existe deux types de phase cubique en fonction de la manière dont s'empilent les lipides dans les trois dimensions (figure 9)

- les cubiques micellaires, qui sont des micelles placées côte à côte, aux sommets de cubes qui s'empileraient dans les trois directions. Les compartiments entre les micelles contiennent du solvant aqueux.
- les phases bicontinues, où une couche continue de lipides se replie pour exposer ces têtes hydrophiles à un compartiment aqueux.

Pour faire croître des cristaux en phase cubique, il faut dans un premier temps constituer la mésophase. Celle-ci se forme spontanément en mélangeant la solution de protéines solubilisées en détergent avec un composé lipidique (souvent il s'agit de monooléine) avec un ratio de 2 :3 en volume. Dans un deuxième temps des agents de précipitation et des sels sont ajoutés. Le mélange est incubé et des cristaux peuvent apparaître sur une échelle de temps allant de quelques heures à plusieurs semaines. Ces étapes se passent classiquement à 20 °C mais cette méthode, toujours en cours de développement, permet maintenant de travailler à basse température grâce à la mise à disposition de nouveaux lipides [29].

Le mécanisme de cristallisation à partir des phases cubiques n'est cependant pas encore clairement élucidé. Il se ferait en trois étapes avec tout d'abord l'insertion de la protéine dans la phase cubique, la déstabilisation de la phase cubique pour favoriser les réarrangements des protéines avec la formation d'agencements 2D, et enfin une interaction des structures 2D dans la troisième dimension [30]. En fait l'ajout d'agent de précipitation cause une déshydratation de la phase cubique et entraîne une transition de phase vers une phase lamellaire qui semblerait être essentielle à l'obtention de cristaux.

La meilleure résolution obtenue par cette technique a été obtenue avec la bactériorhodopsine (BR) (1,55 Å) [31]. Cette technique a aussi permis d'obtenir des cristaux de la BR directement à partir des membranes natives, sans passer par une étape de solubilisation en détergent [32]. Bien sûr, il s'agit là de résultats obtenus avec une protéine très stable et des propriétés intrinsèques particulières. Cependant, cette technique, qui compte à ce jour quelques dizaines de structures résolues, est prometteuse.

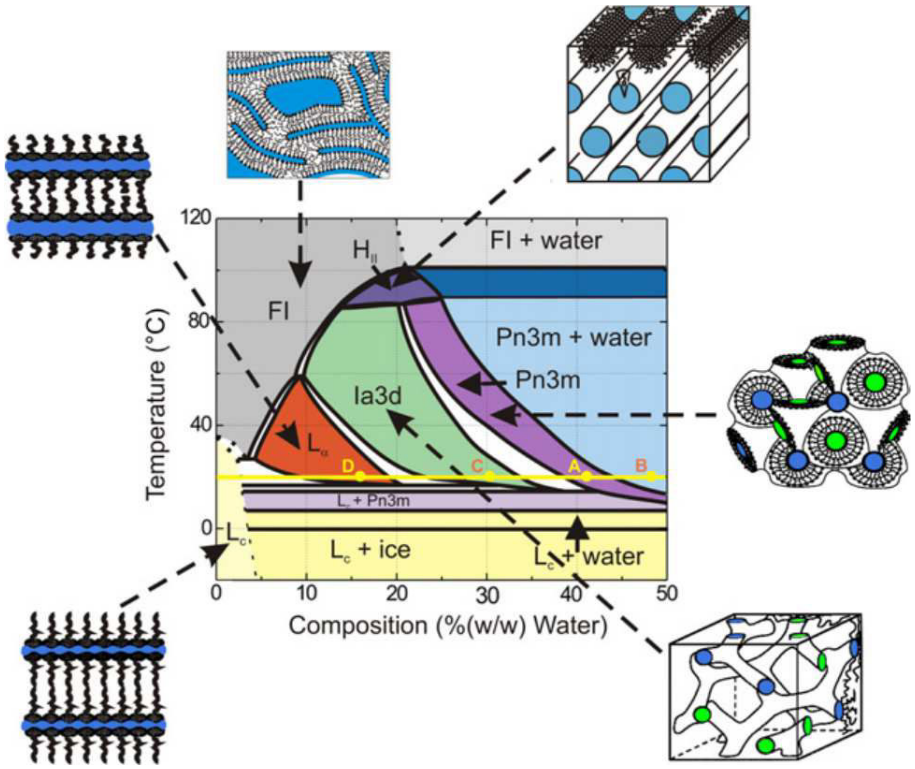


Figure 9 – Diagramme de phase et structures formées par un système mono-oléine/eau. Extrait de [29]. L'isotherme à 20°C croise différentes phases solides avec L_c, cristal lamellaire, liquide avec L_α, cristal liquide lamellaire (point D), Pn3m-cubique (point A), Ia3d-cubique (point C) et un état d'équilibre entre une phase cubique complètement hydratée et de l'eau (point B). H_{II} est une phase inverse hexagonale, FI est une phase fluide isotropique.

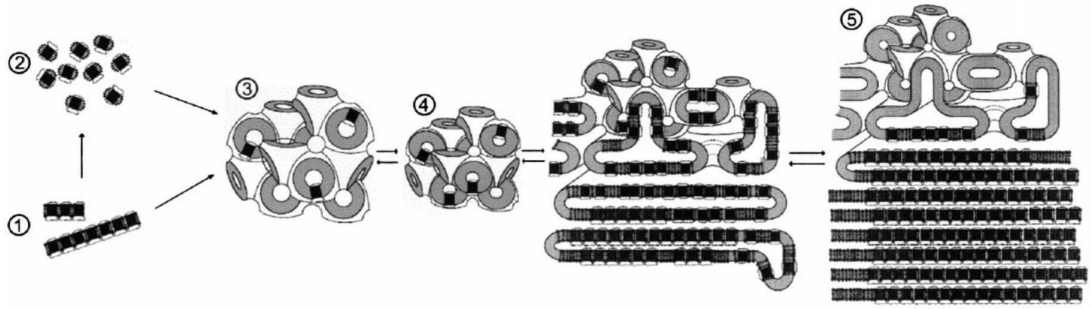


Figure 10 – Étapes hypothétiques de la formation de cristaux 3D *in méso*. Extrait de [30]

2.2.2 La cristallisation en bicelles

Une bicelle peut être considérée comme une bicouche lipidique de taille finie, qui s'obtient par l'addition de détergent (ou de lipides à courtes chaînes) sur des lipides à

longues chaînes. Ce mélange s'assemble spontanément sous forme de disque où les lipides, à longue chaîne, forment une bicouche plane protégée de l'eau par les molécules de détergent qui se placent sur la tranche du disque. Les dimensions de la bicelle dépendent du ratio chaînes longues sur chaînes courtes. Les protéines membranaires s'insèrent dans ces bicelles au sein de la surface plane et conservent leurs activités biologiques [33]. La BR a pu être cristallisée par cette méthode en 2002 (figure 11) [34].

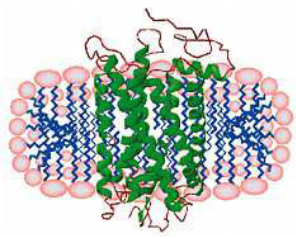


Figure 11 – Schématisation d'une bicelle lipides/détergents. La protéine se place au sein de la bicelle constituée de lipides (sur la grande surface) et de détergents (sur la tranche).

Ces techniques bien que prometteuses sont encore très jeunes et leur essor est encore très limité. Face à elles, la cristallisation en détergent garde un temps d'avance, aussi bien sur l'aspect théorique des mécanismes mis en jeu, que sur les retours d'expériences. La cristallisation "in surfo" est donc loin d'être une technique dépassée. Elle reste la technique privilégiée pour l'obtention de cristaux de protéines membranaires, celle qui est la plus fréquemment utilisée et qui a conduit au plus grand nombre de succès.

2.3 La cristallisation en détergent *in surfo*

La cristallisation en détergent est la méthode "historique" qui découle de la cristallisation des protéines solubles, sauf que cette fois-ci, il ne s'agit plus de cristalliser une protéine seule en solution mais le complexe PDL en entier. C'est pourquoi le ratio réussites/essais reste très faible en comparaison avec celui de la cristallisation des protéines solubles. La présence dans le complexe protéique initial du détergent et des lipides influence souvent négativement aussi bien la cristallogénèse que la qualité du cristal.

2.3.1 Influence du détergent

L'étape de la cristallisation est la plus contraignante en terme de choix du détergent. Le premier critère de choix est un critère de stabilité : le détergent doit être pur et chimiquement inerte, mais surtout il doit former avec la protéine un complexe homogène et stable.

Or dans un environnement de détergent, *in surfo*, les protéines sont en général instables. Les voies d'inactivation envisagées sont (figure 12) (i) une pertubation du système par les échanges de tensioactifs entre ses formes micellaire, monomère ou liée à la

protéine ; (ii) une déstabilisation directe de la région transmembranaire par insertion de sa chaîne hydrophobe ; et/ou (iii) une solubilisation excessive de cofacteurs ou lipides résiduels indispensables à la stabilité de la protéine.

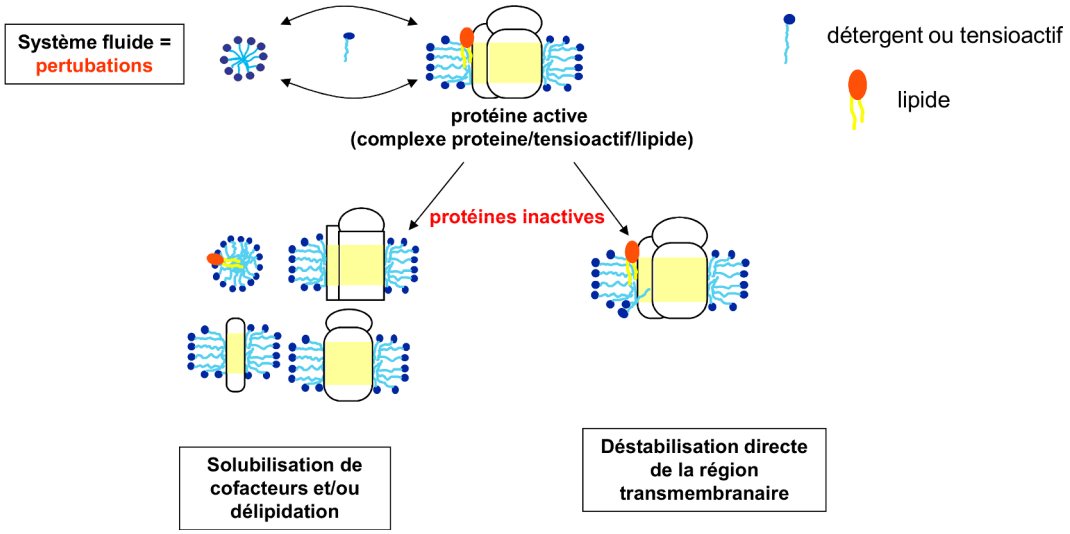


Figure 12 – Inactivation des protéines membranaires par le détergent. D'après Cécile Breyton (IBS, Grenoble), communication personnelle.

Il se pose alors un dilemme auquel il faut trouver un compromis. Les détergents à longues chaînes ont tendance à former de grosses bouées autour de la protéine, augmentant la proportion d'eau dans le cristal, ce qui peut diminuer sa qualité. Pourtant les protéines membranaires sont souvent plus solubles et plus stables dans ces détergents à longues chaînes, plus proches de la structure des lipides natifs.

Les retours d'expérience permettent déjà de donner une indication sur les détergents les plus appropriés : à l'heure actuelle, les plus utilisés sont les détergents non-ioniques à tête sucre et à chaîne alkyle avec, en fer de lance, le dodecylmaltoside (DDM), possédant une chaîne en C12, et l'octylglucoside (OG) avec une chaîne en C8.

Outre la stabilité et l'homogénéité du complexe PDL, le détergent va impacter aussi la formation du cristal en gênant les interactions entre parties polaires des protéines : soit à cause de l'excès de détergent sous forme de micelles libres en solution, qui ralentissent la diffusion des protéines de la solution vers le noyau de cristallisation, soit à cause de la bouée qui, si elle est trop importante, pourra masquer la partie hydrophile de la protéine et donc limiter la surface disponible pour les interactions hydrophiles.

Enfin une fois tous ces obstacles surmontés, si la protéine a conservée sa forme native, et qu'un cristal a pu croître, encore faut-il que celui-ci diffracte pour pouvoir obtenir des informations structurales. Là encore, le détergent, présent en grande quantité dans le cristal, et avec lui l'eau qui l'hydrate, va avoir une influence considérable aussi bien sur la qualité du cristal que sur sa morphologie [26, 35].

Pour donner une idée de la proportion de détergent dans le cristal, on peut prendre l'exemple de la protéine du cytochrome b_6f. Daniel Picot (communication personnelle) a estimé à $1{,}3.10^{12}$ le nombre de monomères de b_6f (100 kDa) dans le cristal, soit une concentration de 210 mg/mL en protéine, ce qui représente seulement 18% du volume du cristal. Le reste du volume du cristal est comblé par une phase amorphe contenant de l'eau et du détergent à forte concentration (l'ordre de grandeur retenu pour la constitution de la bouée est d'environ 1 gramme de détergent pour 1 gramme de protéine [36]).

Toutefois des réarrangements s'opèrent souvent dans le cristal, les bouées interagissent entre elles et les cristaux obtenus *in surfo* présentent souvent des empilements intermédiaires entre le type I et le type II qui contiennent moins de détergents que les types II [37].

2.3.2 Influence des lipides

Alors que l'importance du détergent est apparue comme une évidence dès les débuts de la cristallisation des protéines membranaires, l'influence des lipides n'a été prise en compte que plus tard. En 1993, Nussberger a, le premier, montré la nécessité de la présence d'un galactolipide spécifique pour la formation d'un cristal 3D d'un complexe protéique collecteur de lumière chez la plante [38]. Depuis les exemples se sont succédés [39], et dans certains cas, l'ajout de lipides a même contribué à l'obtention de cristaux [40, 41]. En fait, la quantité de lipides influence directement la stabilité de la protéine et peut, tout comme le détergent, modifier la compacité du complexe PDL et changer la forme et la résolution de cristaux de protéines membranaires [42]. Il y a donc une quantité optimale de lipides à définir pour trouver le meilleur compromis entre environnement proche des conditions natives et complexe PDL compact. Mais cette quantité diffère d'une protéine à l'autre et ne peut être connue à priori. Par ailleurs le détergent utilisé pour la purification déterminera en grande partie la quantité de lipides copurifiés avec la protéine.

La cristallisation des protéines membranaires reste donc une tâche très délicate, fruit d'un mélange entre théorie, retour d'expériences et criblage extensif. Pour augmenter les chances de réussite deux voies d'optimisation sont possibles : chercher à réduire l'influence du détergent ou pouvoir mieux cibler les conditions optimales de cristallisation.

2.3.3 Voie d'optimisation n°1 : réduire l'influence du détergent

Pour réduire l'influence du détergent trois approches ont été développées :

Augmenter la partie hydrophile de la protéine. La première stratégie consiste à augmenter la surface hydrophile de la protéine membranaire pour maximiser les zones potentielles de contacts cristallins. Comme beaucoup de protéines membranaires interagissent dans leur milieu naturel avec des protéines solubles, il est possible d'envisager des essais de co-purification de la protéine membranaire d'intérêt liée à une protéine soluble. Ces dernières doivent toutefois pouvoir être isolées et présenter une bonne affinité

pour la protéine membranaire. Si aucune protéine soluble n'est disponible, un ligand synthétique peut aussi être employé à condition qu'il soit soluble, affin et non déstabilisant pour la protéine. Enfin la dernière solution réside dans l'utilisation de fragments d'anticorps [43] et plus exactement des fragments Fv qui correspondent au fragment variable de l'anticorps contenant le site de liaison à l'antigène. Ils peuvent être synthétisés dans *E. coli*, ils sont solubles, monovalents, globulaires avec une masse d'environ 25 kDa et se lient avec une grande affinité à la protéine membranaire.

Enlever l'excès de détergent. Éliminer l'excès de micelles facilite le transfert de la protéine vers le cristal et perturbe aussi l'équilibre détergent lié/détergent en solution, ce qui pourrait libérer des parties hydrophiles de la protéine et permettre l'obtention de nouveaux "packing" (ou empilements) cristallins (figure 4.10).

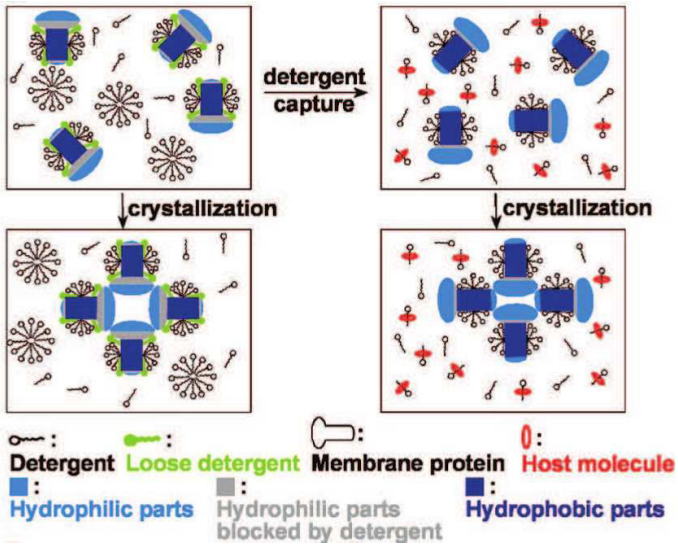


Figure 13 – Représentation schématique des effets hypothétiques du retrait du détergent lors de la cristallisation de PM. Extrait de [44]. Le retrait du détergent par une molécule hôte modifie la bouée de détergent et pourrait aboutir à de nouvelle forme cristalline.

Des techniques classiques de biochimie peuvent être utilisées pour éliminer le détergent comme la dialyse ou les lavages de la protéine immobilisée sur colonne. La dialyse présente le désavantage d'être longue et fastidieuse, surtout dans le cas des détergents à faibles CMC. Les lavages sur colonne d'affinité, quant à eux, ne permettent pas toujours d'obtenir la protéine en concentration suffisante pour envisager la réalisation d'essais de cristallisation. L'usage de concentreurs par ultrafiltration pour augmenter la concentration de la protéine est alors nécessaire, mais ceux-ci peuvent aussi concentrer le détergent.

D'autres méthodes physico-chimiques ont donc été développées. Elles consistent à piéger le détergent soit avec de la méthylcyclodextrine [44] (molécule formant une cage hydrophobe), soit par adsorption sur des billes hydrophobes de polystyrène [45]. Ces Bio-

beads SM2 ont été utilisés avec succès pour le contrôle du ratio détergent-protéine lors de la cristallisation d'un transporteur ADP/ATP [46].

Utilisation de nouveaux amphiphiles. Pour augmenter la stabilité de la protéine membranaire, le détergent initial peut être remplacé par un détergent "plus doux" ou un tensioactif au pouvoir détergent presque inexistant. Nous appelons ici, pouvoir détergent, la capacité d'un amphiphile à solubiliser une membrane lipidique telle que nous l'avons expliqué au paragraphe 2.1.2 de cette introduction. Ces amphiphiles sont alors dénommés "détergents". Les autres amphiphiles ne possédant pas ce caractère détergent seront appelés sous le terme générique de "tensioactifs", tout en sachant que les détergents sont aussi des tensioactifs.

L'utilisation de ces composés pour remplacer le détergent est de plus en plus fréquente. Dans le chapitre 1, présentant plus en détails les tensioactifs et leurs propriétés physico-chimiques, nous établirons une liste non exhaustive de ces nouveaux tensioactifs au design spécialement conçu pour la stabilisation et/ou la cristallisation des protéines membranaires. Ceux-ci ne solubilisant pas les membranes, l'étape d'extraction des protéines membranaires doit être réalisée par un détergent classique, puis celui-ci est échangé (remplacé) par le nouveau tensioactif. Parmi les méthodes d'échange des détergents, certaines comme la dialyse sont fastidieuses et consommatrices de tensioactif, d'autres comme la précipitation/renaturation ne sont pas applicables à toutes les protéines. Enfin, les plus utilisées restent encore celles utilisant l'échange de tensioactifs sur gradient de saccharose ou en colonne de purification. Il faut noter qu'il n'est pas forcément nécessaire de remplacer tout le détergent pour modifier le "packing" du cristal (et donc la résolution), un échange partiel peut s'avérer parfois préférable pour obtenir une meilleure qualité des cristaux [47]).

2.3.4 Voie d'optimisation n°2 : rationaliser la cristallisation des PM

Comme une cristallisation classique, la cristallisation d'une macromolécule biologique peut être gérée par son **diagramme de phases**. Il trace la concentration de protéine, C, en fonction des variations de son environnement (figure 14). Il est divisé en deux zones, la **sous-saturation** et la **sursaturation**, séparées par **la courbe de solubilité** qui représente la limite entre la phase soluble et la phase solide. A la solubilité, la protéine à la concentration C_s, est en équilibre thermodynamique entre un état soluté et une phase solide cristalline. Une solution de protéine est dite "sous-saturée" (et respectivement sursaturée) lorsque la concentration en protéine est inférieure (supérieure) à la solubilité.

Le phénomène de cristallisation de la protéine, c'est à dire le passage d'une solution homogène à un solide est guidé par la sursaturation qui est défini par une grandeur sans dimension : $\beta = \frac{C}{C_s}$. Or la solubilité d'une protéine dépend de sa propre nature (c'est un polyélectrolyte tributaire des résidus d'acides aminés qui le composent), de sa pureté, mais aussi de nombreux paramètres physico-chimiques (pH, force ionique, solvant, tempé-

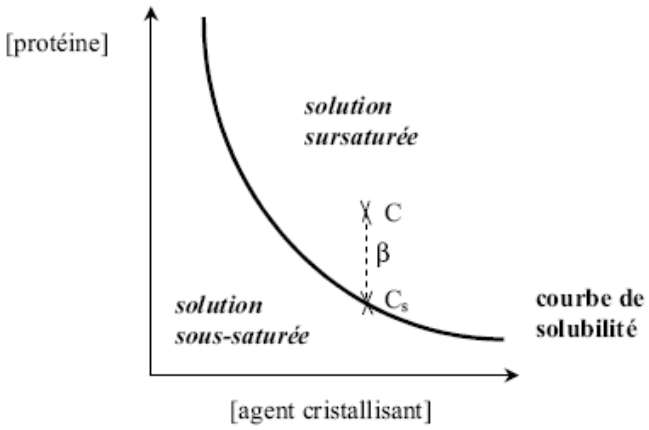


Figure 14 – Diagramme de phases d'une protéine. C : concentration de la protéine en solution, C_s : concentration de la protéine à la solubilité, β : sursaturation.

rature, pression, composition du mélange, etc.). La théorisation de tous ces phénomènes simultanés n'est donc pas aisée, pourtant seule une meilleure compréhension sur le plan fondamental permettrait de rationaliser la cristallisation des protéines membranaires et représenterait, à ce titre, un puissant levier pour l'universalisation de la cristallisation. Dans l'optique de mieux comprendre les mécanismes de cristallogénèse plusieurs groupes de recherche étudient la physico-chimie des solutions de cristallisation et plus particulièrement, le paramètre du second coefficient du viriel (A_2 ou B_{22}), témoin des interactions globales en solution, qui est un bon indicateur du potentiel d'une solution à générer des cristaux.

L'exemple des protéines solubles. Une étude réalisée au début des années 1990, par George et Wilson sur plusieurs protéines solubles, a montré que dans leurs conditions de cristallisation respectives, les protéines présentaient toutes des valeurs de A_2 comprises entre -8,0.10^{-4} et 0 mol.ml.g^{-2} [48]. Ce domaine étroit de valeurs du second coefficient du viriel, appelé le "crystallization slot", correspond à des interactions faiblement attractives entre les protéines.

L'hypothèse d'une corrélation entre le second coefficient du viriel et la cristallisation a, par la suite, été renforcée par de nouveaux travaux sur d'autres protéines solubles, qui présentaient toutes aussi des valeurs de A_2 dans le "cristallisation slot". On peut notamment citer les recherches sur le lysozyme en présence de sel [50, 51] ou de PEG [52, 53], sur la chymotrypsine [54], l'apoferritine [55], l'ATCase [56], la porine [57], l'albumine et l'ovalbumine [58], la ribonucléase [59], le virus de la mosaïque du brome [60] ou l'urate oxydase [61].

En 1999, cette corrélation fut explicitée par la démonstration de l'existence d'une relation analytique entre le second coefficient du viriel osmotique et la solubilité de la

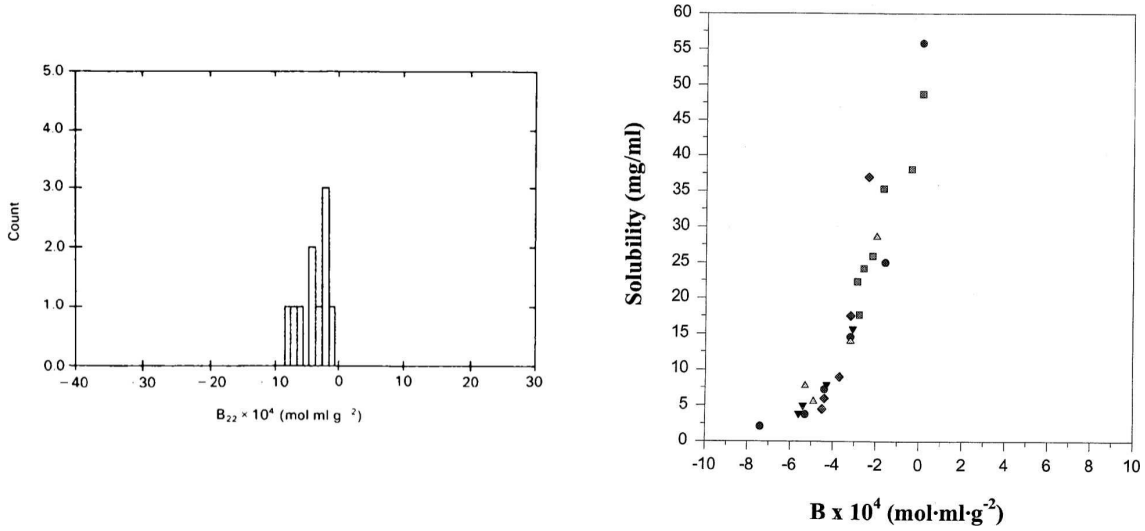


Figure 15 – Crystallization slot, solubilité et A_2. A gauche : Le "crystallization slot" de George et Wilson [48], histogramme représentant le "crystallization slot" obtenu par les mesures du second coefficient du viriel sur diverses protéines en conditions de cristallisation. A droite : la corrélation entre solubilité et second coefficient du viriel pour le lyzozyme dans différentes compositions de solvant (extrait de [49]).

protéine [49, 62] dont dépend le processus de nucléation. Cette relation confirme donc l'intérêt du second coefficient du viriel pour estimer le potentiel de cristallogénèse d'une solution : plus une protéine soluble se trouve dans des conditions de A_2 proches du "crystallization slot", plus elle aurait de chances de cristalliser.

Et maintenant les PM ? A la différence des protéines solubles, le détergent du complexe PDL va entrer dans la composition du réseau cristallin de la protéine. La cristallisation d'une protéine membranaire n'est donc pas une "simple" évolution dans le diagramme de phase de la protéine, mais dans celui du complexe protéine/détergent/lipide. Or la proportion en détergent peut être très importante et son rôle dans les interactions en solution lors de la cristallisation du complexe PDL devient non négligeable. Cette hypothèse est appuyée par les travaux de Zulauf, Rosenbusch et Garavito [63–65] qui ont observé que la cristallisation des complexes PDL était favorisée dans des conditions proches du cloud point du détergent. Ce résultat signifie que les forces attractives entre les micelles, causant leur agrégation au point de trouble ou "cloud point", seraient aussi responsables de l'attraction entre les molécules de détergent des complexes PDL. Ainsi dans des conditions proches du "cloud point", l'attraction due aux bouées de détergent serait suffisante pour rapprocher les complexes PDL et permettre la création de contacts cristallins entre les parties protéiques des complexes [66, 67].

Par analogie avec les protéines solubles, le groupe de Loll a réalisé des mesures du second coefficient du viriel pour quantifier l'interaction entre des micelles de détergents et

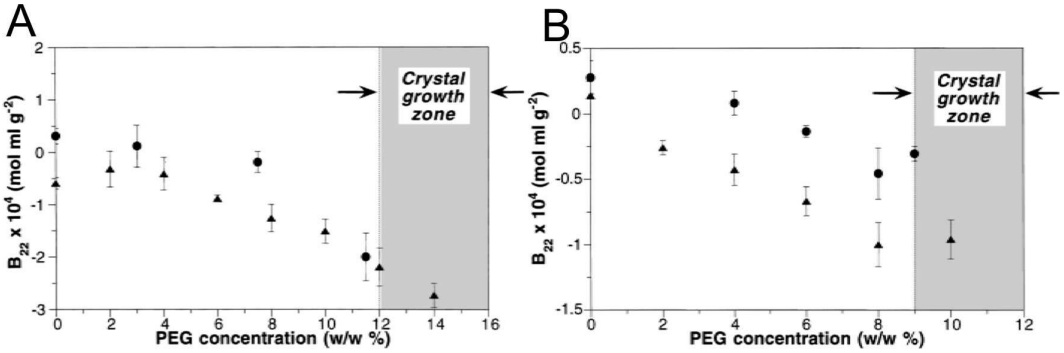


Figure 16 – Étude du second coefficient du viriel des micelles et du complexe PDL, par Hitscherich et *al.* [57] : Valeurs de second coefficient du viriel (B_{22}) pour les complexes porine OmpF-détergent (cercles) et les micelles libres de détergents (triangles), à différentes concentrations en PEG, dans les conditions cristallisation donnant des cristaux tetragonaux (A, détergent : 0.9% n-octyl-β-D-glucoside, 0.09% n-octyl-polyoxyethylene) ou trigonaux (B, détergent : 0.6% n-octyl-2-hydroxyethylsulfoxide, 01% n-octyl-polyoxyethylene). Le domaine de concentration en PEG, où des cristaux peuvent croitre, est grisé.

des complexes de OmpF (protéine membranaire intégrale de la famille des porines) [57] (figure 16). Il en ressort qu'en conditions cristallisantes, les valeurs de second coefficient du viriel mesurées entre complexes PDL sont dans le domaine du "crystallization slot" définie par George et Wilson. Le deuxième résultat important de cette étude est que les interactions micelle/micelle et complexe PDL/complexe PDL présentent le même comportement, à savoir qu'elles deviennent de plus en plus attractives lorsqu'on se rapproche du cloud point. Les forces attractives micelle/micelle peuvent contribuer dans l'interaction complexe PDL/complexe PDL (*cf.* figure 16 A où les valeurs de B_{22} du complexe PDL sont similaires à celles des micelles libres) ou au moins compensatoires des attractions défavorables protéine/protéine des complexes PDL (*cf.* figure 16 B, où les valeurs de B_{22} du complexe PDL sont parallèles mais supérieures, donc plus répulsives que celles des micelles libres). Ainsi la valeur du second coefficient du viriel des micelles de détergents (en absence de protéine), caractéristique des forces entre micelles et non d'un changement de la taille de la micelle [68], est un bon indicateur de prédiction du second coefficient du viriel du complexe PDL ou au moins de son évolution. Berger et *al.* arrive aux mêmes conclusions en montrant que la courbe du B_{22} du complexe PDL de bactériorhodopsine, solubilisée en OG, et celle de la température du cloud point, en fonction de l'agent cristallisant, présentaient la même pente [69]. En résumé pour les protéines intégrales, la proportion de détergent dans le complexe PDL est telle que le détergent a un rôle prédominant dans le premier temps du rapprochement des complexes PDL. Des contacts cristallins entre les parties hydrophiles des protéines pourront alors se créer et engendrer la nucléation du cristal. De ce fait, l'étude du second coefficient du viriel des micelles libres de détergent permet de prédire l'évolution des A_2 des complexes PDL sans avoir à consommer de la protéine.

3 Le complexe protéique RC-LH1-pufX

Dans ce contexte de la cristallisation *in surfo*, notre étude vise à réaliser une caractérisation complète du complexe PDL afin de mieux comprendre l'influence des différents facteurs mis en jeu. Il nous fallait donc pour cela choisir une protéine modèle qui servirait de fil rouge à notre étude biochimique. Notre choix s'est arrêté sur le complexe protéique RC-LH1-pufX issu de la chaîne photosynthétique de *Rhodobacter blasticus*. Pour mieux en comprendre les raisons, nous allons tout d'abord présenter ce complexe protéique et les différentes informations structurales dont on dispose.

Rhodobacter blasticus est une bactérie qui appartient, comme tout le genre *Rhodobacter (Rb.)*, au groupe des bactéries pourpres non sulfureuses (*Rhodospirillaceae*). Ces bactéries, très étudiées, et notamment les *Rhodobacter* ont la particularité de posséder trois voies possibles de production d'énergie : la respiration oxygénique, la respiration nitrate (ou dénitrification) et la photosynthèse. Par ailleurs elles sont capables de réduire les métaux lourds, ce qui en font des bactéries dépolluantes. Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés à un complexe protéique impliqué dans les premières étapes de la photosynthèse. Nous allons, dans ce paragraphe, présenter succinctement la photosynthèse bactérienne afin d'introduire les protéines membranaires impliquées dans ce processus et notamment le photosystème RC-LH1 des bactéries pourpres, qui se présente sous la forme d'un dimère chez les *Rhodobacter* : le complexe RC-LH1-pufX.

3.1 La photosynthèse bactérienne

Il existe sur Terre trois sources d'énergie pour la croissance des organismes vivants : la lumière, les composés inorganiques et les composés organiques. La photosynthèse est le processus bio-énergétique par lequel les plantes et certaines bactéries synthétisent de la matière organique à partir de la lumière. D'un point de vue évolutif, ce processus est d'une importance primordiale car il est probablement à l'origine de modifications environnementales profondes (passage d'une atmosphère réductrice à un milieu oxydant riche en oxygène) qui auraient permis l'apparition de la respiration sur Terre. Deux types de photosynthèse se distinguent :

- la photosynthèse oxygénique, chez les plantes, les algues et certaines bactéries (les cyanobactéries) où du CO_2 est consommé et de l'O_2 est relargué.
- la photosynthèse anoxygénique, chez les bactéries vertes et les bactéries pourpres, pour laquelle il n'y a pas de production d'oxygène.

3.1.1 Les bactéries photosynthétiques anoxygéniques

Les bactéries pourpres et vertes, appartenant à la famille des Eubactéries, forment un groupe extrêmement hétérogène au niveau morphologique (forme, taille, structure des membranes...), physiologique (consommation de carbone, d'azote...) et constitutif (structures moléculaires de l'appareil photosynthétique, composition en pigments,...). Au niveau

métabolique elles peuvent être phototrophes ou chimiotrophes, autotrophes ou hétérotrophes. En présence d'oxygène, elles réalisent la respiration "classique" et répriment la synthèse des complexes de l'appareil photosynthétique. En revanche lorsqu'elles sont cultivées en anaérobie et en présence de lumière, elles réalisent la photosynthèse. Nous verrons que cela implique la production de membranes invaginées intracytoplasmiques qui sont fortement réprimées quand la bactérie utilise la respiration.

Les bactéries pourpres et vertes doivent leurs noms à la grande variété de pigments de type bactériochlorophylles (Bchl) et caroténoïdes qu'elles contiennent et qui confèrent aux cultures bactériennes des couleurs allant du vert au pourpre, en passant par le brun et le rouge.

3.1.2 Les pigments photosynthétiques

Les pigments photosynthétiques ont des fonctions très importantes dans les étapes primaires de la photosynthèse : la collecte de la lumière (par absorption), la photoprotection (par dégradation de l'excès d'énergie) et la stabilisation structurale des complexes collecteurs de lumière [70].

Deux types de pigments sont présents chez les bactéries pourpres :

1. La bactériochlorophylle a (Bchl a) (figure 17) : c'est un dérivé chimique de la chlorophylle, composé d'un macrocycle poly-substitué possédant un atome de magnésium central. Les groupements substitués sur le macrocycle définissent les différentes structures de la Bchl. La molécule de Bchl a possède un groupement acétylé en position C_3, un groupement cétone en C^1_{13} et une chaîne carbonée en C^3_{17}. Cette chaîne varie entre les différentes espèces, elle est par exemple de type phytol chez *Rb. sphaeroides* et géranylgéraniol chez *Rs. rubrum*. Ces molécules présentent trois pics d'absorption principaux vers 370, 595 et 770 nm.
2. Les caroténoïdes (figure 18) : ce sont des chaînes linéaires d'une quarantaine de carbones, présentant 7 à 13 doubles liaisons conjuguées, et terminées par des groupements chimiques très peu polaires de type méthyle ou cyclo-alcane. Leurs pics d'absorption, situés entre 450 et 570 nm, complètent le spectre d'absorption de la Bachl a.

3.1.3 La chaîne photosynthétique chez les bactéries pourpres

Les différentes protéines de la chaîne photosynthétique La chaîne photosynthétique des bactéries pourpres possède un seul photosystème, une version simplifiée du photosystème II chez les plantes, qui convertit l'énergie lumineuse en énergie chimique. Il est composé de deux types de protéines : les antennes collectrices de lumière (LH, pour light-harvesting) qui absorbent les photons et le centre réactionnel (RC) qui réalise une séparation de charges électriques. L'antenne LH1 est présente chez toutes les souches bactériennes et est intimement liée au RC qu'elle entoure. Les antennes LH2 sont des antennes

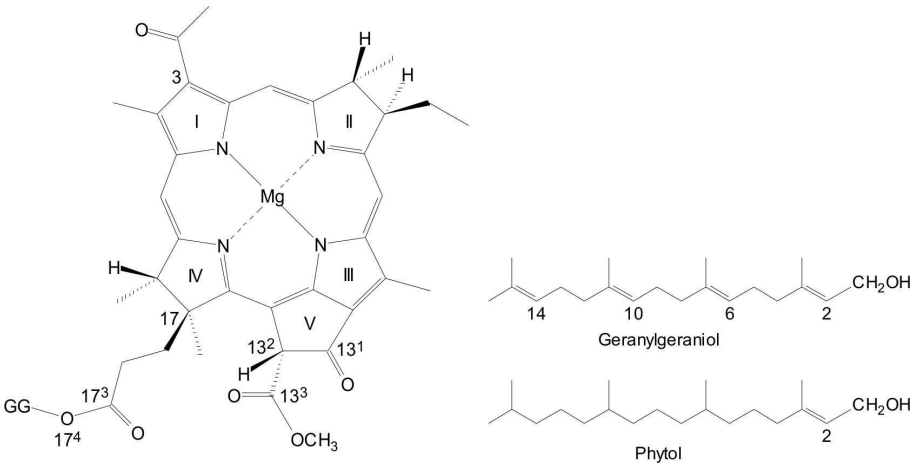


Figure 17 – Structure générique de la bactériochlorophylle a . A gauche, le macrocycle avec les cycles pyrroliques (I, II, III, et IV) et l'isocyle (V) porteur d'une chaîne de type genarylgaraniol (GG). A droite : structure des chaînes de base de la bactériochlorophylle a

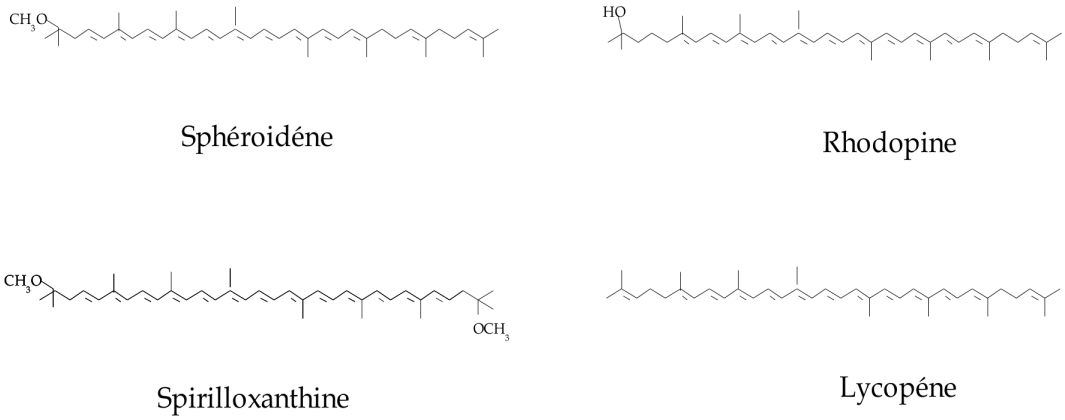


Figure 18 – Les principaux caroténoïdes chez les bactéries pourpres

périphériques, présentes uniquement chez certaines espèces. Leur développement dépend des conditions de culture [71] et est accru en faible lumière pour augmenter la capacité de collecte et de transfert de la lumière vers le RC. Outre leurs localisations (autour du RC ou périphérique), les antennes LH1 et LH2 se différencient aussi par leur longueur d'onde d'absorption maximale. Chez *Rb. sphaeroïdes* ou *Rb. Capsulatus*, les antennes LH1 absorbent vers 875 nm et les antennes LH2 entre 800 et 850 nm. Ces deux antennes sont les plus fréquemment observées chez les bactéries pourpres mais quelques espèces possèdent d'autres types d'antennes que nous n'aborderons pas ici. Enfin, deux autres protéines transmembranaires interviennent dans la chaîne photosynthétique, le complexe bc_1 et l'ATP synthase, ainsi qu'une protéine soluble, le cytochrome c.

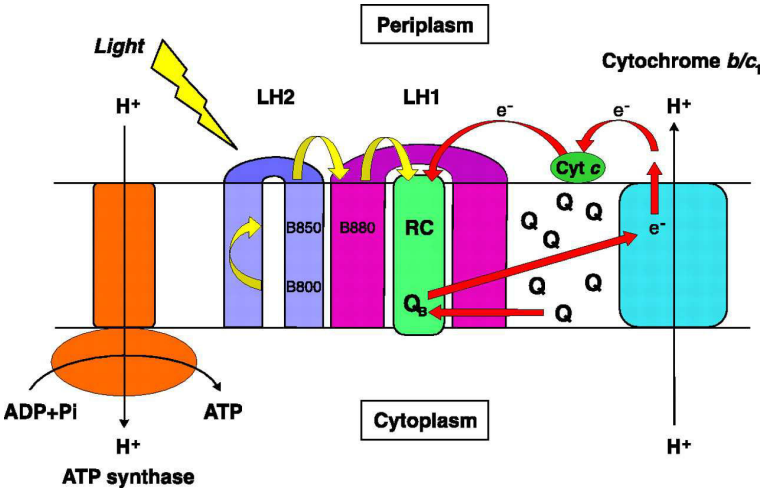


Figure 19 – Schématisation de la chaîne photosynthétique. Extrait [72]. Voir texte pour explication.

Le cycle photosynthtétique La chaîne photosynthétique peut être schématisée par la figure 19. Après absorption de la lumière, les antennes vont transférer leur énergie au RC qui devient un puissant donneur d'électron pour les quinones. Ce transfert d'électron se fait en deux temps : il y a tout d'abord réduction de la quinone Q_B située dans le site Q_B du RC via la quinone Q_A. Puis un deuxième acte photochimique va réduire et doublement protoner Q_B qui va alors se détacher du RC et migrer dans la membrane pour être oxydée par le complexe bc_1. Le RC oxydé va récupérer ses électrons par l'intermédiaire du cytochrome c2 réduit par le complexe bc_1. Ce transfert cyclique d'électrons couplé à une prise de protons à travers la membrane va permettre la formation d'un potentiel de membrane qui permettra de générer de l'ATP grâce une ATPase.

Localisation dans les membranes invaginées L'appareil photosynthétique est localisé au niveau des membranes intracytoplasmiques qui se développent à partir de la membrane cytoplasmique. La forme de ces invaginations varie d'un genre à un autre, avec la présence de tubes (*Rps. rubrum*, *Rb. capsulatus*), de lamelles (*Blastochloris (Blc.) viridis*, *Rps. palustris*) ou de vésicules (figure 20). Cependant la formation de ces membranes invaginées et leur rendement de production sont fortement régulés par les conditions environnementales [73–75]. La tension en oxygène et l'intensité lumineuse sont les deux paramètres majeurs qui influencent la synthèse de ces membranes invaginées.

3.1.4 Organisation dans la membrane native

Les premières observations de membranes photosynthétiques ont été réalisées par Miller en 1982 [77] sur la bactérie *Blc. viridis* par microscopie électronique. Elles avaient déjà à l'époque permis de constater l'organisation très structurée et la haute densité de ces

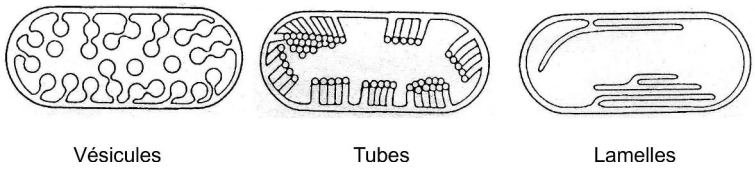


Figure 20 – Morphologie des membranes invaginées

membranes, ainsi que le positionnement particulier du RC au cœur d'une antenne collectrice de lumière. Le développement des techniques d'imagerie (microscopie electronique ou AFM) a permis de franchir un cap en terme de qualité d'image et de multiplier les observations. Sur la figure 21, il est possible d'apprécier la grande diversité architecturale des complexes photosynthtétiques qui existe chez les différentes souches bactériennes [76]. Les antennes LH2, périphériques, ont une forme d'anneau circulaire peu variable, alors que les antennes LH1 plus elliptiques présentent une plus grande flexibilité structurale autour du RC. Ces structures peuvent être complètement fermées (cas A et B) ou ouvertes sous forme de monomère (C) ou de dimère (D).

Le laboratoire de bioénergétique cellulaire du CEA Cadarache (LBC) fut l'un des premiers a montré l'existence de dimères de RC-LH1 en forme de S [78], résultant de l'association de deux monomères de RC-LH1 grâce à la présence d'un polypeptide supplémentaire : le pufX. Dans ce complexe, les antennes LH1 s'associent en formant un anneau ouvert (en forme de C) qui entoure le RC (figure 22). L'organisation de ces dimères en longs alignements réguliers et très denses avait également été révélée et il avait été suggéré que la proximité des différents partenaires jouait un rôle sur la cinétique de transfert d'électron [79]. L'organisation supramoléculaire de ces complexes aurait donc un rôle fonctionnel dans le cycle photosynthétique.

Mais sans structure à haute résolution des RC-LH1 de nombreuses questions sur l'organisation supramoléculaire de ces complexes restent sans réponses (Quelle est l'influence d'un dimère par rapport à un monomère ? Pourquoi existe-t-il des antennes ouvertes et des antennes fermées ? etc.). Plusieurs groupes de recherche se sont donc attachés à étudier la structure de ces complexes dimériques de RC-LH1.

3.2 Structure du photosystème des bactéries pourpres

Les structures cristallographiques des antennes LH2 et du centre réactionnel à résolution atomique ainsi qu'une structure à moyenne résolution du RC-LH1 monomérique sont disponibles et permettent d'établir un certain nombre d'hypothèses sur la structure du complexe dimérique.

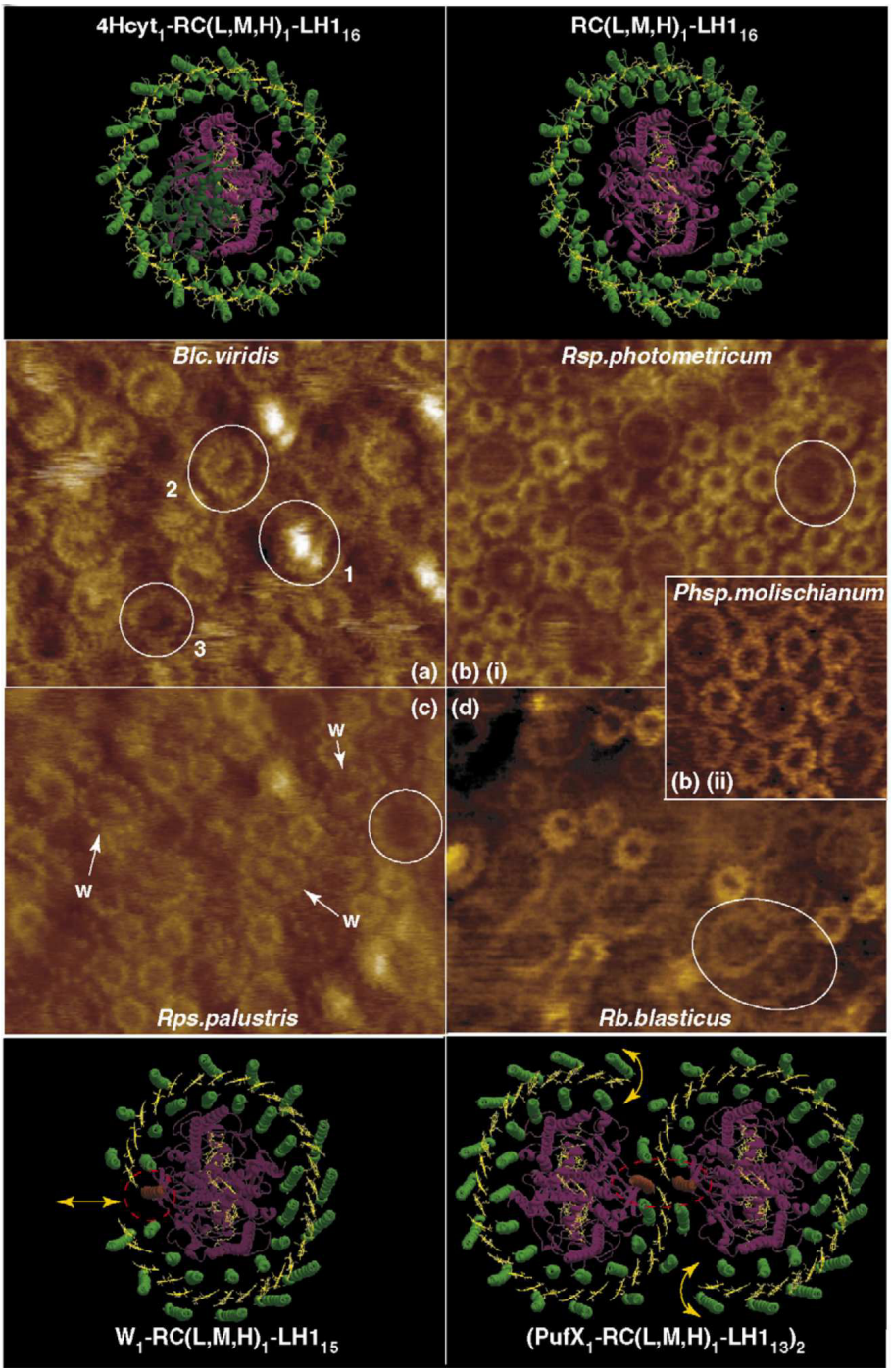


Figure 21 – La diversité architecturale des photosystèmes en membranes natives par AFM et les modèles structuraux associés. Extrait de [76]. Une souche ne possédant pas de LH2 : *Blc. viridis* (A), et quatre souches possédant des antennes LH2 : *Rhodospirillum photometricum* (B.i), *Phaeospirillum molischianum* (B.ii), *Rps. palustris* (C) et *Rb. blasticus* (D). Le complexe est RC-LH1 est dimérique dans le cas de *Rb. blasticus* et monomérique chez les autres souches présentées.

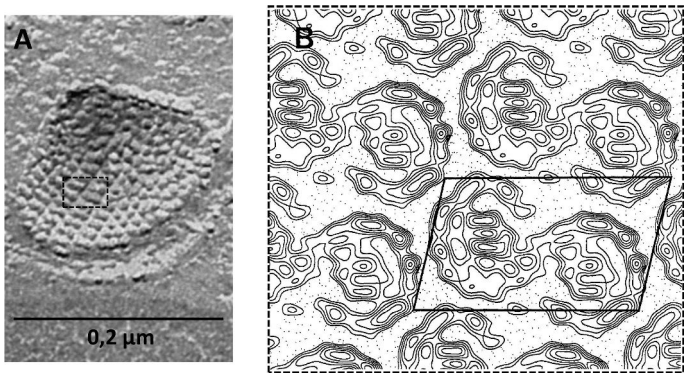


Figure 22 – Organisation des membranes photosynthétiques. Gauche : Image par freeze-fracture de membranes de *Rhodobaca bogoriensis*. (Le rectangle en pointillés est indiqué à titre d'exemple). Droite : Carte de projection à 20 Å de résolution de membranes natives par coloration négative, chez *Rb. sphaeroides* [78].

3.2.1 Les antennes

Les antennes qu'elles soient de type LH1 ou LH2 présentent une grande similarité de structure (Voir référence [72] pour revue). La structure 3D, à haute résolution, du complexe LH2 de *Rps. acidophila* a été la première à être publiée en 1995 [80]. Depuis, elle a pu être obtenue sur d'autre souches bactériennes [81, 82].

L'unité de base des antennes : un hétérodimère lié à des pigments Les antennes LH1 et LH2 sont des protéines intégrales, constituées par la répétition d'une unité structurale de base : un hétérodimère de deux polypeptides, α et β, d'environ 5 à 7 kDa auxquels viennent s'associer des caroténoïdes et bactériochlorophylles (figure 23). Dans les antennes LH2, chaque hétérodimère est associé à trois molécules de Bchl a et une molécule de caroténoïdes. Dans les antennes LH1 le rapport est de deux Bchl a et deux caroténoïdes par hétérodimère.

Ces polypeptides présentent une partie centrale hydrophobe d'environ 21-23 résidus, structurée en hélice α et des extrémités polaires N- et C-terminal, situées respectivement côté cytoplasmique (avec 12-14 résidus, pour le polypeptide α et 13-25 résidus pour le polypeptide β) et périplasmique (α : 16-20 résidus, β : 5-12 résidus).

Les antennes LH2. La structure du complexe LH2 chez *Rps. acidophila* [80] (figure 24), révèle que cette protéine comporte 9 hétérodimères $\alpha\beta$ disposés en anneau avec un diamètre interne de 36 Å et un diamètre externe de 68 Å (les polypeptides α sont placés côté interne et les polypeptides β côté externe de la couronne). Par conséquent chaque protéine de LH2 contient 9 caroténoïdes situés entre les polypeptides α et β et 27 Bchl a. Celles-ci sont divisées en deux groupes. 9 d'entre elles, une par hétérodimère, absorbent à une longueur d'onde de 850 nm. Elles sont positionnées parallèlement à la membrane, côté

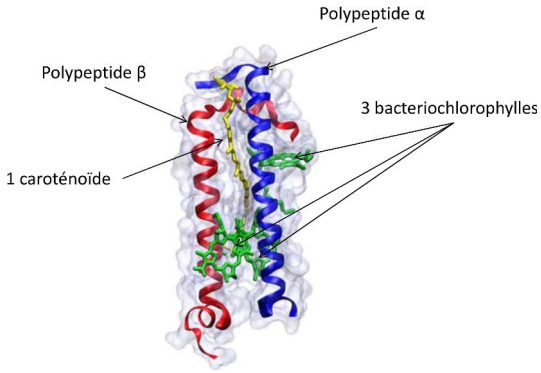


Figure 23 – Structure de l'hétérodimère α/β et les pigment associés. A partir des antennes LH2 de Rps. acidophila cristallisée à 2,5 Å de résolution [80]. Le coté cytoplasmique se trouve en haut de la figure. Image extraite de [83].

cytoplasmique, leur ion central Mg^{2+} étant complexé à un résidu méthionine de la partie N-terminal du polypeptide α, très conservé chez les différentes espèces. Les 18 autres Bchl a, dont l'absorption maximale est à 850 nm, sont plus proches de l'extréminté C-terminale, et se placent perpendiculairement à la membrane, en se coordinnant alternativement à un résidu histidine du polypeptide α ou β. Le caroténoïde quant à lui, se retrouve sur toute la hauteur de la protéine, mais interagit principalement avec les résidus polaires de l'extrémité N-terminale du polypeptide α.

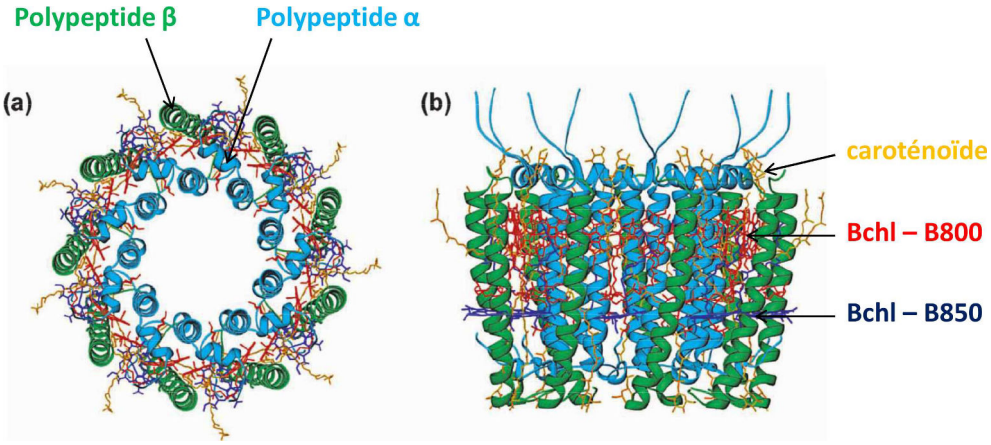


Figure 24 – Structure de l'antenne LH2 chez *Rps. acidophila* à 2 Å de résolution. A : vue du dessus par rapport au plan de la membrane. B : vue latérale. En vert le polypeptide β ; en bleu turquoise le polypeptide α ; en bleu la bactériochlorophylle a B850 (Bchl-B850) ; en rouge, la bactériochlorophylle B800 (Bchl-B800) ; en orange, le caroténoïde). Image extraite de [72].

3.2.2 Le complexe RC-LH1 des bactéries pourpres

Depuis la détermination de la structure à haute résolution du centre réactionnel chez *Rb. sphaeroïdes* [84], il n'a toujours pas été possible d'obtenir la structure du complexe formé par l'association RC-LH1. Une structure à 8,5 Å de résolution a été cependant obtenue par cryomicroscopie à partir d'un cristal 2D de LH1 chez *Rps. rubrum* [85]. Ainsi il a été possible de déterminer que l'antenne LH1 de cette souche contient 16 hétérodimères $\alpha\beta$ qui entourent le centre réactionnel. Mais comme nous l'avons évoqué en présentant les images AFM des membranes photosynthétiques, la configuration des antennes LH1 autour du RC n'est pas figée et le nombre d'hétéorodimères n'est pas conservé d'une espèce à l'autre.

En 2003, une étude cristallographique à 4,8 Å de résolution du complexe RC-LH1 de de *Rps. palustris* a été publiée [86] (figure 25). Le centre réactionnel est composé de trois sous-unité protéiques H (heavy), M (medium) et L (light) en référence à leur différence de masse moléculaire apparente sur gel SDS-PAGE. La sous-unité H présente une seule hélice α et un domaine cytoplasmique. Les sous unités L et M possèdent chacune 5 hélices α transmembranaires qui s'associent de façon non-covalente aux cofacteurs de la protéine : deux Bchl a, deux bactériophéophytines, un caroténoïde et deux quinones (Q_A et Q_B). La couronne de complexes LH1 est composée de 15 hétérodimères $\alpha\beta$, la place du $16^{ième}$ étant occupée par une hélice α transmembranaire, nommée polypeptide W. Ce polypeptide W présent chez *Rps. palustris* serait un analogue du polypeptide pufX que l'on retrouve chez *Rb. sphaeroïdes*, *Rb. capsulatus* et *Rb. blasticus*.

3.3 Le complexe RC-LH1-pufX

3.3.1 Le polypeptide pufX

L'organisation du RC-LH1 en monomère ou en dimère semble être liée à la présence de ce polypeptide pufX (voir référence [87] pour revue) qui jouerait un rôle structural majeur dont les conséquences fonctionnelles sont très importantes. En effet la délétion du gène du pufX entraîne une monomérisation du RC-LH1 et une fermeture des antennes LH1. Cela a pour conséquence une perte de la capacité de la bactérie de se développer en conditions photosynthétiques [88]. Le pufX est donc impliqué dans la diminution du nombre d'hétérodimers $\alpha\beta$ de la couronne LH1, ce qui permet l'ouverture de la couronne de LH1. Cette ouverture est interprétée comme étant un passage pour l'arrivée des quinols au contact du RC, lors du transfert d'électrons, favorisant un échange rapide quinone/quinol [78,89]. La perte de cette ouverture pourrait donc participer à la perte de l'activité photosynthétique.

Au niveau du mécanisme moléculaire, le pufX interagirait avec les polypeptides α de l'hétérodimère $\alpha\beta$ des LH1 [90]. Mais encore une fois, l'absence de structure à haute résolution du complexe RC-LH1-pufX est un handicap de taille pour définir le rôle structural du polypeptide pufX. A ce jour, seuls des modèles de RC-LH1-pufX ont pu être proposés à partir d'images d'AFM ou de microscopie électronique.

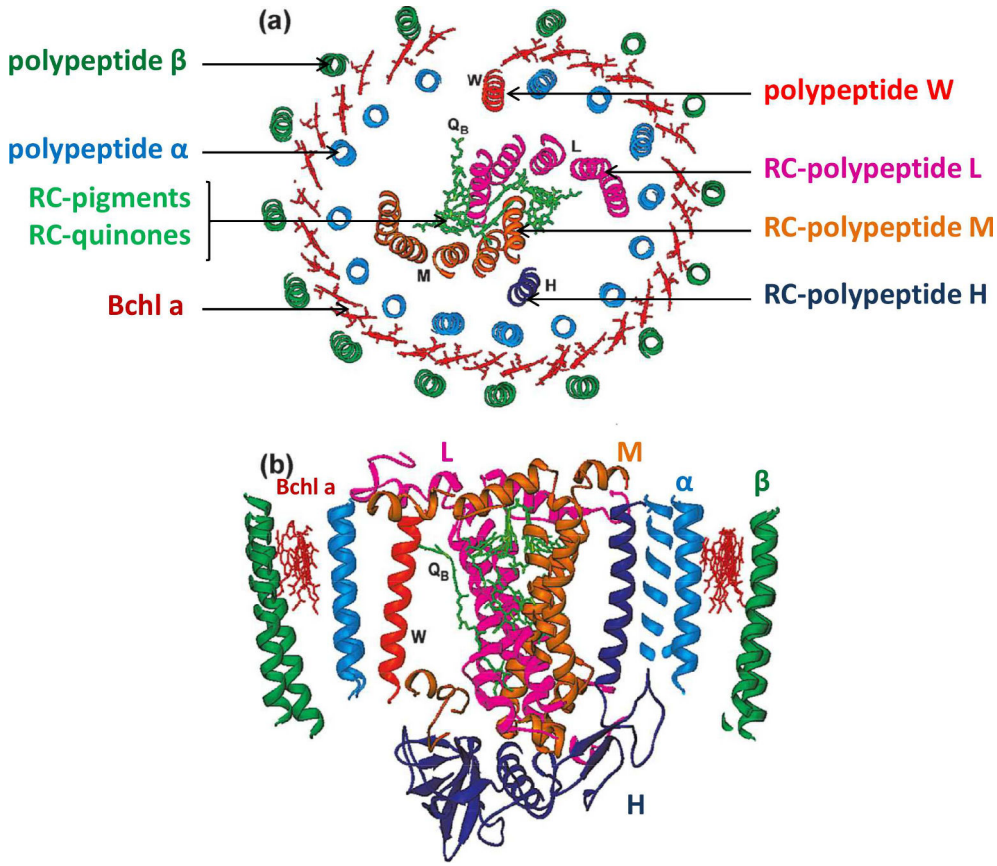


Figure 25 – Structure du RC-LH1 *Rps. palustris* à 4,8 Å de résolution. A : vue du dessus par rapport au plan de la membrane. B : vue latérale. En bleu clair le polypeptide α et en vert le polypeptide β de l'antenne LH1. En rouge la position hypothétique de bactériochlorophylle a (Bchl a). Et le centre réactionnel, ces sous-unité protéique H (bleu), M (orange) et L (rose), ses pigments et quinones (vert) et son polypeptide W (rouge). Image extraite de [72].

3.3.2 Les différents modèles structuraux proposés

Deux polypeptides pufX se situeraient au niveau des ouvertures de la couronne de LH1 :

Le premier modèle proposé par le groupe de Hunter, à partir d'une carte de projection à 8,5 Å de résolution obtenue par cryomicroscopie, positionnent les 28 hétérodimères $\alpha\beta$ de façon continue en forme de S autour des deux RC. Pour chaque RC, il y aurait un polypeptide puf X par centre qui se placerait entre le RC et le LH1, à proximité de ses ouvertures (extrémités du S). L'orientation des polypeptides puf X a pu être déterminée plus tard par des études RMN en solution. Leurs parties N-terminales primordiales pour la dimérisation du RC-LH1-pufX seraient tournées vers le centre du dimère, qui correspond à la zone de l'interface entre les deux monomères [91] (figure 26).

Deux polypeptides puf X se situeraient au centre du dimère :

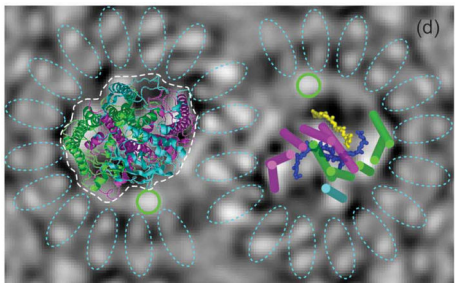


Figure 26 – Modèle du RC-LH1-pufX (1) chez *Rb. sphaeroïdes* d'après [92]. Le pufX serait localisé par le cercle vert. Les positions des 28 hétérodimères $\alpha\beta$ sont localisées par des pointillés bleu clair. Représentation du RC : enveloppe générale en pointillés blanc ; sous-untité L en violet ; sous-unité M en vert, sous-unité H en cyan ; bactériochorophylle a en bleu ; quinone Q_B en jaune. A gauche les structures des protéines sont entière, à droite seule la position de hélice α est marquée.

Un autre modèle place deux polypeptides pufX au centre du complexe dimérique. Les images AFM de la membrane native de *Rb. blasticus* montrent que le complexe LH1 entourant chaque RC est composé de 13 hétérodimères $\alpha\beta$, formant une couronne sur 290°. Les deux pufX se placeraient côte à côte, au niveau de l'interface des deux monomères, dans l'alignement des deux couronnes en C du LH1 [93] (figure 27).

Un autre modèle, à partir de modélisations *in silico*, propose une structure à peu près équivalente où les deux polypeptides pufX seraient aussi positionnés au centre du dimère mais pas directement en contact. L'espace entre les deux laisserait la place pour le positionnement de molécules de bactériochlorophylles a [94] (figure 28).

Quatre polypeptides pufX au niveau de 4 ouvertures de la couronne de LH1 :

Une dernier modèle, publié récemment, diffère notoirement des deux premiers en proposant la présence de quatre polypeptides pufX par dimère au lieu de deux [95]. Ce résultat a été obtenu grâce à une étude en microscopie électronique (particule isolée) réalisée sur le complexe RC-LH1-pufX issu de la bactérie *Rhodobaca bogoriensis*. Cette nouvelle structure révèle la présence d'une double ouverture autour de chaque RC et propose l'insertion de 13 hétérodimères α β par RC sur la partie périphérique du dimère et deux autres (un par RC) au centre du dimère. Ces 2 hétérodimères centraux sont "isolés" par quatre ouvertures dans les antennes LH1, à proximité desquels se tiendraient les quatre polypeptides pufX (figure 29).

3.4 Pourquoi ce modèle ?

Le choix du complexe RC-LH1-pufX, comme modèle d'étude sur l'influence des tensioactifs sur la cristallisation des protéines membranaires, repose tout d'abord sur son

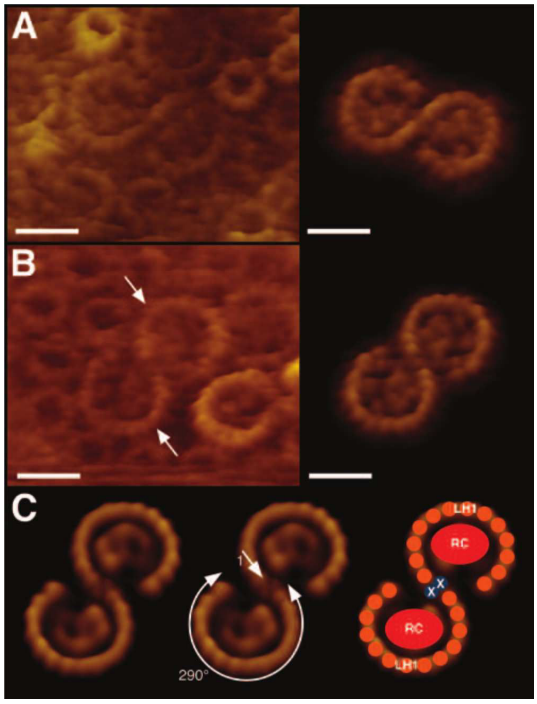


Figure 27 – **Modèle du RC-LH1-pufX (2a)** chez *Rb. blasticus* par une étude AFM d'après [93]. A et B : analyse brute de la surface periplasmique et isolement de complexe dimérique. C : Moyenne des images obtenus pour un complexe RC-LH1-pufX, et le modèle associé avec en rouge le RC, en orange les hétérodimères $\alpha\beta$ formant la LH1 et en bleu les deux pufX.

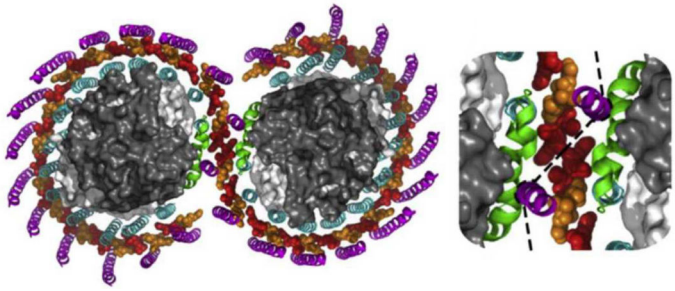


Figure 28 – **Modèle du RC-LH1-pufX (2b)** chez *Rb. sphaeroïdes* d'après [94]. La zone de contact est zoomée à droite. L'enveloppe du RC est représentée en gris avec le domaine extra-membranaire du polypeptide H en gris foncé. La bactériochlorophylle est alternativement en rouge et orange, les polypetides α et β des LH1 sont respectivement en cyan et violet, les 2 polypeptides pufX en vert.

intérêt scientifique évident. Nous venons de le voir, la structure de ce complexe fait débat et seule l'obtention d'une structure à haute résolution pourra permettre de déterminer avec précision la localisation des pigments et des polypeptides pufX. Au delà de la simple connaissance de la structure de ce complexe, il s'agit d'obtenir des informations essen-

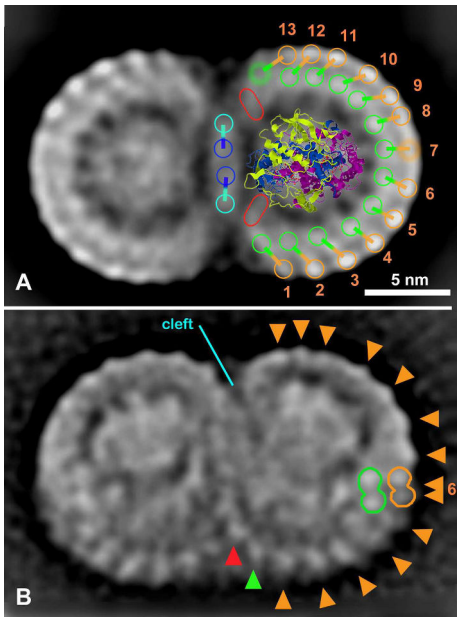


Figure 29 – Modèle du RC-LH1-puf X (3) chez *Rhodobaca bogoriensis* d'après [95]. Le RC est représenté avec sa sous-unité H en jaune, L en violet, et M en bleu. Pour chaque RC Les LH1 comportent 13 hétérodimères situés en périphérie (numérotés de 1 à 13) avec en vert le polypeptide α et en orange le polypeptide β. Le $14^{ième}$ hétérodimère est en bleu, et les deux polypeptides pufX en rouge.

tielles sur les interactions entre ces différents éléments du complexe RC-LH1-pufX, pour comprendre les mécanismes moléculaires mis eu jeu lors de la première étape du la photosynthèse. Ce niveau de compréhension est nécessaire pour ensuite aborder la question de l'organisation supra-moléculaire de ces complexes dans les membranes photosynthétiques.

Bien sûr le choix d'un modèle si complexe est ambitieux et il aurait été envisageable de choisir un modèle plus simple comme la bactériorhodopsine, dont des cristaux, à fort pouvoir diffractant, ont déjà été obtenus par toutes les méthodes existantes. Mais justement, pour étudier la cristallogénèse et pouvoir mesurer et comparer l'influence des différents tensioactifs, nous avions besoin d'une protéine moins stable, d'une protéine qui "ne cristallise pas à tous les coups". Il nous fallait, au final, une protéine qui corresponde à l'immense majorité des protéines membranaires, un cas général : une protéine qui ne donne pas de cristaux permettant la détermination de sa structure. Le complexe RC-LH1-pufX en fait partie. Il est constitué comme beaucoup de protéines, de l'association de plusieurs sous-unités protéiques (les hétérodimères $\alpha\beta$, les différents peptides du RC) et possèdent des cofacteurs non-protéiques (les pigments, les quinones) qui vont être soumis à l'influence directe des tensioactifs. Les conditions sont donc loin d'être en faveur de la réussite de sa cristallisation, ce qui amplifie l'intérêt d'une étude sur sa cristallogénèse.

Enfin la dernière raison, et peut être la plus importante, est que nous ne partions pas, non plus, de rien. De nombreux essais de cristallisation avaient déjà été réalisés sur ce

complexe lors d'une collaboration entre E. Pebay-Peroula et C. Jungas. Des conditions de cristallisation du complexe avaient été déterminées en présence de DDM et des cristaux diffractant à 8 Å de résolution avaient pu être obtenus (Colette Jungas, communication personnelle, figure 30). Ces résultats étaient prometteurs pour essayer de mieux comprendre l'influence des paramètres clés de la cristallisation dans le but ultime d'améliorer le pouvoir diffractant des cristaux de RC-LH1-pufX. Ils permettaient de démarrer notre étude, avec une première référence en détergent classique, et de pouvoir espérer mieux comprendre l'influence des paramètres clés de la cristallisation, pour peut être améliorer le pouvoir diffractant des cristaux de RC-LH1-pufX.

Figure 30 – Cristaux de RC-LH1-puf X de *Rb. blasticus* diffractant à 8 Å de résolution. Collaboration Colette Jungas et Eva Peybay-Peroula.

4 Les objectifs de l'étude

Dans ce travail, nous avons cherché à mieux comprendre l'influence des tensioactifs lors la cristallisation des protéines membranaires. Cet objectif nécessite de connaître intimement les tensioactifs aussi bien au niveau de leur physico-chimie que de leurs interactions avec la protéine. Nous nous sommes appuyés sur l'étude de plusieurs tensioactifs (le DDM, le F_8TAC, le PCC-malt, les tripodes et les FH-malt), et d'une protéine membranaire (le RC-LH1-puf X) et nous avons adopté une approche originale et pluridisciplinaire de la cristallisation des protéines membranaire, au cours de laquelle nous voulions :

1. **Utiliser de nouveaux amphiphiles** au design spécialement conçu pour répondre aux contraintes de protéines membranaires et les comparer à un détergent classique de la cristallisation des protéine membranaire : le DDM ;
2. **Caractériser les assemblages** de ces tensioactifs en solution ;
3. **Traduire, en terme d'interaction**, les différentes forces impliquées dans la cristallogénèse en fonction des conditions de cristallisation pour rationaliser les méthodes de cristallisation ;
4. **Contrôler la quantité de tensioactif et de lipides** associés à la protéine ;
5. **Cristalliser** le complexe RC-LH1-pufX.

Ainsi, nous souhaitions tirer profit au maximum de l'utilisation coordonnée de trois voies d'optimisation de la cristallisation *in surfo* (utilisation de nouveaux amphiphiles,

contrôle de l'excès de détergent et rationalisation de la cristallisation), pour, peut être, pouvoir améliorer dans un second temps la qualité des cristaux du complexe RC-LH1-pufX de *Rhodobacter blasticus*.

Dans le *chapitre 1*, nous expliquerons sur quels critères ont été développés, jusqu'à présent, les nouveaux amphiphiles conçus pour la manipulation des protéines membranaires et pourquoi nous avons sélectionné 4 d'entre eux pour notre étude. Nous conclurons ce chapitre par la présentation des synthèses que nous avons réalisées. Le *chapitre 2* sera consacré à la caractérisation physico-chimique en solution de ces 4 tensioactifs, que nous comparerons au DDM. Cette partie importante de la thèse nous permettra (i) d'éclairer la relation entre la structure de ces composés et leur comportement en solution, qui est déterminant pour la cristallisation, et (ii) de cibler les meilleurs candidats pour la cristallogénèse, que nous souhaitons ensuite tester sur le complexe protéique RC-LH1-pufX. Avant cela nous avons développé dans le *chapitre 3* une méthode de dosage des tensioactifs par HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatographie afin de pouvoir mesurer la quantité de tensioactif lié à la protéine dans la bouée. Grâce à cette technique, nous avons pu caractériser le complexe protéine/détergent/lipide du RC-LH1-pufX après purification, aussi bien en terme de tensioactif que de lipides (*chapitre 4*). Enfin le dernier chapitre sera dédié aux essais de cristallisation du complexe RC-LH1-pufX en liaison avec l'étude physico-chimique des tensioactifs. Pour finir, une conclusion générale présentera les perspectives qu'ouvre ce travail de thèse.

CHAPITRE 1

Les tensioactifs

Dans ce chapitre nous allons revenir sur les propriétés et caractéristiques générales des tensioactifs, avant de dresser une liste non exhaustive des molécules dont le design a été imaginé spécialement pour le maintien en solution et/ou la cristallisation des protéines membranaires. Nous présenterons les motivations qui ont guidé le choix des quatre familles de tensioactifs étudiées dans ce travail, et détaillerons les synthèses de ces composés qui ont été réalisés.

1 Généralités sur les tensioactifs

Les propriétés physico-chimiques des tensioactifs vont souvent dépendre de la nature de leurs têtes polaires (figure 1.1), c'est pourquoi ils sont souvent regroupés en quatre classes :

- Les **tensioactifs anioniques** dont la tête polaire porte une charge négative. Ce sont par exemple des carboxylates, des sulfates, des sulfonates ou des phosphates (ex : SDS).
- Les **tensioactifs cationiques** qui présentent une charge positive. Les plus courants ont une tête de type ammonium quaternaires, ou pyridinium.
  Ces deux familles peuvent être regroupées sous l'étiquette des **tensioactifs ioniques**.
- Les **tensioactifs zwitterioniques** ou amphotères dont la partie polaire comporte une charge négative et une charge positive qui s'annulent. Ces composés sont donc globalement neutres, comme les oxides d'amine.
- Les **tensioactifs non ioniques** qui ne possèdent aucune charge. Ce sont généralement des dérivés de glucoside, maltoside ou du polyéthylène glycol (PEG).

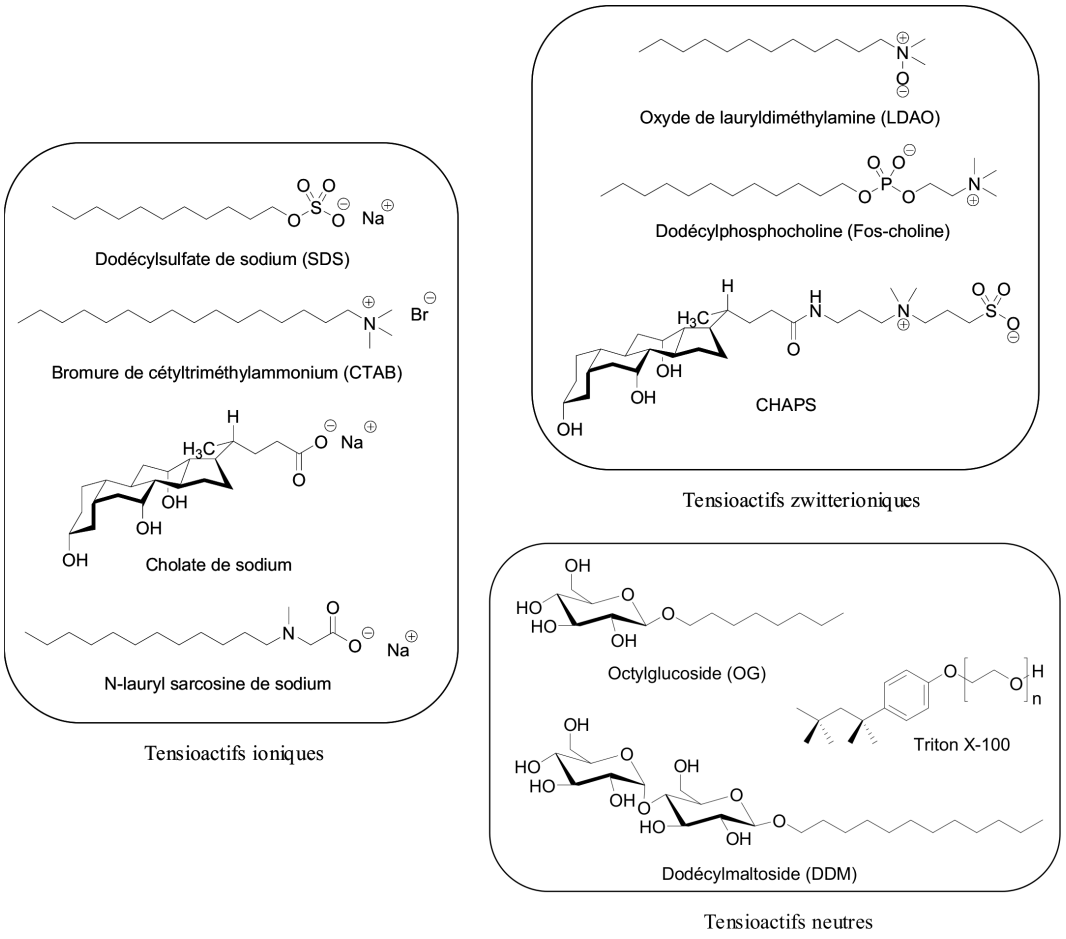


Figure 1.1 – Les différentes classes de tensioactifs : quelques exemples de structures de tensioactifs classées selon la nature de la tête polaire

D'autres classifications des tensioactifs existent toutefois, comme par exemple celles réalisées selon les propriétés de leur partie hydrophobe : leur nature (hydrocarbonée, fluorocarbonée ou silylée), leur caractère (saturé ou insaturé), leur structure (linéaire, cyclique ou ramifiée), leur nombre (mono-, bi- ou tri-catenaire). Enfin les tensioactifs peuvent aussi être regroupés en fonction des caractéristiques physico-chimiques de leur micelle, que nous allons à présent définir.

1.1 La concentration micellaire critique (CMC)

Comme nous l'avons introduit page 10, la valeur de la CMC est le résultat d'un équilibre d'interactions en solution : certaines d'entre elles favorisent la micellisation, alors que d'autres s'y opposent. Ces interactions sont de type solvant/tensioactif ou tensioactif/tensioactif. Le caractère ambivalent des tensioactifs, rend la CMC d'un tensioactif dépendante de la structure même du tensioactif, en plus des conditions du milieu. Le

groupe hydrophile (type, charge, taille, contre-ion) et le groupe hydrophobe (longueur, degré d'insaturation, présence de ramification, de cycles) vont tous deux impacter la CMC.

1.1.1 Influence de la tête polaire

Les interactions attractives solvant/tête polaire et celles répulsives tête polaire/tête polaire ont tendance à défavoriser la micellisation. Dans le premier cas, plus la solvatation des têtes polaires est importante (c'est à dire plus le groupe hydrophile a une forte polarité), plus la solubilisation du monomère sera favorisée, au détriment de la formation de micelle. Le second cas correspond aux interactions de type électrostatique qui existent entre les têtes des tensioactifs dans la micelle. Si celles-ci sont trop importantes, les molécules en solution ont du mal à s'approcher suffisamment pour que se produise l'interaction entre les groupes hydrophobes. La présence des ces interactions électrostatiques dans la micelle a plusieurs conséquences :

- La CMC des tensioactifs ioniques dépend de la nature du contre ion.
- La CMC des tensioactifs ioniques est très sensible à la présence d'électrolytes dans le milieu, qui vont réduire les répulsions inter-têtes chargées et diminuer la CMC [96].
- Pour une chaîne hydrophobe identique, les tensioactifs ioniques ont tendance à avoir une CMC plus élevée que les tensioactifs neutres.
- Les tensioactifs zwitterioniques dont la tête polaire est globalement neutre ont une CMC qui est peu dépendante des charges environnantes.

1.1.2 Influence de la partie hydrophobe

Comme nous l'avons vu précédemment c'est l'effet hydrophobe qui est à l'origine du phénomène de micellisation, il est donc logique que la CMC dépende fortement de la partie hydrophobe des tensioactifs. Plus celle-ci sera importante, plus le tensioactif aura tendance à former des micelles et sa CMC sera plus basse. Si celle-ci est trop courte l'hydrophobie de l'amphiphile ne sera pas suffisante pour générer la micellisation (cas des chaînes aliphatiques à moins 6 carbones).

D'une manière générale, l'allongement de la chaîne hydrocarbonée du tensioactif, augmente son caractère hydrophobe, avec pour conséquence : (i) de diminuer l'hydrosolubilité du tensioactif, (ii) de faciliter l'adsorbtion des tensioactifs à la surface de l'eau, et d'augmenter la stabilité de la monocouche interfaciale (iii) d'augmenter la tendance du tensioactif à s'auto-associer en solution et donc d'abaisser la CMC. Expérimentalement il a été déterminé que la valeur du logarithme de la CMC diminue linéairement avec l'augmentation du nombre de carbones dans la chaîne linéaire entre 6 et 16 carbones. Au delà de 16 carbones, la valeur de la CMC devient indépendante de la longueur de chaîne [97], probablement parce que les longues chaînes ont une tendance à se replier sur elles-mêmes, minimisant la surface de contact avec l'eau. Ainsi jusqu'à 16 carbones, l'addition d'un groupement méthylène -CH_2 à une chaîne carbonée linéaire, divise par deux

la CMC du tensioactif. Par ailleurs certaines équivalences d'hydrophobie ont été mises en évidence, comme par exemple, le groupe phényl qui a un effet équivalent à environ 3 groupes méthylène.

A l'inverse, la CMC augmente avec la ramification de la chaîne, ce qui correspond à l'augmentation de la solubilité des hydrocarbures dans l'eau avec leur ramification (cf. figure 1.2). La CMC augmente aussi avec le nombre d'insaturations de la chaîne, les composés porteur d'une double liaison *cis* exhibant une CMC plus élevée que le composé *trans* correspondant.

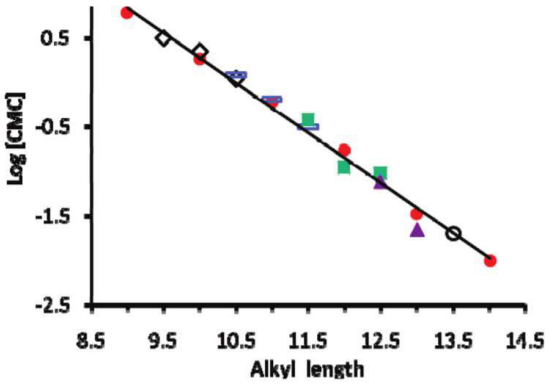


Figure 1.2 – Évolution de la CMC des composés maltoside en fonction de la longueur et de la ramification de la chaîne : le log[CMC] (CMC en mM) est tracé en fonction du nombre de carbones dans la chaîne linéaire (cercles pleins) ou ramifiés, en comptant que un carbone de la ramification équivaut à 0,5 carbone de la chaîne principale. Les losanges correspondent aux tensioactifs ramifiés dont la chaîne principale compte 9 carbones, 10 carbones pour les rectangles, 11 pour les carrés, 12 pour triangles et 13 pour le cercle blanc [98].

1.1.3 Influence de l'environnement physico-chimique

Les conditions expérimentales, comme le pH, la température, la force ionique ou la présence d'autres espèces tensioactives (lipides, détergents, certaines protéines) peuvent moduler aussi bien les interactions favorables, que les interactions défavorables à la formation de micelles. Elles ont donc une incidence directe sur la valeur de la CMC.

- **Présence d'électrolytes** : de manière générale il convient de dire que la présence d'électrolytes tend à diminuer la CMC. La première justification est que l'addition d'électrolytes réduit la solubilité de beaucoup de composés dans l'eau, cela va donc réduire la solvatation de la partie hydrophile du tensioactif. La deuxième explication est que les électrolytes vont écranter les charges des têtes polaires et réduire les répulsions électrostatiques défavorables à la formation de micelles. L'effet des électrolytes sur la CMC est aussi bien valable pour les tensioactifs chargés que pour les tensioactifs non ioniques (mais dans une moindre mesure).

– **Mélange d'autres tensioactifs** : Dans le cas de mélanges de molécules amphiphiles en solution il peut y avoir formation d'auto-assemblages hétérogènes, où les interactions tête/tête de tensioactifs voisins sont réduites. La CMC de la micelle mixte formée est plus basse que celle du tensioactif pur. Les molécules classiques utilisées comme co-tensioactif sont les alcools et les lipides.
– **La température** : La CMC d'un composé diminue dans un premier temps avec l'augmentation de température, puis l'effet s'inverse, suite à deux phénomènes opposés. D'une part, l'élévation de la température provoque la déshydratation de la partie hydrophile, ce qui favorise la micellisation (la CMC diminue). D'autre part, l'augmentation de température désorganise les molécules d'eau situées au voisinage des parties hydrophobes, les forces d'interaction entre molécules d'eau diminuent et l'écart entre les interactions eau/eau par rapport aux interactions eau/partie hydrophobe est diminué. Les interactions eau/partie hydrophobe responsables de la micellisation, deviennent donc moins défavorables à plus haute température (la CMC augmente).

1.2 Le nombre d'agrégation et le paramètre d'empilement

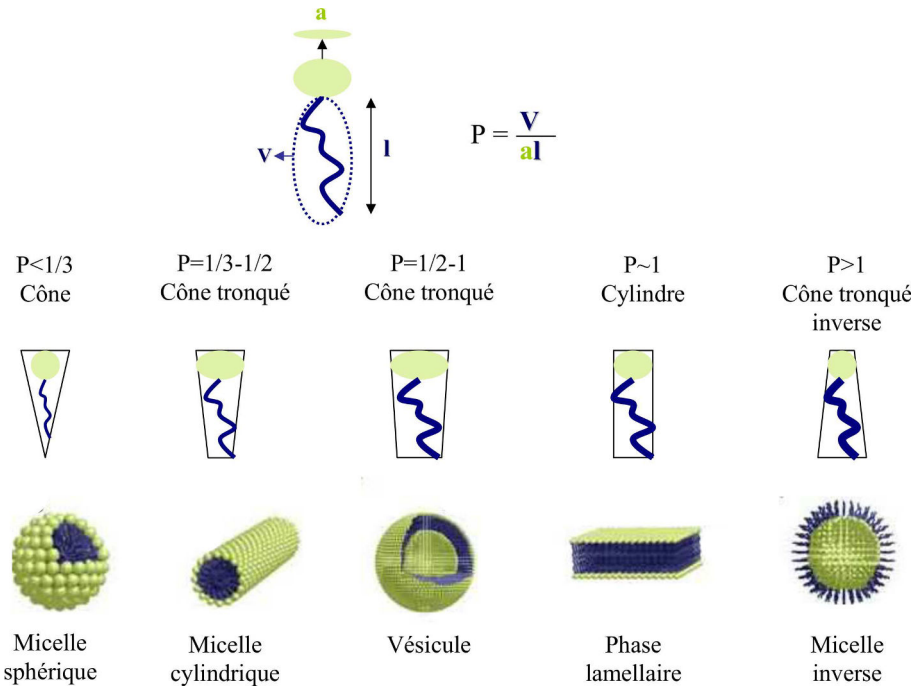


Figure 1.3 – Paramètre d'empilement des tensioactifs : Le calcul du paramètre d'empilement permet de prédire la forme des agrégats formés [99]

Les travaux de Ninham et Israelchvili [99] ont montré que la structure globale des auto-assemblages de tensioactifs en solution, dépendait de la géométrie des surfactants. Ainsi

les formes des agrégats peuvent être prédites par la valeur du paramètre d'empilement P, qui tient compte du rapport entre les aires occupées par la partie hydrophile et la partie hydrophobe, selon :

$$P = \frac{V}{al} \tag{1.1}$$

avec V, le volume de la chaîne du détergent, l, la longueur de la chaîne et a, l'aire de la section de la tête polaire à l'interface. Chaque valeur de P est reliée à une géométrie particulière du tensioactif qui impose une forme définie à l'agrégat, comme le montre la figure 1.3.

Le nombre d'agrégation, noté N_{agg}, correspond au nombre de surfactants par micelle. Pour la plupart des détergents, la concentration en tensioactif n'a pas d'influence sur le nombre d'agrégation qui reste constant (à condition, bien sûr, de rester au dessus de la CMC).

1.3 La balance hydrophile/lipophile

La balance lipophile-hydrophile (HLB, pour "hydrophilic/lipophilique balance") est caractéristique de la structure des tensioactifs. Elle représente l'équilibre entre les groupements hydrophobes et hydrophiles. Sa valeur est d'autant plus élevée que le tensioactif est hydrophile. Cette classification des tensioactifs en fonction de leurs HLB a été établie pour la première fois par Griffin en 1949. Certaines propriétés physicochimiques des détergents, notamment leur hydrosolubilité, peuvent être prédites à partir de leur valeur de HLB.

1.4 Le point de Kraft et le point de trouble (ou "cloud point")

Le point de Kraft (pour les tensioactifs ioniques) : Lorsque la température augmente, la solubilité des tensioactifs ioniques augmente aussi. Cette augmentation est lente dans un premier temps, puis s'accélère à partir d'une certaine température, appelée température ou point de Kraft (figure 1.6). Ce point de Kraft marque en fait le passage d'une solubilisation de monomères à une solubilisation de micelles. Avant la température de Kraft le tensioactif n'est pas assez soluble pour former des micelles, sa solubilité est inférieure à la CMC, l'équilibre se fait entre la solution de monomères et le tensioactif solide précipité. Au point de Kraft, la solubilité est au niveau de la CMC du tensioactif, puis supérieure à des plus hautes températures. Le point de Kraft est donc directement relié à la CMC et est dépendant des mêmes facteurs que la CMC (voir § 1.1). Tout paramètre augmentant la CMC, induit une augmentation de la température de Kraft. Toutefois certains de ces paramètres vont influer aussi bien sur la CMC, et sur la solubilité, leur effet sur le point de Kraft sera donc plus difficile à prédire (cas des électrolytes qui peuvent aussi bien augmenter la solubilité, phase de salting-in, ou la diminuer, salting-out)

Le point de trouble ou "cloud point" (pour les tensioactifs non-ioniques dérivés du

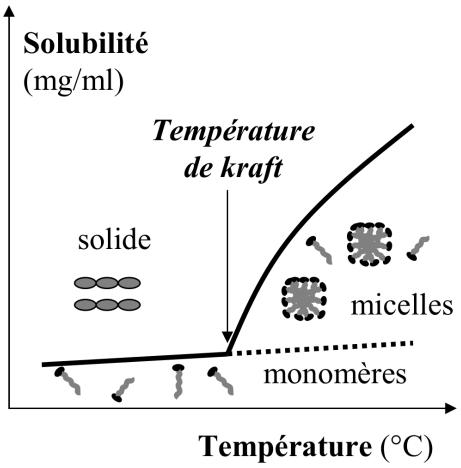


Figure 1.4 – **Température de Kraft** : le point de Kraft se trouve au point d'inflexion de la courbe d'évolution de la solubilité du tensioactif ionique en fonction de sa concentration.

PEG) : Lorsqu'une solution de tensioactifs est chauffée progressivement, celle-ci connait une transition de phase repérable macroscopiquement par le passage d'une solution transparente à une solution trouble, définissant le point de trouble (en °C). En continuant de chauffer au delà de cette température, la solution devient biphasique avec une phase riche en tensioactif, et une phase aqueuse pauvre un tensioactif. Ce point de trouble est pratiquement indépendant de la concentration en tensioactif. Ce phénomène serait dû à la déshydratation des têtes polaires lors de l'augmentation de la température, ce qui diminue le caractère hydrophile du tensioactif, et par voie de conséquence augmente son caractère hydrophobe. Ainsi d'une part la CMC se retrouve diminuée, mais la perte de la couche d'hydratation implique une restructuration des micelles dont le nombre d'agrégation et la taille vont croitre. Lorsque ces agrégats atteignent une taille d'une centaine de nanomètres ils interagissent avec la lumière, produisant la turbidité de la solution. Et lorsqu'ils atteignent à plus haute température, une taille de l'ordre du micromètre ils sédimentent par gravité provoquant la séparation de phase. Le point de trouble dépend de tous les effets ayant une influence sur le phénomène de micellisation. Si la micellisation est favorisée (abaissement de la CMC) la température du cloud point sera diminuée.

1.5 Diagramme de phases des tensioactifs

La phase micellaire du tensioactif n'existe que dans un certain domaine de concentration et de température, propre à chaque tensioactif, qui est défini par son diagramme de phase. Comme on vient de le voir, l'augmentation de la température provoque en général l'apparition du point de trouble, signe de la présence de deux phases non miscibles : l'une riche en détergent, l'autre dépourvue de détergent. La courbe définie par la température et la concentration de ce point de trouble s'appelle la **limite de consolution**. Il est à noter

que pour certains détergents le point de trouble est obtenu en abaissant la température de la solution micellaire, la limite de consolution du tensioactif, se retrouve alors sous le domaine micellaire dans le diagramme de phase de tels détergents, comme le montre la figure 1.5, reprise de [100], montrant les diagrammes de phase schématisés fréquemment observés pour les détergents non ioniques dans l'eau.

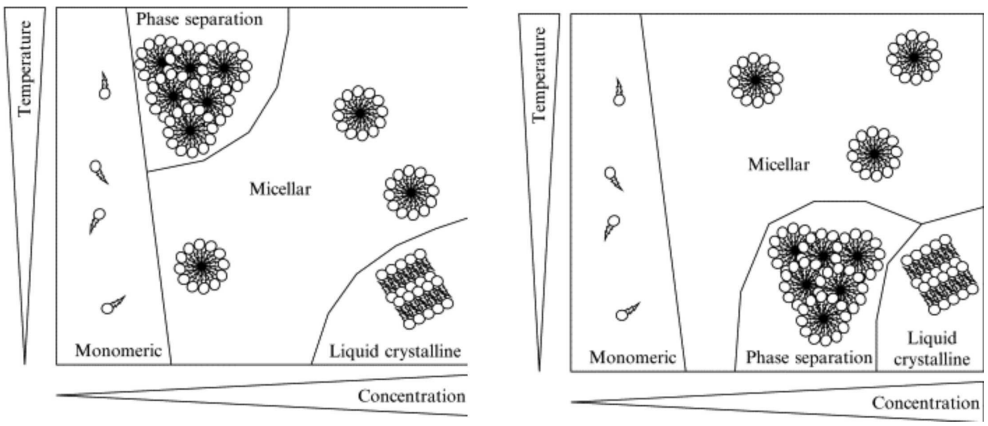


Figure 1.5 – schématisation des diagrammes de phase classique de détergents non ioniques [100]. La CMC est définie par la limite entre la solution de monomère et le reste du diagramme de phase. La limite de consolution se situe à la frontière entre la phase micellaire et la phase composée de deux phases liquides non miscibles entre elles. Cette zone se situe soit au-dessus soit en dessous de la zone micellaire en fonction du tensioactif.

La transition de la phase micellaire à l'état biphasique est précédée d'une étape d'agrégation de micelles non visible à l'œil mais détectable par diffusion de lumière ou de neutrons. Ce phénomène est particulièrement intéressant pour la cristallisation des protéines membranaires car la concentration locale de micelles de détergent pourrait aider à cristalliser les protéines membranaires [101]. Aux faibles températures, se trouve la **limite de cristallisation critique**, en dessous de laquelle le tensioactif "précipite" formant des cristaux hydratés de détergent. Le franchissement de cette zone a plutôt tendance à défavoriser la croissance cristalline de la protéine [102]. Cependant il faut bien comprendre que toutes les limites du diagramme de phase d'un tensioactif vont être décalées par la présence de protéine, de sel, ou d'agent cristallisant. La détermination expérimentale d'un diagramme de phase d'un détergent n'est donc valable que dans une seule condition expérimentale, et représente déjà un travail long et fastidieux.

Ces schémas sont donc des versions simplifiées des diagrammes de phase réels, qui peuvent être bien plus complexes et faire intervenir d'autres types de phases (mésophases, phases hexagonales ou lamellaires) comme le montre cet exemple donné dans la littérature [103] pour l'hexaoxyethylene dodecyl ether, $C_{12}E_6$, sur la gamme complète de concentration et une température de 0 à 100 °C .

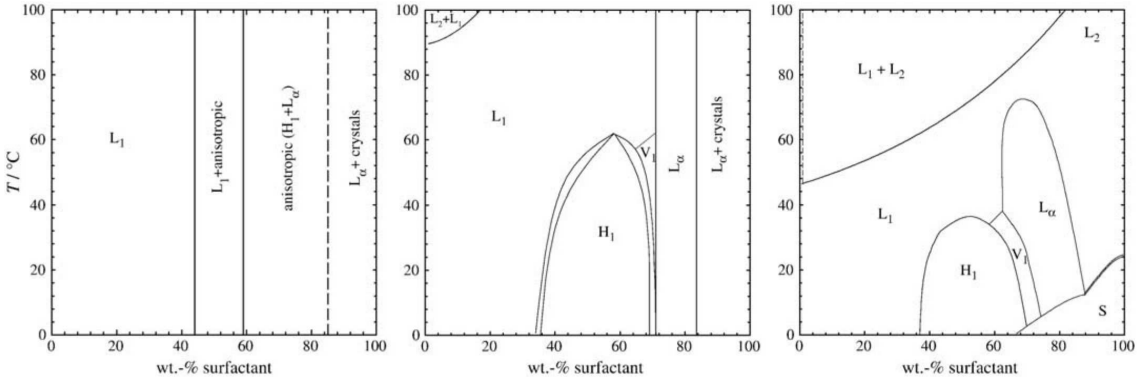


Figure 1.6 – Exemple de diagrammes de phase de détergent [103] : DDM/eau (à gauche), le mélange 1 :1 DDM/$C_{12}E_6$ (milieu), et $C_{12}E_6$/eau (à droite). L1 représente une phase micellaire normale isotrope, L2 une phase micellaire inverse isotrope, S une phase solide en tensioactif, H1 une phase hexagonale, V1 une phase cubique bicontinue, et Lα une phase lamellaire.

2 Les nouveaux outils amphiphiles conçus pour la manipulation des protéines membranaires

Dans l'introduction nous avons cité les cinq familles des détergents "historiques" de la cristallisation des protéines membranaires. Cependant très rapidement des groupes de recherche ont imaginé de nouvelles molécules afin d'améliorer leur efficacité en fonction du but recherché : solubilisation des membranes, maintien en solution, renaturation, ou cristallisation de protéines membranaires. Sur la base, bien souvent, de considérations structurales, de plus en plus de ces tensioactifs voient le jour.

2.1 Les amphipols

Les amphipols (ou APols pour "Amphipatic Polymers")) sont des polymères amphiphiles ioniques, présentant un grand nombre de chaînes hydrophobes (figure 1.7), capables de maintenir les protéines membranaires solubles, dans leur état natif, dans l'eau sous forme de petit complexes hydrophiles. Chaque monomère peut créer de multiples contacts avec la région transmembranaire de la protéine [104], ce qui leur confère une très grande affinité pour la surface de la protéine. Ainsi la désorption spontanée de la protéine est presque inexistante et l'équilibre de distribution des amphipols est largement en faveur de sa forme liée à la protéine, par rapport à sa forme libre en solution. En conséquence la phase micellaire, responsable dans le cas des solutions de détergents, de la solubilisation des lipides, cofacteurs et sous-unités, et donc de la déstabilisation de la protéine membranaire, est ainsi éliminée. Les amphipols ont été utilisés avec succès sur les protéines membranaires, pour leur maintien en solution ou leur renaturation, leur immobilisation sur support solide, leur étude par résonance magnétique nucléaire (RMN),

et microscopie électronique, leur insertion dans des vésicules, films noirs de lipides, ou cellules entières [105,106]. Le plus utilisé est sans doute l'A8-35 composé d'une chaîne polyacrylate relativement courte ($\sim$ 35 résidus acrylate) dont certains carboxylates ont été greffés aléatoirement par de l'octylamine ($\sim$ 9 d'entre eux), ou de l'isopropylamine ($\sim$ 14 résidus) pour une masse molaire moyenne de 4,3 kDa. Les groupements acides non greffés restent chargés en solution aqueuse et confère a l'amphipol une grande solubilité alors que les chaînes octylamide lui apporte son hydrophobie, et que les chaînes isopropylamides servent à réduire la densité de charge.

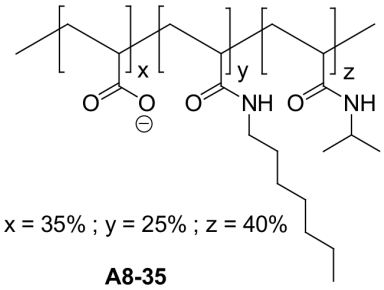


Figure 1.7 – Exemple de structure des amphipols

Cependant la solubilité de l'A8-35 dépend de la présence de charges sur ses groupements carboxylates, ce qui la rend dépendante des tous les paramètres qui modifieront le nombre de charges du composé comme l'utilisation de faibles pH ou l'addition de cations multivalents (comme le calcium). Pour certaines applications aux conditions particulières il y a donc un risque d'agrégation de l'A8-35, et il sera préférable d'utiliser d'autres amphipols au design plus adapté. Parmi eux on peut citer **les NAPols** qui sont une version non ionique de amphipols [107]. Ce sont des homotélomères de monomères amphiphiles (figure 1.8) capables, comme l'A8-35, de maintenir les protéines membranaires en solution en absence de détergent. Les NAPols ont pu être utilisés pour des essais de RMN de protéine membranaire, de renaturation de protéine ou encore de synthèse protéique avec l'avantage d'être insensibles au pH [108].

2.2 Les "tripodes amphiphiles"

2.2.1 Les tripodes de Gellman

Le groupe de Gellman a proposé, dès le début des années 2000, des "tripodes amphiphiles" qui possèdent trois "pattes" hydrophobes courtes [110]. Ces tensioactifs offrent une rigidité de structure qui fixe leur conformation, contrairement aux détergents classiques à chaîne aliphatique. Cette propriété a pour objectif d'aider à la cristallisation par une meilleure homogénéité conformationnelle du complexe protéine-tensioactif et donc un empilement plus régulier dans le réseau cristallin. En faisant varier la tête polaire par l'introduction d'un ou plusieurs sucres (glucoside ou maltoside) (cf. figure 1.9 à gauche),

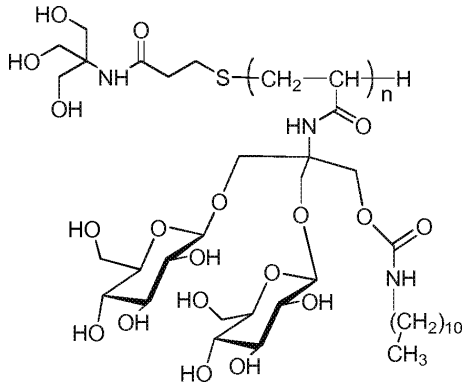


Figure 1.8 – Exemple de structure de NAPols

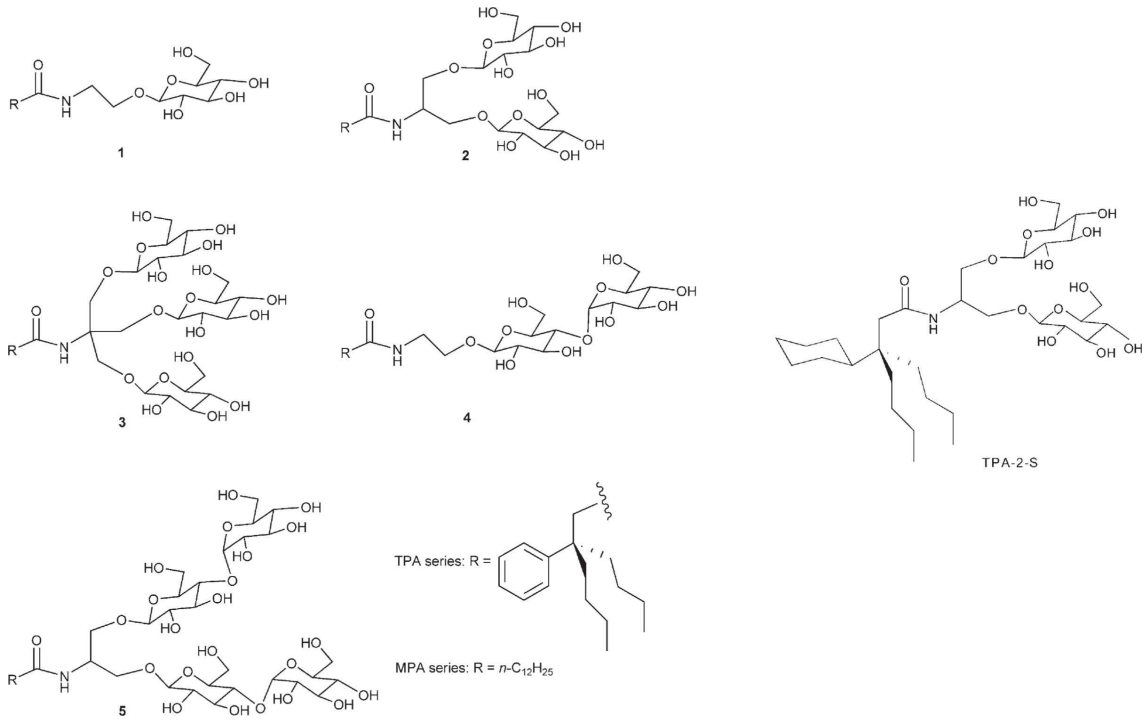


Figure 1.9 – Structures des "tripodes amphiphiles" de Gellman [109]

ils ont pu étudier la faculté de ces tensioactifs à solubiliser des membranes et à conserver la structure native du complexe photosynthétique RC-LH1 de *R. capsulatus*. Au final ils ont retenu le composé TPA-2-S (figure 1.9 à droite) qui montre une disposition équivalente (si ce n'est meilleure) que le DDM pour la solubilisation et la stabilisation de la protéine RC-LH1. Ce composé présente par ailleurs l'avantage de ne pas absorber dans l'UV comparé à la première série de tripodes contenant un motif benzène sur l'une des trois branches hydrophobes [109].

2.2.2 Les tripodes amphiphiles faciaux

L'usage de trois groupements hydrophobes courts, dans les tripodes amphiphiles de Gellman (figure 1.9) permet d'éviter les interactions dénaturantes du tripode avec la protéine (perte des degrés de liberté de la chaîne), tout en multipliant les possibilités de contact entre l'amphiphile et la protéine. C'est pourquoi ils sont capables de maintenir les protéines membranaires sous leur forme native pendant plusieurs semaines. Avec la même idée, Julien Dauvergne, au cours de sa thèse (CBSA 2010), a synthétisé une autre famille de tripode ayant le particularité d'être des amphiphiles faciaux. Pour cela, il a utilisé une plateforme aromatique de type benzène perfonctionalisées de manière alternée par des groupements polaires et apolaires [111]. Ce noyau benzène adopte alors une conformation où chacun des substituants se place de façon à ce que les groupements vicinaux ne soient pas du même coté du noyau aromatique. Ainsi en venant greffer des groupements hydrophiles en positions 1, 3 et 5 et hydrophobes en position 2, 4 et 6, l'amphiphile présente une zone hydrophile au dessus du plan du cycle aromatique et une zone hydrophobe en dessous. Les tripodes mis au point possèdent 3 pattes hydrophobes de type akyle, avec des chaînes allant de 3 à 7 carbones, et trois têtes polaires, composées d'un glucose et d'un linker permettant son greffage au cycle aromatique par "click chemistry" (figure 1.10).

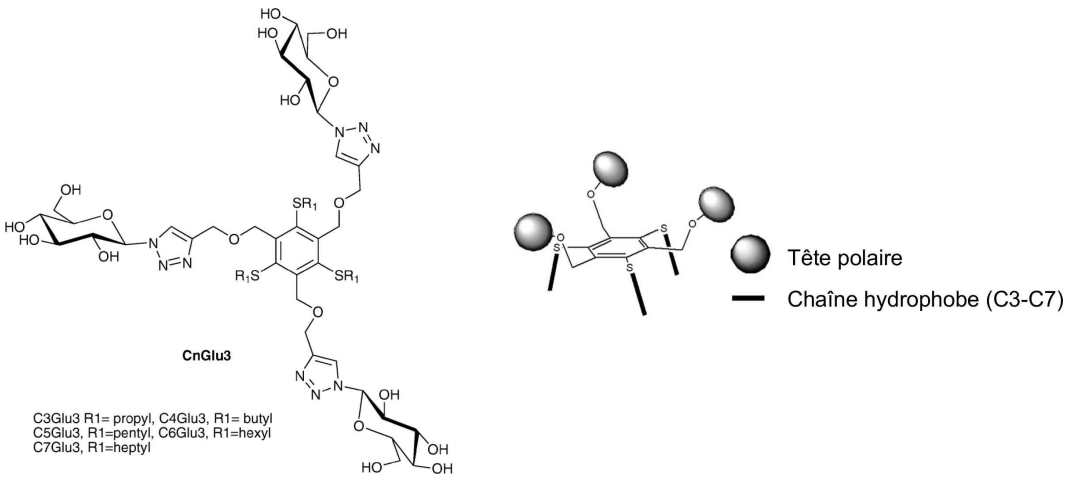


Figure 1.10 – Structure et configuration spatiale des tripodes amphiphiles faciaux [111].

2.3 Les dérivés du maltose-neopentyl glycol (MNG)

Le groupe de Gellman a aussi synthétisé quelques années plus tard des détergents de type maltose-neopentyl glycol [112]. Dérivés du neopentyl glycol (ou pentaerythritol), ils possèdent un carbone quaternaire central permettant de relier une tête hydrophile contenant deux groupements maltoside à deux chaînes hydrophobes (cf. figure 1.11). Ces composés ont montré une meilleure capacité à stabiliser et maintenir en solution plusieurs

protéines membranaires, comparativement à certains détergents classiques dont le DDM. D'autre part, la cristallisation du cytochrome b_6f a pu être réalisée en MNG-3, et la résolution obtenue est comparable à celle mesurée pour des cristaux qui ont poussés en DDM. Il a aussi été possible de réaliser la cristallisation en phase cubique de la protéine de fusion du récepteur adrénergique humain β_2-T4-lysozyme en MNG-3, qui n'avait pas pu être réalisée avec le DDM. Cependant bien que ces composés soient prometteurs pour la manipulation de protéines membranaires, aucune étude de leur comportement physico-chimique en solution n'a été publiée à ce jour.

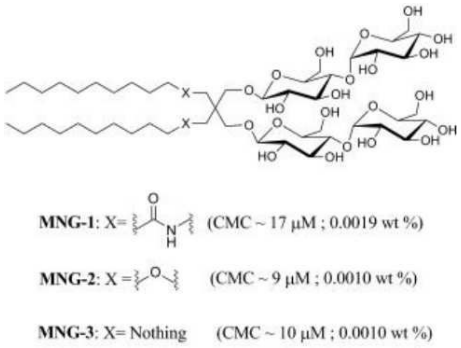


Figure 1.11 – Structures des amphiphiles maltose-neopentyl glycol [112]

2.4 Les maltosides à chaînes ramifiées

Un autre groupe s'est aussi orienté sur la production d'amphiphiles de type maltoside, par la synthèse de dérivés ramifiés du DDM [98]. Leur objectif était d'obtenir une hydrophobie comparable aux n-alkyl-maltosides mais avec des chaînes plus courtes (la chaîne linéaire principale varie de 9 à 13 carbones) pour étudier l'effet de la ramification (de 1 à 3 carbones) de ces chaînes. Ces composés donnent des CMC comparables aux tensioactifs maltoside à chaîne linéaires (cf. fig 1.2). Mais leurs micelles sont plus petites à nombre total de carbones équivalent. Les maltoside contenant 12 carbones au total (cf. figure 1.12) sont capables de solubiliser les membranes, et des tests effectués sur la connexine humaine 26, ont montré que ces deux composés permettaient de maintenir cette protéine membranaire en solution sous sa forme native. Les essais de cristallisation de cette protéine en présence de maltoside à 11 carbones linéaires et une ramification -CH_3 (Mal11-1), ou de maltoside à 10 carbones linéaires ramifié par un groupement éthylène (Mal10-2) ont abouti à la formation de cristaux d'une symétrie différente de celle obtenue en présence de DDM.

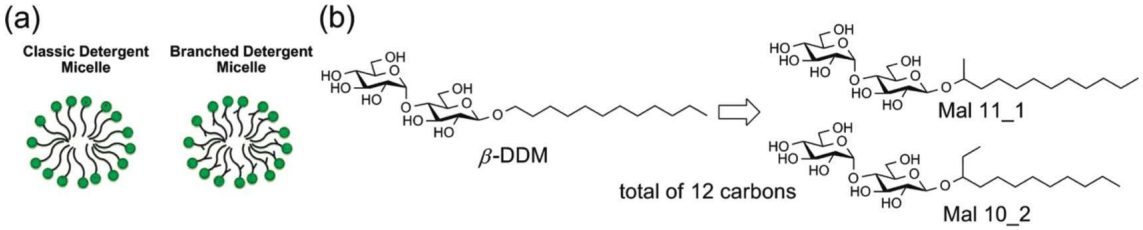


Figure 1.12 – schéma des micelles, et structures des maltosides ramifiés à 12 carbones, Mal11-1 et Mal10-2, en comparaison au DDM [98]

2.5 Les cymals

Commercialisés par affymétrix, la famille des Cymal est également dérivée du DDM, mais ces tensioactifs exposent un groupement cyclohexyl en fin de chaîne hydrophobe, qui augmente légèrement la rigidité de la chaîne. Le cyclohexyl-hexyl-β-D-maltoside a ainsi été utilisé avec succès pour la cristallisation de sous unités de la cytochrome c oxydase [113].

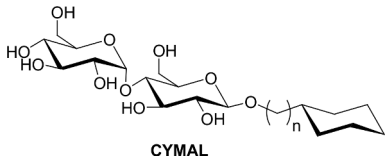


Figure 1.13 – Structures des cymals, vendus par affymétrix avec n variant de 1 à 7.

2.6 Le PCC-malt

Le groupe de Wolfram Welt a imaginé des tensioactifs dont la partie hydrophobe est encore moins flexible que celle des cymals, ce qui permet de générer peu de contacts dénaturants à l'interface protéine/tensioactif. En effet une chaîne hydrophobe rigide sera alors moins déstabilisante pour la protéine en comparaison à une chaîne alkyle qui peut adopter une large distribution de conformations pour former une micelle (figure 1.14). L'équipe CBSA a été sollicitée pour réaliser la synthèse de ces composés.

Plusieurs structures ont été imaginées et celle correspondant au PCC-malt (figure 1.15) apparait comme la plus prometteuse [114]. La tête polaire est constituée de maltose, connu pour ses effets non dénaturants et la partie hydrophobe de deux groupements cyclohexyl, pour gagner en rigidité. Un chaînon propyl terminal est ajouté pour améliorer l'affinité avec la surface hydrophobe de la protéine. La taille théorique d'un groupement trans bicyclohexyl est donnée à 7,46 Å, et une liaison C-C à 1,25 Å ce qui donne un longueur maximale de chaîne (conformation *trans*) de 11,2 Å pour le PCC-malt, équivalente à une chaine décyle aliphatique .

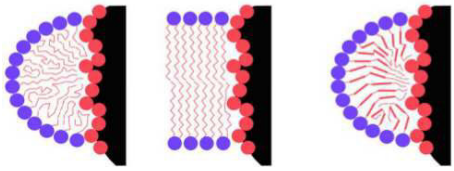


Figure 1.14 – Comparaison schématique des contacts formés à l'interface de la région transmembranaire d'une protéine [114]. A gauche : les chaînes alkyles du tensioactif sont peu ordonnées, il y a une forte interaction entre la protéine et le tensioactif. Au milieu : les chaînes alkyles des lipides de la membrane s'organise de façon parallèle. A droite : les parties rigides du PCC-malt impose un plus grand degré d'organisation que la chaîne alkyle mais moins de contact à l'interface.

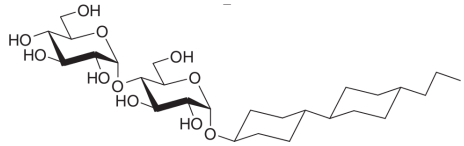


Figure 1.15 – Structure du PCC-malt [114].

2.7 Les tensioactifs fluorés

Depuis plus de 20 ans l'équipe "chimie bioorganique et systèmes amphiphiles" (CBSA) de l'université d'Avignon développe des tensioactifs fluorés et hémifluorés, non détergents, capables de solubiliser les protéines membranaires dans leur état natif [115]. La structure de ces tensioactifs est similaire à celles des détergents classiques, hormis la présence d'atomes de fluor dans leur queue hydrophobe en quantité plus ou moins importante. Les chaînes hydrocarbonées et fluorocarbonées étant faiblement miscibles entre elles [116], l'incorporation d'un segment fluoré à la chaîne hydrophobe d'un tensioactif lui apporte un caractère également lipophobe. Ces composés sont donc incapables d'extraire efficacement les protéines membranaires d'une membrane cellulaire. En revanche les tensioactifs fluorés sont moins dénaturants que les détergents hydrocarbonés envers les protéines membranaires pour deux raisons essentielles :

1. Les lipides, les sous-unités protéiques et les cofacteurs indispensables à la conservation de la structure native de la protéine ne sont pas ou peu séparés de celle-ci par les micelles de tensioactifs (hémi)fluorés.

2. Les chaînes fluorées étant plus volumineuses que leurs équivalentes hydrogénées, elles sont plus encombrantes et rigides, ce qui les rend moins intrusives vis à vis du domaine transmembranaire de la protéine membranaire, et limite la déstabilisation des interactions permettant la conservation de la structure quaternaire de la protéine.

Les premières molécules mises au point au laboratoire ont été la **série des F-TAC**, constitués d'une tête polaire oligomérique poly-alcoolique dérivée du Tris-(hydroxyméthyl)aminométhane (THAM) et d'une chaîne hydrophobe perfluorée [117] à 6 ou 8 carbone fluorés, donnant respectivement le F_6TAC et le F_8TAC (figure 1.16). Ils ont été initialement imaginés il y a 20 ans pour stabiliser les émulsions de bromure de perfluorooctane et de perfluorodecaline, composés possédant une très grande capacité de solubilisation de l'oxygène. L'objectif était alors d'obtenir des émulsions de perfluorocarbures stables pour le transport de l'oxygène dans le sang *in vivo* (substitut sanguin). Les premières expériences ont montré que le FTAC n'étaient pas cytotoxiques, et c'est en cherchant pourquoi, qu'il a été démontré que les FTAC n'étaient pas des détergents : ils ne sont pas capables d'extraire les protéines des membranes et ne désorganisent pas les membranes cellulaires. Dès lors ces tensioactifs fluorés semblaient potentiellement moins dénaturants que les détergents hydrocarbonés et les auteurs ont voulu savoir s'ils permettaient de résoudre les problèmes de dénaturation des protéines membranaires solubilisées en détergent. C'est ainsi qu'a débuté l'histoire des tensioactifs fluorés pour la manipulation des protéines membranaire avec les succès qu'on lui connait aujourd'hui [118]. Ils ont notamment été utilisés pour la purification de protéines [119] et comme molécules chaperonnes pour aider à la réinsertion de protéine dans les membranes de vésicules [120], ou à la production de protéine membranaire par un système d'expression *in vitro* [121].

Ces composés présentent toutefois le désavantage de ne pas pouvoir maintenir en solution sur de longues périodes les protéines membranaires en solution. Celles-ci précipitent en raison du manque d'affinité de la chaîne fluorée lipophobe avec le domaine transmembranaire de la protéine. Pour permettre une interaction plus favorables du tensioactif vis à vis de la protéine une famille de composés hémifluorés, **les HFTAC**, munis d'une extrémité éthyl hydrocarbonée a été développée avec succès [122]. Le groupement éthyle placé au bout de la chaîne hydrophobe (figure 1.16) permet alors d'accroître la stabilité du complexe HFTAC/protéine de manière significative pour arriver à des résultats comparables au DDM.

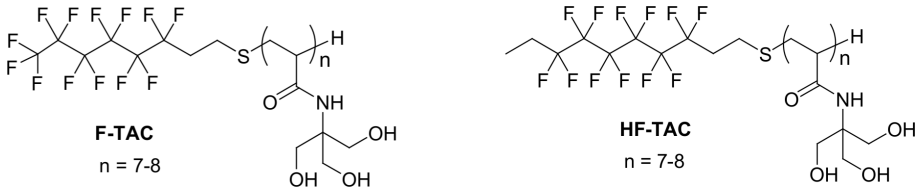


Figure 1.16 – Structure des FTAC et HFTAC

Cependant, la tête oligomérique des (H)F-TAC conduit inévitablement à une polydispersité structurale de ces tensioactifs. Si cela ne modifie pas leur CMC, les lots sont toutefois des mélanges d'oligomères et leur composition ainsi que leur masse peut varier d'une synthèse à l'autre. Pour pallier cet inconvénient, le laboratoire a remplacé cette tête polymérisée dérivée du THAM par des groupements polaires structurellement bien

définis tels que les oxydes d'amine [123], ou les groupements saccharidiques de type galactose [118], d'acide lactobionique (HF-Lac et FLac) [124] ou maltose (HF-Malt) [125]. Les tensioactifs fluorés ioniques plus simples à synthétiser se sont révélés incapables de stabiliser les protéines, et ont été abandonnés au profit de têtes de type sucre. Mais ceux-ci doivent être greffés à la chaîne hydrophobe par leur carbone anomère, ce qui génère deux stéréoisomères α et β lors de la réaction. Il est ainsi difficile d'obtenir des composés glycosylés parfaitement purs. Le HF-Lac fait cependant figure d'exception puisque c'est un pseudo disaccharide constitué d'un résidu galactose terminal, dont la lactone a été additionnée par attaque nucléophile sur une amine hémifluorée pour obtenir une liaison amide.

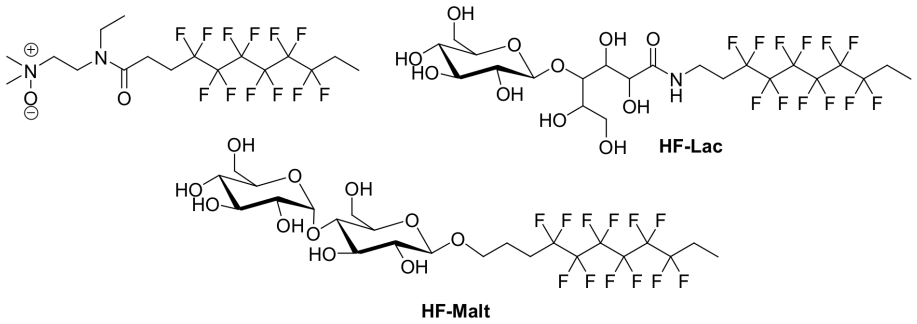


Figure 1.17 – Structure des tensioactifs hémifluorés à tête polaire sucre

Toutefois l'étude de ces composés (H)F-Lac et HF-Malt sur le cytochrome B6f et la Bactériorhodopsine a montré qu'ils permettaient bien de maintenir en solution cette protéine sans la dénaturer, mais qu'ils formaient des larges agrégats mal définis, dont la taille évolue avec la concentration. Les complexes tensioactif/protéine obtenus sont alors polydisperses, ce qui est peu satisfaisant pour travailler avec les protéines membranaires, où il est préférable d'utiliser des tensioactifs formant de petites micelles de tailles bien définies. Comme la forme des agrégats formés dépend de la géométrie du monomère [99], une autre famille d'amphiphiles fluorés, à tête glycosylée, a été développée pour qu'il soit possible de moduler le paramètre d'empilement, en jouant sur l'aire de la partie polaire. Ainsi les **les (H)F mono-, di- ou triGlu** possèdent un motif polyfonctionnel polaire de type tris(hydroxyméthyl)aminométhane qui permet de fixer à volonté, un, deux ou trois résidus glucose, pour varier le volume et l'hydrophilie de la partie polaire (figure 1.18). La chaîne hydrophobe a quant à elle été calquée sur celle des (H)F6-TAC. Le composé mono-substitué donne, comme les (H)F-Lac et HF-malt, des micelles polydisperses, alors que les dérivés di- et tri-substitués forment de petites micelles de tailles bien définies. La taille de la tête polaire influe aussi sur la capacité du tensioactif à maintenir l'intégrité de la protéine, et pour laquelle le composé di-substitué a montré une bien meilleure aptitude que le composé à plus grosse tête polaire [126]. Toutefois à ce jour aucune étude de cristallisation de protéines membranaires avec ces tensioactifs n'a encore été effectuée.

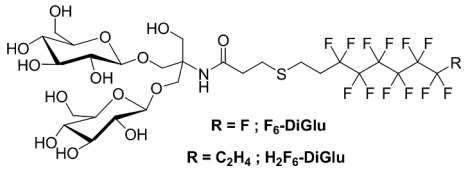


Figure 1.18 – Structure des tensioactifs fluorés, modulables en terme d'hydrophobie, à tête polaire de type glucose : Ces composés peuvent présenter un, deux ou trois résidus glucose dans leur partie polaire (ici deux), et être perfluoré (F_6-DiGlu), ou hémi-fluoré (H_2F_6-DiGlu).

3 Synthèse des tensioactifs

3.1 Choix des tensioactifs pour cette étude

Afin de mieux comprendre l'influence de la nature des tensioactifs sur les interactions entre tensioactifs et protéines membranaires, il est nécessaire d'étudier assez précisément leur comportement d'auto-association dans l'eau, ainsi que les interactions existantes entre leurs propres micelles en solution. Nous avons choisi de travailler tout d'abord sur le DDM (β), un des détergents les plus utilisés pour la cristallisation des protéines membranaires, et qui a permis l'obtention de cristaux de notre protéine modèle le complexe RC-LH1-pufX. Ensuite nous avons sélectionné des tensioactifs développés au laboratoire pour nous permettre de réaliser un petit criblage de tensioactifs et de leurs propriétés. Le cahier des charges à remplir pour ces composés étaient d'être disponibles au laboratoire ou faciles à synthétiser, et de présenter des caractéristiques structurales relativement variées afin d'avoir un éventail le plus large possible et une vue globale de comportement d'association dans l'eau de ces différentes familles de tensioactifs. Nous avons donc retenu :

1. **le F_8TAC** : à ce jour il n'y a dans la littérature aucune trace de l'existence de protéine cristallisée en FTAC, ce qui est d'autant plus surprenant que ces composés sont largement utilisés pour la manipulation des protéines membranaires depuis de nombreuses années. Nous essayerons donc de comprendre pourquoi.
2. **le PCC-malt** : sa tête polaire de type maltoside permettra une comparaison directe de ce composé avec le DDM, pour mieux appréhender l'influence de la chaîne hydrophobe. Le gain de rigidité apporté par les groupements bicyclohexyl et la conformation α de son carbone anomérique, devraient modifier les propriétés du PCC-malt par rapport au DDM.
3. **les tripodes amphiphiles faciaux** : ces composés très récemment synthétisés n'avaient fait l'objet d'aucune étude physico-chimique approfondie et n'avaient pas encore été testés sur des protéines membranaires au début de cette thèse. Les étudier permettait de déterminer l'intérêt de leurs géométries particulières. La synthèse de ces composés ne fait toutefois pas partie du cadre de cette thèse, elle est exposée

dans la thèse de Julien Dauvergne [111], et est résumée dans l'article [127] donné en annexe de ce manuscrit.

Par ailleurs, nous avons développé lors de cette thèse, une nouvelle famille de fluorosurfactants, **les FH-malt**, dérivée du DDM, mais avec une chaîne hydrophobe comprenant un court segment fluoré. Ces composés s'inscrivent logiquement dans l'évolution du design des tensioactifs proposés par l'équipe CBSA. Et ils apportent pour notre étude, un équivalent fluoré au DDM avec le même carbone anomérique β, avec la qualité d'être potentiellement moins déstabilisant vis à vis des protéines membranaires (dû au gain de lipophobie, de rigidité et de volume de la chaîne hydrophobe). L'expérience accumulée au laboratoire CBSA, a montré que la présence d'un chaînon éthyl hydrogéné terminal permettait d'accroître les interactions entre la protéine et les tensioactifs fluorés (HF-TAC et HF-DiGlu), pour obtenir une meilleure stabilité des complexes dans le temps. Or la synthèse de ces composés est relativement ardue, et l'on peut se demander si l'utilisation de composés faiblement fluorés ne permettra pas de compenser ce manque d'interaction en diminuant la caractère lipophobe de ces chaînes, souvent composées jusqu'ici de six ou huit carbones fluorés. Une question résiduelle est de savoir si ces composés seront suffisamment fluorés pour conserver les avantages des tensioactifs fluorés. L'objectif est d'avoir des composés faciles à synthétiser, avec des propriétés d'association voisines de celles du DDM dans l'eau. Pour cela nous avons cherché à préserver la balance hydrophile-lipophile du DDM en modulant la longueur des segments hydrocarbonés et fluorés pour obtenir des contributions hydrophobes globales identiques à celle du DDM. Dans la littérature [116] il est décrit qu'en terme d'hydrophobie, un groupement -CF_2 est équivalent à 1,5-1,7 groupement -CH_2. Pour obtenir des composés dont la contribution hydrophobe est équivalente aux 12 carbones du DDM, il faudra compenser l'hydrophobie plus forte des carbones fluorés en raccourcissant le segment hydrogéné. Pour un segment fluoré de 4 carbones il faut ainsi additionner un segment hydrocarboné de 5 carbones (F_4H_5-malt : $4 \times 1{,}6 + 5 \approx 11{,}4$ carbones hydrogénés), et pour un segment fluoré de 2 carbones il faut additionner un segment hydrocarboné de 9 carbones. (F_2H_9-malt : $2 \times 1{,}6 + 9 \approx 12{,}2$ carbones hydrogénés).

Enfin pour permettre un point de comparaison supplémentaire à ces nouveaux tensioactifs que sont les FH-malt, l'octylmaltoside fluoré a été ajouté à l'étude. Ce produit commercialisé par affymétrix, est lui aussi dérivé du DDM et possède une chaîne hydrophobe avec 6 carbones fluorés et 2 carbones hydrogénés, ce qui équivaut à une chaîne hydrocarbonée de $\approx$ 11,6 carbones. Par analogie aux FH-malt synthétisés, ce composé sera appelé F_6H_2-malt dans ce manuscrit.

3.2 Synthèse des F-TAC

La synthèse du F8TAC **8** est réalisée par une réaction de télomérisation radicalaire entre un thiol fluoré **6** et le Tris(hydroxymethyl)acrylamidomethane (THAM) **7** selon

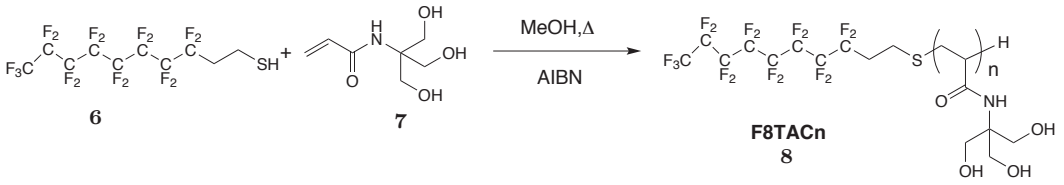


Figure 1.19 – Synthèse du F8TAC. Le degré de polymérisation est donné par la valeur de n.

l'équation présentée dans la figure 1.19. La télomérisation radicalaire suit les mêmes règles que la polymérisation radicalaire classique (autocondensation d'une molécule polymérisable, le monomère, en présence d'un amorceur pour obtenir une macromolécule constituée de n motifs identiques), à ceci près que la croissance des chaînes est arrêtée par une réaction de transfert à une molécule télogène également appelée "agent de transfert de chaîne", comme schématisé sur la figure 1.20. Le degré de polymérisation moyen des macromolécules (DPn) obtenues dépend de la constante de transfert du monomère à l'agent télogène. Dans le cas des thiols, cette constante est voisine de 1 ce qui conduit à la formation de macromolécules dont le DPn est proche du second facteur important, le rapport des concentrations initiales [monomère]/[agent télogène]. Ce dernier facteur est noté R_0.

Cette technique permet ainsi de contrôler le nombre de motifs moyens présents sur la partie polaire du tensioactif et donc de contrebalancer très facilement l'hydrophobie de la partie aliphatique du tensioactif. Dans le cas des tensioactifs fluorocarbonés cette hydrophobie est plus exacerbée que pour les tensioactifs hydrocarbonés. Il est donc important de générer facilement une hydrophilie de la tête polaire suffisante, pour apporter : (i) une parfaite solubilité dans l'eau de ces composés et (ii) un paramètre critique d'empilement favorable à la formation de micelles sphériques dont le nombre d'agrégation est constant.

Les réactions de télomérisation ont été effectuées en conditions radicalaires en présence de l'α,α-azo-bis(isobutyronitrile) (ou AIBN), comme agent initiateur de radicaux libres. Les conditions de réaction ont été soigneusement contrôlées, afin d'éviter la présence potentielle d'agents inhibiteurs de radicaux libres. Les solvants ont donc été re-distillés et soumis à un dégazage permanent par barbotage d'argon. De même, les additions des agents télogènes et de l'initiateur radicalaire ont été effectuées dès le début du reflux par injection de solutions à travers un septum étanche. Le polymère est précipité par addition dans l'éther du sirop réactionnel dilué dans un minimum de méthanol afin d'éliminer le thiol qui n'a pas réagi ainsi que les fractions les plus légères de télomérisation. Elle permet aussi de resserrer la distribution de la taille des polymères, en supprimant les télomères de petit DPn, ainsi que le produit de monoaddition. Le DPn moyen est alors déterminé par RMN ^{1}H en comparant l'intégration du signal correspondant aux 3 protons des groupements alcool du motif THAM (entre 4,6 et 5,4 ppm) et les 2 protons du méthylène situé en alpha de la chaîne perfluorée. Il a été mesuré à 6 pour le lot de F_8TAC synthétisés.

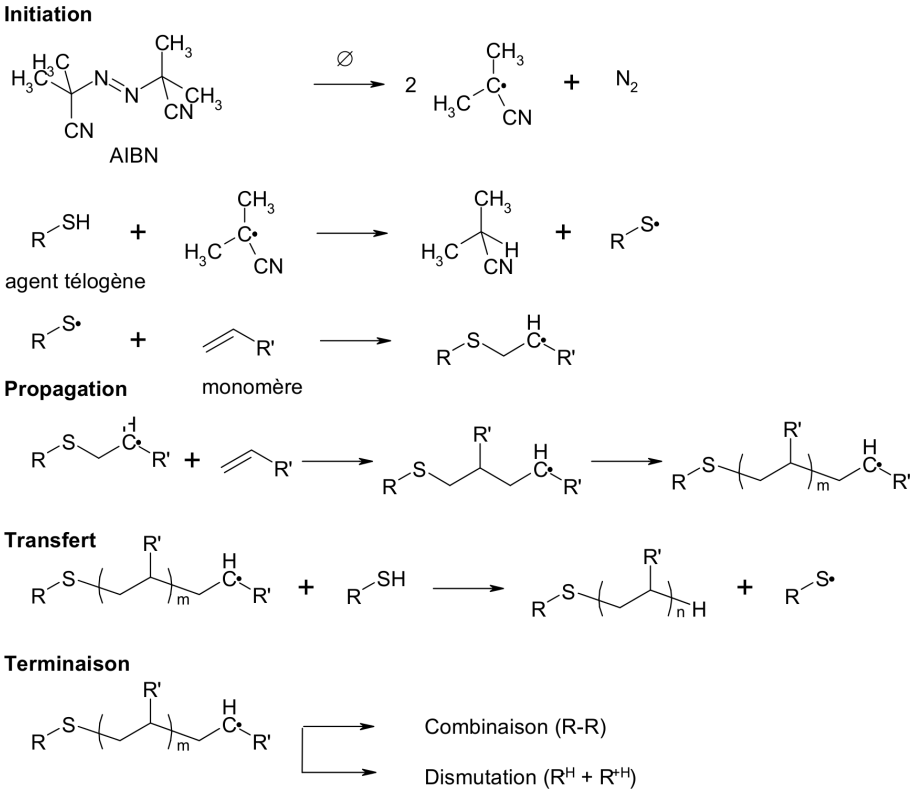


Figure 1.20 – Mécanisme de la télomérisation radicalaire.

3.3 Synthèse du PCC-α-malt

La synthèse du PCC-malt est réalisée en trois étapes à partir du maltose et du trans-4-(trans-4'-propyl)bicyclohexanol. (a) Le maltose **9** est acétylé par un mélange anhydride acétique pyridine à froid pour conduire au maltose peracétylé **10**. Le produit est obtenu pur avec un rendement de 70% après recristallisation dans l'acétate d'éthyle après 3h de réaction. (b) Le maltose peracétylé **10** est ensuite mis en réaction sous atmosphère d'argon en présence de trans-4-(trans-4'-propyl)bicyclohexanol **11** en présence de BF_3-Et_2O (acide de Lewis) jusqu'à la consommation complète de l'alcool. Dans un premier temps, un mélange de composés stéréoisomères α et β est obtenu par cette réaction de O-glycosylation visualisée en CCM, mais l'équilibre se déplace peu à peu pour former majoritairement le composé α au bout de 8 jours, qui est le produit le plus stable. La formation de ce composé est donc soumise à un équilibre malgré l'assistance du groupement avoisinant qui se produit habituellement avec le glucose acétylé et qui conduit à la production très majoritaire du produit β (figure 1.21). La formation du produit α majoritaire est mise en évidence par l'apparition d'un doublet caractéristique du proton anomérique situé en position équatoriale à 5,417-5,401 ppm doté d'une faible constante de couplage de 4 Hz (couplage H1-H2 équatorial axial).

Le mélange est purifié sur colonne de silice et le composé **12** (PCC-α-Malt acétylé) est

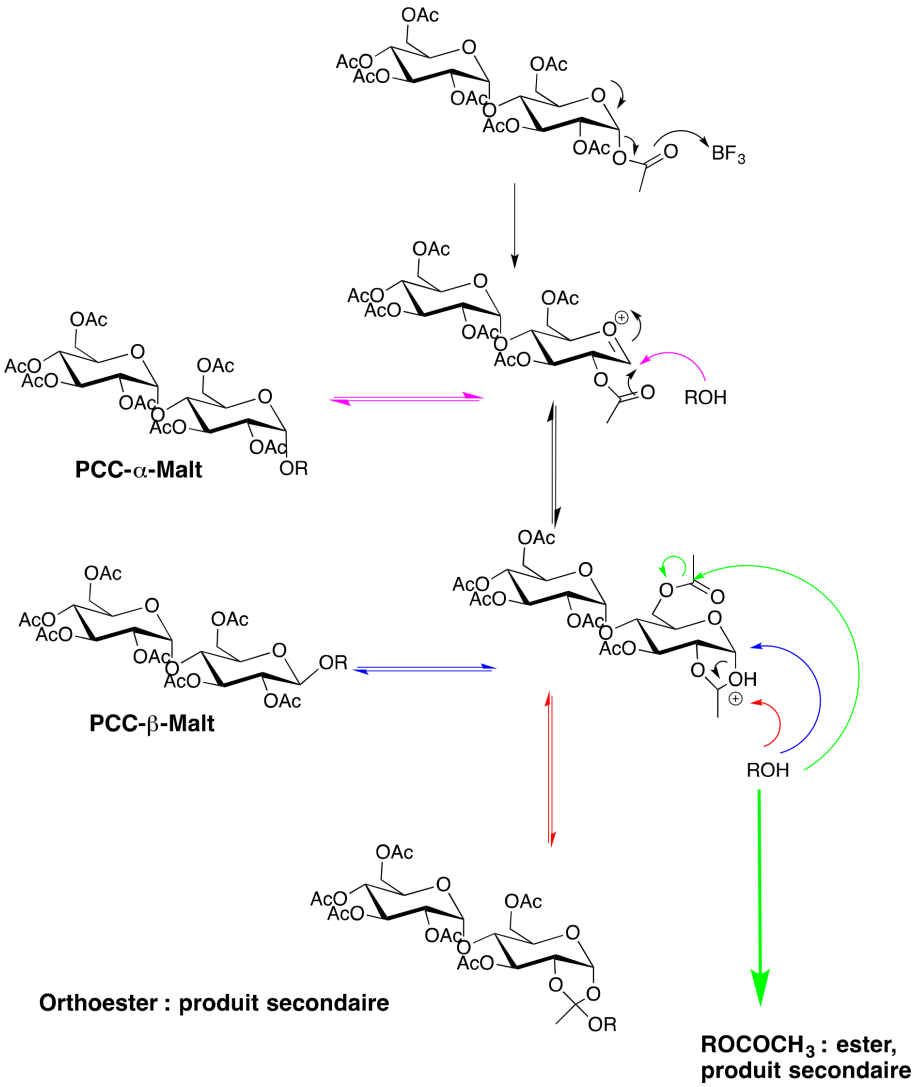


Figure 1.21 – Les produits et sous-produits de la synthèse du PCC-malt.

ensuite obtenu pur par recristallisation dans l'éthanol à chaud avec un rendement de 40%. Le rendement est ici limité par deux réactions parasites qui se produisent lors de la réaction par des glycosydes peracétylés. La transesterification des groupements ester présents sur les deux sucres par l'alcool qui conduit à la formation de l'alcool acétylé et d'autre part la formation de l'orthoester par réaction de l'alcool sur le carbocation généré par réaction de l'acétyl en 2 sur le carbone anomérique du maltose (figure 1.21). Ce problème aurait certainement pu être considérablement limité par l'utilisation d'une protection des sucres plus encombrante de type benzoyle, que nous n'avons malheureusement pas eu le temps de tester. Dans l'étape (c), le produit acétylé **12** est ensuite déprotégé par traitement au méthylate de sodium en quantité catalytique dans le méthanol à température ambiante pour obtenir le PCC-α-malt **13** avec un rendement global de 30%.

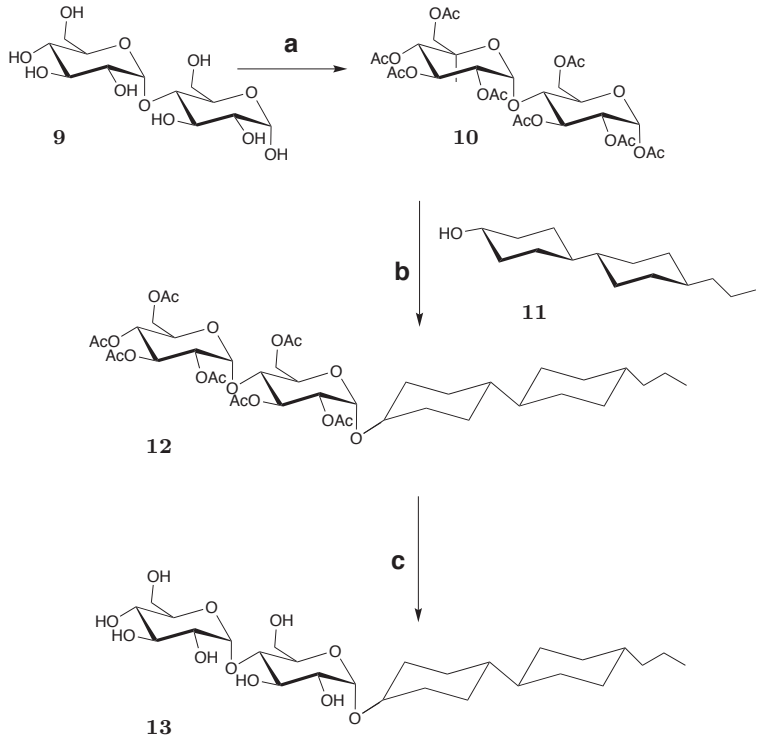


Figure 1.22 – **Synthèse du PCC-malt**. a)AcOAc, Pyridine, 4h, 0°C, 70% ; b) CH_2Cl_2 dist., Ar, BF_3-Et_2O, 8 jours, 40% ; c) 1- CH_3ONa, MeOH dist, 3h, 2- IRC-50, 1h, 90%.

3.4 Synthèse des faiblement fluorés

3.4.1 Synthèse du F_4H_5-malt

La synthèse de ces composés faiblement fluorés ne comportait en théorie aucune difficulté technique. Le plan de synthèse choisi à l'origine consistait à synthétiser dans un premier temps le bras hydrophobe du tensioactif, par réaction d'addition radicalaire d'un iodure de perfluoroalkyle sur un alcool vinylique. L'alcool hémifluoré ainsi obtenu doit alors être greffé au maltose peracétylé selon la même méthode de glycosylation employée pour synthétiser le PCC-α-malt. Cette méthode de synthèse a été mise en œuvre avec succès pour obtenir le F_4H_5-malt.

Pour la réaction d'addition d'iodures fluorés sur les vinyls, nous avons choisi d'utiliser un amorçage radicalaire par les métaux en utilisant le zinc [128] qui présente l'avantage d'être réalisé à température ambiante et de pouvoir effectuer l'addition et la réduction de l'iodure dans un même temps. L'alcool intermédiaire déshalogéné peut ensuite être obtenu par une réaction "one pote" de réduction par le zinc en milieu acide.

a-Synthèse du bras hydrophobe

L'alcool hémifluoré **16** est obtenu par addition radicalaire d'un iodure fluoré **15** (l'iodure de perfluorobutyle) sur la fonction vinyle du 4-penten-1-ol **14** par un catalyseur métallique, le zinc, dans le dichlorométhane (figure 1.24). On observe lors de la réaction

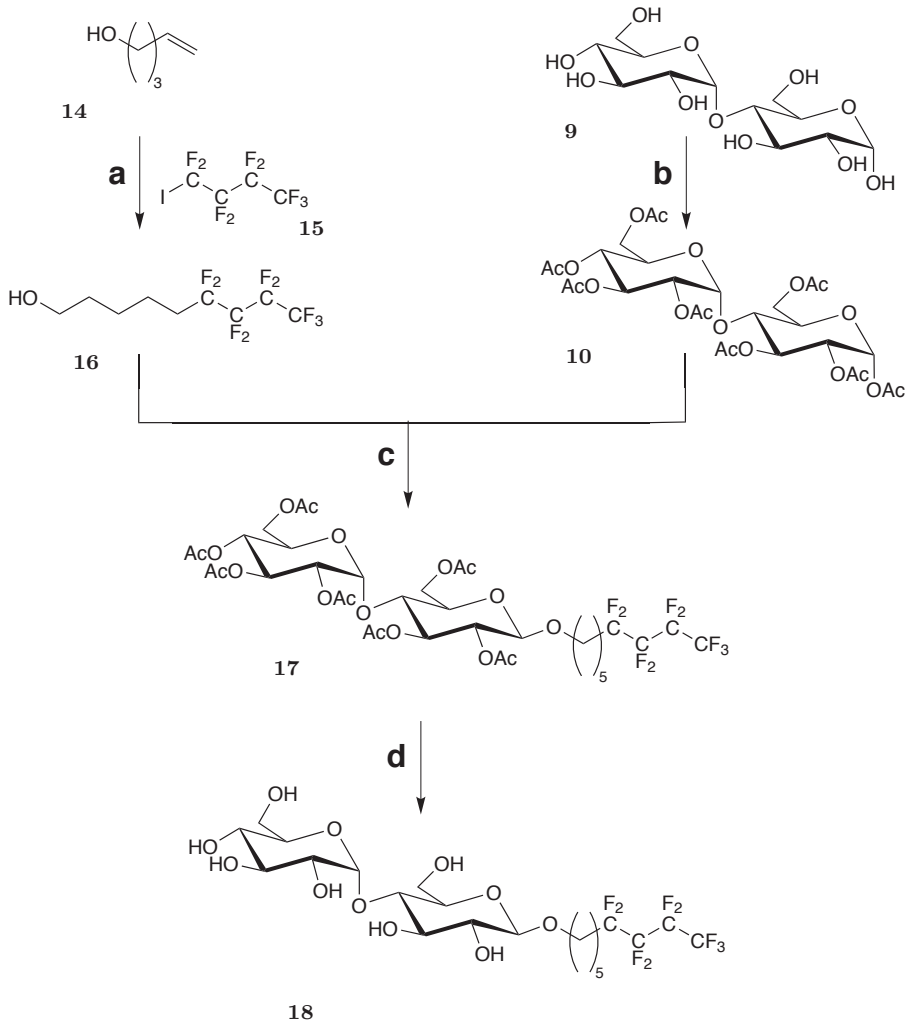


Figure 1.23 – **Synthèse du F_4H_5-malt** a) 1- Zn, CH_2Cl_2 dist., 2-CH_3COOH, HCl, 70% ; b) AcOAc, pyridine, 0°C, 3h, 50 % ; c) 1- CH_2Cl_2 dist., Ar, BF_3-Et_2O 2- AcOAC, 32 % ; d) 1- CH_3ONa, MeOH dist, 3h, 2- IRC-50, 1h, 90%.

une augmentation de la température. L'avancement de la réaction est difficile à suivre, car les ratio fronts du produit d'addition et du vinyl de départ sont identiques. Même si leur absorption dans l'UV à 254 nm diffère, on ne peut pas suivre la disparition de la fonction vinyle en CCM, pour déterminer la fin de la réaction d'addition. Le suivi a donc été réalisé par RMN, en prélevant une aliquote de brut qui est filtré, évaporé et étudié en RMN ^{1}H, afin d'observer la disparition du multiplet du proton vinylique à 5,8 ppm.

Une fois l'alcool vinylique consommé, la réaction d'addition radicalaire est suivie de la réduction "one pot" de l'iodure obtenu par un mélange d'HCl 1N et d'acide acétique. Lors de cette réaction le zinc est complètement dissout sous forme de sels (figure 1.25). La réaction peut ici être suivie par CCM par la disparition de la tache en UV correspondant à l'iodure. Le produit **16** est purifié par chromatographie flash et obtenu sous la forme

d'une huile avec un rendement global de 70%.

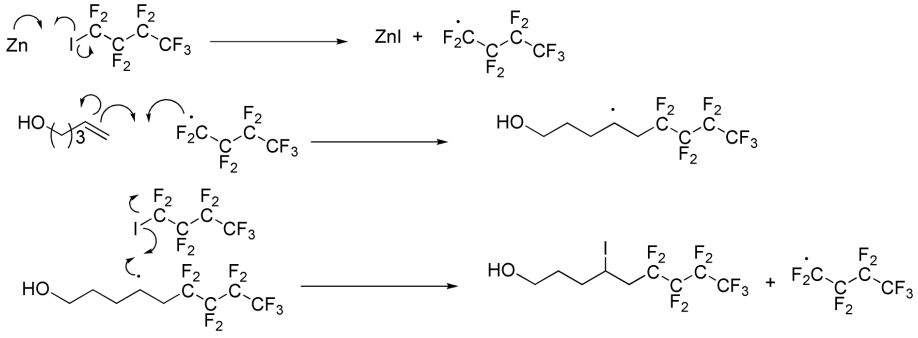


Figure 1.24 – Mécanisme d'addition radicalaire catalysée par le zinc.

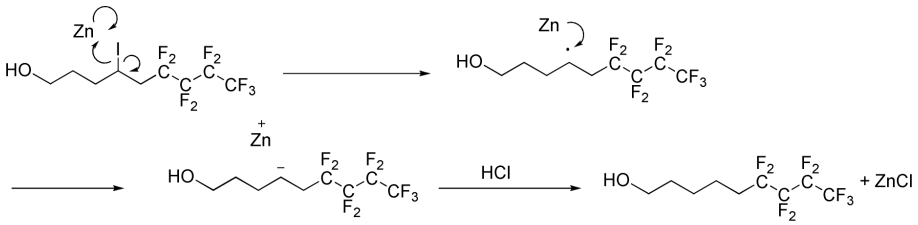


Figure 1.25 – Mécanisme de réduction de l'iodure.

b-Acétylation du maltose Le maltose est peracétylé (**10**) en présence d'anhydride acétique et de pyridine à 0°C pendant 3 heures. Un mélange de composé α et β est obtenu dans des proportions à peu près équivalentes. L'obtention du β-maltoside **10** se fait par recristallisations successives dans l'éthanol pour un rendement global de 50%.

c-Glycosylation L'alcool hémifluoré **16** est ensuite additionné sur le maltose peracétylé **10** en présence de trifluoroborane étherate (BF_3-Et_2O) à température ambiante, sous atmosphère d'argon et à l'abri de la lumière. Comme observé lors de la synthèse du PCC-malt des réactions secondaires de transesterifiaction sont observées, ce qui consomme l'alcool hémifluoré et diminue drastiquement les rendements de réaction. Un traitement "one pot" à l'anhydride acétique en fin de réaction permet de ré-acétyler le mélange et de limiter la formation de composés de desacétylation. Le produit **17** est obtenu pur après chromatographie flash avec un rendement de 32%. La formation très majoritaire de l'anomère β est démontrée en RMN ^{1}H (figure 1.26) par l'apparition d'un doublet caractéristique à 4,485-4,454 ppm possédant une constante de couplage de 7,75 Hz correspondant au proton H_1 du maltose (couplage H_1-H_2 axial-axial).

d-Déprotection Le composé acétylé **17** est alors déprotégé en présence de méthylate de sodium dans un excès de méthanol pour donner le composé final **18** qui est purifié par chromatographie flash (dichloromethane/méthanol : 8/2) avec un rendement de 90%.

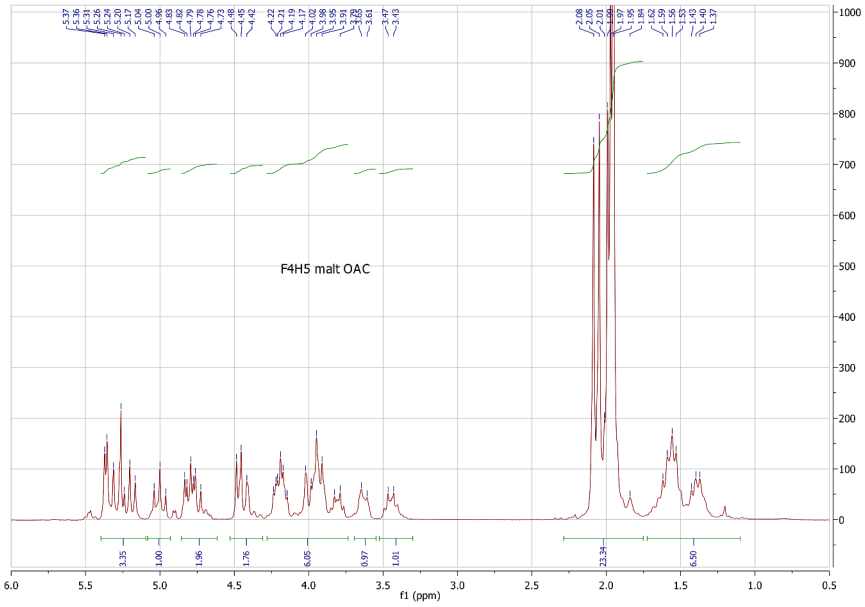


Figure 1.26 – Spectre ^{1}H-RMN du composé 17. Le proton H_1 est axial, (δ=4,585-4,454 ppm, J(H_1-H_2)=7,75 Hz), le composé **17** est β. L'interprétation complète du spectre est donné dans la partie expérimentale.

3.4.2 Synthèse du F_2H_9-malt

Dans un premier temps nous avons tenté de synthétiser le F_2H_9-malt selon la même voie de synthèse que celle utilisée pour le F_4H_5-malt. A partir de l'iodure de perfluoroethyle et du 8-nonen-1-ol. Toutefois l'iodure de perfluoroethyle étant gazeux à température ambiante, la synthèse de l'alcool fluoré F_2H_9OH (bras hydrophobe) a dû être réalisée dans un tube hermétique. L'alcool hémifluoré est obtenu après purification sur colonne avec un rendement de 26%. Le maltose peracétylé est mis en réaction avec cet alcool hémifluoré en présence de BF_3-Et_2O. Malheureusement la réaction est totalement inopérante. L'alcool ne réagit pas, malgré la réalisation de plusieurs essais avec des lots différents de maltose peracétylés et d'alcool hémifluoré.

Pour augmenter la réactivité du maltose lors de la réaction de glycosylation et obtenir le composé d'addition du bras hydrophobe sur la tête maltoside, nous avons voulu utiliser une autre voie de synthèse, la méthode au thioglycoside, malheureusement sans succès. Dans cette méthodologie de glycosylation, il est possible de glycosyler le maltose thioéthéré **19** en présence de N-iodosuccinimide (NIS) **20** et du trifluorométhanesulfonate d'argent [98,129] (figure 1.27). La première étape d'obtention du maltose peracétylé thioéthéré s'est révélée compliquée, mais a pu être réalisée. La première stratégie consistant à faire réagir directement du maltose perbenzoylé, avec un thioéther en présence de trifluoroborane éthérate à température ambiante [130] n'a pas abouti. Par analogie aux réactions de glycosylation décrites par Deng [131], nous avons utilisé des ultrasons pour tenter d'initier

cette réaction mais sans succès. Le thioéther a finalement été synthétisé à partir du bromomaltose perbenzoyl, en utilisant un composé disulfide clivé par un mélange de zinc et de chlorure de zinc [132] mais avec un rendement relativement faible. En revanche l'étape finale de couplage du thioéther avec l'alcool fluoré en présence de NIS pour obtenir le composé **21** n'a pas fonctionné.

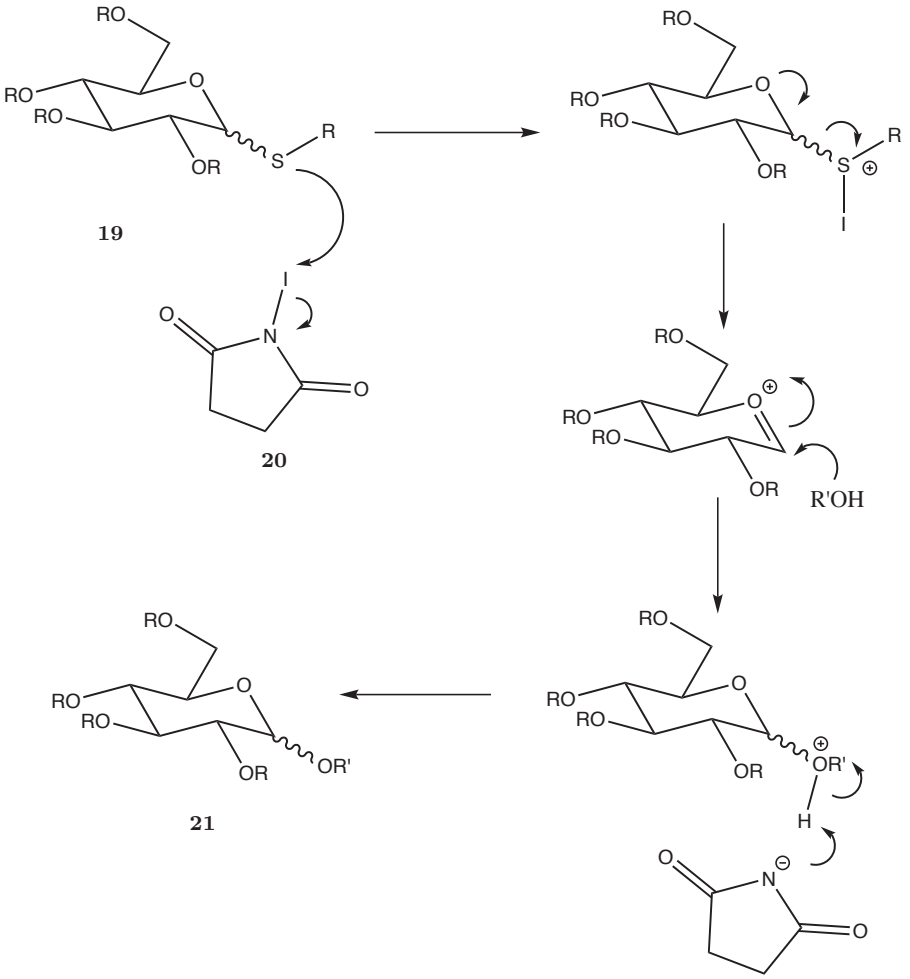


Figure 1.27 – Mécanisme de glycosylation en présence de NIS

Ces échecs multiples et les faibles rendements obtenus montrent la complexité de la synthèse de ces composés FH-malt dont la structure parait pourtant relativement simple. La présence du segment fluoroéthyl semble considérablement perturber la réactivité de l'alcool hémifluoré quelque soit la méthodologie de glycosylation employée. Ce problème nous oblige à mettre en place une méthodologie de substitution qui implique obligatoirement d'introduire ce segment perfluoré après avoir introduit le maltose sur la chaîne en C9. Nous avons donc changé de stratégie de synthèse en décidant d'introduire le chaînon fluoré sur la fonction vinyl après réaction du nonénol sur le maltose. Cette méthode présente l'avantage d'être potentiellement moins coûteuse en iodure de perfluoroéthyle

car l'introduction du chaînon perfluoré intervient plus en aval de la synthèse. Cependant cette méthodologie nous impose d'utiliser une autre méthode de réduction de l'iodure qui évite notamment un milieu acide aqueux susceptible d'hydrolyser la liaison glycosidique. Nous avons également décidé d'initier l'addition radicalaire de l'iodure perfluoré sur la fonction vinyl par une autre méthodologie que celle employée jusqu'à présent en utilisant le triéthylborane. La première étape consiste donc à faire réagir le 8-nonen-1-ol sur le maltose peracétylé en présence de BF_3-Et_2O. Puis dans un deuxième temps le segment fluoré est additionné pour former le bras hémifluoré selon le schéma décrit figure 1.28.

a-Acétylation du maltose. Réaction identique à celle décrite au § 3.4.1.

b-Glycosylation du maltose peracétylé. Le maltose peracétylé **10** est traité par le 8-nonen-1-ol **22** en présence de BF_3-Et_2O pendant 48 heures à température ambiante à l'abri de la lumière. Comme lors de l'étape de glycosylation du F_4H_5-malt, la réaction produit beaucoup d'espèces secondaires issus de la transestérification parasite des groupements acétyl du maltose, engendrant la consommation de l'alcool par acétylation, et la déprotection aléatoire du maltose. Pour limiter le phénomène et augmenter le rendement de la réaction, l'étape de glycosylation est suivie d'une acétylation en présence d'anhydride acétique. Le composé glycosylé protégé **23** est obtenu avec un rendement de 35%. La présence d'un doublet à 4,521-4,501 ppm possédant une constante de couplage de 8 Hz en ^{1}H RMN indique que l'anomère β est très majoritairement formé lors de la réaction (figure 1.29).

c-Insertion du segment fluoré. Le produit formé **23** est alors mis en réaction avec l'iodure de pentafluoroéthyle **24** dans du THF en présence de triéthyle borane (BEt_3), utilisé comme initiateur de la réaction radicalaire, pendant 48 heures, à température ambiante et à l'abri de la lumière pour obtenir le composé **25**. Cette méthode rarement utilisée pour initier l'addition d'halogénure de perfluorohexyle sur des vinyl aliphatiques [133] présente cependant l'avantage de pouvoir être initiée à froid et d'autre part de nécessiter la présence d'oxygène pour générer les radicaux éthyl initiateurs de la réaction. L'oxygène est habituellement un inhibiteur des réactions radicalaires et doit être éliminé par bullage d'argon ou mieux encore par des cycles de congélation aspiration décongélation qui peuvent être longs et fastidieux et dont on peut bien entendu se passer dans le cas présent même si l'utilisation de solvants distillés et dégazés est indispensable à la réussite de cette réaction. Il est à noter que les autres méthodes d'addition radicalaire par le zinc ou l'AIBN dans l'acétonitrile à ébullition ont échoué ou ne se sont pas montrées aussi efficaces que celle-ci. Il est nécessaire ici de souligner que l'addition de la chaîne fluorée doit être quantitative car l'oléfine de départ et le produit d'addition présente le même ratio front en CCM et sont impossibles à séparer par chromatographie. La réaction doit donc être quantitative et ne peut être suivie que par RMN ^{1}H, avec la disparition du signal du vinyl **23** à 5,5 ppm et l'apparition du signal du -CHI à 2,75 ppm du composé **25**. La réaction est en fait complète après 48h00 d'agitation. Après purification sur colonne de silice le composé est obtenu avec un rendement très satisfaisant de 93%.

d-Élimination de l'iode. La difficulté a ensuite été de trouver une méthode de réduc-

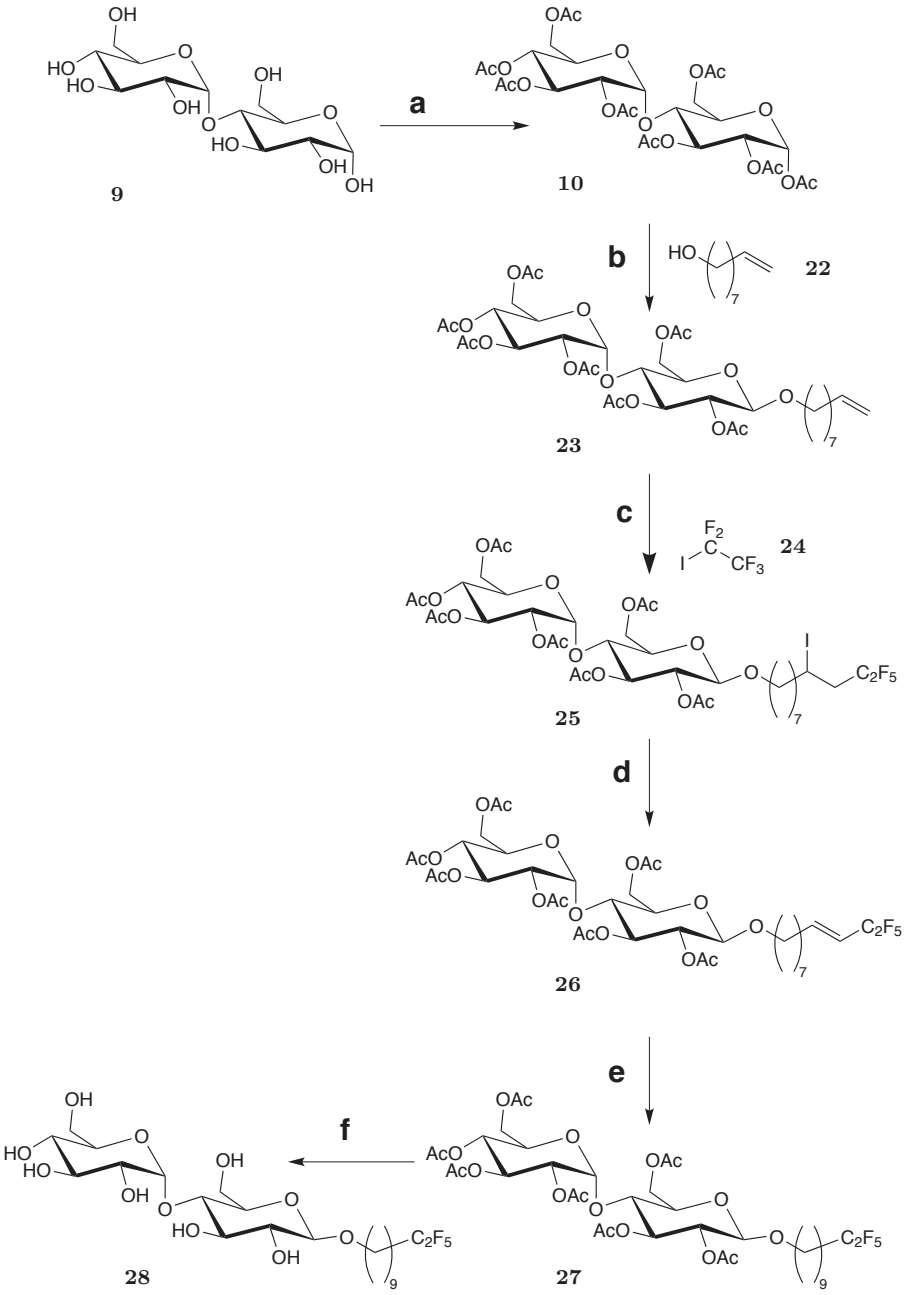


Figure 1.28 – **Synthèse du F_2H_9-malt** a) AcOAc, pyridine, 0°C, 3h, 50 % ; b) 1- CH_2Cl_2 dist., Ar, BEt_3 2- AcOAC, 35 % ; c) THF dist., $BF_3{-}Et_2O$, 48h, 93% ; d) DBU, THF dist., 70°C, 24h, quantitatif ; e) MeOH dist., Pd/C, 7 mbar, 48h, quantitatif ; f) 1- CH_3ONa, MeOH dist, 3h, 2- IRC-50, 3h, 78%

tion de l'iodure qui assez soit quantitative car le dérivé iodé **25** et le produit de réduction **26** présentent les mêmes ratio front dans tous les mélanges de solvant testés, rendant leur séparation par chromatographie sur colonne de silice impossible. La réduction par les métaux ($Zn/HCl/CH_3COOH$) ou par un mélange $Bu_3SnH/AIBN$ n'a pas permis l'élimination

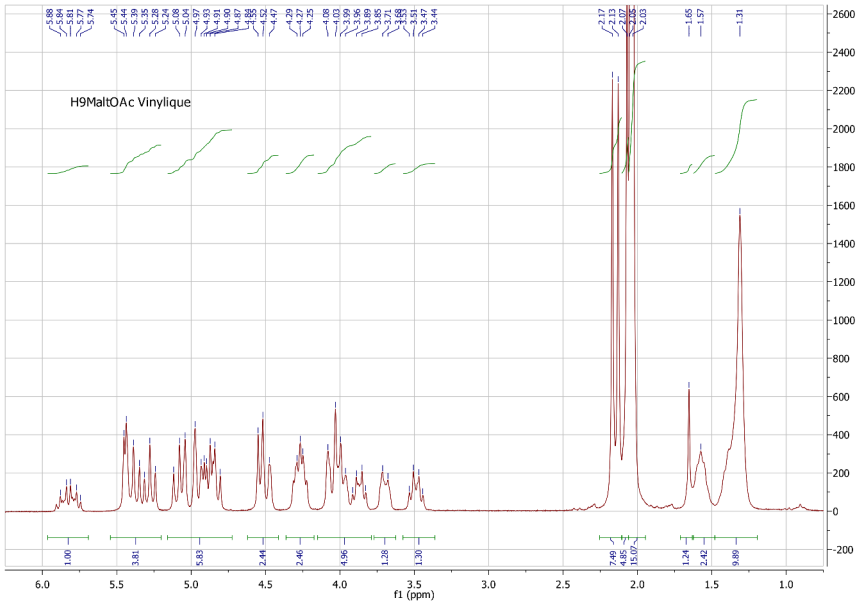


Figure 1.29 – **Spectre ^{1}H-RMN du composé 23.** Le proton H_1 est axial, (δ=4,521-4,501 ppm, J(H_1-H_2)=8 Hz sur RMN 400 MHz), le composé **23** est β. Le signal à 5,5 ppm est caractéristique de la fonction vinyle. L'interprétation complète du spectre est donné dans la partie expérimentale.

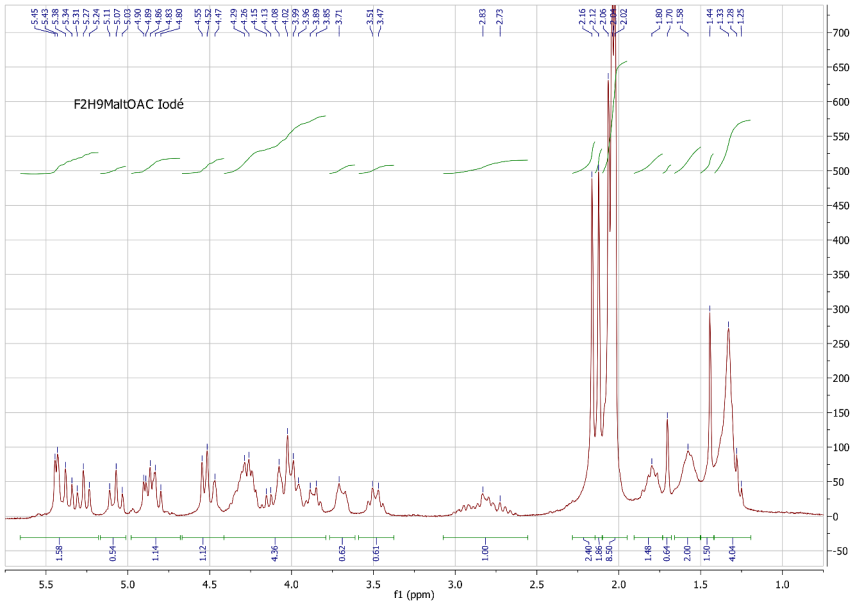


Figure 1.30 – **Spectre ^{1}H-RMN du composé 25.** Le signal à 2,75 ppm est caractéristique du proton de -CHI. L'interprétation complète du spectre est donné dans la partie expérimentale.

complète, car le signal du -CHI est toujours visible en RMN ^{1}H. Nous avons donc décidé de réaliser une séquence d'élimination et réduction en deux étapes. Les dérivés perfluorés iodés en position β présentent la particularité d'être en effet très sensibles aux réactions d'élimination car les protons situés en α de la chaîne perfluorée, très électro-attractrice, présentent un caractère acide prononcé et sont donc faciles à arracher en milieu basique. Il a été particulièrement délicat de trouver les conditions basiques de cette réaction d'élimination car les composés perfluorés sont particulièrement sensibles aux conditions basiques trop dures. Ainsi en présence de soude ou d'alcoolate ils se décomposent rapidement et le milieu réactionnel devient noir probablement à cause de l'élimination d'acide fluorhydrique. En revanche les amines telles que la triéthylamine ne sont pas capables d'assurer l'élimination de HI même à chaud. Nous avons pu trouver une amine suffisamment basique pour assurer l'élimination de l'iodure : la 1,8-Diazabicycloundec-7-ene (DBU) dont le pKa est égal à 12. Le composé iodé a donc été traité avec la DBU dans du THF à 70 °C pendant 4 heures. En RMN ^{1}H le signal à 2,75 ppm du -CHI du composé **25** disparaît totalement et deux multiplets apparaissent à 6,4 et 5,5 ppm correspondant à la formation de la double liaison du produit d'élimination **26** (figure 1.31).

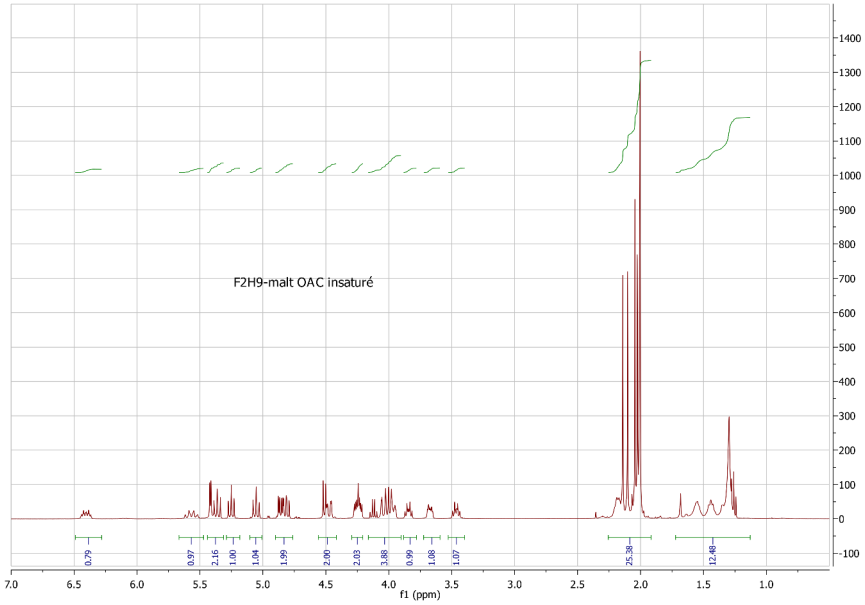


Figure 1.31 – Spectre ^{1}H-RMN du composé 26. Les multiplets à 6,4 et 5,5 ppm sont caractéristique de la double liaison de la chaîne. L'interprétation complète du spectre est donné dans la partie expérimentale.

e-Réduction de l'oléfine. La réduction de la double liaison carbone-carbone du composé **26** est ensuite effectuée par hydrogénation catalytique sur palladium sur charbon, dans du méthanol à 7 bar pendant 48h à température ambiante. Le suivi par RMN ^{1}H montre la disparition totale des multiplets à 6,4 et 5,5 ppm, preuve de la réduction quan-

titative de l'oléfine **26** et l'obtention du F_2H_9-malt sous sa forme acétylée **27**. Le composé a été purifié par flash chromatographie et recristallisé dans le méthanol à chaud. Cette dernière méthode permettant d'obtenir un produit pratiquement exempt de stéréoisomère α.

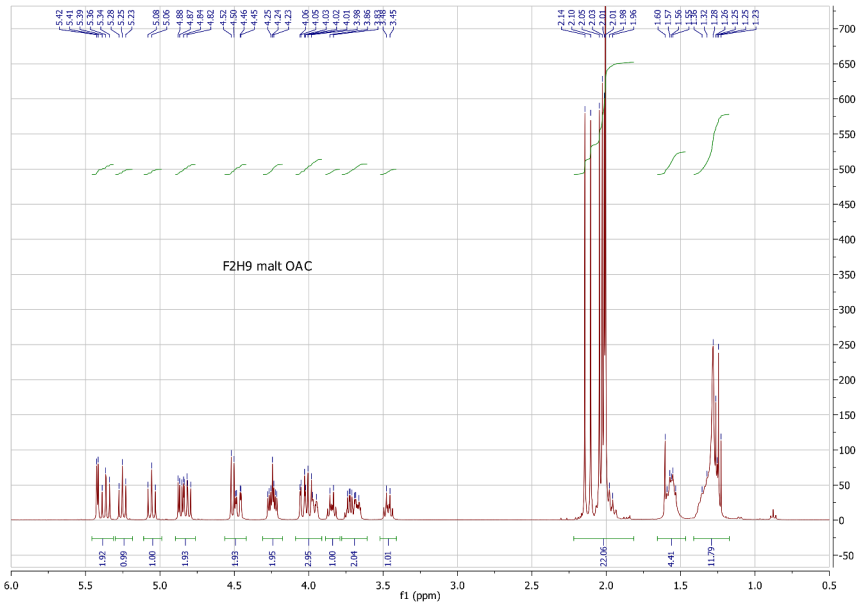


Figure 1.32 – Spectre ^{1}H-NMR: δ du composé 27. Le proton H_1 est axial, (δ=4,50-4,52 ppm, J(H_1-H_2)=5 Hz), le composé **23** est β. L'interprétation complète du spectre est donné dans la partie matériel et méthode.

f-Déprotection des groupements acétyle. Le composé **27** est ensuite traité avec du méthylate de sodium dans du méthanol en excès pendant 4 heures à température ambiante afin d'obtenir le composé final **28** avec un rendement de 78% après purification par chromatographie flash.

CHAPITRE 2

Caractérisation physico-chimique des tensioactifs en solution aqueuse

Après avoir synthétisé les tensioactifs, nous allons dans ce chapitre les caractériser d'un point de vue physico-chimique afin de déterminer leurs propriétés de micellisation et leur comportement en solution aqueuse. Nous avons aussi réalisé en parallèle l'étude du DDM (β) pour pouvoir comparer les tensioactifs développés au laboratoire, à ce détergent, déjà bien décrit dans la littérature, et largement utilisé dans le monde de la cristallisation des protéines membranaires. Cette caractérisation a été effectuée à l'aide des techniques de tensiométrie de surface, et de diffusion des rayonnements dont nous rappellerons les principes fondamentaux pour une meilleure compréhension des résultats.

1 Mesure de la concentration micellaire critique (CMC)

La première caractéristique à connaître lors de l'utilisation d'un tensioactif est sa concentration micellaire critique (CMC). Elle peut être mesurée expérimentalement par le suivi de l'évolution de certains paramètres de la solution en fonction de la concentration en tensioactif. En effet l'apparition de micelles à la CMC provoque un changement brutal de plusieurs propriétés physico-chimiques du milieu, comme par exemple la tension superficielle, l'indice de réfraction, la conductivité, la diffusion de la lumière, etc. Une autre technique possible consiste à utiliser des marqueurs colorimétriques ou fluorescents dont l'émission va dépendre de l'évolution de leur environnement immédiat [134]. Les valeurs de CMC sont obtenues aux points d'inflexion de l'évolution de ces paramètres. Il s'agit souvent d'une mesure indirecte qui repère les conséquences de la micellisation et non la micellisation directement. C'est pourquoi les résultats ainsi déterminés peuvent différer en

fonction de la technique utilisée. Dans notre cas, nous avons réalisé les mesures de CMC par tensiométrie de surface.

1.1 Détermination de CMC par tensiométrie de surface : principe

Pour comprendre l'origine de la tension de surface il faut comparer les forces intermoléculaires (liaisons hydrogène, forces de van der Walls ou interactions dipôle/dipôle) exercées sur une molécule de solvant (exemple l'eau pure) en fonction de son positionnement soit au sein de la solution (dans le "bulk"), soit à une interface :

- une molécule d'eau située dans le liquide (et non à une interface) est entourée d'autres molécules d'eau, les forces intermoléculaires sont d'intensités égales dans toutes les directions. La résultante de ces forces, ressentie par la molécule au cœur de la solution, est donc nulle.
- une molécule d'eau située à une interface du liquide, par exemple la surface air/eau, est entourée de molécules d'eau "en-dessous" et d'air "au dessus", les forces d'interaction ne sont donc plus isotropes. L'attraction par les autres molécules d'eau est plus forte que l'attraction par les molécules du milieu extérieur. La résultante des forces ressenties par la molécule à la surface de l'eau est donc orientée vers l'intérieur du liquide.

Ce déséquilibre des forces a pour conséquence de soumettre les molécules d'eau de la surface, à une pression extérieure : c'est la pression superficielle. Pour rester à l'équilibre et compenser cette pression, le liquide contracte ses molécules à l'interface, ce qui crée une tension élastique le long de la surface appelée **tension superficielle**. Celle-ci dépend de la nature du liquide mais aussi de la température comme illustré dans le tableau 2.1.

Liquide	Température (°C)	Tension superficielle (mN/m)
Acide acétique	20	27,6
Ethanol	20	22,3
Eau	20	72,9
Eau	50	67,9

Tableau 2.1 – **Tensions superficielles** pour des liquides purs en contact avec l'air à une température donnée

Pour mesurer la tension de surface, nous avons utilisé la méthode du plateau de Wilhelmy, qui présente l'avantage d'être moins sensible aux vibrations de la verrerie que d'autres méthodes existantes (ex : méthode de l'anneau Noüy) que nous n'aborderons pas ici. La méthode de Wilhelmy utilise une plaque métallique inerte de dimension connue, reliée à une microbalance, qui vient plonger dans la solution de tensioactif. Le robot re-

monte alors la plaque jusqu'à ce que l'extrémité inférieure de la plaque affleure la surface du liquide, sans qu'il y ait rupture du ménisque (cf. figure 2.1).

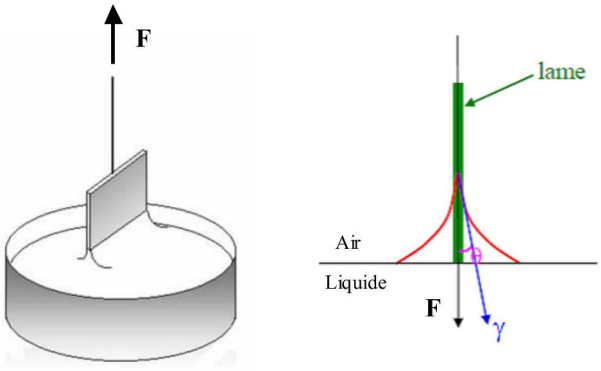


Figure 2.1 – Principe de la méthode de Wilhelmy pour la mesure de la tension superficielle A gauche : montage expérimental. A droite représentation des forces exercées par la plaque sur le liquide (vue latérale)

Dans cette condition limite, la force F exercée sur la lame, mesurée par la microbalance, est proportionnelle à la tension de surface γ et à la longueur l de la lame immergée selon l'équation :

$$F = l\gamma \cos\theta \tag{2.1}$$

avec : θ l'angle formé par la lame et la tangente du ménisque. Si le mouillage de la lame est minimal, ce qui est le cas avec un métal comme le titane du plateau de Whilhelmy, l'angle θ devient nul. L'équation 2.1 se simplifie et permet de déduire la valeur de la tension de surface en N/m :

$$\gamma = \frac{F}{l} = \frac{mg}{l} \tag{2.2}$$

avec m : la masse (kg) mesurée à l'instant où la lame affleure la surface du liquide, et g : l'accélération de la pesanteur (9,81 N/kg).

Les mesures de tension de surface sont très intéressantes pour l'étude des tensioactifs, car ils ont une action directe sur celle-ci. En s'adsorbant à la surface eau/air, le tensioactif induit une diminution de la tension superficielle de l'eau qui est directement proportionnelle à sa concentration à la surface. Ainsi avant la CMC, l'ajout progressif de tensioactif dans l'eau abaisse la tension superficielle qui passe de 72,9 mN/m à des valeurs situées entre 10 et 30 mM/m en fonction de la nature du tensioactif. A partir de la CMC, la surface de l'eau est saturée en tensioactifs, la tension superficielle n'évolue plus en fonction de la concentration. La mesure de la tension superficielle γ pour plusieurs concentrations en tensioactif, permet ainsi d'obtenir la courbe d'évolution de la tension superficielle dont la rupture de pente permet de déterminer la CMC du tensioactif comme montré sur la figure 2.2.

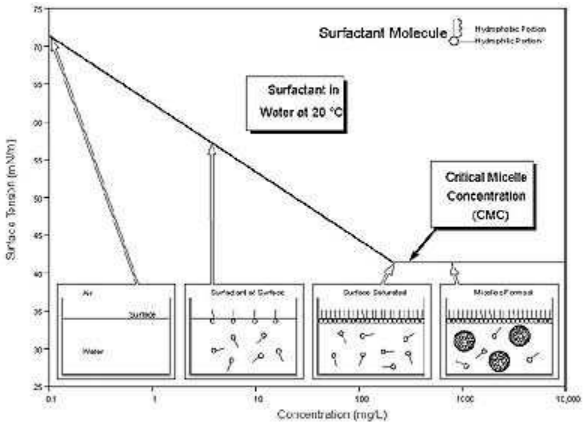


Figure 2.2 – Détermination de la CMC à partir de la courbe de tension superficielle en fonction de la concentration en tensioactif. Image reprise du site www.kruss.de.

1.2 Résultats pour les tensioactifs étudiés

Les valeurs de CMC retenues sont la moyenne des résultats obtenus sur deux ou trois mesures, en fonction de la quantité de tensioactif disponible. Les courbes de tensiométrie de surface sont présentées dans la figure 2.3 et les valeurs de CMC déterminées sont données dans le tableau 2.2.

Tensioactif	Mw g/mol	CMC mg/L	CMC mmol/L	γ CMC mN/m	A_{min} A^2	CMC littérature mmol/L
DDM	510,60	76,695	0,150	34-35	56,0	0,17[a]
PCC-malt	548,75	18,019	0,033	38-40	59,4	0,036[b]
F_8TAC_6	1530	9,95	0,0065	26-29	87,40	0,03[c]
F_2H_9-malt	586,54	627,597	1,07	28-30	94	NA
F_4H_5-malt	630,45	315,23	0,5	NA	NA	NA

Tableau 2.2 – Mesure des CMC par tensiométrie de surface à température ambiante (20-25 °C). Les valeurs issues de la littérature font référence à [a] [135], [b] [114], [c] [117]. Mw : masse molaire, A_{min} : Aire par molécule, NA : donnée non applicable

La mesure de la CMC du F_4H_5-malt par tensio-métrie de surface s'est révélée plus délicate que les autres. Ce composé présente un comportement atypique en tensiométrie de surface. Bien que réalisée 6 fois sur 3 lots de synthèse différents, il n'a jamais été possible d'obtenir une courbe de tensiométrie de surface "classique" avec deux portions de droite clairement définies. Les courbes obtenues présentent un point d'inflexion que l'on peut estimer aux alentours de 0,5 mmol/L, mais compte tenu de la faible qualité de celles-ci, nous garderons cette valeur comme indicative de la CMC, sans chercher plus de précision de mesure. Il nous semble nécessaire pour mesurer la CMC de ce composé d'utiliser d'autres techniques analytiques. La RMN du fluor peut être une voie d'accès

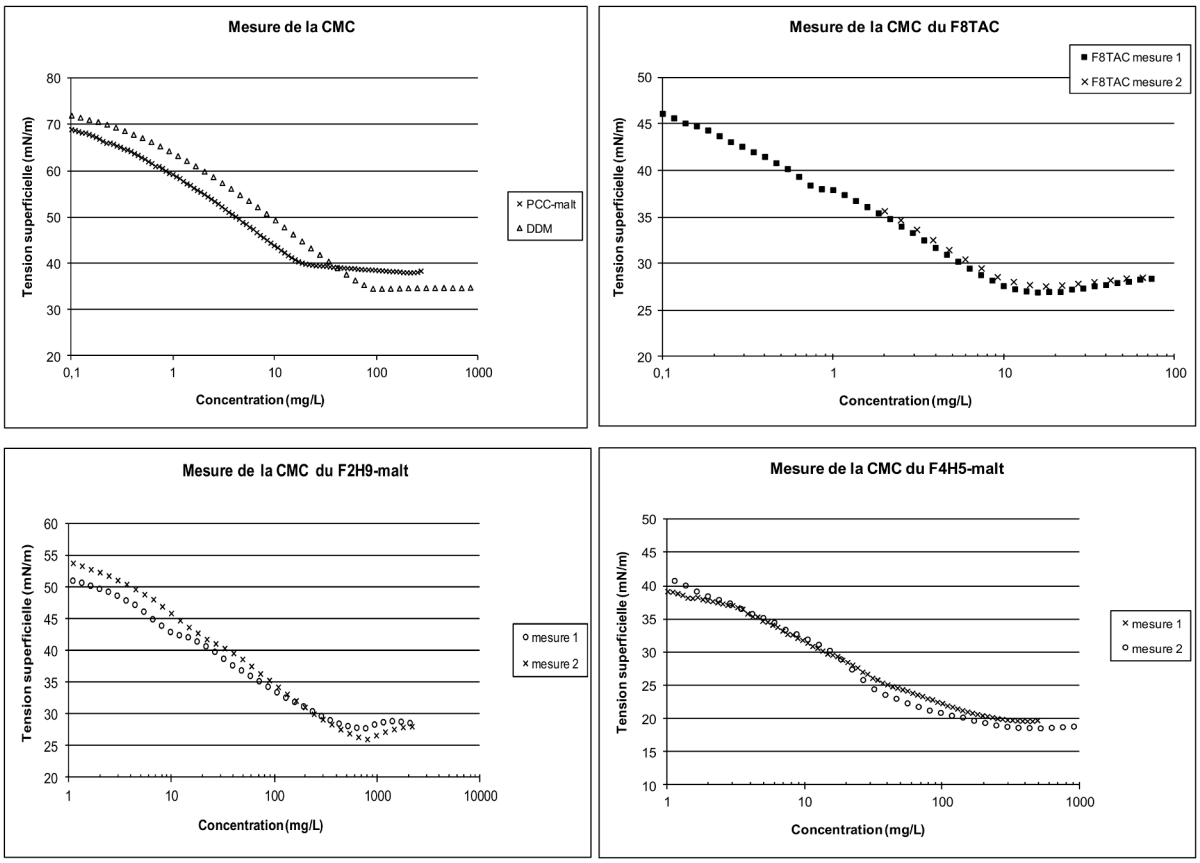


Figure 2.3 – Résultats des mesures de CMC

intéressante pour cette mesure, mais je n'ai malheureusement pas eu le temps de la mettre en œuvre au cours de ma thèse.

Pour les autres composés utilisés mais non synthétisés au cours de cette thèse (F_6H_2-malt, et les Tripodes), les valeurs de CMC retenues sont celles de la littérature, nous les recensons dans le tableau 2.3.

Tensioactif	Mw g/mol	CMC mmol/L	CMC . mg/L	γCMC °C	A_{min} mN/m
F_6H_2-malt[a]	688,4	1,02	702,2	NA	NA
Tripode C_3 [c]	1120,27	2,4	2688,7	39,2	275
Tripode C_4 [c]	1162,35	0,83	964,8	36	211
Tripode C_5 [c]	1204,4	0,13	156,6	36	210

Tableau 2.3 – CMC d'après la littérature mesurées à température ambiante. NA : donnée non précisée. Références bibliographiques : [a] [136], [b] [137], [c] [111]

1.3 Discussion

La valeur de CMC obtenue pour le DDM commercial par tensiométrie de surface (0,15mM) est conforme aux données de la littérature (0,17mM) [135], ce qui valide les conditions expérimentales de mesure. Il en va de même pour la CMC du PCC-malt synthétisé estimée à 0,036mM contre 0,033mM référencé dans [114].

En revanche, la CMC mesurée pour le F8TAC diffère de celles données dans la littérature puisqu'elle a été mesurée à 0,0065mM au lieu de 0,03mM déterminée par suivi de fluorescence d'une sonde hydrophobe. Cet écart de 4 à 5 fois la valeur valeur initiale s'explique par la faible valeur de la CMC, qui nécessite l'utilisation d'une technique très précise. Le développement des techniques automatisées, telle que la tensiomètrie de surface a permis de devenir plus performant aux petites concentrations que les méthodes manuelles utilisées à l'époque de la première détermination de la CMC des FTAC. Celle-ci avait été effectuée par spectrophotométrie en utilisant la méthode de Menger [138] (sonde : chlorure de pinacymol). Il aurait été intéressant de vérifier avec ce nouveau degré de précision, si nous retrouvions des valeurs de CMC indépendantes du degré de polymérisation de la tête polaire, pour des DPn moyen compris entre 4 et 15 [117].

Cette nouvelle valeur de CMC environ 4,5 fois plus faible, indique que l'on pourrait sans doute réduire la concentration du F_8TAC sans risque d'agrégation de la protéine par rapport aux concentrations utilisées jusqu'à présent. C'est le caractère non dénaturant du F_8TAC qui a permis l'utilisation de ce composé en très large excès pour maintenir en solution les protéines sans atteinte à leur stabilité.

Parmi les composés à chaine fluorée et tête maltoside, le F_2H_9-malt et le F_6H_2-malt présentent une CMC, à peu près égale à 1 mM, soit environ 6,8 fois celle du DDM. Pourtant le design de ces composés hémifluorés a été imaginé afin d'obtenir des propriétés hydrophobes identiques à celle du DDM. Ils auraient donc dû avoir des CMC équivalentes à celle du DDM. Ce résultat montre les limites de l'approximation $CF_2 \approx 1,6CH_2$ qui a été déterminée initialement pour le passage de chaînes totalement hydrogénées à des chaînes perfluorées [116]. Nos composés n'étant que partiellement fluorés, la présence, sur une même chaîne, d'une partie hydrogénée et d'une partie fluorée introduit un nouveau facteur influençant la micellisation, qui rend cette approximation moins fiable. Les CMC se trouvent donc être plus élevées que celles attendues. Il semble que la faible miscibilité entre les chaînes hydrogénées et fluorées défavorise ou déstabilise la formation des micelles, par rapport à un composé totalement fluoré ou totalement hydrogéné. L'équivalence démontrée pour le passage d'une chaîne hydrogénée à une chaîne perfluorée, ne l'est plus pour passer d'une chaîne hydrogénée à une chaîne hémifluorée ou faiblement fluorée.

Ce résultat confirme ceux de l'équipe du Pr. Riess qui avait déjà remis en question cette règle du $CF_2 \approx 1,6CH_2$ pour des tensioactifs hémifluorés à têtes dimorpholinophosphate ($C_nF_{2n+1}(CH_2)_m$-$OP(O)[N(CH_2CH_2)_2O]_2$ [139]. Ils ont mis en évidence que pour leurs composés, le segment hydrogéné, greffé à un segment fluoré, n'a pas le même comportement, lors de la micellisation, que s'il appartenait à une chaîne totalement hy-

drogénée. Sa contribution est en fait réduite d'un facteur 3. En revanche une chaîne contenant un segment fluoré séparé de la tête polaire par seulement 2 carbones hydrogénés (m=2), se comporterait comme une chaîne totalement fluorée sans cet espaceur court, et garderai l'équivalence $CF_2 \approx 1,6CH_2$. Ils proposent d'expliquer ce phénomène par le repliement de l'espaceur hydrogéné dans une conformation qui permettrait de minimiser la différence de taille entre la section d'une chaîne fluorocarbonée et hydrocarbonée (environ 30 vs. 20 Å^2 respectivement). Toutefois leurs résultats ne sont pas applicables à nos composés puisqu'ils supposeraient que le F_6H_2-malt soit équivalent au decylmaltoside (CMC=1,66mM), le F_4H_5-malt à l'octylmaltoside (CMC=19,5mM) et le F_2H_9-malt à l'hexylmaltoside (CMC=210mM). Ces valeurs de CMC sont non concordantes (largement surestimées), ce qui laisse penser que la contribution hydrophobe plus faible du segment hydrocarboné est non seulement liée à la présence d'une partie fluorée, mais à la nature de la tête polaire. Finalement tout se passe comme si l'hydrophobie d'un segment hydrocarboné dépendait de l'environnement hydrophobe mais aussi hydrophile auquel il est greffé.

La détermination de la CMC du F_4H_5-malt par tensiométrie de surface n'a donnée qu'une valeur indicative de la CMC aux environs de 0,5 mmol/L. Les différentes mesures montrent que la tension de surface augmente irrégulièrement d'un essai à l'autre lors de la dilution du tensioactif en dessous de la CMC. Or l'allure de cette partie de la courbe est caractéristique de l'arrangement des tensioactifs à l'interface, ce qui semble indiquer que le F_4H_5-malt présente un comportement atypique à l'interface. La faible tension de surface des solutions concentrées en F_4H_5-malt ($\gamma = 18-20mN/m$) confirme le caractère tensioactif de ce produit qui se place bien à l'interface air/eau, mais les équilibres entre l'interface et la solution semblent relativement lents aboutissant à ces courbes de tensiométrie de surface moins bien définies. Il est possible que le caractère lipophobe des chaînes perfluorées gène l'organisation de ces tensioactifs hémifluorés à l'interface air/eau, ou les échanges entre la solution et l'interface. Ainsi lors de la mesure en tensiométrie, les temps d'équilibre avec la surface pourraient être très longs, aboutissant à ces courbes d'évolution lentes, sans cassure nette à la CMC. Le phénomène observé en tensiométrie se situe à une interface et ne préjuge pas de ce qui se produit pour les micelles au sein de la solution. La détermination de la CMC par ^{19}F RMN aurait permis de se focaliser sur le comportement en solution. Pour notre part ce sont les mesures réalisées en SAXS qui vont nous permettre de définir si le F_4H_5-malt présente un comportement particulier en solution.

En effet nous venons de voir que les segments fluorés avaient une influence sur la CMC, qu'en sera-t-il sur les assemblages formés en solution ? La détermination de la CMC permet de connaître la concentration minimale à partir de laquelle se forment les micelles, mais pour pouvoir caractériser ces assemblages micellaires (masse, taille, forme) et leurs comportements en solution (interactions) en vue de la cristallisation des protéines membranaires, nous allons utiliser la diffusion des rayonnements. Avant de présenter nos résultats, nous allons dans le paragraphe suivant rappeler les principes théoriques de

la diffusion des rayonnements et les différentes techniques de diffusion de la matière en solution.

2 La diffusion des rayonnements par la matière

2.1 Principes généraux

Les techniques de diffusion des rayonnements, consistent à envoyer sur l'échantillon un rayonnement et à mesurer la répartition spatiale de la diffusion produite par l'échantillon. Nous utiliserons deux types de diffusion : la diffusion de la lumière et celle des rayons X. L'interaction de ces rayonnements avec la matière et les informations obtenues vont dépendre de la longueur d'onde, λ, et de la taille D de l'objet observé (figure 2.4) :

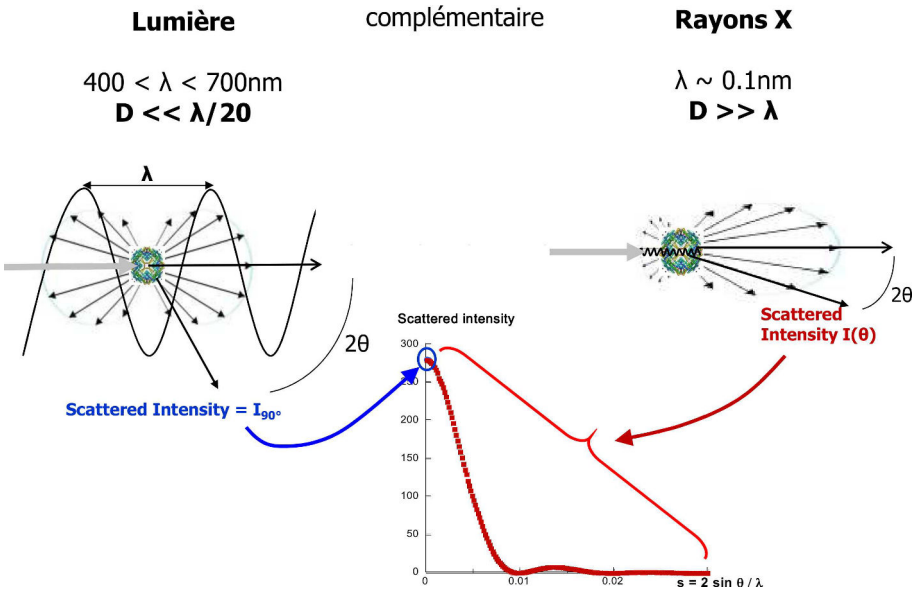


Figure 2.4 – La diffusion de la lumière et des RX par la matière. Le type de diffusion dépend de la taille de l'objet par rapport à la longueur d'onde.

- Soit $\lambda \gg$ **D**, c'est le cas de *la lumière visible* qui a une longueur d'onde comprise entre 400 et 700 nm. Elle interagit avec les molécules polarisables en leur induisant un moment dipolaire. Ce dernier va à son tour créer dans tout l'espace un champ électromagnétique proportionnel à la polarisabilité des molécules. La diffusion de la lumière permet d'obtenir des informations sur la masse, le rayon hydrodynamique, le rayon de giration (si D$\ll$ $\lambda/20$) [1], des interactions statiques (A_2) ou hydrodynamiques.

1. La notion de "taille de particule" n'a pas la même signification en fonction du phénomène physique étudié :
   – le rayon hydrodynamique (Rh) obtenu par diffusion dynamique de la lumière. Il caractérise le rayon d'une sphère dure fictive qui aurait le même coefficient de diffusion de la lumière que la molécule

- Soit $\lambda \ll \mathbf{D}$, cas *des rayons X* (RX) qui ont une longueur d'onde de l'ordre de l'angstrœm. Les RX vont interagir avec le cortège électronique des atomes présents dans le système. La diffusion par les rayons X permet de déterminer la masse, la taille (rayon de giration, distance maximale et fonction de distribution des distances), et la forme des objets, par des modèles appropriés, ainsi que les interactions interparticulaires (A_2) dans le cas de solutions non idéales.

Lorsque qu'il n'y a pas de changement de longueur d'onde entre le faisceau incident et le faisceau diffusé, on parle de **diffusion élastique ou statique**. Et lorsqu'il y a une variation de la longueur d'onde mesurée par rapport à l'onde émise, on parle de **diffusion quasi-élastique ou dynamique**. Nous allons à présent décrire plus en détail ces différentes techniques pour mieux comprendre comment elles vont nous permettre de caractériser les assemblages de tensioactifs.

2.2 La diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière a lieu lorsque l'émetteur et le récepteur sont en mouvement l'un par rapport à l'autre. Il se crée alors un effet doppler, c'est à dire un léger décalage en fréquence entre l'onde émise et l'onde reçue, induisant une légère modification de la longueur d'onde mesurée par rapport à celle émise. C'est le cas par exemple pour des objets en solution. L'intensité diffusée par un volume v_i, diffère au cours du temps en fonction du nombre d'objets présents dans v_i à chaque instant. L'amplitude de cette variation dépend donc de la vitesse et de la direction du déplacement de chaque particule individuelle.

Dans le cas de solutions diluées de petites molécules par rapport à la longueur d'onde ($\lambda >> D$), leur déplacement est dû au mouvement brownien. Le spectre de l'intensité diffusée est alors une lorentzienne centrée sur la fréquence de l'onde incidente dont la largeur à mi-hauteur dépend du coefficient de diffusion (D) de la particule.

La diffusion dynamique est donc basée sur l'étude des fluctuations d'intensité au cours du temps, qui reflètent les fluctuations temporelles de concentration autour de la valeur moyenne. En pratique, la comparaison des intensités est réalisée par un corrélateur. Cet outil mesure le degré de similarité de l'intensité à différents intervalles de temps (figure 2.5) : il compare l'intensité du signal à l'instant t, avec celle du même signal à l'instant t+dt, où dt représente un intervalle de temps.

---

d'intérêt. Il tient compte notamment de la couche d'hydratation de la molécule.

- le rayon de giration (Rg) obtenu par diffusion statique. Il correspond à la moyenne quadratique des distances de chaque point de la macromolécule à son centre de gravité, pondérées par la densité électronique de chaque élément de volume qui entoure le point considéré.
- la distance maximale (Dmax) obtenue par diffusion des rayons X aux petits angles : c'est la plus grande longueur existant entre deux points de la molécule.

Par exemple pour une macromolécule de forme sphérique, type sphère dure de rayon R, le rayon de giration Rg et le rayon hydrodynamique Rh sont reliés par Rh=R=$\sqrt{\frac{5}{3}}$Rg, et Dmax=2R=2Rh

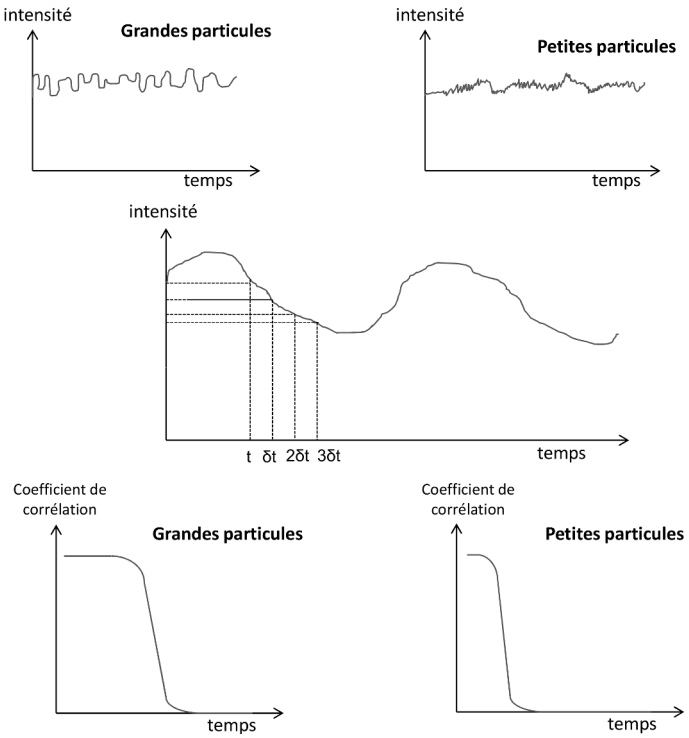


Figure 2.5 – Variation de l'intensité diffusée (en haut et centre) et **courbes d'auto-corrélation** (en bas) pour de grosses (gauche) et petites (droite) molécules

Pour un signal soumis à des fluctuations aléatoires, la connaissance de l'intensité du signal initial ne permet pas de prédire l'intensité du signal à un temps infini. Ceci signifie que son intensité à deux temps espacés (δt grand) n'est pas relié, la corrélation entre les deux mesures d'intensité est nulle. En revanche pour un intervalle de temps dt très court, la valeur de l'intensité au temps (t+δt) dépend de l'intensité au temps t, ces deux valeurs sont donc fortement corrélées. Dans le cas extrême où deux signaux sont identiques, la corrélation est égale à un. A un temps (t+2δt), la corrélation entre les deux signaux diminue, et ainsi de suite aux temps (t+3δt), (t+4δt), etc, la corrélation diminue au cours du temps jusqu'à être nulle aux temps infinis.

Plus les particules ont une taille importante, plus la corrélation du signal persiste dans le temps, avant de connaître une décroissance lente. A l'inverse, pour les petites particules, plus mobiles, la diminution de la corrélation est rapide. La fonction d'auto-corrélation caractérise ainsi la perte de corrélation du signal en fonction du temps par une exponentielle de constante de temps τ_0 qui permet de déterminer le coefficient de diffusion, D (m^2/s).

Dans le cas d'une *population monodisperse*, la courbe d'auto-corrélation est une mono-exponentielle décroissante et le coefficient de diffusion est relié au rayon hydrodynamique R_h (m) des particules (rayon d'une sphère équivalente tenant compte de la forme et de la

couche d'hydratation) par la relation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \tag{2.3}$$

avec k_B : constante de Boltzmann (1,38.10−23 J/K), T, la température absolue (K), η, la viscosité dynamique du milieu de dilution (Pa.s).

Cette relation reste vraie si l'écart entre la mono-exponentielle et la courbe expérimentale est inférieur à 20 %. Un écart supérieur à 20 % signifie que la solution est poly-disperse, la fonction d'auto-corrélation est alors la somme des mono-exponentielles de chacune des populations. Les coefficients de diffusion et les rayons hydrodynamiques sont dans ce cas plus difficiles à déterminer.

2.3 La diffusion statique de la lumière

Lors de la diffusion statique de la lumière, la matière réémet l'onde incidente à la même longueur d'onde. Il n'y a pas de perte d'énergie lors de la diffusion de l'onde. L'intensité diffusée I est la moyenne dans le temps du nombre de photons émis par l'objet étudié. Dans le cas d'une solution monodisperse, elle varie selon l'équation du facteur de Rayleigh R (en cm^{-1}) qui exprime le rapport de l'intensité diffusée, I sur l'intensité incidente, I_0 dans le vide.

$$R = \frac{I}{I_0} = \frac{4\pi^2 n^2 (\frac{dn}{dc})^2}{N_a \lambda^4} cMP(q)S(c,q) = KcMP(q)S(q) \tag{2.4}$$

avec $\frac{dn}{dc}$: l'incrément de l'indice de réfraction de la solution, N_a : le nombre d'Avogadro, λ : la longueur d'onde du faisceau incident et diffusé, c et M : la concentration et la masse molaire des particules. P(q) est le facteur de forme, et S(c,q) est le facteur de structure de la particule.

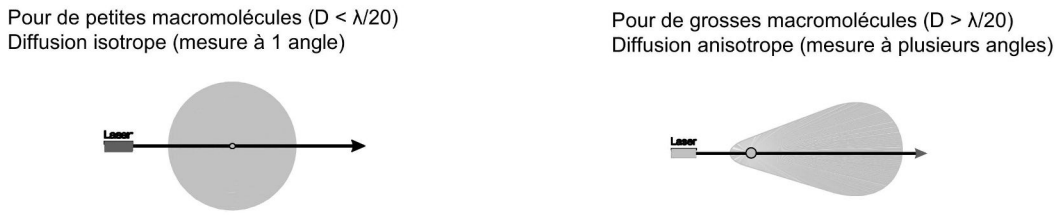


Figure 2.6 – La diffusion statique de la lumière

Le facteur de forme est caractéristique de la forme de l'objet seul en solution (figure 2.6)

– Si $D \ll \lambda/20$, la diffusion est isotrope, l'intensité est indépendante de l'angle de diffusion 2θ, et le facteur de forme P(q) est égal à 1.

– Si $D \gg \lambda/20$, la diffusion est anisotrope, l'intensité diffusée dépend de l'angle de diffusion 2θ, et l'expression du facteur de forme P(q) s'écrit :

$$P(q) = 1 + \frac{16\pi^2 R_g^2}{3\lambda^2} \sin^2 \frac{\theta}{2} \tag{2.5}$$

Le facteur de structure est issu de la corrélation spatiale entre particules, c'est à dire des interactions inter-moléculaires, et s'exprime en fonction du second coefficient du viriel A_2 selon :

$$\frac{1}{S(q,0)} = 1 + 2MA_2c \tag{2.6}$$

Dans le cas de solutions monodisperses d'objets de petite taille devant la longueur d'onde ($D<\lambda/20$), l'équation 2.4 peut donc s'écrire sous la forme :

$$R = \frac{I}{I_0} = \frac{4\pi^2 n^2 (\frac{dn}{dc})^2}{N_a \lambda^4} cM \frac{1}{1 + 2MA_2c} \tag{2.7}$$

En définissant la constante optique

$$K = \frac{4\pi^2 n^2 (\frac{dn}{dc})^2}{N_a \lambda^4} \tag{2.8}$$

L'équation 2.7 devient :

$$\frac{Kc}{R} = \frac{1}{M} + 2A_2c \tag{2.9}$$

Dans la pratique, le facteur de Rayleigh n'est jamais mesuré en absolu. Il est obtenu en comparant l'intensité diffusée par l'échantillon (I), à celle diffusée par un liquide de référence, I_{ref}, de facteur de Rayleigh connu R_{ref} (exemple : le toluène). On a alors :

$$R = \frac{I - I_{solvant}}{I_{ref}} \left(\frac{n_{solvant}}{n_{ref}} \right)^2 R_{ref} \tag{2.10}$$

L'intérêt de la diffusion statique est de pouvoir caractériser la masse et les interactions faibles entre particules. Mais cela nécessite de travailler sur des solutions monodisperses. Dans le cas de solutions polydisperses contenant plusieurs populations, il peut être intéressant de coupler la technique de diffusion statique à une chromatographie d'exclusion stérique pour caractériser chaque population en terme de masse.

La chromatographie par exclusion de taille, ou size exclusion chromatography (SEC) en anglais, sépare les molécules en fonction de leurs volumes hydrodynamiques et permet d'obtenir en sortie de colonne des populations monodisperses. Plus un composé est volumineux, plus son temps de rétention sera faible. Les différentes populations sont ensuite analysées par diffusion de lumière laser multi-angle, (ou multi-angle laser light scattering, MALLS), en statique, ce qui permet de déterminer la masse des composés en tout point

du profil l'élution.

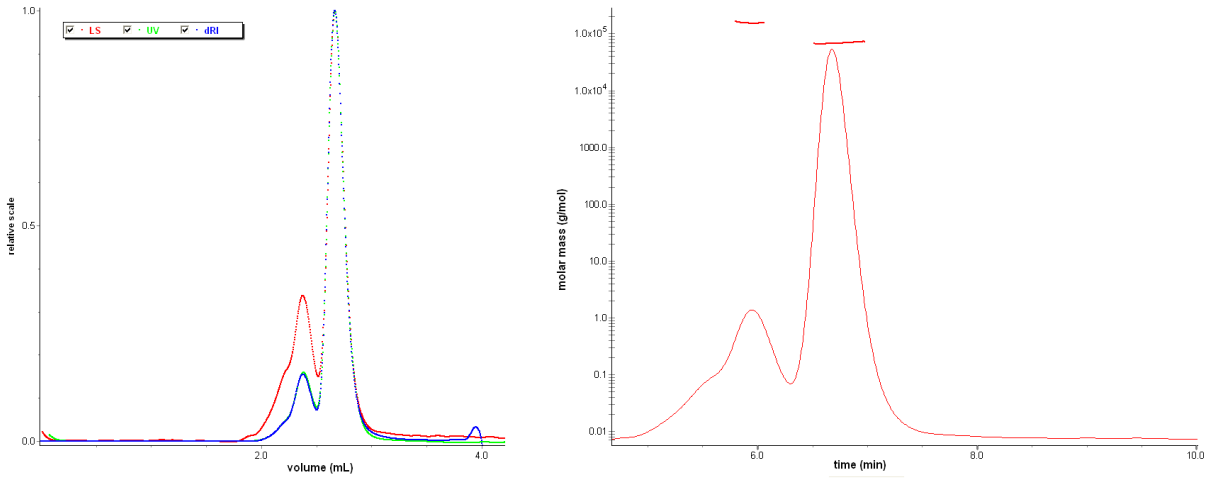


Figure 2.7 – Analyse SEC-MALS de la BSA. Le graphique de gauche montre les profils en sortie de colonne d'exclusion stérique vus par le détecteur de diffusion de lumière (LS), le spectromètre (UV) et le réfractomètre (dRI). Le graphique de droite présente les masses (lignes horizontales) des composés de chaque fraction.

Dans l'exemple de l'analyse de la Bovin Serum Albumin (BSA) donnée dans la figure 2.7, sont représentés à gauche les profils d'élution détectés en sortie de colonne par diffusion de lumière, par spectrophométrie (détection de l'absorbance de la protéine) et par réfractométrie. Il apparaît clairement qu'une fraction d'agrégat soluble sort au début du pic du monomère, en l'occurrence des dimères de BSA. Sur le graphique de droite, sont représentées les masses des composés analysés, superposées à leur temps de rétention. La masse du monomère peut donc être obtenue sans pollution due à la présence des dimères, contrairement à une mesure en batch en lumière statique. Appliquée aux solutions micellaires de tensioactifs, la technique de SEC-MALLS permet de séparer physiquement la fraction de monomères de celle des micelles. Contrairement à de la diffusion dynamique en batch, le signal ainsi mesuré n'est dû qu'à l'excès de micelle et permet d'obtenir en diffusion statique la masse des micelles.

La masse des composés est obtenue par l'expression :

$$M = \frac{\left(\frac{I_\theta}{I_0}\right)_{comp} - \left(\frac{I_\theta}{I_0}\right)_{tamp}}{K\left(\frac{dn}{dc}\right)^2 (RI_{comp} - RI_{tamp})} \qquad avec \qquad K = \frac{2\pi^2 n^2}{Na\ \lambda^4}\left(\frac{1+\cos^2\theta}{r^2}\right) \tag{2.11}$$

où K correspond à une constante optique qui dépend de l'indice de réfraction n du tampon, λ la longueur d'onde de la lumière, θ l'angle entre le rayon incident (I_0) et le rayon diffusé (I_θ), r la distance entre la molécule et le détecteur, et Na le nombre d'Avogadro.

2.4 La diffusion des rayons X (SAXS)

Pour caractériser les interactions faibles nous préfèrerons l'utilisation de la diffusion des rayons X aux petit angles (ou SAXS, pour "Small angle X-ray scatering"), car ils ont l'avantage par rapport à la lumière de permettre le contrôle de la monodispersité des particules et d'obtenir des indications sur la forme de celles-ci. En effet ces informations sont données aux grands angles dans la partie inaccessible par diffusion de lumière (voir figure 2.4).

2.4.1 Amplitude et intensité de diffusion

La diffusion des rayons X aux petits angles est très utilisée pour l'étude des biomolécules en solution. Son principe est décrit dans de nombreux ouvrages comme celui de Guinier et Fournet [140], pères de cette technique, et dans de nombreux articles [141,142]. Les rayons X interagissent avec la matière en produisant des particules chargées (électrons et protons) constituant les atomes des macromolécules. La diffusion élastique des rayons X s'identifie à la diffusion Thomson, pour laquelle l'intensité diffusée est inversement proportionnelle à la masse au carré de l'élément diffusant. La masse des protons étant très supérieure à celle des électrons, la diffusion des protons sera négligeable, et on pourra considérer que les rayons X n'interagissent qu'avec le cortège électronique des atomes présents dans le système. Au sein d'un échantillon placé sous faisceau X, tous les électrons (de cœur et périphériques) diffusent de façon équivalente et l'intensité diffusée I_d à une distance r par les électrons s'écrit :

$$I_d = \frac{I_0}{r^2}\left(\frac{e^2}{4\pi\varepsilon_0 m_e c^2}\right)^2 \frac{1+\cos^2 2\theta}{2} \tag{2.12}$$

avec I_0 : l'intensité incidente, m_e : la masse de l'électron et 2θ : l'angle de diffusion.

L'amplitude A(q) du signal diffusé par un échantillon est la somme des amplitudes diffusées par l'ensemble des électrons qui le compose, en tenant compte des déphasages entre les ondes diffusées. Elle s'écrit comme la transformée de Fourier de la densité électronique (ou nombre d'électrons par unité de volume) de la particule en un point r, ρ(r) :

$$A(s) = \int_{Vr} \rho(r)\exp(-irq)dr \tag{2.13}$$

avec V_r : le volume de l'échantillon, et q : le vecteur de diffusion.

L'intensité diffusée I(q) par l'échantillon s'écrit comme le carré du module de l'amplitude A(q) :

$$I(q) = |A(q)|^2 = \int_{Vr} g(R)\exp(-iRq)dr \tag{2.14}$$

avec R : la distance ente deux points quelconques de l'échantillon et $g(R) = \int_{Vr} \rho(r)\rho(r+R)dr$: la fonction d'autocorrélation de la densité électronique de la particule.

Dans le cas de particules en suspension dans un solvant (comme les colloïdes ou les macromolécules biologiques), la diffusion a pour origine le contraste électronique $\Delta\rho$(r) entre la particule de densité électronique ρ et le solvant homogène de densité électronique constante ρ_0.

Pour un échantillon isotrope, on peut alors déterminer la moyenne sphérique de l'intensité :

$$I(q) = \langle I(q) \rangle = 4\pi \int_0^\infty g(R) \frac{\sin Rq}{Rq} dr, \quad avec \quad g(R) = \int_{Vr} \Delta\rho(r)\Delta\rho(r+R)dr \qquad (2.15)$$

2.4.2 Diffusion par une solution monodisperse idéale (sans interaction)

$\rightsquigarrow$ Intensité diffusée : le facteur de forme

Dans le cas d'une solution idéale, ou infiniment diluée, il n'y a pas d'interaction entre les particules. Elles diffusent indépendamment les unes des autres et l'intensité résultante appelée **facteur de forme**, et notée I(0,q), est la somme des intensités i_1(q) diffusées par chacune des N molécules .

$$I(0,q) = N i_1(q) \qquad (2.16)$$

$\rightsquigarrow$ Les différentes représentations graphiques, et détermination de la taille

L'allure de la courbe de l'intensité diffusée en fonction du vecteur d'onde renseigne qualitativement sur la forme globale de l'objet (globulaire, allongée ou plate). Dans chacun des cas, des approximations sur l'intensité aux petits angles permettront la détermination des dimensions caractéristiques de l'objet.

Pour les molécules globulaires : la "courbe de Guinier", $\ln I(q) = f(q^2)$**.** L'intensité diffusée à faible concentration peut s'écrire sous forme d'un développement limité qui permet d'exprimer l'intensité à l'origine pour q.Rg <1 ("domaine du Guinier") selon :

$$I(0,q) = I(0,0)\left[1 - \frac{(q.Rg)^2}{3} + ...\right]$$
$$\Longrightarrow I(0,q) \approx I(0,0)\exp(-\frac{R_g^2.q^2}{3}) \quad pour \quad q < \frac{1}{Rg} \qquad (2.17)$$

avec I(0,0) l'intensité diffusée (lorsque l'angle de diffusion et la concentration tendent vers 0) et Rg, le rayon de giration de la molécule (moyenne des distances par rapport au centre de gravité de la molécule où chaque point est pondéré par sa masse).

En traçant $I(q) = f(q^2)$ sur une échelle logarithmique (approximation du Guinier), on obtient une droite dont la pente permet de déterminer la valeur du **rayon de giration**, Rg. L'ordonnée à origine de cette droite donne l'intensité diffusée I(0,0), qui permet de déterminer la masse moléculaire de l'objet diffusant en solution comme expliqué à la fin de ce paragraphe (cf. figure 2.8).

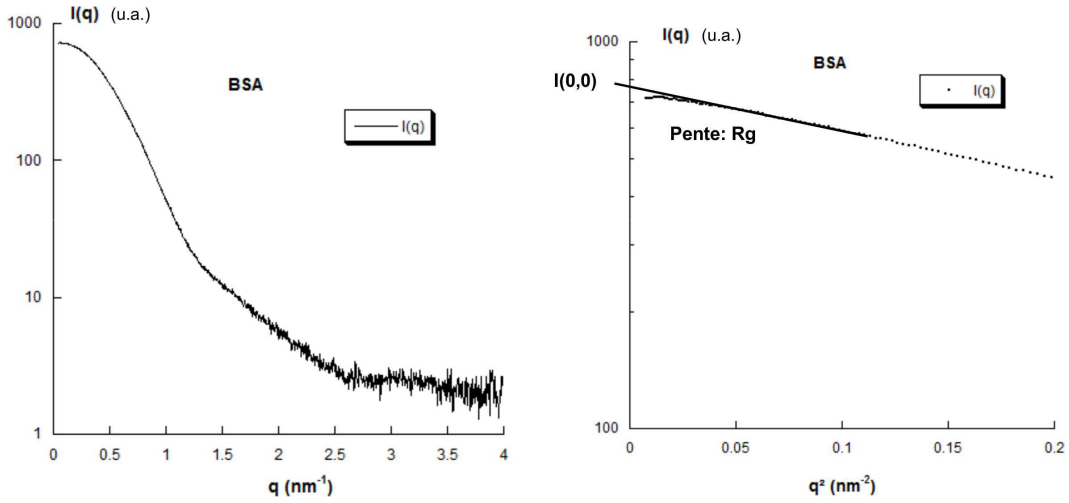


Figure 2.8 – Détermination du Rg et I(0,0) par SAXS. Courbe SAXS de la BSA à gauche, et sa courbe de Guinier correspondante, à droite, permettant de déterminer le rayon de giration, Rg, et l'intensité diffusée, I(0,0).

Pour les molécules allongées ou en forme de bâtonnet : $q.I(q) = f(q^2)$. Pour les molécules allongées en forme de bâtonnet, ou d'un cylindre de longueur L et de rayon Rc, la diffusion est séparée en deux zones,

- les petits angles (q.Rg<1) : zone qui renseigne sur la longueur du bâtonnet avec L=$\sqrt{12}$.Rg
- les plus grands angles, pour $\frac{2\pi}{L} < q < \frac{1}{R_c}$: zone qui renseigne sur rayon du cylindre par la relation :

$$q.I(q) \propto \exp(-\frac{q^2 R_c^2}{2}) \tag{2.18}$$

Pour les molécules plates ou en forme de disque : $q^2.I(q) = \mathbf{f(q^2)}$ Pour les molécules en forme de disque de rayon R_t et d'épaisseur T, les petits angles donnent le rayon par $R_t = \frac{T}{\sqrt{12}}$ et à plus grands angles on a la relation :

$$q^2.I(q) \propto \exp(-\frac{q^2 R_t^2}{2}) \tag{2.19}$$

En résumé, la figure 2.9 donne une représentation de l'allure des profils de diffusion en fonction de la forme de l'objet.

$\rightsquigarrow$ Fonction de distribution de distance de paires, et détermination du Dmax

Dans ces trois cas, une autre longueur caractéristique peut être déterminée par SAXS : c'est la longueur maximale de l'objet. Ce Dmax est obtenu en traçant la fonction mathématique appelée fonction de distribution des distances de paires et notée p(r). Elle représente l'histogramme des distances intraparticulaires d'une macromolécule : c'est à

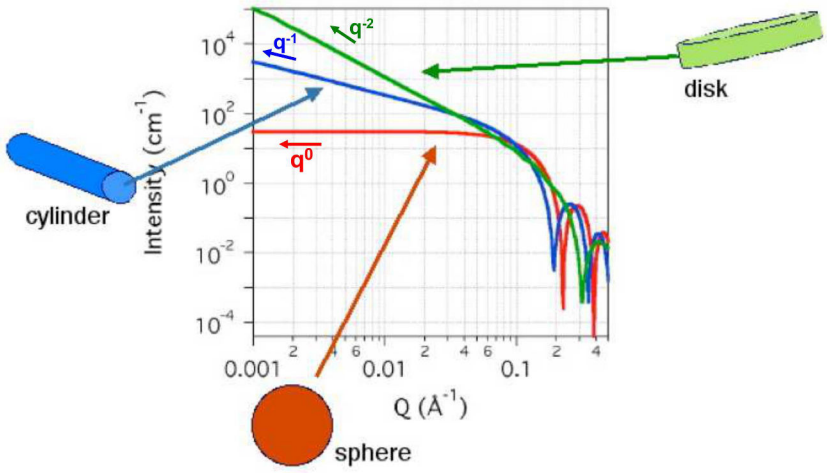


Figure 2.9 – Courbes SAXS en fonction de la forme des particules. La pente de l'intensité diffusée en fonction de q, représentée en échelle logarithmique, donne une première approximation de la forme globale de l'objet en solution.

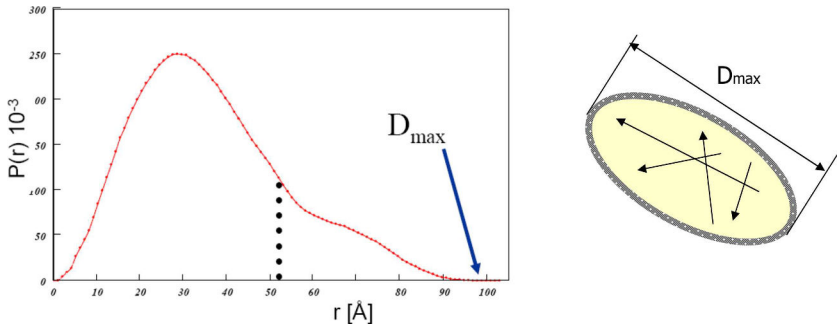


Figure 2.10 – La fonction de distribution des distances

dire la probabilité de trouver deux diffuseurs à une distance r (figure 2.10). Mathématiquement, elle s'obtient par la transformée de Fourier inverse de l'intensité diffusée, I(c,q). Pour résoudre cette équation nous avons utilisé le programme GNOM [143].

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2}\int_0^\infty I(q)\frac{\sin qr}{qr}q^2 dq \tag{2.20}$$

$\rightsquigarrow$ Détermination de la forme de la particule

A partir du facteur de forme, I(0,q), il est possible d'obtenir des informations sur la forme de la particule. Une première façon, est d'utiliser une méthode de modélisation *ab Initio* de la structure de la macromolécules en solution. Plusieurs modèles *ab initio* existent (avec différents programme associés) et permettent d'avoir une information sur la forme à différentes résolutions (figure 2.11). Toutefois l'utilisation de ces modèles est souvent limitée aux particules de densité électronique homogène.

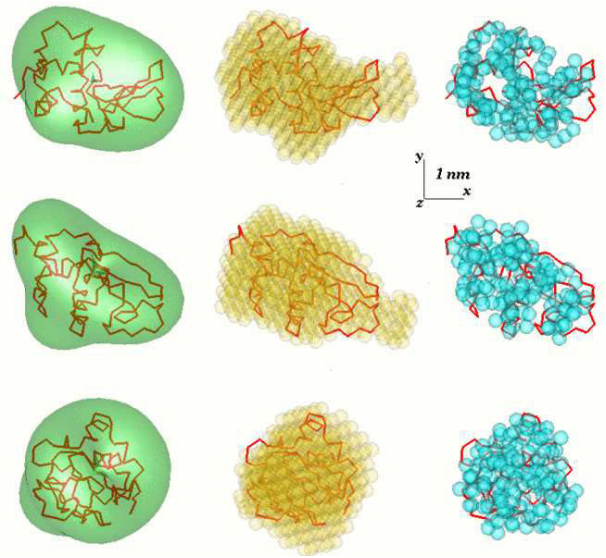


Figure 2.11 – Modélisation du lysozyme par différentes méthodes. gauche : reconstruction d'une enveloppe globale par SACHA ; centre : ajustement de pseudo atomes par DAMMIN ou DAMMIF ; droite : modèle de chaîne par GASBOR.

Pour les particules de densité électronique non homogène, il est préférable d'utiliser des méthodes de calcul : les conditions initiales sur la forme de l'objet sont fixées initialement, et le logiciel calcule la courbe SAXS correspondante. Nous avons utilisé pour ceci le logiciel SASfit, qui génère des courbes de diffusion théoriques à partir d'un certain nombre de paramètres préétablis, qu'il fait évoluer par itération jusqu'à obtenir une courbe théorique la plus proche possible de la courbe expérimentale (par application de la méthode des moindre carrés). Les paramètres requis varient en fonction du modèle général choisi initialement et concernent principalement les distances internes de la structure et les différentes densités électroniques du système. Par exemple pour une sphère de rayon R, et de contraste de densité électronique $\Delta\eta$, l'intensité diffusée sera donnée par l'équation :

$$I_{sphère}(q,R) = \left(4\pi R^3 \Delta\eta \frac{\sin qR - qR\cos qR}{(qR)^3}\right)^2 \tag{2.21}$$

En faisant varier R et $\Delta\eta$, les courbes SAXS de différentes sphères pleines peuvent ainsi être calculées (figure 2.12).

$\rightsquigarrow$ Détermination expérimentale de la masse d'un composé inconnu

La technique de SAXS permet d'accéder à la détermination de plusieurs paramètres intrinsèques des objets étudiés, et en particulier leur masse. Toutefois l'intensité diffusée dépendant aussi bien des propriétés de l'objet que de l'énergie du faisceau incident, il est donc important de calibrer le faisceau de RX avant chaque utilisation. La méthode classique de calibration est d'utiliser un composé de masse connue, et de mesurer l'intensité

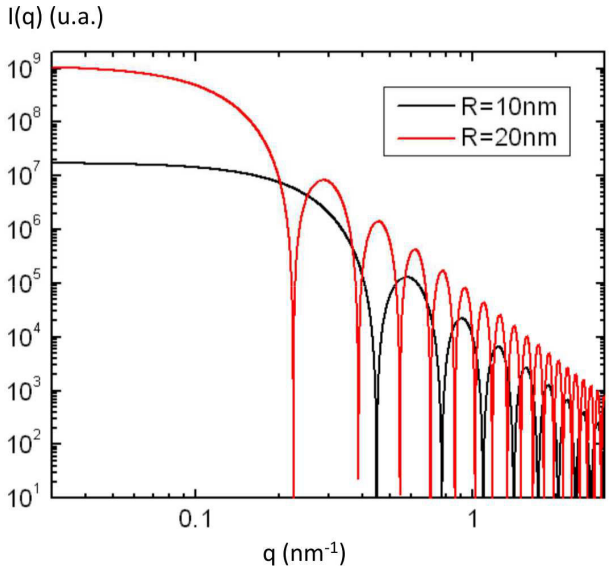


Figure 2.12 – **Intensité diffusée pour des sphères pleines** de rayon R=10nm et R=20nm, avec un contraste électronique fixé à 1.

diffusée par celui-ci à l'origine, I(0,0), dans les mêmes conditions que les échantillons. C'est donc un calcul de la masse à partir de I(0) relative. En pratique la BSA est utilisée, lors de l'analyse de solution de protéines. Le volume partiel spécifique des protéines étant évalué à v_p = 0,74 cm^3/g, la masse d'une protéine inconnue est alors donnée par :

$$M_{protéine} \approx M_{BSA} \frac{\frac{I(0)}{c}}{\frac{I_{BSA}(0)}{c}} \tag{2.22}$$

Cependant lorsque le composé analysé n'est pas une protéine (cas de l'analyse des micelles), les volumes partiels spécifiques ne sont plus identiques, et la masse pourra être obtenue en faisant intervenir une constante au carré :

$$M_{macromol} \approx M_{BSA} \frac{\frac{I(0)}{c}}{\frac{I_{BSA}(0)}{c}} \left(\frac{v_{p|BSA}(\rho^{e-}_{BSA} - \rho_{tampon})}{v_{p|macromol}(\rho^{e-}_{macromol} - \rho_{tampon})} \right)^2 \tag{2.23}$$

avec pour le calcul de la constante :

- $v_{p|BSA}$=0,74 cm$^3/g$ le volume partiel spécifique de la BSA
- ρ^{e-}_{BSA}=0,435 e$^-$/Å^3 la densité électronique de la BSA
- ρ_{tampon} la densité électronique du tampon (pour l'eau, ρ_{eau}=0,334 e$^-$/Å^3)
- $v_{p|macromol}$ en cm^3/g obtenu par densimétrie ou par simulation sur logiciel (exemple : chemsketch)
- $\rho^{e-}_{macromol}$ en e$^-$/Å^3 la densité électronique de la macromolécule en solution.

Cette dernière est définie par $\rho^{e-}_{macromol} = \frac{N^{e-}}{V_m}$, où N^{e-} est la somme du nombre d'électrons apportés par chaque atome de la structure (1 par hydrogène, 6 par carbone, 8 par oxy-

gène, 9 par fluor, 7 par azote, etc), et V_m est le volume moléculaire (en cm^3/molécule). Il s'obtient à partir du volume molaire V_M (en cm^3/mole), et donc du volume partiel spécifique v_p (en cm^3/g), d'après les relations : $V_m=\frac{V_M}{Na}$ et $V_M=v_pM_w$, où Na est le nombre d'Avogadro et M_w la masse molaire (en g/mol) de la macromolécule. Ce qui donne en tenant compte du passage des cm^3 aux $Å^3$:

$$\rho^{e-}_{macromol} = \frac{N^{e-}.10^{-24}}{V_m} = \frac{N^{e-}.10^{-24}Na}{V_pM_w} \tag{2.24}$$

Cette méthode de détermination de la masse d'après l'intensité relative présente certains inconvénients. La BSA est, comme nous l'avons vu dans le profil d'élution par SEC, figure 2.7 une protéine qui s'agrège rapidement. Les standards doivent donc être préparés le même jour que l'analyse et centrifugés pour éliminer au maximum les agrégats. La présence de ces agrégats solubles, difficiles à éliminer complètement, fausse la valeur du $I_{BSA}(0)$ obtenue en la surévaluant. Par ailleurs la masse molaire de la BSA, M_{BSA}, varie dans la littérature, la calibration se fait donc avec un standard dont la masse est connue avec une incertitude non négligeable. Pour éviter ce problème, nous avons choisi d'adopter une autre méthode de détermination de la masse qui se base sur l'intensité I(0,0) absolue en utilisant l'eau comme standard comme décrit par Orthaber [144]. Cette méthode présente l'avantage d'être moins biaisée, puisque la diffusion de l'eau est indépendante de l'angle de diffusion, et ne dépend que de ses propriétés physiques de compressibilité. L'intensité de diffusion de l'eau (en nombre d'électrons diffusés par photons incidents) est donc parfaitement connue : elle est notée $d\Sigma/d\Omega|_{eau}$, et vaut $1{,}632.10^{-2}$ cm^{-1} à 20 °C.

En pratique, pour calculer l'intensité absolue d'un composé, il faut déterminer l'intensité relative de l'eau et du composé étudié dans les conditions expérimentales. Celle de l'eau est donnée par l'ordonnée à l'origine de l'asymptote du signal de l'eau auquel on a retranché celui de la cuve vide. Pour le composé il faut tracer la courbe de Guinier ln I(q) =f(q^2) dans le domaine de Guinier pour obtenir le $I(0,0)^{rel}$.

L'intensité absolue d'une macromolécule en solution à 20 °C peut alors s'exprimer suivant la relation :

$$d\Sigma(q)/d\Omega|_{molécule} = \frac{I(0)^{rel}_{molécule}}{I(0)^{rel}_{eau}}\, d\Sigma/d\Omega|_{eau} \tag{2.25}$$

et la masse de la macromolécule est obtenue par :

$$M_{molécule} = \frac{\underline{d\Sigma(q)/d\Omega|_{molécule}}\, Na}{(\Delta\rho)^2 v_p^2} \tag{2.26}$$

avec

- le nombre d'Avogadro, Na = $6{,}023.10^{23}$
- le volume partiel spécifique v_p en cm^3/g

- la différence de densité électronique en cm^{-2}, $\Delta\rho = (\rho^{e-} - \rho^{eau})b^{e-}$
- ρ^{e-} la densité electronique calculée selon l'équation 2.24
- la constante b^{e-}=$\frac{e^2}{m_e c^2}$=0,28179.10^{-12} cm/e^-
- la densité électronique de l'eau ρ^{e-} =3,34.10^{23} e^-/cm^3

2.4.3 Diffusion par une solution monodisperse de particules en interactions

Dans une solution idéale, c'est à dire sans interaction, toutes les particules se comportent comme si elles étaient seules dans la solution. Dans une solution monodisperse de particules en interaction, l'intensité diffusée présente un écart à l'idéalité dû aux interactions entre particules. L'intensité totale diffusée I(c,q) est alors exprimée comme étant l'intensité diffusée par la solution idéale, I(0,q) ou **facteur de forme**, tel que défini dans l'équation 2.16, corrigé par le **facteur de structure** S(c,q).

$$I(c,q) = Ni_1(q)S(c,q) = I(0,q)S(c,q) \tag{2.27}$$

Le facteur de structure est obtenu par la transformée de Fourier de la fonction de distribution de paires p(r), selon :

$$S(c,q) = 1 + \frac{N}{V}\int_V r4\pi r^2 \left(p(r) - 1\right)\frac{\sin rq}{rq}dr \tag{2.28}$$

La valeur du facteur de structure lorsque q tend vers zéro, S(c,0), renseigne sur la nature des interactions entre particules en solution. Il peut se définir comme une fonction de la pression osmotique, via la compressibilité :

$$S(c,0) = \frac{RT}{M}\left(\frac{\partial\Pi}{\partial c}\right)^{-1} \tag{2.29}$$

La pression osmotique pour une solution non idéale s'exprime, quant à elle, en fonction du second coefficient du viriel (noté A_2 ou B_{22} en mol.ml.g^{-2}) symbole des interactions présentes dans la solution par

$$\Pi = cRT\left(\frac{1}{M} + A_2c + A_3c^2...\right) \tag{2.30}$$

avec R : constante des gaz parfaits (8.31 J.mol^{-1}.K^{-1}), T : température, c :concentration massique en colloïde, M : masse moléculaire du colloïde et A_2, A_3 :les coefficients du viriel.

Les équations 2.30, 2.29 et 2.27 permettent d'obtenir :

$$S(c,0) = \frac{I(c,0)}{I(0,0)} = \frac{1}{1 + 2MA_2c} \tag{2.31}$$

Le facteur de structure à l'origine (q→0) peut donc être déterminé expérimentalement

par le rapport des limites, qui se simplifie en faisant un développement limité ($MA_2 \ll 1$) selon :

$$S(c,0) = \frac{\lim\limits_{q\to 0} I(c,q)}{\lim\limits_{c\to 0} I(c,0)} = \frac{1}{1+2MA_2c} \approx 1 - 2MA_2c \tag{2.32}$$

Les interactions en solution peuvent donc être quantifiées par la détermination du A_2. Lorsque ces interactions sont répulsives, les particules sont réparties uniformément, $S(c,0)<1$, soit $A_2>0$. Lorsque les interactions sont attractives, les particules présentent des variations de concentrations locales, $S(c,0)>1$, et $A_2<0$ (figure 2.13).

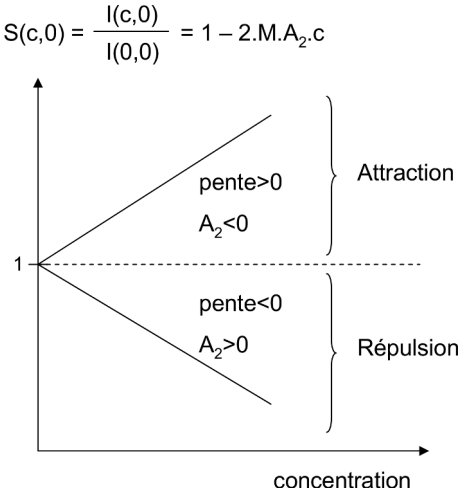


Figure 2.13 – Facteur de structure et interactions

Le second coefficient du viriel peut être déterminé par diffusion des RX aux petits angles mais aussi par ultracentrifugation analytique [145], chromatographie analytique [146], mesures de pression osmotiques [147], diffusion statique de la lumière [48], ou diffusion des neutrons aux petits angles. Son expression formelle fait intervenir le potentiel total isotrope U(r) existant entre particules, qui est la résultante des interactions colloïde/colloïde et colloïde/solvant en solution :

$$A_2 = \frac{2\pi Na}{M^2} \int_0^{+\infty} \left(1 - e^{-\frac{U(r)}{k_B T}}\right) r^2 dr \tag{2.33}$$

Les interactions intermoléculaires (colloïde/colloïde) correspondent à l'action réciproque qu'exercent deux molécules l'une sur l'autre, et ont été largement étudiées par Israelachvili [148]. Elles dépendent de r, la distance interparticulaire, et s'expriment en terme d'énergie potentielle, aussi appelé potentiel d'interaction U, ou de sa dérivée, la force F : $F(r) = -gradU(r)$. Par convention, la force est dite attractive lorsqu'elle tend à rapprocher les particules et correspond à des valeurs de F(r) négatives. La force est répulsive ($F(r)>0$) lorsque les molécules ont tendance à s'éloigner. L'intensité de l'énergie est évaluée en comparaison à k_BT qui correspond à l'énergie d'agitation thermique. La

distance interparticulaire r, jusqu'à laquelle la force est ressentie significativement permet de qualifier la portée de la force (courte pour une petite distance r, et longue si r est grand).

Le second coefficient du viriel est un paramètre qui permet donc de quantifier les interactions globales en solution. Il est particulièrement intéressant dans le cas de l'étude des conditions de cristallisation des protéines, puisqu'il existe un intervalle de valeurs de A_2, le "crystallization slot", où la protéine a une plus forte probabilité de cristalliser. Nous allons donc voir quelles sont les différentes composantes qu'il retranscrit, et quels renseignements il apporte dans le cadre de la cristallisation des protéines.

2.4.4 La mesure des interactions de solutions de PM

Les différentes composantes du potentiel d'interaction. Les forces d'interaction entre deux particules en solution sont la résultante de la combinaison de trois types d'interactions élémentaires : les interactions répulsives de volume exclu, les interactions électrostatiques et celles de polarisation liées à la nature électrostatique des molécules. Nous allons, dans la suite, détailler ces trois types d'interactions en considérant des particules sphériques dans un système isotrope, c'est à dire où il n'existe pas de direction privilégiée pour les interactions, qui dépendent alors uniquement de la distance r. Nous aborderons ensuite les interactions solvant/colloïde

Les forces de volume exclu traduisent l'effet de répulsion des nuages électroniques de deux particules qui se rapprochent. Purement répulsives, elles sont aussi appelées forces de répulsion stérique ou cœur dur. De très courtes portées, ces forces se caractérisent par une augmentation brusque de leurs intensités lorsque deux molécules s'approchent. Pour les macromolécules biologiques, le modèle de sphères indéformables est une bonne première approximation. Dans ce cas l'expression du potentiel, dit de "sphère dure", est donnée par :

$$U(r) = \begin{cases} +\infty & \text{pour r<D} \\ 0 & \text{pour r>D} \end{cases} \tag{2.34}$$

avec D : diamètre de la particule

Il faut toutefois noter que d'autres modèles du potentiel de répulsion stérique existe afin de tenir compte de l'éventuelle compressibilité des particules, mais nous ne les aborderons pas dans ce travail.

Les interactions électrostatiques - Les forces coulombiennes (charge/charge)

Entre deux particules de charges Z_1 et Z_2 situées à une distance r dans un solvant de constante diélectrique ε_s, il existe des forces de répulsion électrostatique dites

coulombiennes dont le potentiel s'écrit :

$$U(r) = \frac{Z_1 Z_2}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_s r} \tag{2.35}$$

où ε_0 est la permittivité du vide, que pondère la constante diélectrique ε_s pour tenir compte du milieu.
Cette interaction à longue portée est attractive pour des particules de charges opposées, et répulsive pour des charges de même signe.

- Les forces charge/dipôle permanent

Avant de présenter les forces charges/dipôles, il convient ici de définir tout d'abord la notion de dipôle permanent. Il s'agit en fait d'une particule dont la structure présente deux pôles ponctuels de charges de signes opposés mais d'intensité égale, notée z. La "force" du dipôle est caractérisée par son moment dipolaire μ =zl, où l est le vecteur orienté de la charge négative vers la charge positive. Une molécule est constituée d'un ensemble de dipôles u_i et peut être considérée comme un dipôle unique de moment dipolaire $\mu = \sum u_i$, si ce moment dipolaire est non nul (dans l'espace et dans le temps), la molécule est dite polaire.

En solution des interactions charges/dipôles vont se créer et dépendent de l'orientation du dipôle par rapport à la charge Z. Dans l'eau, l'interaction charge/dipôle est généralement d'intensité inférieure à l'énergie d'agitation thermique k_BT, ce qui la rend négligeable. Les dipôles sont donc libres de tourner à peu près librement. En moyennant par une distribution de Boltzmann toutes les orientations de dipôles, le potentiel d'interaction est donné par :

$$U(r) = -\frac{Z^2\mu^2}{6(4\pi\varepsilon_0\varepsilon_s)^2 k_B T r^4} \quad pour \quad \frac{Z\mu}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_s r^2} < k_B T \tag{2.36}$$

- Les forces dipolaires (dipôle permanents/dipôle permanents)

L'interaction dipôle/dipôle permanents est encore plus faible que la précédente dans le cas de macromolécules. Elle n'induit pas d'alignement des molécules polaires, l'utilisation d'une moyenne de Boltzmann sur toutes les orientations donne l'expression du potentiel d'interaction entre deux dipôles μ_1^2 et μ_2^2 suivant :

$$U(r) = -\frac{\mu_1^2\mu_2^2}{3(4\pi\varepsilon_0\varepsilon_s)^2 k_B T r^6} \quad pour \quad \frac{\mu_1\mu_2}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_s r^3} < k_B T \tag{2.37}$$

Ce potentiel variant en $1/r^6$ est appelé potentiel d'orientation ou de Keesom. Il est l'un des trois potentiels qui constituent l'interaction de van der Waals entre atomes et molécules (*cf.* § 2.4.4, page 97)

Les interactions de polarisation Tout atome ou toute molécule est polarisable, c'est à dire que son nuage électronique peut être déformé sous l'action d'un champ électrique E extérieur. Ce champ électrique est créé par la présence des charges et dipôles permanents dans l'environnement de la particule considérée. Cette dernière présente alors un moment dipolaire induit μ_{ind} proportionnel à E : $\mu_{ind} = \alpha \mathrm{E}$, où α est la polarisabilité de la particule. Il se défini alors trois potentiels d'interaction :
L'interaction charge/dipôle induit, entre une molécule de charge Z et une molécule non-polaire (dipôle induit) de polarisabilité α :

$$U(r) = -\frac{\alpha Z^2}{2(4\pi\varepsilon_0\varepsilon_s)^2 r^4} \tag{2.38}$$

L'interaction dipôle permanent/dipôle induit, entre un dipôle permanent μ et une molécule non-polaire de polarisabilité α :

$$U(r) = -\frac{\alpha\mu^2}{(4\pi\varepsilon_0\varepsilon_s)^2 r^6} \tag{2.39}$$

Appelée interaction de Debye ou induction, c'est la deuxième composante des interactions de van der Waals (*cf.* § 2.4.4, page 97)

L'interaction dipôle induit/dipôle induit, entre tous les atomes ou molécules, y compris celles neutres et apolaire. Les molécules apolaires possèdent un moment dipolaire en moyenne nul dans le temps, mais présente un moment dipolaire fini à chaque instant, créé par la position à l'instant t des électrons en rotation autour des protons du noyau. Ce dipôle instantané génère un champ électrique capable de polariser les atomes ou molécules voisines, qui deviennent alors à leur tour des dipôles induits. Le potentiel d'interaction entre deux atomes différents, de polarisabilité α_1 et α_2, et d'énergie première d'ionisation [2] E_{i1} et E_{i2} s'écrit :

$$U(r) = -\frac{3}{2}\frac{\alpha_1\alpha_2}{(4\pi\varepsilon_0\varepsilon_s)^2 r^6}\frac{E_{i1}E_{i2}}{E_{i1}+E_{i2}} \tag{2.40}$$

Cette force est appelée force de dispersion ou force de London, et constitue la troisième et dernière composante des forces de van der Waals (*cf.* § 2.4.4, page 97)

Les interactions de van der Waals Les interactions de van der Waals caractérisent les interactions existantes entre deux entités polaires, ou polarisables. Comme nous l'avons introduit dans les paragraphes précédents les forces associées regroupent

1. les forces d'orientation, ou de Keesom (dipôle permanent/dipôle permanent)

2. énergie nécessaire pour extraire un électron à un atome

2. les forces d'induction, ou de Debye (dipôle permanent/dipôle induit)
3. les forces de dispersion, ou de London (dipôle induit/dipôle induit)

toutes variant en $1/r^6$. L'expression du potentiel de van der Waals peut donc s'écrire :

$$U_{vdw}(r) = -\frac{J_{vdw}}{r^6} = -\frac{J_{orient} + J_{ind} + J_{disp}}{r^6} \tag{2.41}$$

où J_{orient}, J_{ind}, J_{disp} peuvent être respectivement extraits des équations 2.37, 2.39, et 2.40, aussi bien pour les molécules que les atomes.

Dans le cas de deux macromolécules, l'interaction de van der Waals peut être calculée à l'aide de la théorie de Lifshitz qui considère les particules comme des milieux continus caractérisés par leur constante diélectrique statique et leur indice de réfraction. Ainsi pour deux particules sphériques de rayon R situées à une distance r l'une de l'autre, le potentiel de van der Waals s'écrit :

$$U_{vdw}(r) = -\frac{A}{12}\left[\frac{4R^2}{r^2 - 4R^2} + \frac{4R^2}{r^2} + 2ln\left(1 - \frac{4R^2}{r^2}\right)\right] \tag{2.42}$$

où A est la constante de Hamaker qui dépend des constantes diélectriques (ε) et des indices de réfraction (n) de la particule (indicés p) et du solvant (indicés s) selon l'équation :

$$A = \frac{3}{4}kT\left(\frac{\varepsilon_p - \varepsilon_s}{\varepsilon_p + \varepsilon_s}\right)^2 + \frac{3E_i}{16\sqrt{2}}\frac{(n_p^2 - n_s^2)^2}{(n_p^2 + n_s^2)^{3/2}} \tag{2.43}$$

Son premier terme correspond aux interactions de Debye et de Keesom, alors que le second tient compte des forces de dispersions. En première approximation le potentiel d'ionisation ($E_i = 12$ eV), l'indice de réfraction ($n_p = 1.519$) et la constante diélectrique ($\varepsilon_p = 2$) sont constants d'une protéine à l'autre [149], ce qui permet d'estimer la constante de Hamaker à $3k_BT$.

Les interactions solvant/colloïde Comme on le voit par la présence du facteur ε_s dans les équations 2.35 à 2.40, les interactions vont subir des modifications, souvent non négligeables, en fonction du solvant. En effet celui-ci peut moduler les propriétés de la particule comme sa charge (en fonction du pH ou de la force ionique) ou sa polarisabilité. De façon réciproque, la présence du colloïde perturbe l'organisation locale du solvant par le volume qu'il occupe d'une part, et par les forces de solvatation qu'il engendre. Dans notre étude les particules (tensioactifs, micelles, protéines) étant toujours en solvant aqueux, les principales forces exercées sont les **forces hydrophiles** (d'hydratation) et les **effets hydrophobes**. Une surface hydrophile (souvent polaire ou chargée) présente une plus grande affinité pour l'eau que pour les autres surfaces hydrophiles. Elle va donc préférentiellement s'entourer de molécules d'eau, provoquant une restructuration de celles-ci (via les liaisons hydrogène) dans la couche d'eau vicinale à la surface. Deux colloïdes

hydrophiles en solution exercent ainsi une force d'hydratation répulsive l'un envers l'autre. A l'inverse, une surface hydrophobe montre peu d'affinité pour l'eau, produisant une force attractive pour les autres surfaces hydrophobes du milieu. Par conséquent, en solution les surfaces hydrophiles se repoussent et les surfaces hydrophobes s'attirent, ces phénomènes sont à l'origine de nombreux processus naturels tels que le repliement de protéine ou la micellisation.

Modulation des interactions et de la solubilité

Les effets de sel Les sels en solution sont des espèces chargées capables d'écranter les charges de la protéine, ce qui va influer sur la force des interactions existantes, notamment via les forces de Coulomb. Pour des pH éloignés du point isoélectrique, pI, le nombre de charges des protéines augmente, induisant une plus grande répulsion entre protéines, et donc une augmentation du second coefficient du viriel. Inversement à pH proche du pI, les protéines sont faiblement chargées, les interactions coulombiennes répulsives sont plus faibles. Cependant les protéines étant très sensibles aux variations de pH, la plage où la protéine reste stable est limitée et dépend de chaque protéine.

Outre l'effet de pH, les sels jouent aussi un rôle par la force ionique qu'ils imposent. Ainsi les interactions protéine/protéine évoluent de façon continue du répulsif (à faible force ionique), à moins répulsif, ou attractif, à forte concentration en sel. Il faut toutefois noter qu'avant cette phase de "salting out", pour les faibles concentrations en sel, la plupart des protéines connaissent une courte phase de "salting in". Dans ce cas, l'ajout de sel provoque une augmentation de la solubilité des protéines qui se traduit par l'augmentation du A_2 et des interactions répulsives. La portée de l'attraction amenée par un sel est faible, et sa force est spécifique de la nature du sel (cf. figure 2.14). L'efficacité d'un anion à induire des attractions suit l'ordre direct ou inverse de la série de Hofmeister (en fonction du pH par rapport au pI de la protéine). Dans ces travaux de 1888 [150], repris par exemple par Zhang en 2006 [151], Hofmeister a classé les ions suivant leur capacité à faire précipiter les protéines en prenant pour modèle les protéines du blanc d'œuf de poule. Il a montré que l'effet déstabilisant des anions est supérieur à celui des cations suivant l'ordre :

- cations : $NH_4^+ < K^+ < Na^+ < Li^+ < Li^+ < Mg^{2+} < Ca^{2+} < CH_6N_3^+$ (Guanidinium)
- anions : $SO_4^{2-} < HPO_4^{2-} < CH_3CO_2^- < C_6H_5O_7^{3-}$ (citrate)$< F^- < Cl^- < Br^- < NO_3^- < ClO_3^- < I^- < ClO_4^- < SCN^-$

A pH<pI, la protéine porte une charge globale positive, les anions qui se lient à la protéine diminuent la charge nette de celle-ci, diminuant ainsi sa solubilité suivant l'ordre direct de la série de Hofmeister. A pH>pI la protéine est chargée négativement, l'efficacité des anions à induire la précipitation suit alors l'ordre inverse de la série de Hofmeister (figure 2.14).

L'effet de la température Lorsque l'on augmente la température la solubilité de la protéine est en général augmentée, et le diagramme de phase est décalé vers de plus grandes concentrations (cf. figure 2.14). Les protéines étant des espèces thermosensibles, cela limite la possibilité des variations de température. Il existe toutefois des conditions expérimentales pour lesquelles des protéines vont avoir un comportement inverse. C'est le cas par exemple de l'inhibiteur de trypsine pancréatique bovin (BPTI) dont le sens de l'influence de la température sur la solubilité dépend du sel utilisé. Ainsi la BPTI a pu être cristallisée à chaud [152].

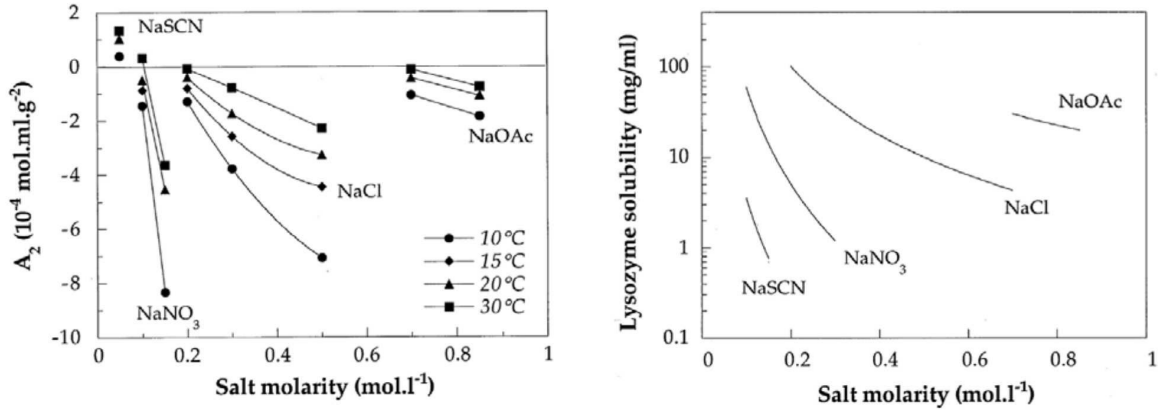


Figure 2.14 – Effet des sels et de la température. Extrait de [50]. Variation du second coefficient du viriel et de la solubilité du lysozyme en fonction du sel, de sa concentration et de la température. Le lysozyme montre, dans l'ordre, une meilleure solubilité en présence d'ions acétate, chlorure, nitrate, et thiocyanate, résultats corrélés aux mesures de A_2. Par ailleurs, plus la température est élevée, plus les valeurs de A_2 augmentent.

L'ajout de polymères non-adsorbants à une solution colloïdale produit une séparation de phase, avec une phase riche en colloïdes, et une phase riche en polymères (et pauvre en colloïdes). Ce phénomène fut décrit et commenté dès 1954 par Asakura et Oosawa [153], puis repris et expliqué par Vrij (1976) [154] et Lekkerkerker et coll. (1992) [155]. Il est le résultat de l'interaction attractive colloïde/colloïde nommée déplétion, provoquée par l'ajout de polymère. Cette force attractive à courte portée peut être expliquée d'après le modèle d'Asakura-Oosawa (figure 2.15).

En considérant une seule particule sphérique de rayon R en solution, les molécules de polymères sont réparties aléatoirement autour de sa surface exerçant sur elle une pression en moyenne nulle dans l'espace. Les molécules de polymère, considérées sphériques de rayon R_{pol}, ne pouvant pénétrer les surfaces des colloïdes, elles se situent au minimum à une distance $R+R_{pol}$ de la surface du colloïde (les centres des particules servant de références pour les distances). Le volume situé entre la surface colloïde et la sphère "fictive" de rayon $R+R_{pol}$, est appelé zone de déplétion. Si maintenant on considère deux particules en solution qui se rapprochent suite aux mouvements browniens, lorsque leurs surfaces

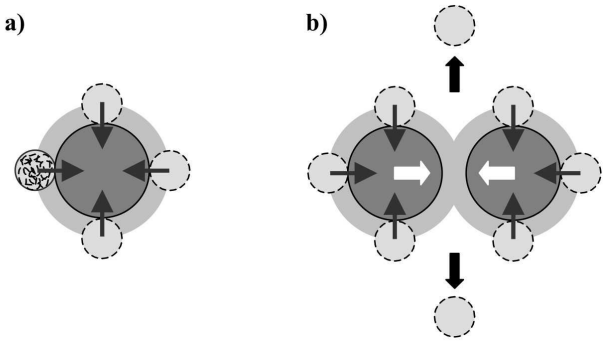


Figure 2.15 – Pression osmotique et forces de déplétion [153]. **a)** Les molécules de polymère (gris clair) sont réparties de façon homogène autour du colloïde (gris foncé). En gris intermédiaire est définie la zone de déplétion. La pression osmotique (flèches) est globalement nulle. **b)** Deux particules se sont rapprochées provoquant le recouvrement de leurs zones de déplétion. Les molécules de polymère se retrouvent expulsées de cette zone, créant un déséquilibre de pression osmotique, qui engendre une interaction attractive de déplétion (flèches blanches) entre les molécules de colloïdes.

se trouvent à une distance inférieure à R_{pol}, les zones de déplétion des deux particules se recouvrent et les molécules de polymères se retrouvent exclues de ce volume de recouvrement. Cette région présente alors une pression osmotique en polymère plus faible que le reste de la solution, ce qui engendre une interaction attractive des colloïdes : c'est la force de déplétion. Par ailleurs ce rapprochement des particules libère dans la solution un nouveau volume accessible aux polymères, qui voient leur entropie augmenter, ce qui est thermodynamiquement plus favorable.

Le modèle d'Asakura-Oosawa exprime l'interaction de déplétion de la manière suivante en fonction de r la distance entre les deux centres des colloïdes de rayon R :

$$U_{depl}(r) = \begin{cases} +\infty & \text{pour } r \leq 2R \\ -\Pi_{pol} V_{overlap}(r) & \text{pour } 2R < r \leq 2R + R_{pol} \\ 0 & \text{pour } r > 2R + 2R_{pol} \end{cases} \tag{2.44}$$

avec :

- Π_{pol} la pression osmotique exercée par les polymères sur les colloïdes, qui dépend de la concentration des polymères n_{pol} :

$$\Pi_{pol} = n_{pol} k_B T \tag{2.45}$$

- $V_{overlap}$ le volume de recouvrement des zones de déplétion, qui fait intervenir la taille du polymère R_{pol} :

$$V_{overlap}(r) = \frac{4}{3}\pi(R + R_{pol})^3 \left(1 - \frac{3r}{4(R + R_{pol})} + \frac{1}{2}\left[\frac{r}{2(R + R_{pol})}\right]^3\right) \tag{2.46}$$

En pratique les polymères inertes utilisés comme agents cristallisants sont souvent de type PEG (poly éthylène glycol). Plus leurs masses moléculaires et leurs concentrations dans la goutte de cristallisation sont élevées, plus les interactions sont attractives (figure 2.16). La déplétion est un phénomène à longue portée. En présence de plusieurs agents cristallisants, les effets de sels et de PEG ont lieu de façon synergique, sans être additifs [56].

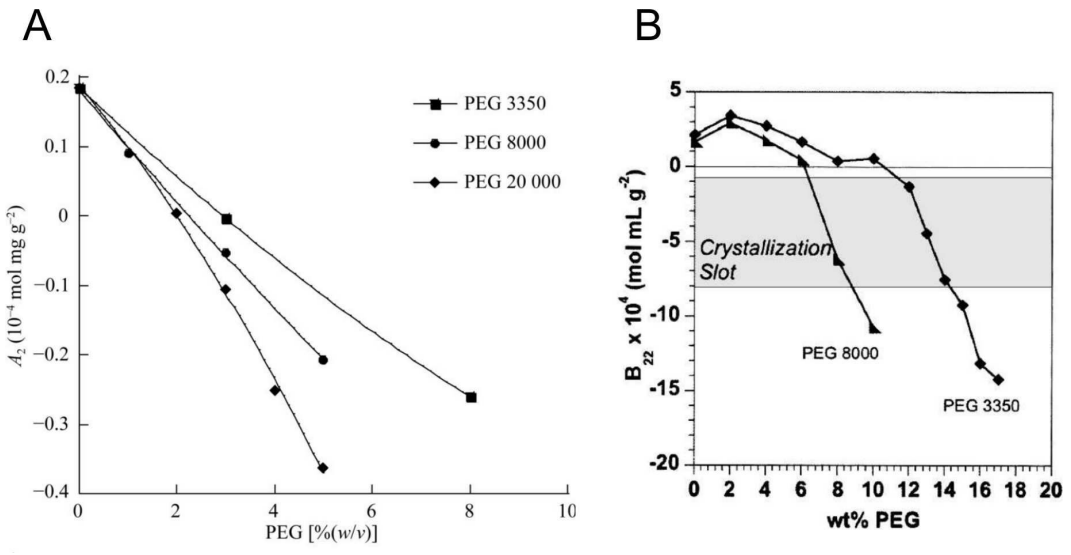


Figure 2.16 – Effet de PEG A) [156]. Évolution du second coefficient du viriel de l'urate oxidase (pH 8,5 à 20°C) en fonction de la taille du PEG (3350, 8000 ou 20000 Da), et de sa concentration. B) [157]. Évolution du second coefficient du viriel de complexe BR-OG (1,mg/mL BR, 40 mM OG, 20°C) en fonction de la taille du PEG (3350 ou 8000 Da) et de sa concentration. Plus la taille du PEG et sa concentration sont élevées, plus les valeurs de A_2 sont faibles, ce qui est caractéristique d'une plus forte attraction entre molécules de protéine.

Conclusion L'utilisation du second coefficient du viriel pour comprendre les mécanismes de cristallisation a mis en évidence que les interactions entre protéines solubles variaient en fonction du type de sel et du pH, et que les interactions attractives augmentaient avec :

- la concentration en agent cristallisant (sel ou polymère non adsorbant)
- la taille du polymère(rayon et masse molaire)
- la diminution de la température, en général.

Peu d'études portent sur le cas des protéines membranaires intégrales. Dans ces systèmes la proportion de détergent dans le complexe PDL est telle, qu'il a un rôle prédominant dans la première étape du rapprochement des complexes entre eux. Ainsi il semble important de réaliser l'étude des interactions sur les micelles libres de détergent, avant même de vouloir étudier des solutions de complexes PDL.

3 Études préliminaires à la diffusion des rayonnements

Pour pouvoir interpréter les résultats de l'étude des tensioactifs par diffusion des rayonnements, nous avons besoin de déterminer au préalable les propriétés optiques et volumétriques des composés ($\frac{dn}{dc}$, v_p). Le calcul de plusieurs paramètres intrinsèques aux molécules (nombre d'électrons, densités électroniques, etc) sera aussi utile pour la détermination de la masse des micelles, et les simulations de forme sous le logiciel SASfit.

3.1 Mesure des dn/dc par réfractométrie pour la diffusion de lumière

L'indice de réfraction n, est défini comme le rapport de la vitesse de la lumière dans le vide (c) et dans le milieu étudié (v) : n=c/v. Il résulte d'un phénomène microscopique de polarisation des atomes sous l'action d'une onde électromagnétique incidente. Plus la matière interagit avec la lumière, plus l'indice de réfraction aura une valeur supérieure à 1. L'indice de réfraction est donc directement relié à la polarisabilité de la matière, il peut d'ailleurs être aussi défini comme le rapport au carré de la permittivité diélectrique du milieu ε sur celle du vide ε_0 : $n=\left(\frac{\varepsilon}{\varepsilon_0}\right)^2$.

Pour des solutés il faut utiliser l'incrément de l'indice de réfraction, noté $\frac{dn}{dc}$ (en mL/g) défini comme la variation de l'indice de réfraction en fonction de la concentration du soluté à température constante. Sa détermination se fait par mesure de l'indice de réfraction, pour plusieurs concentrations en soluté, à température constante. L'incrément de l'indice de réfraction est notamment nécessaire pour calculer la masse moléculaire des objets en solution par la technique de diffusion statique de la lumière (cf. équation 2.7).

	DDM	PCC-malt	F_2H_9-malt	F_4H_5-malt	F_6H_2-malt
dn/dc ($mL.g^{-1}$)	0,1430 ±0,0010	0,1600 ±0,0010	0,1179 ±0,0011	0,0841 ±0,0009	0,0650 ±0,0009

Tableau 2.4 – Mesure des incréments d'indice de réfraction

3.2 Mesure des volumes partiels spécifiques par densitométrie pour le SAXS

Le volume partiel spécifique, v_p s'exprime en $cm^3.g^{-1}$, et correspond au volume occupé par le composé dans un mélange. Les volumes étant non additifs, le volume, $V_{solution}$, d'une

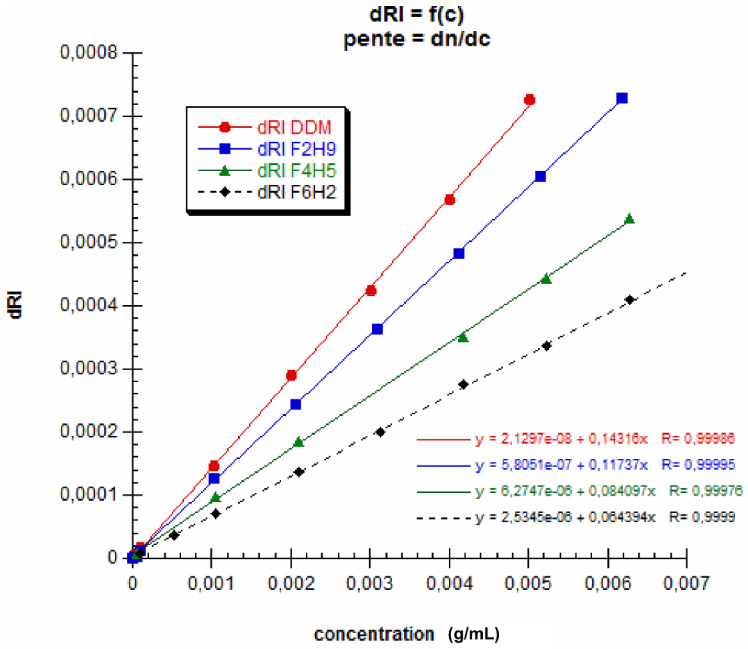


Figure 2.17 – Détermination des incréments d'indices de réfraction des tensioactifs à température ambiante

solution à N composants se calcule alors par :

$$V_{solution} = V_{solvant} + \sum_{i=1}^{N} v_{pi} m_i \tag{2.47}$$

avec $V_{solvant}$: le volume du solvant, v_{pi} et m_i : le volume partiel et la masse du $i^{ième}$ composé. Le volume partiel spécifique est nécessaire dans l'exploitation des résultats de nombreuses techniques comme l'ultracentrifugation, ou la diffusion des rayons X ou neutrons aux petits angles. Il peut être déterminé à partir de la variation de la densité d'une solution en fonction de la concentration, selon l'équation donnée dans la littérature [158] :

$$v_p = \frac{1}{\rho_{solvant}} \left(1 - \frac{\partial \rho}{\partial c}\right) \tag{2.48}$$

où $\rho_{solvant}$ est la densité du solvant, et ρ la densité de la solution, et c sa concentration en soluté. En mesurant la densité d'une solution à différentes concentrations en tensioactif, la courbe de la densité en fonction de la concentration donne une droite de pente (1- $v_p.\rho_{solvant}$) qui permet de déduire expérimentalement la valeur du volume partiel spécifique. Les mesures ont été réalisées sur le DDM, le PCC-malt, le F_2H_9-malt, et le F_4H_5-malt (figure 2.18), et les résultats sont repris dans le tableau 2.5.

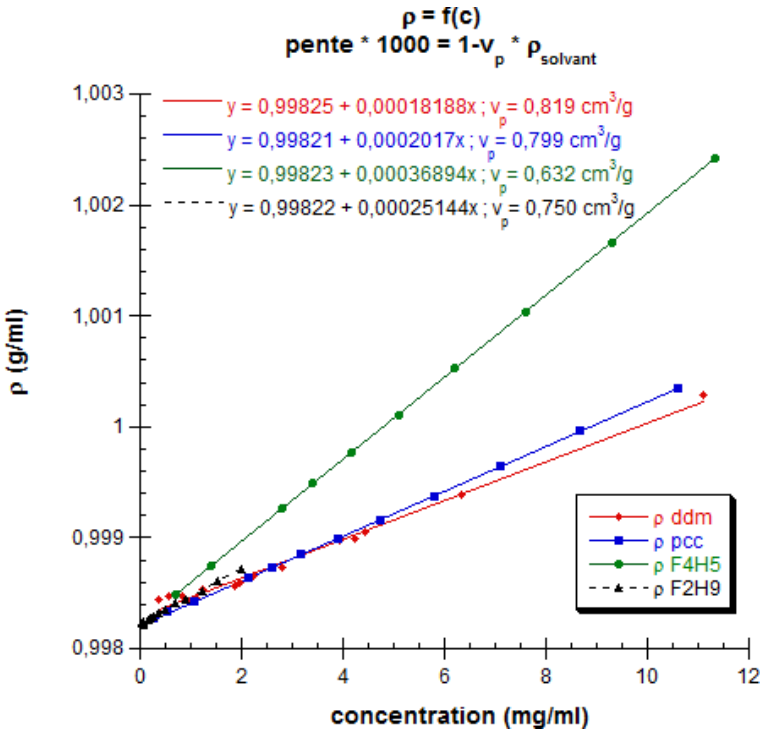


Figure 2.18 – Détermination des volumes partiels spécifiques

	DDM	PCC-malt	F_2H_9-malt	F_4H_5-malt
v_p ($mL.g^{-1}$)	0,819	0,799	0,749	0,632

Tableau 2.5 – Mesure des volumes partiels spécifiques

3.3 Calculs des densités électroniques

Le volume partiel spécifique sert à la détermination de la densité électronique dont les résultats, donnés dans le tableau 2.6, servent au calcul de la masse par SAXS. Pour les composés dont le v_p n'a pas été déterminé expérimentalement, nous avons utilisé les valeurs de volume partiel estimées par le logiciel Chemsketch.

Par ailleurs pour les simulations SASfit faites sur le DDM, le PCC-malt et le F_2H_9-malt, nous avons eu besoin d'estimer les différentes densités électroniques des micelles. Nous avons choisi pour cela de calculer séparément la densité du cœur hydrophobe et celle de la couronne hydrophile (cf. tableau 2.7). Nous avons calculé le volume d'une tête maltoside à partir du DDM en retranchant au volume moléculaire du tableau 2.6, le volume moléculaire de la chaîne hydrophobe. Celui-ci peut être calculé par l'équation $V_{chaine} = 27{,}4 + 26{,}9\ n_c$, où n_c est le nombre d'atome de carbones dans la chaîne [22]. Pour le DDM à 12 carbones, le volume de sa chaîne est de 350,2 $Å^3$, et le volume de la tête maltoside de 344,1 $Å^3$. Avec ce volume de tête, il est alors possible de déterminer le volume de la chaîne des autres composés dont nous avions mesuré le v_p.

Tensioactif	Vp cm^3/g	V_M cm^3/mole	V_m $Å^3$/molécule	Ne^- e^-	ρe^- $e^-/Å^3$
Tripode C3*	0.592	661.3	1098.5	594	0.5397
Tripode C4*	0.613	709.3	1178.2	618	0.522
Tripode C5*	0.629	757.2	1257.8	642	0.5105
F8TAC*	0.644	872.3	1448.3	704	0.486
DDM	0.819	4.180	694.3	278	0.400
PCC-malt	0.799	438.4	727.8	298	0.409
F_2H_9-malt	0.750	439.3	729.4	310	0.425
F_4H_5-malt	0.632	398.4	661.5	326	0.492
F_6H_2-malt*	0.578	397.2	659.5	350	0.531
F_6-Diglu*	0.593	521.6	866	452	0.522

Tableau 2.6 – Table des densités électroniques des tensioactifs. Vp : Volume partiel spécifique ; V_M=Vp.M_w (ou donnée Chemsckecht si *) : Volume molaire ; Vm=V_M/Na (ou donnée Chemsckecht si *) : Volume moléculaire ; Ne^- : Nombre d'électron de la molécule calculé à partir du nombre d'électrons par atomes (C $6e^-$; H $1e^-$; O $8e^-$; N $7e^-$; S $16e^-$; F $9e^-$) ; ρe^-=Ne^-/Vm : Densité électronique.

	Formule	V_M cm^3/mole	V_m $Å^3$/molécule	Ne^-	ρe^- $e^-/Å^3$
tête malt	$C_{12}H_{21}O_{11}$	207.1	344.1	181	0.526
chaîne dodécyl	$C_{12}H_{25}$	210.8	350.2	97	0.277
chaîne PCC	$C_{15}H_{27}$	231.0	383.7	117	0.305
chaîne F_2H_9	$C_{11}H_{18}F_5$	232.0	385.3	129	0.335

Tableau 2.7 – Table des densités électroniques pour une structure cœur/couronne. V_M : Volume molaire ; Vm :Volume moléculaire ; Ne^- : Nombre d'électron ; ρe^- : Densité électronique

3.4 Mesure de la taille par DLS (Rh)

Comme nous l'avons vu dans le § 2.2, la technique de diffusion dynamique de la lumière permet d'estimer le rayon hydrodynamique des objets en solution monodisperse. Nous l'avons utilisé pour mesurer la taille des micelles en solution du DDM, du PCC-malt, et des FH-malt. Pour exemple, les courbes d'auto-corrélation du DDM présentées figure 2.19, sont superposées et ont la forme globale de mono-exponentielles qui décroissent rapidement aux temps courts, signe que nous sommes en présence d'une population majoritaire homogène de particules de petite taille. Le décollement de la courbe par rapport à l'axe des abscisses en fin de décroissance indique toutefois la présence de quelques agrégats résiduels minoritaires, malgré les précautions prises lors de la préparation des échantillons (centrifugation de 2h). La mesure des tailles des micelles est cependant possible (figure 2.20). La valeur du rayon hydrodynamique obtenue pour le DDM est de 3,4 ± 0,1 nm, ce

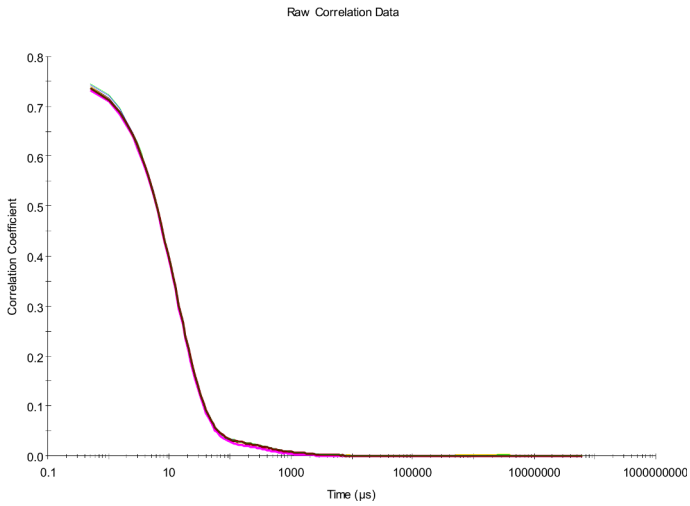


Figure 2.19 – Courbes d'auto-corrélation obtenue par diffusion dynamique de la lumière sur 8 mesures du même échantillon de DDM à 20 mg/mL

qui est en accord avec la littérature (3,42 ± 0,03 nm) [159].

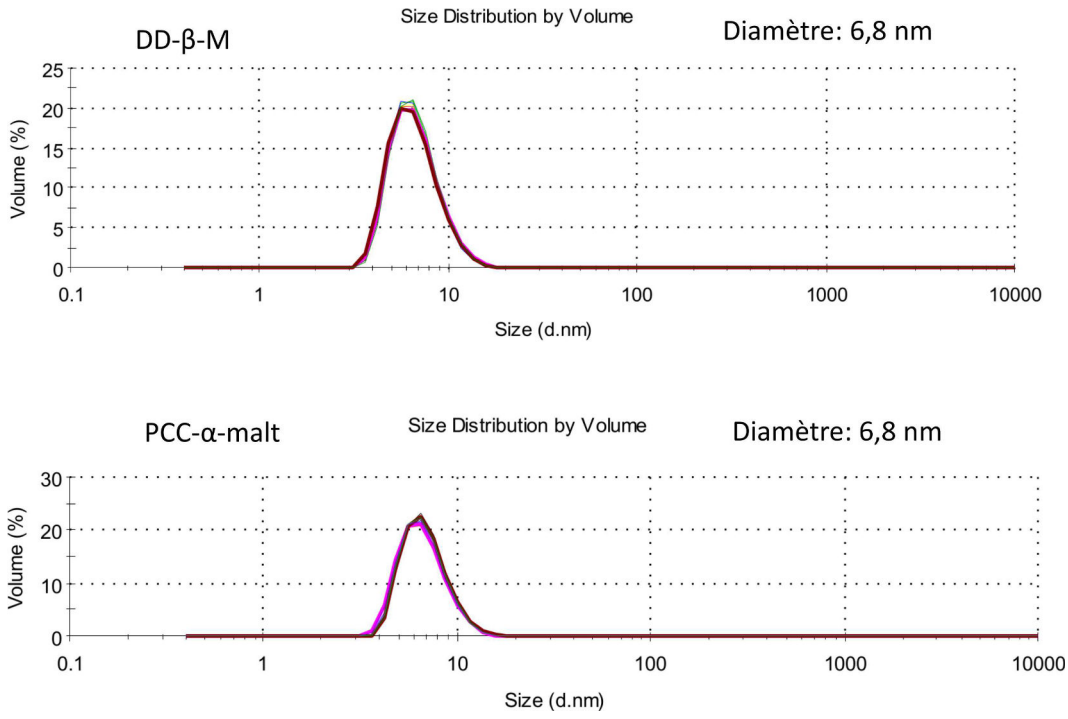


Figure 2.20 – Distribution de tailles des micelles de DDM et PCC-malt sur 8 mesures de solutions à 20 mg/mL

Pour les micelles de PCC-malt nous obtenons une taille équivalente (Rh=3,4 ± 0,2 nm), et l'étude de la famille des FH-malt montre que le F_6H_2-malt forme de grosses

micelles d'un rayon d'environ 10 nm. Le F_4H_5-malt possède des micelles d'un rayon situé entre 3,8-4,1 nm, légèrement supérieur aux micelles de DDM alors que le F_2H_9-malt forme de plus petites micelles (2,65 nm). L'ensemble des résultats de mesures du rayon hydrodynamique des micelles par rapport à la distribution de tailles en volume est donné dans le tableau 2.8

Tensioactif	Rh (nm)
DDM	3,4 ± 0,1
PCC-malt	3,4 ± 0,2
F_6H_2-malt	9,5 ± 0,3
F_4H_5-malt	4,1 ± 0,05
F_2H_9-malt	2,65 ± 0,05

Tableau 2.8 – Mesure des tailles de micelles par DLS d'après la distribution de tailles en volume, pour des solutions de tensioactif à 20 mg/mL à température ambiante

Au sein de la famille des FH-malt, la taille de la micelle augmente avec le nombre d'atomes de fluor présents sur la chaîne hydrophobe. La tête polaire maltoside étant identique entre ces composés, la présence d'une quantité variable de fluor sur la chaine influe directement sur le paramètre d'empilement, déterminant de la forme des micelles. En augmentant le volume de la chaîne par ajout de fluor, la forme du monomère passe de conique pour une chaîne aliphatique à une forme de plus en plus cylindrique. La courbure de la surface de la micelle est de moins en moins importante, la micelle présente donc un rayon hydrodynamique plus grand.

3.5 Mesure de la masse par SEC-MALLS

Cette étude a été réalisée sur le DDM et le PCC-malt. La figure 2.21 montre les profils d'élution des micelles de DDM et PCC-malt détectées en sortie de colonne par un réfractomètre, ainsi que la masse mesurée en chacun des points. Les masses des micelles ainsi estimées sont de 90±1 kDa pour le PCC-malt contre 65±3 kDa pour le DDM. Avec une masse molaire de 548,66 g/mol, pour le PCC-malt, et 510,6 g/mol pour le DDM, les nombres d'agrégation déterminés par cette technique sont de 164 pour la micelle de PCC-malt, et 127 pour celle de DDM. Nous n'avons malheureusement pas eu le temps d'étudier les composés de la famille des FH-malt par cette technique.

La diffusion de la lumière nous a donnée des indications sur la taille (Rh) et la masse des micelles des différents composés. Nous allons à présent chercher à confirmer et compléter ces informations grâce à la diffusion de RX aux petits angles par l'étude de la forme de ces

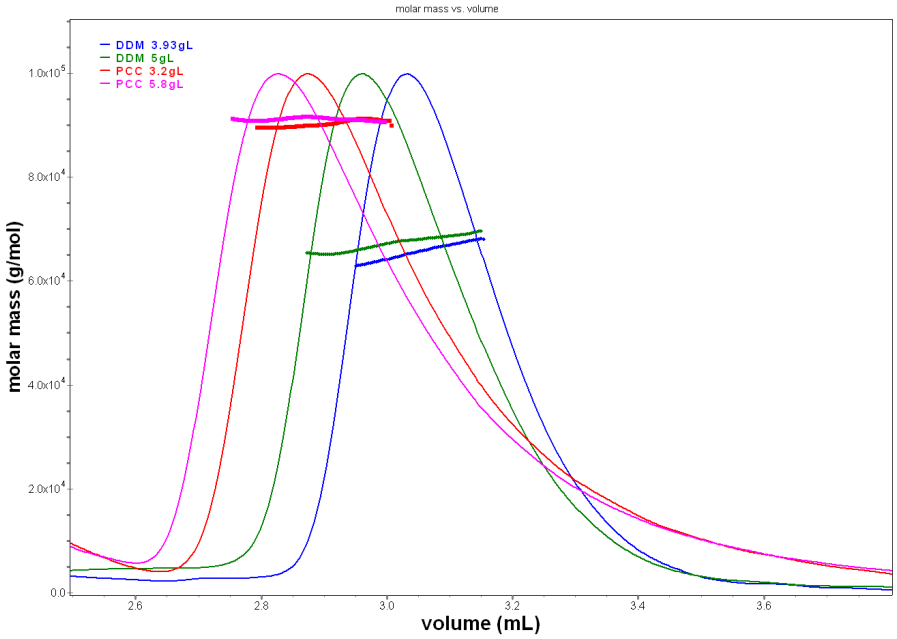


Figure 2.21 – Comparaison des tailles de micelles de PCC-malt et DDM : Profils d'élution en colonne de SEC du PCC-malt à 3,2 g/L (rouge) et 6,8 g/L (rose) et du DDM à 3,93 g/L (bleu) et 6 g/L (vert), et calcul des masses des micelles correspondantes (lignes horizontales)

assemblages en solution. Par ailleurs, en vue de l'utilisation des ces tensioactifs pour la cristallisation des protéines membranaires, nous nous intéresserons aussi aux interactions entre leurs micelles en solution puisqu'elles renseignent sur le potentiel du tensioactif à conduire à la cristallisation [67, 69].

4 Étude SAXS des micelles de tensioactifs

Les analyses SAXS ont été réalisées sur la ligne ID14eh3 de l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) à Grenoble. Elles ont été réalisées sur les quatre familles de tensioactifs retenues pour la comparaison au DDM, à savoir les tripodes, le F_8TAC, le PCC-malt et les FH-malt.

4.1 Les tripodes faciaux

4.1.1 Résultats

Les courbes SAXS des différents tripodes en fonction de leurs concentrations (figure 2.22) montrent deux comportements différents. D'un côté le C3Glu3 et le C4Glu3 présentent des courbes décroissantes monotones, dont le profil évolue en fonction de la concentration, et qui ont la particularité de se croiser en un point unique, à des valeurs intermédiaires de q. De l'autre côté le C5Glu3 montre un comportement plus "classique" avec des

courbes superposables, dans la majorité du domaine angulaire, et la présence d'un second maximum entre 2 et 3 nm^{-1}, zone qui correspond à la structure générale de la micelle en solution (le premier maximum est obtenu à q=0 nm^{-1}).

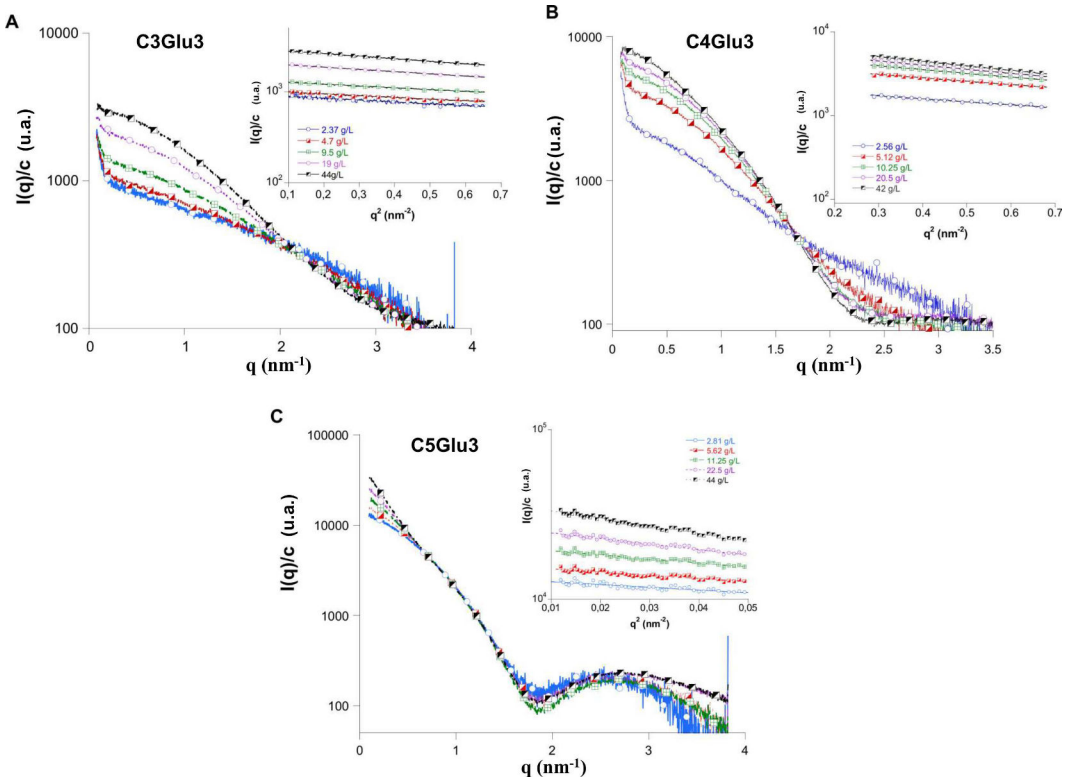


Figure 2.22 – Courbes SAXS du C3Glu3 (A), C4Glu3 (B) et C5Glu3 (C) en fonction de la concentration. Les courbes de Guinier sont données dans les inserts.

Les C3- et C4Glu3 La présence d'un point d'intersection unique des courbes SAXS est généralement caractéristique d'un équilibre entre deux espèces en solution : l'une prédominante à faible concentration, et l'autre majoritaire aux fortes concentrations. Il faut bien noter que dans ce cas, l'analyse SAXS ne permet que d'analyser une population moyenne, qui ne représente pas tout à fait la réalité puisque les solutions sont alors polydisperses. L'approximation du Guinier des C3- et C4Glu3 a donc été réalisée pour chaque concentration afin de déterminer, la masse, le rayon de giration et le nombre d'agrégation de l'agrégat "moyen" à chaque concentration. La plus faible concentration (respectivement 2,4 et 2,6 mg/mL) donne le signal d'un monomère pour le C3Glu3, et celui d'un dimère pour le C4Glu3. L'approximation du Guinier pour les concentrations supérieures montre que lors de l'ajout de tensioactifs les agrégats en solution grossissent avec la concentration, et le fait que les courbes SAXS ne soient pas superposables indique un changement net de leur forme générale. Aux plus fortes concentrations testées le C3Glu3 (44 mg/mL) est sous forme d'un trimère et le C4Glu3 (42mg/mL) sous forme d'heptamère. En calculant

mathématiquement les courbes SAXS données pour des équilibres entre un monomère et un trimère de C3Glu3 et entre un dimère et un heptamère de C4Glu3, on s'aperçoit que les courbes se superposent parfaitement aux courbes SAXS expérimentales, confirmant la probable présence d'un équilibre entre une forme monomérique et trimérique pour le C3Glu3, et dimérique (ou monomérique) et heptamérique pour le C4Glu3. Des courbes à plus fortes concentrations auraient peut être permis de voir une stabilisation du signal avec l'obtention d'une forme finale.

Le C5Glu3 Le composé C5Glu5 présente un comportement micellaire moins atypique, puisque les courbes SAXS présentent toutes la même allure, et se superposent sur la majorité du domaine des q. A la plus faible concentration (2,51 g/L), le signal enregistré lorsque q tend vers zero reste croissant, et ne tend pas vers l'horizontal, ce qui plaide en faveur d'une micelle allongée. Pour vérifier cette tendance, nous avons tracé la fonction de distribution de paire du C5Glu3 à trois concentrations (figure 2.23). Elle met en évidence une évolution de la taille de cet agrégat en fonction de la concentration en tensioactif. A 5,6 g/L sa longueur maximale est de 11 nm alors qu'elle est deux fois plus grande à 42 g/L. De tels profils de la fonction de distribution de paire P(r), sont en général obtenus en présence d'objets allongés, c'est pourquoi nous avons tracé q.I(q) en fonction de q^2 (figure 2.24). L'obtention d'une relation linéaire entre q.I(q) et $\exp(q^2)$, confirme l'aspect cylindrique (en forme de bâtonnets) de ces micelles.

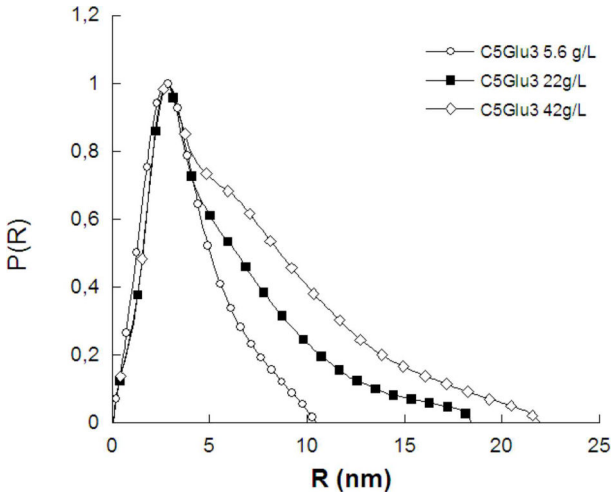


Figure 2.23 – fonction de distribution de pair du C5Glu3 à différentes concentrations

Les équations des courbes de tendance obtenues sur la figure 2.24 permettent de calculer le rayon du cylindre. Par ailleurs, en réalisant l'approximation du Guinier, le rayon de giration permet d'estimer la longueur du cylindre (L) selon L= $\sqrt{12}.R_G$, l'intensité diffusée à l'origine donne la masse (Mw) et le nombre d'agrégation (Nagg) de la micelle. Ces valeurs caractéristiques de la micelle de C5Glu3 sont répertoriées dans le tableau

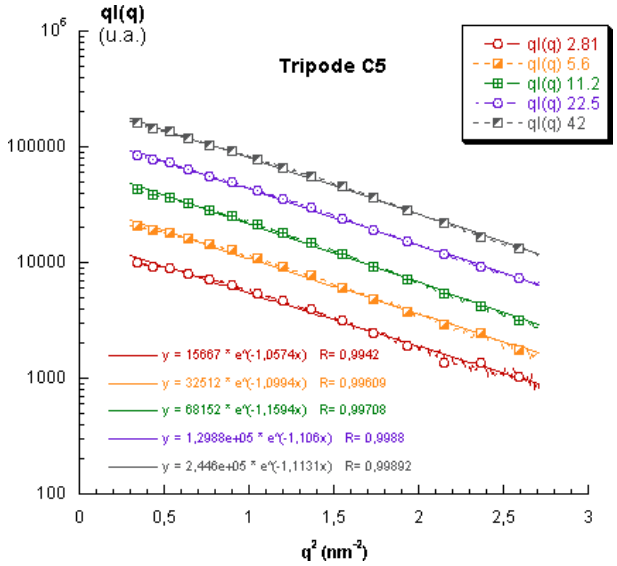


Figure 2.24 – q.I(q)=f(g^2) pour le C5Glu3. L'existence d'une relation de type exponentielle entre ces deux valeurs est caractéristique d'objets allongés de type cylindrique en solution

2.9. Ainsi il est possible de voir que la micelle cylindrique du C5Glu3 s'allonge lorsque la concentration en tensioactif augmente mais que son rayon n'évolue pas. L'évolution de la masse et de la longueur de la micelle varie linéairement avec la concentration en tensioactif, sans atteindre de plateau à la plus forte concentration testée. Il est donc possible qu'à des concentrations supérieures, la micelle de C5Glu3 continue de grossir.

Conc (g/L)	Rg (nm)	L (nm)	Rc (nm)	I(0) (u. a.)	Mw (kDa)	Nagg
2,81	3,61	12.5	1,45	13426	16,244	13
5,60	3,76	13	1,48	15997	19,355	16
11,20	4,19	14.5	1,52	20659	24,995	20
22,50	4,85	16.8	1,49	26822	32,452	27
42,00	5,67	19.6	1,49	37617	45,513	38

Tableau 2.9 – Caractéristiques de la micelle de C5Glu3 en fonction de la concentration

4.1.2 Conclusion

Les tripodes à chaînes courtes à trois carbones présentent une hydrophobie trop faible pour que les molécules puissent correctement s'associer entre elles sous forme de micelles. L'observation de la structure 3D du C3Glu3 donnée par Chemdraw (figure 2.25), laisse penser que ces chaînes très courtes ont peut être des difficultés à créer des interactions latérales. Seules des interactions ponctuelles au niveau des extrémités des chaînes

se créeraient, limitant ainsi le nombre d'agrégation du C3Glu3. La formation de ces agrégats composés de 2 ou 3 unités est thermodynamiquement favorable puisqu'elle permet d'éviter le contact entre l'eau et la face hydrophobe de l'amphiphile. Une concentration d'agrégation critique est donc mesurable en tensiométrie de surface, mais les agrégats sont à peine plus gros que le monomère. C'est probablement pour cela que le signal SAXS présente un point d'intersection des courbes aux différentes concentrations, témoin d'un possible équilibre entre deux espèces.

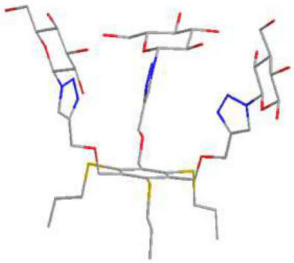


Figure 2.25 – Structure 3D du C3Glu3

L'augmentation du nombre de carbones augmente le caractère hydrophobe des tripodes comme en atteste l'abaissement des concentrations d'agrégation critique pour le C4Glu3 et C5Glu3. Les interactions hydrophobes sont facilitées et l'on observe une augmentation du nombre d'agrégation. Les interactions ne se feraient plus uniquement par l'extrémité des chaînes, mais aussi latéralement. Plusieurs molécules de tensioactif peuvent se retrouver "côte à côte" pour limiter aussi l'exposition à l'eau de la surface hydrophobe latérale. Toutefois avec le C4Glu3, les agrégats restent petits, la chaîne ne semble pas suffisamment longue pour optimiser les interactions, et avoir un agrégat dont la géométrie est bien définie. Une chaîne à cinq carbones semble être le minimum pour obtenir des interactions suffisamment importantes pour générer des agrégats de forme définie, avec un nombre d'agrégation plus important (Nagg=13 à 15 fois la concentration d'agrégation critique) que l'on peut considérer comme des micelles. Il est intéressant de remarquer que pour les tensioactifs à tête sucre, il est d'usage de considérer que la chaîne alkyle doit comporter au moins 6 ou 7 carbones, pour observer un comportement tensioactif. Finalement ce rapport est à peu près respecté dans les tripodes, puisque pour trois têtes glucose, il faut trois chaînes comportant au moins cinq carbones. Toutefois la grande différence se joue au niveau du paramètre de packing puisque dès le C5Glu3, les micelles obtenues sont cylindriques avec l'inconvénient d'avoir une taille qui évolue avec la concentration en tensioactif. Or pour obtenir des micelles stables il faut tendre vers des micelles sphériques, et donc faire varier le paramètre de packing.

La géométrie particulière des tripodes permettait d'envisager que leur paramètre de packing puisse évoluer en allongeant les longueurs de chaîne. En effet pour une seule chaîne aliphatique, le rapport V/L reste constant (0,21 nm^2) quelque soit le nombre de carbone, mais le résultat peut être différent lorsque l'on considère un composé à trois

chaînes parallèles. Des tripodes en C6, C7 et C8 ont été synthétisés par Julien Dauvergne pour augmenter les surfaces d'interaction hydrophobes, mais ces composés ont montré des solubilités faibles, qui limitent leur usage comme tensioactif. Une voie d'optimisation de ces amphiphiles faciaux seraient donc de travailler sur leur tête polaire avec deux objectifs majeurs : (i) améliorer la solubilité des ces composés, et pouvoir ainsi avoir une plus grande souplesse quant à la longueur des chaîne alkyles et (ii) diminuer le paramètre de packing, en augmentant la section de la tête, afin d'obtenir des micelles de type ellipsoïdale, plutôt que cylindrique, qui risquent moins d'évoluer avec la concentration en tensioactif.

4.2 Le F_8TAC

4.2.1 Facteur de forme

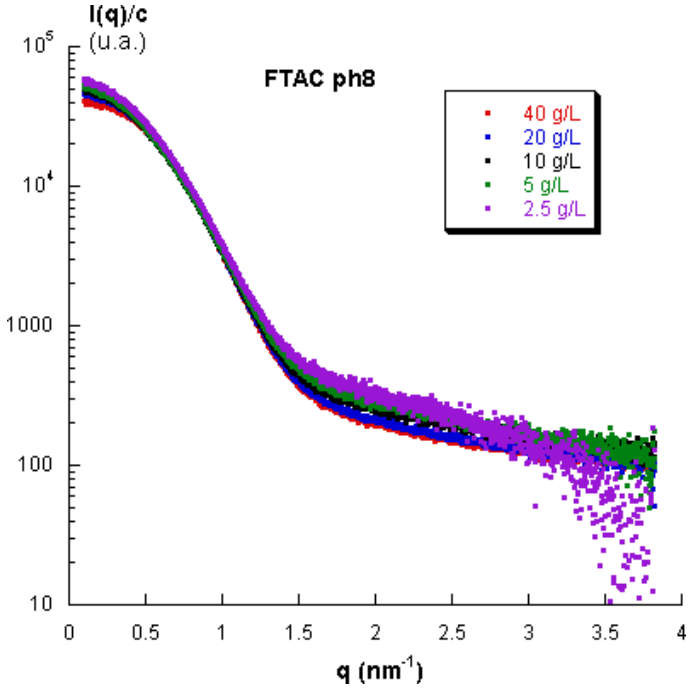


Figure 2.26 – Profils de diffusion du F8TAC en tampon Tris/HCl 20 mM pH8

La figure 2.26 présente l'intensité des rayons X aux petits angles diffusée par des solutions de F_8TAC dans un tampon Tris/HCl 20 mM pH8. Les profils de diffusion du F_8TAC sont décroissants sur tout le domaine des q, et sont relativement "plats" au niveau du domaine angulaire correspondant au facteur de forme de la micelle (1,5-2,5 nm^{-1}). L'absence de second maximum peut être le signe que l'objet présente une forme allongée plutôt que globulaire, et/ou que l'objet possède une homogénéité de contraste électronique. Nous verrons figure 2.27, que le tracé de la fonction de distribution des distances de paires confirme l'aspect globulaire de la micelle de F_8TAC, et permet d'attribuer l'origine de

l'absence de second maximum dans le profil de diffusion, à la densité électronique de ce composé.

En absence de second maximum, le signal diffusé pour q compris entre 1,5 et 2,5 nm^{-1} est tellement faible par rapport à celui du solvant, que les courbes ne s'ajustent pas exactement aux grands angles. Toutefois elles se superposent relativement bien juste avant cette zone, pour q compris entre 0,5 et 1,5 nm^{-1}, ce qui indique que la micelle est bien stable en solution, sa forme et sa taille ne dépendent pas de la concentration en F_8TAC. Aux très petits angles, lorsque q tend vers 0, il apparaît que l'intensité diffusée diminue lorsque la concentration en tensioactif diminue, ce qui est caractéristique de micelles exerçant entre elles des forces répulsives comme nous le verrons lors de l'étude des interactions.

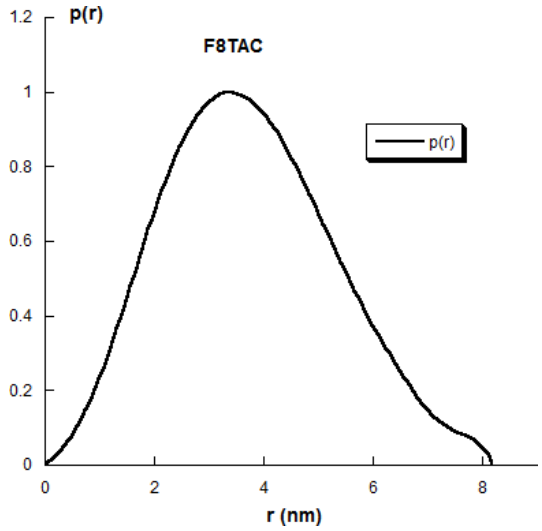


Figure 2.27 – Fonction de distribution de pair du F8TAC

La fonction de distribution des distances du F_8TAC, donnée dans la figure 2.27, montre que la longueur maximale de la micelle est de 8,2 nm. La p(r) présente un seul pic, relativement symétrique ce qui indique d'une part que la micelle de F_8TAC possède une forme globulaire (sphère ou une ellipsoïde), et d'autre part que sa densité électronique est homogène. Le contraste électronique entre le cœur hydrophobe de la micelle et sa partie polaire constituée de têtes poly THAM apparait comme étant très faible. Cette caractéristique "l'emporte" sur la forme globulaire de la micelle lors de la diffusion des RX, puisque le profil de diffusion ne présente pas de second maximum.

La micelle de F_8TAC étant homogène elle peut être modélisée par une forme globulaire uniforme ou par un modèle *ab initio*. De par la polydispersité du F_8TAC, imposant une erreur sur la détermination de sa densité électronique, nous avons préféré utiliser un modèle *ab initio* qui ne nécessite la détermination d'aucun paramètre préalable. La forme générale de la micelle de F_8TAC obtenue (figure 2.28) donne un objet de type ellipsoïdal.

Ce modèle ne permet cependant pas de déduire les dimensions de la micelle. Ceci peut être fait par l'analyse de Guinier qui donne le Rg et la masse de la micelle. Les résultats indiquent une masse de la micelle de F_8TAC à environ 73 kDa, soit un nombre d'agrégation d'un cinquantaine d'unités et un rayon de giration d'environ 2,9 nm.

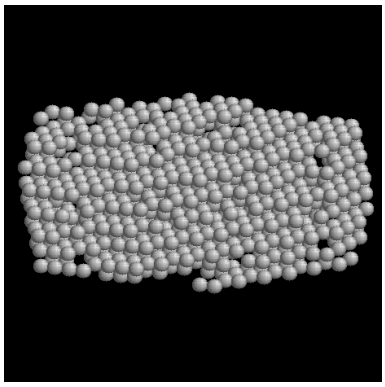


Figure 2.28 – **Modèle *ab initio* de la micelle de F_8TAC** par DAMMIN. Le résultat indique une micelle de forme ellipsoïdale.

4.2.2 Facteur de structure

Afin d'étudier les interactions entre micelles, des données de SAXS ont été collectées pour des solutions de F_8TAC à différentes concentrations et dans différentes conditions de solvant : avec ou sans sel, et avec ou sans PEG. La figure 2.29 montre l'évolution du facteur de structure de ces solutions pour trois conditions (Tris, Tris + sel, et Tris + sel + PEG). Il apparaît ainsi très clairement que le facteur de structure reste toujours inférieur à 1, et évolue en fonction de la concentration de façon similaire dans les trois cas, ce qui signifie que les micelles exercent des forces de répulsion les unes par rapport aux autres. La pente de la droite donne une valeur de A_2 de $0{,}43.10^{-4}$ mol.mL.g^{-2} pour la solution de F_8TAC en Tris, sans ajout d'agent précipitant (PEG, sel).

Les micelles de F_8TAC présentent donc la particularité d'être répulsives entre elles malgré la présence de 6% de PEG 3350. Dans les gammes de concentrations testées en agent cristallisant ($\leq$100 mM pour Nacl, et $\leq$6% pour le PEG), il n'a pas été possible d'obtenir une régime attractif, favorable à la cristallisation.

4.2.3 Conclusion

L'intérêt du F_8TAC dans le domaine des protéines membranaires n'est plus à démontrer [118–121]. Son principal inconvénient est sans doute la polydispersité de sa structure engendrée par son mode de synthèse (télomérisation radicalaire). Cependant par l'analyse SAXS nous avons pu observer que malgré la polydispersité de ses têtes polaires, le F_8TAC s'organise sous la forme de micelles ellipsoïdales oblates monodisperses, dont la

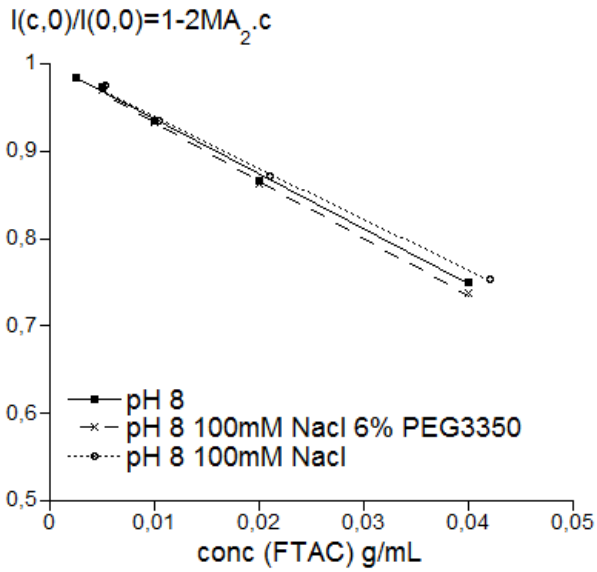


Figure 2.29 – **Évolution du facteur de structure du F_8TAC** en tampon Tris/HCl 20 mM pH8 (ligne continue), Tris/HCl 20 mM pH8, NaCl 100 mM (ligne en pointillés), Tris/HCl 20 mM pH8, NaCl 100 mM, PEG 3350 6% (ligne discontinue)

taille n'évolue pas en fonction de la concentration en tensioactifs. Leur masse est d'environ 73 kDa, et leur longueur maximale de 8,2 nm. Chaque micelle est donc composée d'un mélange de tensioactifs de différents DPn.

Au niveau des interactions, les micelles de F_8TAC sont plus répulsives que celles du DDM par exemple (A_2=0,43.10^{-4} mol.mL.g^{-2}, contre 0,28.10^{-4} mol.mL.g^{-2}). Ce qui signifie d'après la corrélation A_2/solubilité que le F_8TAC est plus soluble que le DDM, mais aussi qu'il aurait une meilleure capacité à solubiliser des protéines membranaires en solution concentrée. Il faut cependant faire attention à la lecture de ce résultat : un paramètre de A_2 positif ne préjuge en rien de la capacité du tensioactif à éviter la dénaturation de la protéine, ni de sa capacité à maintenir la protéine en solution dans le temps. Nous parlons ici du fait que pour une protéine qui ne serait pas déstabilisée par le DDM et le F_8TAC, la courbe de solubilité du complexe PDL serait plus haute (on pourrait atteindre des concentrations plus fortes) dans le cas du F_8TAC. Il est d'ailleurs connu que les protéines solubilisées en F_8TAC ont une tendance à agréger sur une échelle de temps de l'ordre de la semaine, à cause de la faible interaction de la chaîne fluorée avec la partie transmembranaire de la protéine. C'est pour éviter ce phénomène d'agrégation que les HFTAC, surfactants hémifluorés, ont été mis au point [122].

Cette aptitude à la solubilisation se retrouve lors de l'ajout de PEG, puisque le F_8TAC

oppose une forte résistance à l'effet de déplétion. Il y a deux façons d'expliquer qu'à 6% PEG les micelles de F_8TAC restent répulsives :

1. Les forces de répulsion sont si importantes que deux micelles n'arrivent jamais à se rapprocher à une distance inférieure au diamètre du PEG. Or comme nous l'avons vu, c'est en dessous de cette distance critique que se crée le volume inaccessible au PEG, qui initie l'effet de déplétion par différence de pression osmotique. Dans ce cas de figure, il aurait fallu augmenter la taille du PEG pour augmenter le volume de recouvrement des zones de déplétion (équation 2.46) et donc le potentiel de déplétion, d'après l'équation 2.44.
2. Il se crée un effet de déplétion qui partitionne le PEG d'un côté et les micelles de l'autre mais le potentiel de déplétion serait trop faible pour contrebalancer totalement les forces de répulsion des micelles qui auraient alors tendance à se disperser dès qu'elles se rapprochent. L'équilibre entre regroupement des micelles par effet de déplétion et dispersion de celles-ci par les forces répulsives serait en faveur de la dispersion. Dans ce cas, pour obtenir un effet de déplétion et atteindre un régime attractif entre micelles, il faudrait augmenter le potentiel de déplétion, c'est à dire, d'après l'équation 2.44 augmenter la taille du PEG, et/ou augmenter la concentration en PEG.

Chercher à comprendre la cause des interactions répulsives particulièrement importantes pour le F_8TAC est plus compliqué, car en l'état actuel des travaux il est impossible de dire si la répulsion caractéristique de ses micelles, vient de la structure de la tête polaire et/ou de celle de la chaîne hydrophobe fluorée.

Si on essaie de mieux analyser les phénomènes mis en jeu qui pourraient intervenir sur la répulsion du F_8TAC, on s'aperçoit qu'au niveau des têtes polaires, leur polydispersité va donner un aspect beaucoup moins uniforme de la surface de la micelle. Dans le DDM par exemple tous les tensioactifs présentent une tête maltoside de configuration identique, qui vont pouvoir s'organiser de façon très ordonnée dans la micelle. A l'inverse le F_8TAC exhibe au solvant des chaînes poly-Tris plus ou moins longues, avec une organisation très aléatoire. Ceci peut avoir une influence sur (i) les forces d'hydratation, certainement non uniforme à la surface de la micelle en fonction du DPn de chaque tensioactif de la micelle ; et sur (ii) les interactions en général puisqu'il est difficile d'imaginer que les interactions soient optimales lorsque la surface de la micelle est formée de chaînes hydrophiles poly-Tris dont la conformation peut fluctuer considérablement.

L'autre caractéristique fondamentale du F8TAC est la présence d'atomes de fluor en grande quantité dans son cœur hydrophobe. Il n'est pas exclu que cela contribue à la répulsion des micelles de tensioactifs, mais il est difficile à ce stade d'estimer dans quelle mesure le fluor peut avoir une influence sur les interactions micellaires. Le groupe de Riess a montré le caractère ambigu des chaînes perfluorées au cœur de la micelle, qui seraient capables de créer des interactions plus fortes que les chaînes hydrogénées, malgré des forces de van der Walls plus faibles [139]. L'impact du fluor sur les interactions entre

micelles n'est donc pas clair à ce jour. L'étude des interactions entre micelles de H_12TAC, analogue hydrogéné du F_8TAC permettrait sans doute de statuer sur ce point.

Toutefois l'analogie avec les liposomes "furtifs" qui sont rendus invisibles vis à vis du système immunitaire, grâce à leur surface greffée par des chaînes PEGylées, nous laisse penser que la répulsion entre micelles de F_8TAC serait due à la nature de sa tête polaire. Dans ces systèmes, les chaines PEGylées seraient responsables d'une répulsion stérique importante entre la surface du liposome et les protéines du complément, qui dominerait les forces d'attractions dues aux interactions hydrophobes et interactions de van der Waals. L'adsorption des protéines à la surface du liposome (phénomène d'opsonisation) est alors fortement limitée [160].

4.3 Deux tensioactifs au comportement similaire : le DDM (β) et le PCC-malt (α)

4.3.1 Évolution en concentration

Les courbes de diffusion des rayons X aux petits angles du DDM et du PCC-malt dans l'eau sont données dans la figure 2.30 en fonction de la concentration en tensioactif.

Dans les deux cas les courbes aux différentes concentrations se superposent sur tout le domaine angulaire, sauf aux très petits angles qui correspond à la zone où se traduisent les interactions. Les micelles sont donc stables en solution, leur forme n'évolue pas en fonction de la concentration en tensioactif. Elles présentent toutes deux, un second maximum dans le domaine des q correspondant à la forme globale de l'objet. Plus ce second maximum est décalé vers les grands angles, plus l'objet en solution est petit. La position de ce second maximum pour le DDM et le PCC-malt ne diffère que très légèrement entre les deux tensioactifs (1,51 vs. 1,57 nm^{-1}), semblant indiquer que leurs micelles présentent des micelles de tailles relativement similaires. Enfin l'évolution de la diffusion lorsque q tend vers 0 en fonction de la concentration, plus marqué pour le DDM que pour le PCC-malt, montre dans les deux cas, une diminution de l'intensité diffusée lorsque la concentration en tensioactif augmente. Ce phénomène caractérise la présence d'interactions répulsives entre les micelles en solution qui trouvent leur origine dans les forces de volumes exclus.

L'observation préliminaire des profils de diffusion des rayons X indique donc d'ores et déjà que (i) les micelles de PCC-malt et du DDM semblent avoir des tailles à peu près équivalentes, ce qui est cohérent avec les résultats de DLS montrés précédemment, et qui n'évoluent pas avec la concentration en tensioactif, et que (ii) dans l'eau, les micelles de DDM et de PCC-malt exercent entre elles des forces de type répulsif. Nous allons donc vérifier ces interprétations qualitatives en réalisant une analyse plus complète des données de SAXS pour déterminer la taille et la masse des micelles et quantifier les interactions par la détermination des A_2.

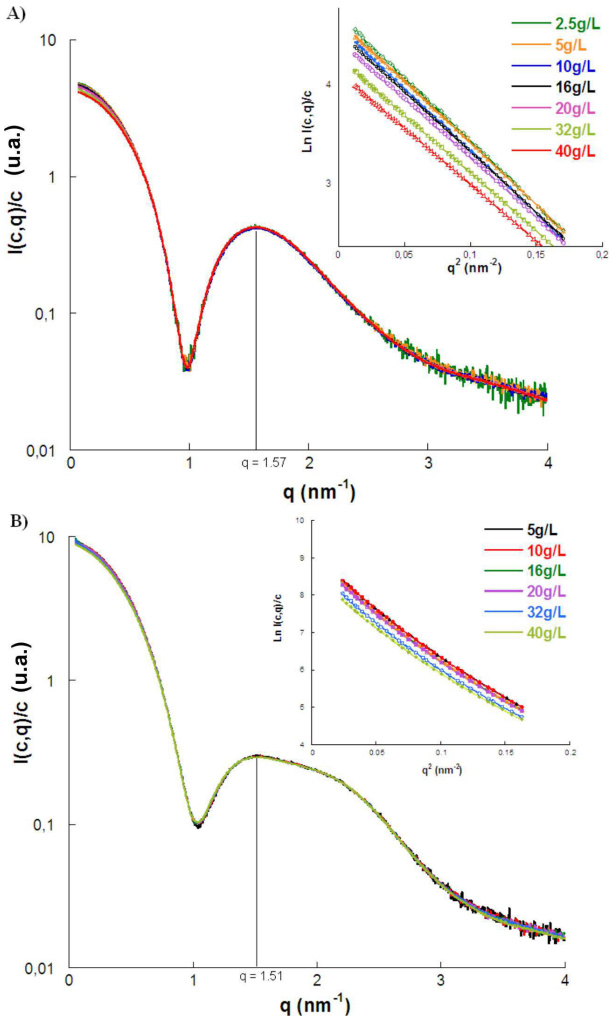


Figure 2.30 – Courbes SAXS du DDM (A) et du PCC-malt (B) dans l'eau en fonction de leurs concentrations

4.3.2 Masse et nombre d'agrégation

La masse de la micelle est estimée grâce à l'approximation du Guinier, comme expliqué au paragraphe 2.4.2, en prenant en compte une courbe de SAXS obtenue à faible concentration pour s'affranchir des interactions. Ainsi la masse de la micelle de DDM a été mesurée par SAXS à 63 ± 0.5 kDa, ce qui équivaut à un nombre d'agrégation de 124, et celle du PCC-malt à 89 ± 0.5 kDa, soit un nombre d'agrégation de 162. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus en SEC-MALLS page 108.

4.3.3 Taille des micelles (Rg, Dmax)

L'étude SAXS permet de déterminer deux longueurs caractéristiques des objets en solution : leur rayon de giration (Rg), par l'analyse du Guinier, et leur distance maximale

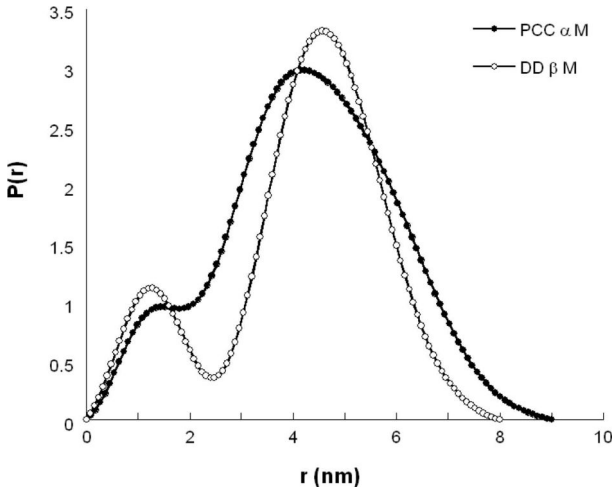


Figure 2.31 – Fonction de distribution de pair pour le DDM et le PCC-malt

(Dmax) grâce à la fonction de distribution de paires comme expliqué au paragraphe 2.4.2. Les rayons de giration trouvés sont de 3,2-3,3 nm, pour les deux tensioactifs. Les fonctions de distribution des distances de paires, données dans la figure 2.31, montrent que la micelle de PCC-malt présente une longueur maximale (Dmax) de 9 nm contre 8 nm pour la micelle de DDM. Par ailleurs il est intéressant de remarquer que ces P(r) présentent deux pics, signe que les micelles observées possèdent des compositions non homogènes. La micelle peut alors être envisagée comme un système cœur/courone, où les chaînes hydrocarbonées forment une unité appelé le cœur, et les têtes maltosides une seconde : la couronne. Les deux pics de la P(r) étant plus marqués dans le cas du DDM, le contraste électronique entre les deux "compartiments" de la micelle du DDM est plus important que pour celle du PCC-malt.

4.3.4 Les simulations SASfit

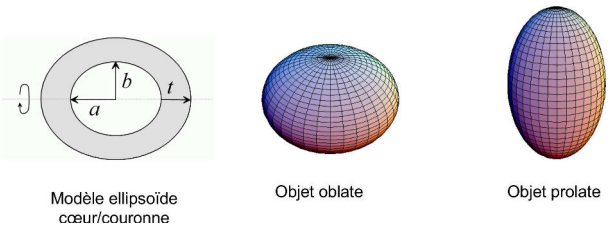


Figure 2.32 – Définition des paramètres SASfit. La figure de gauche montre les différentes longueurs, a, b et t, du modèle ellipsoïde cœur/couronne de sasfit pour un modèle en 2D. Pour le modèle triaxial, la longueur c correspond à la longueur b dans la troisième dimension. L'axe de révolution de l'ellipsoïde est selon l'axe de longueur a. Si a<b (et c) l'ellipsoïde est oblate (figure au centre), si a>b (et c) l'ellipsoïde est prolate (figure de droite). *Extrait de [161]*

La géométrie de la micelle de DDM a déjà été simulée sur logiciel de calcul, notamment par Lipfert [162], avec un modèle de type "ellipsoide cœur-couronne". Ce modèle se justifie au regard de la fonction de distributions des distances de paire du DDM. Comme le PCC-malt présente une P(r) d'allure générale similaire au DDM, nous avons choisi d'utiliser ce même modèle pour déterminer la forme de ses micelles. Nous avons toutefois réalisé ces simulations aussi bien dans un référentiel biaxial [162], que dans un référentiel triaxial [163]. En fonction du modèle bi- ou triaxial, six ou sept paramètres sont pris en compte pour le calcul de la courbe SAXS. Trois d'entre eux concernent les densités électroniques des différentes parties : le cœur, la couronne et le solvant (dans notre cas il s'agit de l'eau, la densité électronique du solvant peut donc être fixée à 0,334 e^-/cm^3). Les autres paramètres correspondent aux différentes distances de la micelle comme schématisé dans la figure 2.32. Dans le cas du modèle triaxial il y a une distance supplémentaire correspondant à b (notée c) dans la troisième dimension.

Avant de commencer les simulations nous avons choisi de poser l'hypothèse de l'absence de molécule d'eau au sein du cœur hydrophobe de la micelle en fixant dans un premier temps sa densité électronique à la valeur déterminée par le calcul dans le tableau 2.7. La densité électronique de la couronne a quant à elle été laissée libre pour tenir compte de l'éventuelle hydratation des têtes polaires. Une fois les distances et la densité électronique de la couronne déterminées, nous avons laissé libre la densité électronique du cœur pour affiner l'ajustement des courbes théorique et expérimentale, ce qui n'a pas modifié grandement sa valeur. Les simulations des micelles du PCC-malt et du DDM obtenues pour les modèles bi- et triaxial sont données figure 2.33.

Pour les deux tensioactifs, les modèles biaxiaux permettent d'obtenir des courbes théoriques relativement bien ajustées aux courbes expérimentales et nous retrouvons bien des paramètres équivalents à ceux qui ont été publiés pour le DDM [162]. Cependant l'emploi du modèle triaxial permet dans les deux cas un meilleur ajustement de la courbe théorique dans le domaine des très petits angles. Or c'est dans ce domaine angulaire qu'est contenue l'information sur la masse de l'objet (obtenue grâce à I(0,0)), propriété dont dépendent forcément les paramètres de taille de la micelle. Par ailleurs ce modèle impose moins de symétrie à la micelle (dans le modèle 2D, b=c), ce qui semble plus correct pour représenter une micelle qui est un système dynamique. Ces deux raisons nous font préférer l'usage du modèle triaxial pour caractériser la structure des micelles de DDM et de PCC-malt avec les paramètres recensés dans le tableau 2.10. Il faut toutefois noter à ce stade, que l'ajustement des simulations sur les courbes expérimentales, et donc la précision des résultats est de meilleure qualité pour le DDM que pour le PCC-malt.

Les premiers chiffres du tableau donnent les densités électroniques estimées du cœur et de la couronne. Les résultats sont cohérents avec les fonctions de distribution de paire obtenues puisque la différence de densité électronique entre le cœur et la couronne est moins importante pour le PCC-malt que pour le DDM ($\Delta\rho$=0,133 $e^-/Å^3$ contre 0,169), ce qui pourrait être à l'origine de l'allure plus "lissée" de la P(r) du PCC-malt.

Les différentes longueurs données peuvent être utilisées pour calculer les volumes du

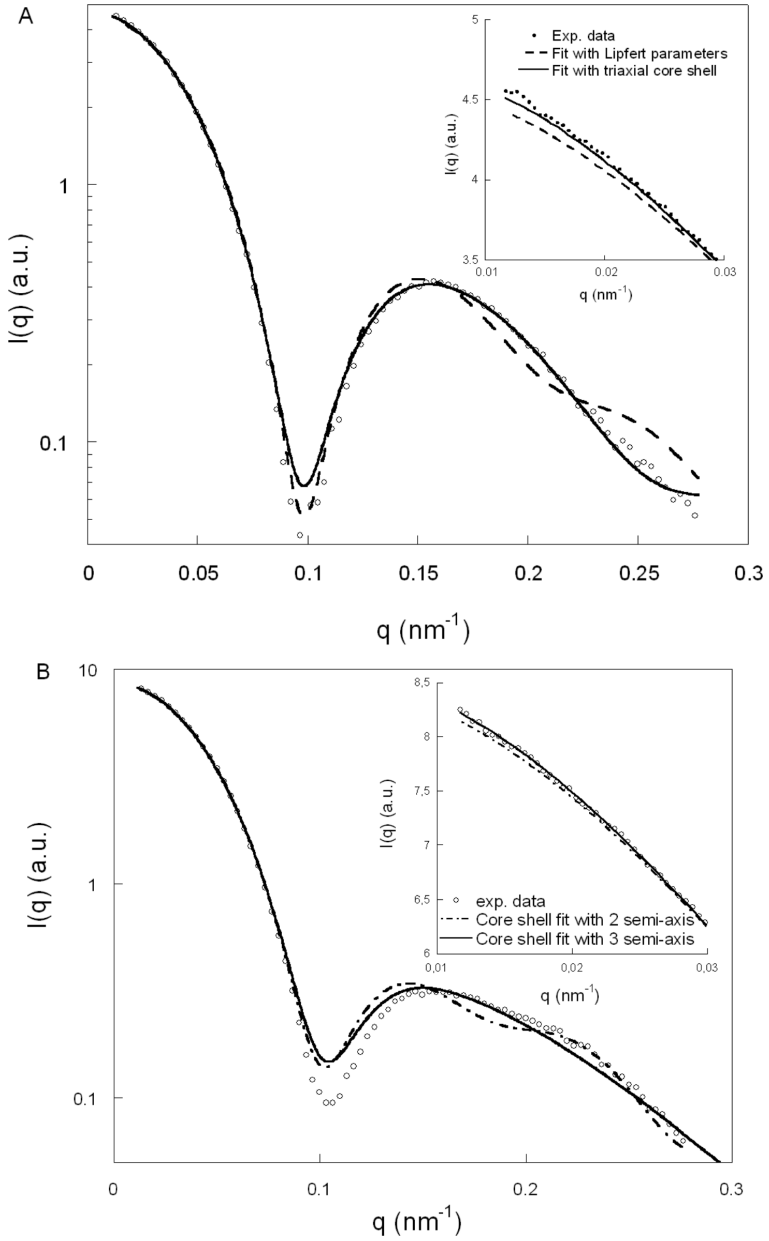


Figure 2.33 – **Simulations SASfit** du DDM (A) et du PCC-malt (B)

Tensioactif	Forme	$\rho_{couronne}$ $e^-/Å^3$	ρ_{coeur} $e^-/Å^3$	a Å	b Å	c Å	t Å	V_{coeur} $Å^3$	V_{total} $Å^3$
DDM	Oblate	0,446	0,277	15,26	22,02	34,08	8,35	47968	127439
PCC-malt	Oblate	0,438	0,305	13,98	25,93	37,55	8,27	57017	146049

Tableau 2.10 – **Résultats des simulations SASfit 3D pour le DDM et le PCC-malt**

cœur et de la couronne de la micelle et ainsi remonter à une estimation du nombre d'agrégation. Le volume du cœur hydrophobe est déterminé par le calcul du volume d'une ellipsoïde ($V_{coeur}=\frac{4}{3}\pi abc$). En divisant ce volume de cœur par le volume d'une chaîne hydrophobe du tensioactif, il est possible d'obtenir une estimation du nombre d'agrégation de la micelle ($Nagg=\frac{V_{coeur}}{V_{chaine}}$).

Ainsi avec les volumes de chaîne estimés dans le tableau 2.7, les simulations SASfit donnent un nombre d'agrégation de 137 pour la micelle de DDM, et de 151 pour la micelle de PCC-malt. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles obtenues par l'analyse du Guinier ce qui tend à valider les résultats de cette simulation sous SASfit.

Il est alors possible de calculer le volume de la couronne par soustraction du volume du cœur au volume total de l'ellipsoïde, avec $V_{total}=\frac{4}{3}\pi(a+t)(b+t)(c+t)$, pour estimer l'hydratation de ces micelles. En effet la volume de la couronne correspond à Nagg fois le volume d'un motif maltose (344,1 Å^3), auquel s'ajoute le volume des molécules d'eau contenues dans la couche d'hydratation. Sachant qu'une molécule d'eau a un volume de 29,9 Å^3, les caractéristiques structurales obtenues par SASfit pour le PCC-malt et le DDM indiquent une hydratation de 9 molécules d'eau par tête maltoside pour le DDM, et 8 pour le PCC-malt. Ce résultat pour le DDM est en accord avec la littérature et la différence de conformation anomérique entre le DDM et le PCC-malt peut être à l'origine de la différence de leur taux d'hydratation de la tête polaire, comme c'est le cas entre le DDM α et le DDM β [164].

Nous l'avons évoqué lors de l'observation préliminaire des courbes SAXS de la figure 2.30, la décroissance de l'intensité diffusée à l'origine du domaine angulaire, est le signe de la présence d'interactions répulsives entre les micelles pour le DDM et le PCC-malt. Celles-ci peuvent être comparées et quantifiées par le second coefficient du viriel A_2.

Influence du PEG Tout d'abord en analysant les valeurs de A_2 du DDM et du PCC-malt dans l'eau (0,28 .10^{-4} mol.mL.g^{-2} contre 0,11.10^{-4} mol.mL.g^{-2}), il apparaît que le DDM présente une plus grande capacité que le PCC-malt à augmenter la solubilité du complexe PDL. Ce surplus d'attraction du PCC-malt par rapport au DDM, se retrouve aussi lors de l'ajout de PEG (figure 2.34). Ces mesures ont été réalisées dans un tampon Tris pour se placer dans des conditions similaires à celles des solutions de complexes de RC-LH1-puf X.

Comme dans l'eau (cf. figure 2.30), les micelles de DDM et de PCC-malt en Tris (figure 2.32) exercent entres elles des forces répulsives. Les A_2 mesurés sont positifs et en moyenne de 0,25.10^{-4} mol.mL.g^{-2} pour le DDM et 0,10.10^{-4} mol.mL.g^{-2} pour le PCC-malt. Ces interactions répulsives sont la conséquence des forces de volume exclu. En revanche en présence de PEG, le A_2 change de signe, le système passe en régime attractif. Pour les deux tensioactifs, plus la quantité de PEG augmente, et plus le A_2 devient négatif, signe que l'attraction s'intensifie. Ce phénomène, déjà observé sur des micelles de détergent est dû à l'effet de déplétion induit par la présence de PEG [68, 165].

Les courbes d'évolution des A_2 du DDM et du PCC-malt sont globalement parallèles.

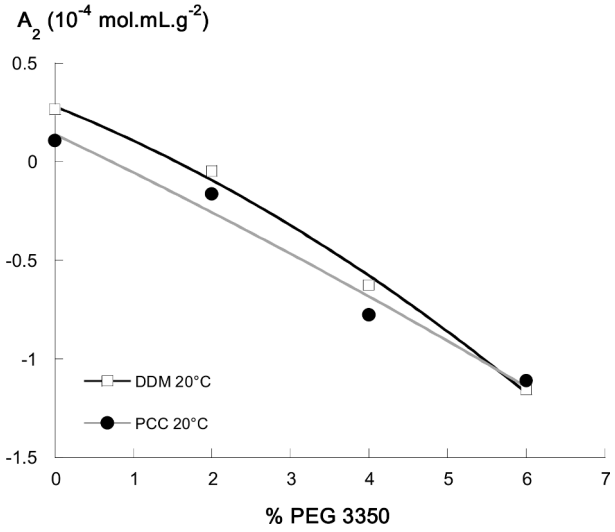


Figure 2.34 – Second coefficient du viriel des micelles de DDM et de PCC-malt en fonction de la concentration en PEG 3350. Les mesures ont été réalisées en tampon Tris/HCl 20 mM pH8, conformément aux conditions d'élution du complexe protéique RC-LH1-pufX

Le PCC-malt est donc plus attractif que le DDM, mais ce surplus d'attraction n'est pas amplifié avec l'augmentation de l'effet de déplétion (lors de l'augmentation de la concentration en PEG). Ces deux tensioactifs, possèdent donc des propriétés relativement similaires, mais le DDM permettra la solubilisation d'une plus grande quantité de complexes PDL, alors que le PCC-malt induira plus facilement la cristallisation. La cristallogénèse en présence de PCC-malt devrait donc pouvoir être initiée avec des concentrations plus faibles en PEG.

Cette modification de l'interaction entre les micelles de DDM et le PCC-malt, provient d'une modification des forces de van der Waals, via la constante de Hamaker et l'indice de réfraction (équation 2.43). L'augmentation de l'indice de réfraction ($\frac{dn}{dc}|_{PCC} > \frac{dn}{dc}|_{DDM}$), induit une augmentation de la constante de Hamaker, et donc une augmentation des forces de van der Waals entre les micelles de PCC-malt.

Influence du tampon Le tampon est un autre paramètre pouvant moduler les interactions entre complexes protéiques dans le cadre de la cristallisation. C'est pourquoi nous avons testé trois milieux choisis en fonction des conditions de cristallisation du complexe RC-LH1-pufX sur les micelles de DDM et de PCC-malt : en tampon Tris/HCl 20 mM pH8, en tampon Tris/HCl 20 mM pH10 et dans l'eau. Ces changements n'ont provoqué aucun changement sur la valeur du A_2 du DDM et du PCC-malt, comme le montre la figure 2.35.

Ce résultat est logique si l'on se réfère au cas des protéines solubles où l'influence du pH et du tampon est expliquée par un changement des interactions répulsives coulombiennes.

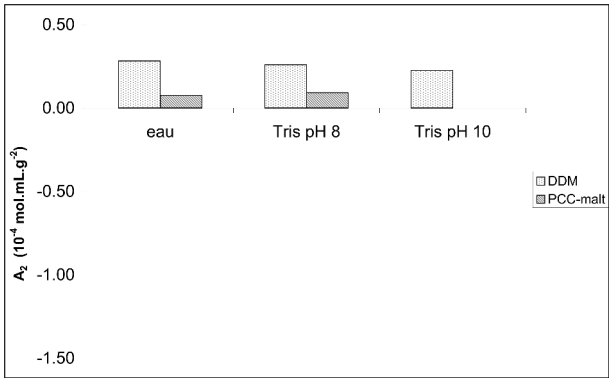


Figure 2.35 – Influence du tampon sur le A_2 de la micelle de DDM et du PCC-malt. A gauche : dans l'eau. Milieu : en tampon Tris/HCl 20 mM pH8. A droite : en tampon Tris/HCl 20 mM pH10. Le graphique est tracé avec la même échelle que le graphique montrant l'influence du PEG, pour mieux estimer les variations significatives de A_2

Ce phénomène peut être causé soit par (i) une baisse de la charge nette de la protéine, lorsque le pH se rapproche du pI, ou que les sels écrantent les charges, soit par (ii) une augmentation de sa charge nette lorsque des ions se lient à la protéine à proximité du pI [61]. Or les tensioactifs que nous étudions ici sont non ioniques, les micelles non chargées n'exercent entres elle pas de forces coulombiennes, et il est donc normal de ne pas observer de variation d'interaction (et donc de A_2) lors du changement de pH. Ce résultat pourrait être en revanche être différent sur l'étude de complexes PDL puisque le domaine extramembranaire de la protéine se retrouve hors de la bouée, au contact du solvant. Si les résidus d'acides aminés qui le composent sont chargés, les interactions entre complexes PDL auront une composante de type électrostatique, et des modifications d'interactions, par variation de pH ou de sel, pourront être remarquées.

Influence du sel sur le DDM Le sel est un autre composé utilisé comme agent de cristallisation, qui est capable de modifier le A_2 des protéines et des micelles de détergents. Nous avons testé son influence sur les interactions entre micelles de DDM, cependant aucune évolution significative du A_2 n'a été obtenue sur la gamme de concentration testée, comme le montre la figure 2.36.

Comme le pH, le sel impacte les interactions via une modification des charges locales de la macromolécule (forces de Coulomb), mais il possède aussi une influence sur les forces d'hydratation. Il est probable que les concentrations testées de NaCl (de 0 à 500 mM) n'aient pas été suffisantes pour modifier l'hydratation des micelles de PCC-malt et de DDM. En effet ce phénomène de déshydratation de micelles par l'ajout de sel a déjà été observé sur les tensioactifs à têtes sucre, avec l'octyl-glucoside [163]. Le groupe du Pr Zemb a montré que cette déshydratation se passerait en trois temps. Pour les faibles forces ioniques (<1M de sel) aucun effet de déshydratation de têtes glucosides n'est détectable. Pour une concentration comprise entre 1 et 1,3 M les micelles subissent un effet de salting-

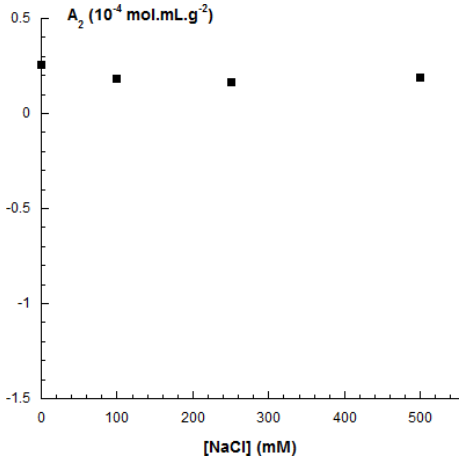


Figure 2.36 – Influence de la variation en sel sur le A_2 de la micelle de DDM Le graphique est tracé avec la même échelle que le graphique montrant l'influence du PEG, pour mieux estimer les variations significatives de A_2

in (augmentation de leur solubilité), et pour des concentrations supérieures à 1,8M se produit un effet de salting-out causé par la diminution importante de l'hydratation des têtes polaires de la micelle. Leurs résultats confirment qu'en limitant notre étude à des faibles concentrations en sel, nous serions restés à des forces ioniques trop faibles pour que la micelle des maltosides perçoivent des changements d'hydratation.

4.3.5 Conclusion sur la relation structure/propriétés physico-chimiques

Les mesures de tailles des micelles du DDM et PCC malt indiquent que leurs micelles présentent des rayons de giration et des rayons hydrodynamiques identiques (Rg=3,2-3,3 nm et Rh=3,4 nm). La forme générale et la taille des deux micelles sont relativement similaires, même si la micelle de PCC-malt présente une longueur maximale légèrement plus grande que le DDM (Dmax=9 nm pour le PCC-malt contre 8 nm pour le DDM).

Maintenant si l'on regarde les masses et les nombres d'agrégation de ces micelles, la première chose à dire est que, pour le DDM, il y a bien concordance entre les nombres d'agrégation de la littérature où le nombre d'agrégation du DDM est donné entre 110 et 140 [25, 166] et ceux que nous avons déterminés par trois méthodes différentes : l'approximation du Guinier (Nagg=124), la mesure SEC-MALS (Nagg=127), et la simulation sur SASfit (Nagg=137). Pour le PCC-malt, nous obtenons une légère variation du nombre d'agrégation en fonction de la méthode utilisée : 162 par l'approximation du Guinier, 164 par mesure SEC-MALS et 151 pour la simulation SASfit. Ces résultats restent toutefois du même ordre de grandeur, et cohérents lorsqu'on regarde la variation du nombre d'agrégation donnée dans la littérature pour le DDM. La qualité de l'ajustement SASfit laisse toutefois penser que la valeur à 151 est sans doute la moins précise des trois estimations. Les deux autres mesures ont été obtenues à partir de la mesure de la masse

de la micelle, qui a été très reproductive entre la détermination par SAXS (90kDa) et celle par SEC-MALS (91 kDa). La micelle de PCC-malt présente donc une masse et un nombre d'agrégation plus importants que la micelle de DDM, estimée à 65 et 63 kDa par, respectivement, SEC-MALLS et SAXS.

La micelle de PCC-malt serait donc plus dense que celle de DDM. Cette compacité accrue peut trouver son origine dans deux phénomènes puisqu'elle contient un plus grand nombre de molécules de tensioactifs (nombre d'agrégation plus grand) pour une taille de micelle équivalente. Comme ils possèdent tous les deux une tête maltoside, cette différence est la conséquence directe de leur partie hydrophobe : soit par leur différence de position, imposée par l'anomérie du sucre (α pour le PCC-malt, et β pour le DDM), soit par leur différence de rigidité.

Une première hypothèse serait que l'anomérie α du PCC-malt permette un empilement plus resserré des tensioactifs dans la micelle avec une meilleure interaction des chaînes hydrophobes entre elles, par rapport à l'anomérie β du DDM. Une seconde hypothèse serait que la présence du groupement bicyclohexyl sur la chaîne hydrophobe du PCC-malt, rende cette chaîne moins fluide qu'une chaîne aliphatique classique et force le système a être plus organisé. Les chaînes ayant moins de degrés de liberté adoptent toutes la même orientation préférentielle dans la micelle, contrairement aux chaînes alkyles qui gardent la libre rotation de leurs liaisons σ. Dans la micelle de DDM il y aurait donc un mélange de chaînes aliphatiques possédant plusieurs conformations possibles (alignées et "coudées") ce qui limiterait la compacité de l'agrégat. Prochainement, les interactions des micelles de DDM α vont donc être analysées par SAXS, pour déterminer la part de l'influence de la position anomérique α du PCC-malt, par rapport à celle de la rigidité de sa chaîne.

Dans les deux hypothèses, le résultat est l'obtention d'une micelle de PCC-malt où l'empilement des surfactants est plus ordonné, ce qui permet d'accroître les interactions de van der Waals entre les chaînes (dues à l'effet hydrophobe). Ainsi dans la micelle l'agencement des tensioactifs les uns par rapport aux autres serait en quelque sorte optimisé. Une autre façon d'aborder ce résultat serait de regarder la dynamique de ces systèmes. Le PCC-malt plus rigide s'échange moins vite que le DDM, les interactions créées entre les tensioactifs sont plus importantes. Alors que dans le cas du DDM les échanges fréquents et rapides des molécules de DDM avec le milieu extérieur semblent "gonfler" la micelle.

Les interactions Bien que le DDM et le PCC-malt possèdent la même tête polaire, l'interaction entre leurs micelles diffèrent légèrement. Ce résultat indique que les interactions entre micelles, mais aussi la déplétion, ne sont pas uniquement des phénomènes de surface. Alors qu'elles exhibent aussi des têtes maltoside au solvant, les micelles de PCC-malt sont plus attractives que celles du DDM. Ces forces d'interaction sont influencées par l'ensemble de la structure de la micelle, y compris son cœur hydrophobe. Il devient donc indispensable, lors du développement de nouveaux amphiphiles, de réfléchir au design de la partie hydrophobe en terme d'interactions et non plus uniquement en fonction de son caractère non déstabilisant vis à vis de la protéine. Cela requiert de réaliser à l'avenir

un nombre important d'études qui permettrait de mieux comprendre la contribution des chaînes hydrophobes, dans les interactions entre micelles de tensioactif. En ce qui concerne le PCC-malt et le DDM, ce supplément d'attraction du PCC-malt pourrait trouver son origine dans le caractère plus dense de sa micelle.

4.4 Les FH-malt

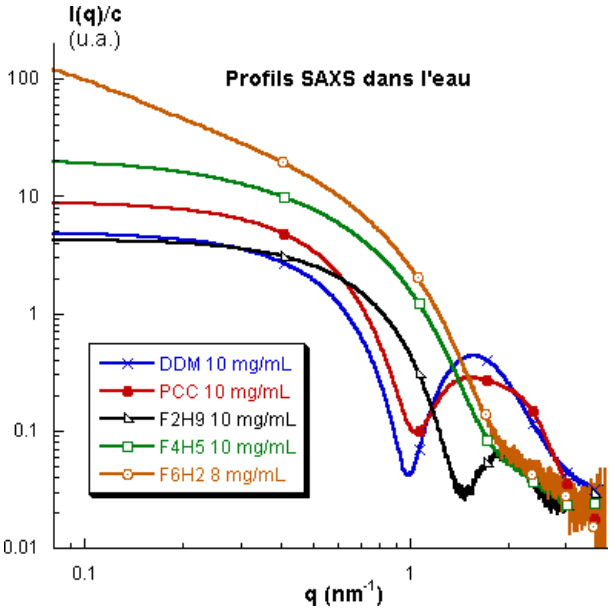


Figure 2.37 – Profils SAXS des différents tensioactifs dans l'eau

La figure 4.12 montre les profils de diffusion des FH-malt à des concentrations proches de 10 mg/mL dans l'eau en comparaison de ceux du DDM et du PCC-malt. Les courbes sont normalisées par rapport à la concentration et à l'énergie du faisceau de rayon X afin de pouvoir les comparer. L'intensité diffusée à l'origine est un indicateur de la masse des micelles, il apparait ainsi clairement que le F_2H_9-malt constitue des micelles plus légères que le DDM et le PCC-malt, alors que les F_4H_5-malt et F_6H_2-malt s'organisent sous la forme de plus gros assemblages, avec toutefois une remontée aux petits angles pour le F_6H_2-malt certainement accentué par la présence d'agrégats de plus grandes tailles en plus des micelles. La masse plus faible de la micelle de F_2H_9-malt est cohérente avec le décalage du second maximum de sa courbe de diffusion aux grands angles, qui indique une micelle de forme globulaire et de taille inférieure à celles du DDM et du PCC-malt. La faible intensité de ce second maximum, est liée à la faible différence de contraste électronique de la micelle, puisque la tangente à l'origine de la courbe SAXS du F_2H_9-malt est horizontale, prouvant l'aspect sphérique de sa micelle. Cette diminution de contraste électronique par rapport à la micelle de DDM pourrait être dû à la présence de fluor dans le cœur hydrophobe, ce qui expliquerait pourquoi les composés contenant plus de

fluor (F_4H_5-malt, F_6H_6-malt mais aussi le F_8TAC) ne présentent pas de second maximum. Pour le F_4H_5-malt et le F_6H_2-malt, cette contribution des atomes de fluor à l'absence de second maximum, s'ajouterait à l'aspect allongé, plutôt cylindrique, de leurs micelles qui se dessine dans la pente de l'intensité à l'origine. Nous allons à présent réaliser l'étude plus approfondie des données SAXS pour chacun des tensioactifs de la famille des FH-malt, car leurs micelles montrent des formes et des comportements différents. Pour une meilleure comparaison des résultats les courbes de diffusions et les fonctions de distribution des distances pour le F_2H_9-malt, le F_6H_2-malt et le F_4H_5-malt ont toutes été regroupées sur la figure 2.38, et sont commentées dans le paragraphe suivant.

4.4.1 Étude du F_2H_9-malt

L'évolution des profils de diffusion du F_2H_9-malt en fonction de sa concentration (figure 2.38, page 131, en haut à gauche) montre qu'au dessus de 8 mg/mL toutes les courbes de diffusion sont parfaitement superposables sur toute la fenêtre angulaire.

En dessous de 8 mg/ml en revanche le signal de l'intensité diffusée diminue abruptement aux petits angles, et est plus bruité pour q>1,3 mm^{-1}, mais il semble, tout de même, se dessiner un second maximum entre 1,5 et 2 nm^{-1}. Le fait que les courbes à 2 et 4 mg/mL, correspondant respectivement à 3,2 et 6,4 fois la CMC, ne se superposent pas à celles des concentrations plus élevées pourrait alors être attribué à la contribution des tensioactifs libres en solution. Problème que nous ne rencontrions pas avec les tensioactifs précédents (DDM, PCC-malt, et F_8TAC) donc la CMC est très basse. Une autre explication pourrait être la mise en évidence d'une instabilité de la micelle aux petites concentrations, avec la formation de petites micelles qui grossiraient en fonction de la concentration, jusqu'à ce qu'elles atteignent une valeur seuil (située entre 4 et 8 mg/mL) au delà de laquelle leur taille n'évoluerait plus. Aucune donnée ne nous permet d'éliminer cette possibilité mais il n'existe dans la littérature que peu d'études SAXS de tensioactifs dont les micelles évoluent avec la concentration. Et à notre connaissance, aucune ne fait référence à des micelles globulaires qui grossiraient en fonction de la concentration pour se stabiliser sous une forme elle aussi globulaire.

Quoi qu'il en soit le F_2H_9-malt forme une micelle stable au moins à partir de 8 mg/mL (soit 12,7 fois la CMC), que nous avons étudié plus en détail. La fonction de distribution de paire de cette micelle (figure 2.38, page 131, en haut à droite) indique qu'elle est homogène et relativement sphérique avec un diamètre maximal de 6,5 nm. La détermination de la masse par la méthode du Guinier donne une micelle de F_2H_9-malt de 33 kDa, pour un nombre d'agrégation de 56 unités.

Comme nous l'avons vu, la courbe SAXS présente un second maximum dans le domaine des q correspondants à la forme globale de l'objet, mais celui-ci est de faible intensité en comparaison de celui du DDM ou du PCC-malt. C'est certainement cette particularité qui explique la difficulté rencontrée par le logiciel SASfit pour calculer une courbe ajustée à la courbe expérimentale (figure 2.39). L'ajustement optimal de la courbe expérimentale

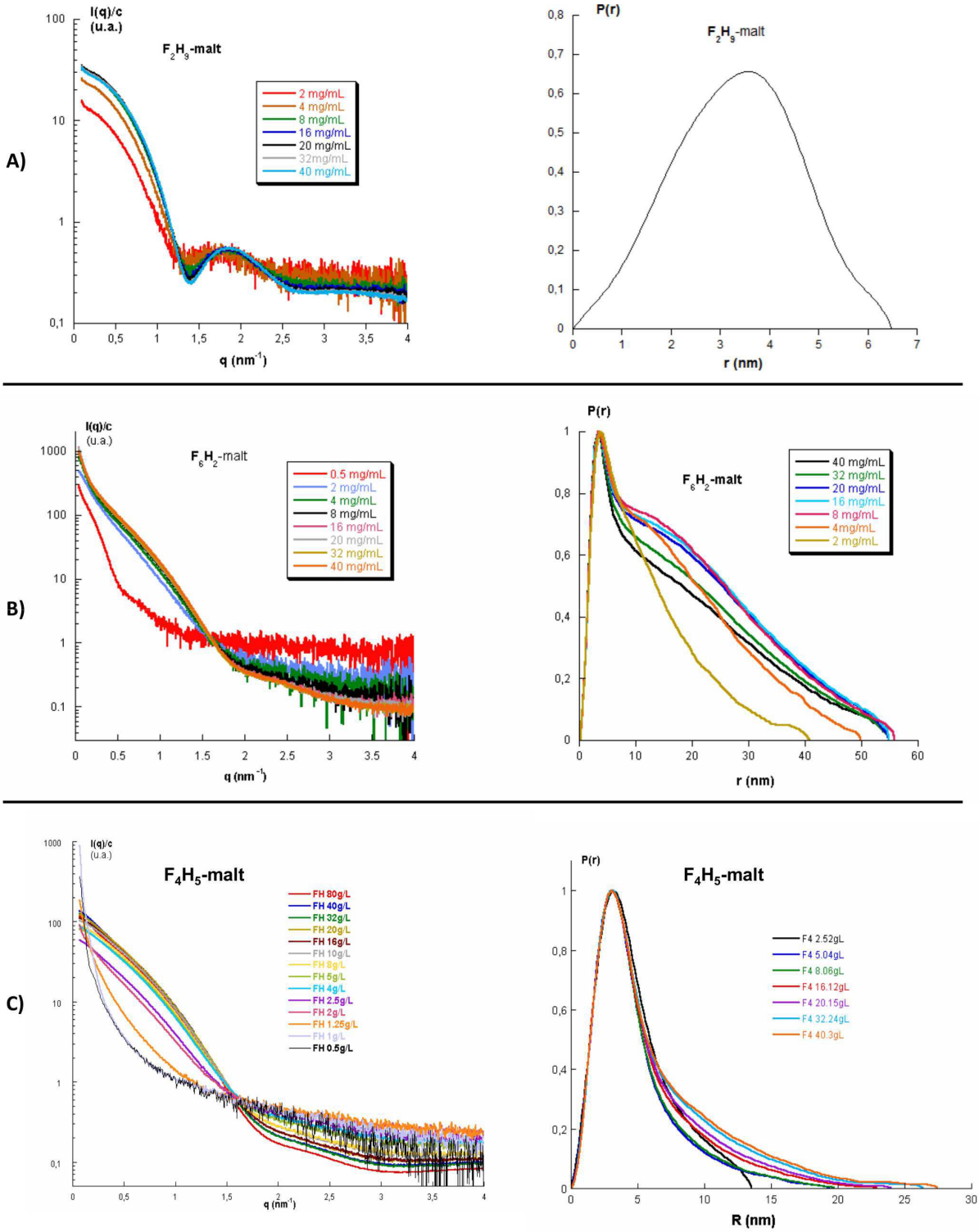


Figure 2.38 – Résultats SAXS de l'étude des FH-malt pour le F_2H_9-malt (haut), le F_6H_2-malt (centre), et le F_4H_5-malt (bas). A gauche : Courbes de diffusion en fonction de la concentration. A droite : Fonction de distribution des distances en fonction de la concentration pour celles qui évoluent.

a été obtenu selon un modèle biaxial, mais avec un petit décalage au niveau du second maximum. L'emploi d'un modèle triaxial n'a pas permis d'améliorer significativement ce résultat, ce qui n'est pas illogique compte tenu de la forme plus sphérique de la micelle de F_2H_9-malt par rapport à celle de DDM.

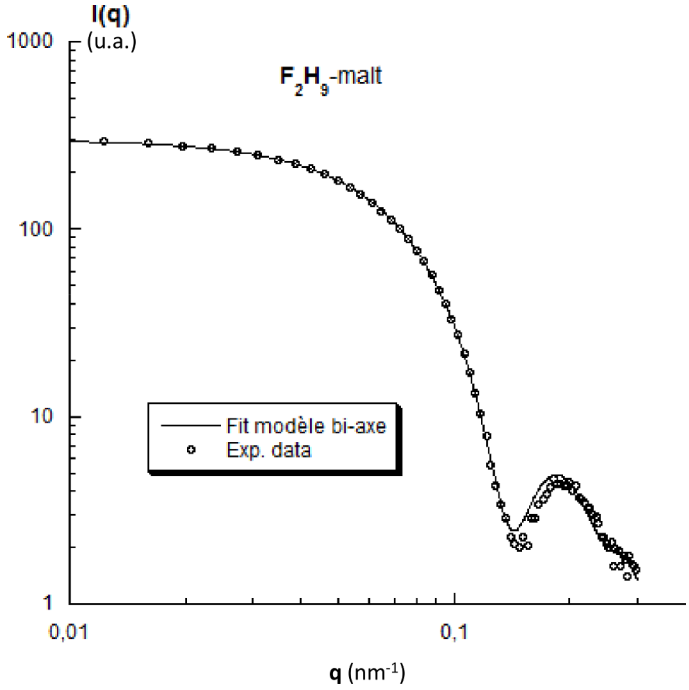


Figure 2.39 – Simulation SASfit pour la micelle de F_2H_9-malt

Pour ce tensioactif, les courbes calculées en fixant la densité électronique du cœur de la micelle se retrouvaient toutes très loin de la courbe expérimentale. Tous les paramètres ont donc été laissés flottants. Pour ajuster sa courbe, SASfit n'a pas trouvé d'autre solution que de réduire très fortement les contrastes électroniques au sein de la micelle et entre la micelle et le solvant (inférieur à 0,0005 $e^-/Å^3$). L'utilisation d'autres modèles plus homogènes, sphérique ou ellipsoïdal, n'ont pas permis de meilleures simulations, montrant les limites de telles méthodes de calcul qui essaient de déterminer 3 à 5 inconnues avec une seule équation. Le tableau 2.11 donne les valeurs des différents paramètres calculés par SASfit pour la simulation de la micelle de F_2H_9-malt. Le calcul du nombre d'agrégation à partir du volume de cœur donné dans ce tableau et du volume de chaîne du tableau 2.7 donne un résultat de 118, ce qui est plus de deux fois supérieur au nombre d'agrégation obtenu par l'approximation du Guinier. Cet écart est certainement lié aux difficultés rencontrées lors de l'ajustement de ce modèle et que nous venons d'exposer. Les résultats de cette simulation sont d'ordre indicatifs de la forme globale de la micelle, mais il serait déplacé de vouloir en tirer des informations sur la structure interne de la micelle (épaisseur de la couronne, hydratation des têtes maltose, nombre d'agrégation) comme cela avait pu être le cas pour les micelles de DDM et PCC-malt.

Tensioactif	Forme	$\rho_{couronne}$	ρ_{coeur}	a (Å)	b (Å)	t (Å)	V_{coeur} (Å^3)	V_{total} (Å^3)
F_2H_9-malt	Oblate	0.334	0.334	15.233	26.674	4.395	45400	79366

Tableau 2.11 – Résultat des meilleurs paramètres des simulations SASfit pour le F_2H_9-malt

4.4.2 Étude du F_6H_2-malt

Les profils de diffusion des RX aux petits angles pour le F_6H_2-malt (figure 2.38, page 131, au centre à gauche) montrent des courbes superposées à partir de 8 mg/mL. Les courbes à 2 et 4 mg/mL sont, comme pour le F_2H_9-malt, de plus faible intensité aux petits angles (q<1,5 nm^{-1}) que les courbes des concentrations supérieures. La courbe à 0,5 mg/mL, concentration en dessous de la CMC (0,702 mg/mL), est donnée à titre d'information pour illustrer le changement d'allure entre le signal du tensioactif libre et celui de la micelle. Il est par conséquent possible d'affirmer qu'à 2 et 4 mg/mL il y a bien formation de micelles en solution, mais qu'encore une fois il est difficile de dire si elles sont différentes de celles observées à partir de 8 mg/mL ou s'il s'agit d'un artefact causé par l'expérimentation. Par ailleurs la présence d'une forte remontée aux très petits angles (q<0,2 nm^{-1}) est le signe de la présence d'agrégats dans les solutions analysées, certainement due aux conditions d'expérimentation puisque pour l'analyse du F_6H_2 les solutions avaient dû être préparées trois jours avant l'analyse, et non le jour même comme ce fut le cas pour tous les autres composés.

La micelle de F_6H_2-malt est donc stable en concentration, au moins à partir de 8 mg/mL. Malgré la présence d'agrégats biaisant la pente à l'origine les profils semblent indiquer la présence d'objets allongés cylindriques ou sous forme de disque. Ainsi la figure 2.40, donnant q.I(q) en fonction de q^2 pour le F_6H_2-malt, suggère la forme cylindrique de ses micelles, par l'obtention de relations linéaires pour chacune des concentrations. Le coefficient à l'intérieur de l'exponentielle reste constant aux différentes concentrations et équivaut à la moitié du rayon du cylindre, ce qui donne un diamètre du cylindre de la micelle à environ 5,5 nm. Par ailleurs, le rayon de giration moyen mesuré est de 15,5 nm, ce qui fait une longueur du cylindre de 54 nm.

Les courbes des fonctions de distribution de paires tracées pour chaque concentration (figure 2.38, page 131, au centre à droite) présentent bien l'allure des P(r) obtenues pour des micelles de type cylindrique, avec une longueur prédominante et une lente décroissance de la probabilité de toutes les tailles supérieures jusqu'à la longueur maximale. Celle-ci paraît fixe pour les concentrations supérieures à 8 mg/mL, aux alentours de 55 nm. En dessous de 8 mg/mL, la fonction de distribution de paire retranscrit l'incertitude sur les courbes de diffusion, avec un cylindre plus court dont on ne peut dire si c'est la réalité ou un artefact.

Le F_4H_5-malt montre un comportement plus complexe (figure 2.38, page 131, en bas

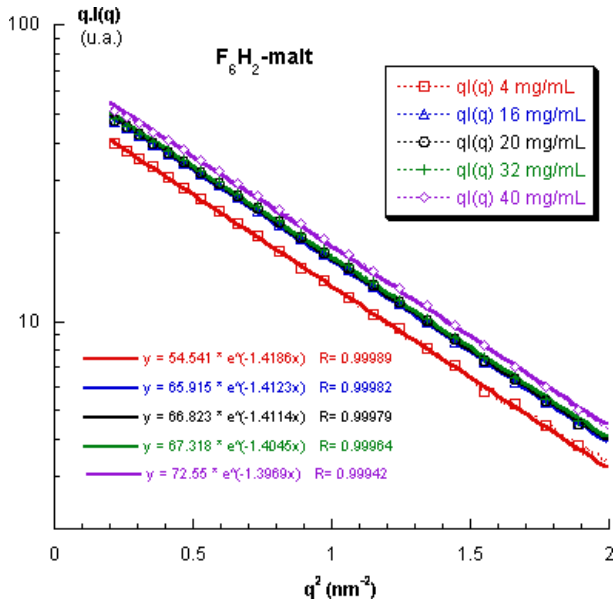


Figure 2.40 – Détermination de la forme cylindrique des micelles de F_6H_2-malt par le tracé de q.I(q) en fonction q^2

à gauche) que les deux autres FH-malt avec des courbes aux différentes concentrations qui sont non superposables et se croisent toutes en un point unique. Elles peuvent être réparties en trois groupes selon leur allure générale :

1. de 0,5 à 1,25 mg/mL : pour ces concentrations proches de la CMC (0,315 mg/mL), les courbes SAXS sont convexes aux petits angles.
2. de 4 à 80 mg/mL les courbes sont concaves aux petits angles, mais ne se superposent dans aucun domaine des q.
3. à 2 et 2,5 mg/mL les courbes sont entre les deux courbures.

Cette observation est en faveur d'une évolution d'une espèce à une autre en fonction de la concentration. Toutefois la réalisation d'une simulation mathématique d'un équilibre entre l'espèce de la plus faible concentration et celle de la plus forte concentration,comme pour les Tripodes, n'a cette fois pas été concluante. Il est donc impossible de déterminer avec les seules données SAXS quelles seraient les populations en présence lors de cette évolution.

Aux fortes concentration, le F_4H_5-malt semble adopter, une forme allongée, comme le F_6H_2-malt, mais qui évoluerait avec la concentration. Les fonctions de distribution de paire tracées sur la figure 2.38, page 131 (en bas à droite), soutiennent cette observation, et tendent à préciser que la forme reste globalement identique mais que la dimension de la micelle augmente au fur et à mesure que la concentration en F_4H_5-malt augmente.

Les courbes de q.I(q) en fonction de q^2 pour les fortes concentrations en F_4H_5-malt (figure 2.41) donnent une relation de type exponentielle, qui atteste de la forme cylindrique

de ces micelles. Le calcul du rayon de la micelle cylindrique à partir du coefficient interne de l'exponentiel (=-$R_c^2/2$), donne une valeur de 1,53 nm à 5 mg/mL qui augmente pour se stabiliser à 1,62 nm pour les concentrations supérieures à 16 mg/mL. Le F_4H_5-malt formerait donc une micelle cylindrique qui grossirait dans les trois directions (rayon et longueur) jusqu'à une concentration au delà de laquelle le rayon reste constant mais où le cylindre continue de s'allonger.

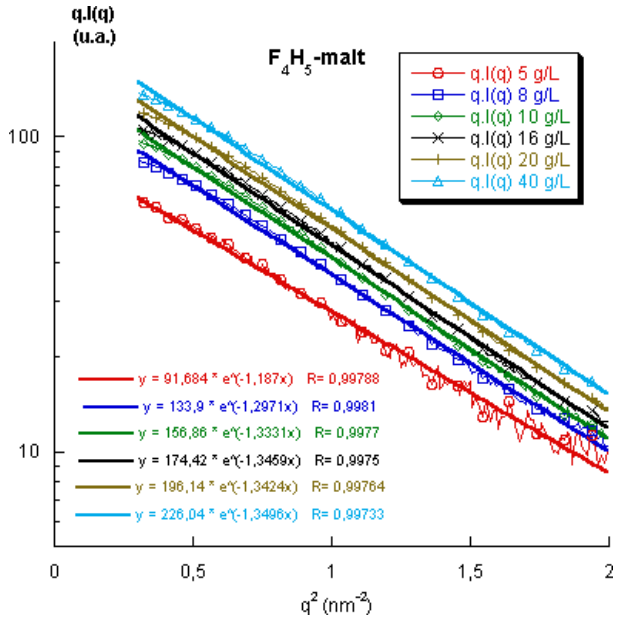


Figure 2.41 – Détermination de la forme cylindrique des micelles de F_4H_5-malt par le tracé de q.I(q) en fonction q^2

4.4.3 Conclusion

Au niveau des résultats de SAXS il apparait clairement que le F_2H_9-malt et le F_6H_2-malt présentent un comportement micellaire classique contrairement au F_4H_5-malt, avec cependant un bémol pour les concentrations inférieures à 8 mg/mL. A ces concentrations il subsiste un doute sur la taille des micelles formées. La lecture sans précaution des résultats SAXS indique la formation dans cette gamme de concentration de petites micelles dont la forme évolue avec la concentration. Pour le F_2H_9-malt qui forme une micelle globulaire stable avec un nombre d'agrégation d'une cinquantaine d'unités à partir de 8 mg/mL, cela signifie qu'avant d'atteindre cette concentration seuil, le tensioactif préfère former de plus petites micelles (Nagg<50) moins stables, à la place de moins de micelles de taille "optimale". N'ayant pas trouvé de référence bibliographique décrivant ce type de comportement, nous avons cherché à étudier ces petites concentrations par une autre technique que le SAXS. Nous avons donc fait réaliser une analyse par AUC (ultracentrifugation analytique) des F_2H_9-malt et F_4H_5-malt, afin de vérifier que ce phénomène

n'était pas le fruit d'un artefact de mesure. Les rapports complets de ces analyses faites par le Dr. Christine Ebel (IBS, Grenoble) sont donnés en annexe de ce manuscrit, nous n'en faisons ici qu'un résumé qui nous permet de conclure sur la qualité des assemblages formés aux faibles concentrations pour ces deux tensioactifs.

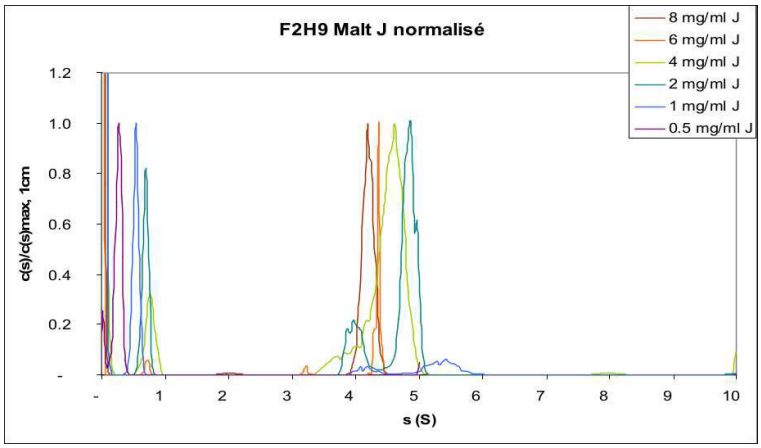


Figure 2.42 – Profils AUC des micelles de F_2H_9-malt. Une population homogène (les micelles) est retrouvée en plus des monomères de F_2H_9-malt

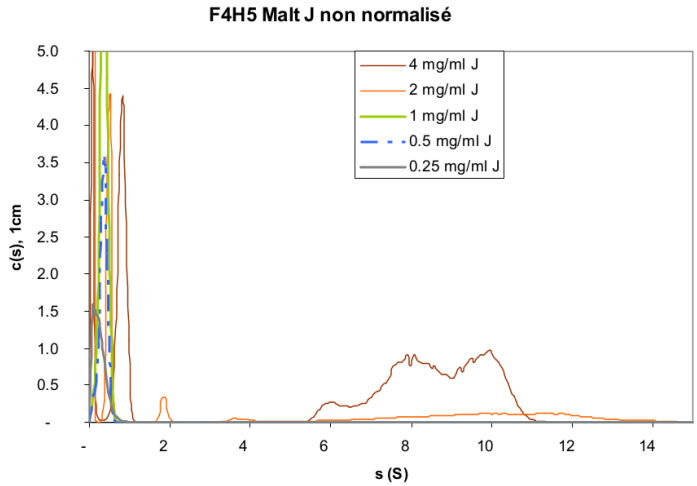


Figure 2.43 – Profils AUC des micelles de F_4H_5-malt. Aux plus fortes concentrations, la population apparaît polydisperse.

Six concentrations, comprises entre 0,5 et 8 g/L, du F_2H_9-malt ont donc été analysées par AUC, et les résultats (figure 2.42 et partie expérimentale) indiquent qu'à partir de 2 mg/mL, les micelles sont globulaires, de tailles identiques quelque soit la concentration. Il semblerait donc que le F_2H_9-malt ait le comportement classique d'un tensioactif, avec la formation dès sa CMC de micelles globulaires dont les caractéristiques n'évoluent pas avec

l'augmentation de la concentration en tensioactif. L'analyse UCA du F_4H_5-malt (figure 2.43 et partie expérimentale) permet de visualiser une hétérogénéité de la population à partir de 2 g/L (en dessous de cette concentration, le signal est trop faible pour pouvoir détecter d'autres espèces que le monomère). La distribution des micelles s'étend sur un large domaine de coefficient de sédimentation, décrivant une population de micelles hétérogènes dont la taille augmente avec la concentration en tensioactif. Ces résultats d'UCA sont donc tout à fait cohérents avec les résultats de SAXS et permettent (i) d'éliminer l'hypothèse d'un équilibre entre deux espèces majoritaires pour le F_4H_5-malt, au profit d'une micelle cylindrique qui grossit avec la concentration en tensioactif, et (ii) de ne considérer que les courbes supérieures à 8 mg/mL comme représentatives du signal des micelles des FH-malt. La "chute" des courbes SAXS des FH-malt pour les petites concentrations pourrait être causée par la présence des groupements -CF_2 plus riches en électrons que les groupements -CF_3 qui comme on l'a évoqué semblent masquer le contraste électronique de la micelle.

Une fois le problème des petites concentrations analysé, la forme générale de la micelle peut être obtenue par SAXS par les mesures à fortes concentrations. Le F_2H_9-malt est relativement sphérique, alors que les F_4H_5-malt et F_6H_2-malt sont cylindriques. En effet l'incorporation de fluor sur la chaîne hydrophobe augmente sa section, plus la chaîne dispose de carbones fluorés plus son volume et donc son paramètre de packing sera augmenté. Toutefois au regard des courbes SAXS, la forme des micelles est stable pour le F_2H_9-malt et le F_6H_2-malt, et beaucoup plus fluctuante pour le F_4H_5-malt. Ce caractère atypique du F_4H_5-malt, dû à la polydispersité de ces assemblages mis en évidence par UCA, se retrouve dans sa courbe de tensiométrie de surface où son comportement est nettement moins net que pour les deux autres FH-malt. Il semblerait que ce composé présente bien plus de difficultés à créer des interactions entre ses chaînes hémifluorées que le F_2H_9-malt ou le F_6H_2-malt. Ce résultat tend à démontrer qu'un ratio à peu près équivalent de carbones fluorés et de carbones hydrogénés représente la conformation la plus défavorable pour qu'un tensioactif hémifluoré en solution puisse former des micelles bien définies. En revanche si l'une des deux parties est majoritaire sur l'autre, le tensioactif présente une micellisation "classique". La contribution des parties hydrocarbonée et fluorocarbonée n'est cependant pas additive comme en atteste leur CMC, certainement à cause de la contribution enthalpique défavorable du mélange de groupes hydrogénés et fluorés dans le cœur de la micelle (prouvées par la difficulté d'obtenir un mélange idéal de micelles mixtes de tensioactifs fluorocarbonés et hydrogénés [167, 168]).

5 Intérêt des tensioactifs étudiés pour la cristallisation des protéines membranaires

L'intérêt des tensioactifs pour la cristallisation des protéines membranaires sera discuté sur trois points :

1. leur aptitude à former des micelles stables
2. leur aptitude à former des complexes protéiques homogènes
3. la qualité des interactions générées entre leurs micelles

5.1 La stabilité des micelles

Les tensioactifs classiques utilisés pour la cristallisation des protéines membranaires forment pour la plupart des micelles, de forme globulaire, stables avec la concentration. Ce choix n'est peut être pas indispensable, mais paraît plus favorable à la cristallisation que l'utilisation de tensioactifs s'organisant sous forme de micelles cylindriques de gros volumes. En effet, un tensioactif possédant de petites micelles globulaires est capable de s'agencer avec un rayon de courbure très faible, il aura donc tendance à former des bouées moins volumineuses qu'un tensioactif à micelles cylindriques. La taille et la forme de la bouée ne sont pas primordiales dans le cadre de la solubilisation des protéines membranaires, en revanche ce sont des paramètres clés pour la cristallisation : plus la bouée est petite (i) plus les interactions protéine/protéine sont favorisées lors de la cristallisation et (ii) plus faible est le risque d'hétérogénéité de la bouée, qui pourrait altérer la qualité du réseau cristallin.

L'autre inconvénient des micelles cylindriques est leur plus grande tendance à s'allonger avec la concentration en tensioactif. Tenter de cristalliser une protéine avec un tensioactif dont les micelles évoluent avec la concentration, c'est se placer dans des conditions à priori moins favorables. Le principe même de la cristallisation impose des variations importantes des concentrations locales en protéine et par voie de conséquence des autres espèces de la solution, micelles de tensioactif compris. Un système évolutif au cours de cristallisation pourrait gêner la cristallisation avec la formation de micelles de plus en plus volumineuses au cours du processus de cristallisation. Le risque est que la présence de ces grosses micelles empêche la formation des contacts cristallins, en bloquant le transfert des protéines jusqu'au noyau cristallin, et/ou modifie l'équilibre de répartition du tensioactif entre sa forme micellaire et sa forme liée à la protéine, au point de générer une hétérogénéité de la bouée dans le temps au fur et à mesure de leur incorporation dans le réseau cristallin.

Pour ces raisons, nous préfèrerons nous placer pour le cadre de cette étude dans des conditions que nous jugeons plus favorables à la cristallisation de type II, en travaillant avec les tensioactifs dont la taille et la forme des micelles n'évolue pas en fonction de la concentration.

De ce point de vue, l'étude physico-chimique nous permet de faire un premier tri, puisqu'elle a mis en évidence les limites de stabilité des micelles de certains composés de la famille des tripodes et des FH-malt.

– le C3Glu3 et C4Glu3 sont d'ores et déjà hors course car ils ne forment pas de micelles mais de petits agrégats, signe de la difficulté de ces composés à créer des contacts hydrophobes pour s'auto-associer. Un tensioactif ayant une faible capacité

à créer des interactions hydrophobes, aura une faible affinité pour la région transmembranaire de la protéine membranaire et ne sera donc pas capable d'éviter son agrégation.
- le F_4H_5-malt forme des micelles cylindriques hétérogènes qui ont tendance à s'allonger avec la concentration en tensioactif.
- Le tripode C5Glu3, et le F_6H_2-malt forment des micelles cylindriques qui s'allongent avec la concentration. Leur formation est toutefois relativement contrôlée puisque pour une concentration donnée, la micelle semble homogène.

5.2 Test de stabilisation de protéines membranaires

5.2.1 Principe

Les tensioactifs développés au sein de l'équipe CBSA ont pour vocation première d'être utilisés pour la manipulation des protéines membranaires. Parallèlement à leur caractérisation physico-chimique, il est donc indispensable de vérifier leur capacité à maintenir les protéines membranaires en solution sous forme native. Ces tests sont réalisés par d'autres laboratoires que l'équipe CBSA sur la bactériorhodopsine (BR) (à l'IBS de Grenoble).

Les tests de stabilité ont été réalisé sur le F_2H_9-malt et le F_4H_5-malt. Ils consistent à extraire la protéine de la membrane par un détergent classique (type OG ou DDM), et à échanger celui-ci par le tensioactif à tester lors d'un gradient de sucrose (10-30% w/w). La protéine solubilisée dans le tensioactif, peut alors être prélevée, et utilisée pour un suivi de sa stabilité au cours du temps. Pour le PCC-malt nous citerons les résultats du test de stabilisation du cytochrome b_6f publié en 2011 dans l'article [114].

5.2.2 Résultats

La figure 2.44 montre les gradients de sucrose de cytochrome b_6f. L'inactivation du cytochrome b_6f se traduit par sa monomérisation, visible sur le gradient, ou la perte de son activité de transfert d'électron. A faible concentration (0,2 mmol/L) en tensioactif la stabilité du cytochrome b6f est identique en DDM ou en PCC-malt. En revanche à forte concentration (5 mmol/L) le PCC-malt apparait beaucoup moins déstabilisant que le DDM, puisqu'il induit une monomérisation beaucoup moins importante et que l'activité du cytochrome b_6f reste stable sur les 10 jours de tests alors qu'elle chute rapidement en DDM.

La photo des gradients de BR, obtenus pour le DDM, le F_4H_5-malt et le F_2H_9-malt sont montrés dans la figure 2.45 (Dr. Cécile Breyton, communication personnelle). Dans les trois cas la BR se retrouve bien maintenue en solution dans le gradient, sous la forme d'une bande de couleur violacée dans le cas du DDM, et bleue en présence des FH-malt. L'obtention d'une bande de BR absorbant dans le bleu ($\lambda_{max} \approx 615nm$) en présence des composés hémifluorés, et l'abaissement de la bande en F_4H_5-malt sont les preuves que l'échange a bien été réalisé. Ce changement de couleur par rapport à la bande obtenue en

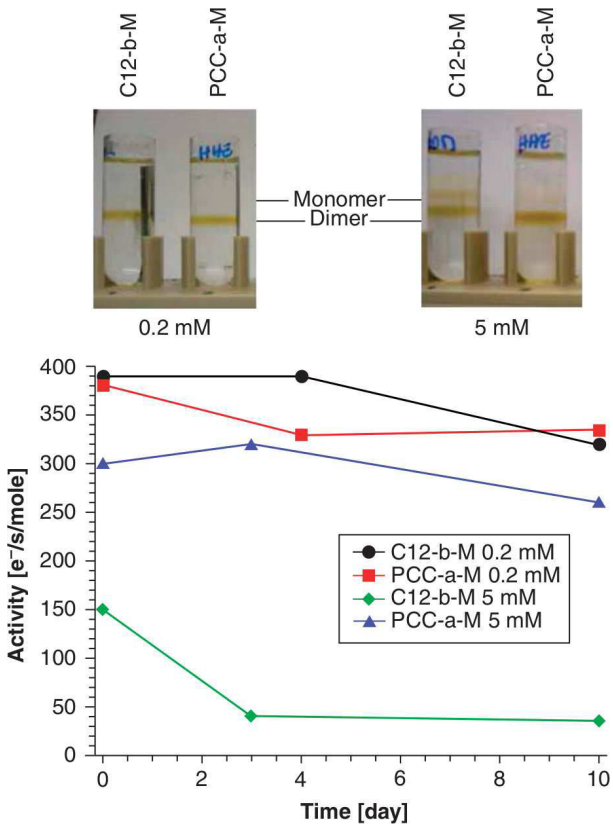


Figure 2.44 – Stabilité du cytochrome b_6f en DDM (C12-b-M) et PCC-malt (PCC-a-M) en fonction de la concentration. Figure reprise de [114]. En haut : migration du complexe b_6f en gradient de sucrose. Bas : Évolution de l'activité d'oxidoréductase du complexe b_6f au cours du temps en fonction du tensioactif et de sa concentration

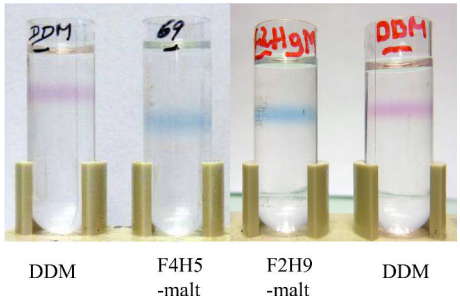


Figure 2.45 – Migration de la bactériorhodopsine en gradient de sucrose 10-30% en présence de DDM, F_4H_5-malt, ou F_2H_9-malt

DDM (absorbant dans le violet à $\lambda_{max} = 554 - 560nm$) a déjà été observé en présence de tensioactifs fluorés [125, 126]. Il est interprété comme le changement de l'environnement du rétinal sans clivage de celui-ci. Le F_4H_5-malt et le F_2H_9-malt permettent donc bien de maintenir la BR sous forme native en solution.

L'étroitesse des bandes de BR obtenues sont le signe que les complexes formés entre les différents tensioactifs et la protéine, sont homogènes d'un point de vue colloïdal, dans les limites de la résolution de la technique de séparation par gradient de saccharose. Le cas du F_4H_5 malt démontre bien que l'hétérogénéité des micelles à différentes concentration n'induit pas forcément une hétérogénéité importante du complexe protéique en solution. C'est un résultat qui n'avait jusqu'à présent jamais été observé avec les tensioactifs fluorés. Habituellement en effet, les tensioactifs formant des micelles allongées forment avec la protéine membranaire des complexes dont la taille est très hétérogène. Cela se traduit par des bandes très larges et diffuses en gradient de sucrose comme pour le F_6H_3-malt (voir figure 2.46 extraite de [125]).

Le suivi au cours du temps de la stabilité de la BR sur 80 jours a montré des résultats similaires pour le DDM et le F_4H_5-malt. En présence de F_2H_9-malt la protéine se dégrade un peu plus rapidement, mais dans des proportions très faibles, qui sont acceptables pour l'utilisation de ce composé lors d'essais de cristallisation. Le nombre restreint de carbones fluorés du F_2H_9-malt pourrait être à l'origine de cette légère diminution de la stabilisation de la BR par rapport aux tensioactifs à 6 carbones fluorés (F6DiGlu) [126] ou à 4 carbones fluorés (F_4H_5-malt) qui maintiennent la BR en solution aussi bien que le DDM. En effet compte tenu de la couleur bleue de la BR lors de la solubilisation en FH-malt les interactions protéine/tensioactif ont lieu majoritairement par l'extrémité de la chaîne fluorée quelque soit la longueur du segment fluoré. Cette instabilité de la BR en F_2H_9 est donc liée à la plus faible concentration en fluor dans ce tensioactif. La dénaturation de la BR avec ce tensioactif, peut s'opérer de deux façons :

- par insertion de la chaîne fluorée dans le domaine transmembranaire. Mais cette option est peu vraisemblable étant donné le caractère lipophobe du fluor.
- par une interaction de moins bonne qualité entre le tensioactif et la protéine qui conduit à une exposition du domaine hydrophobe de la protéine à l'eau.

Toutefois la stabilisation de la protéine dans le temps est suffisante pour envisager la réalisation d'essais de cristallisation en F_2H_9-malt. Et ces interactions protéine/F_2H_9-malt plus faibles pourraient devenir un atout pour la formation du cristal, en permettant la libération d'une nouvelle surface accessible pour la création de contacts cristallins.

Le test de stabilité n'a malheureusement pas pu être réalisé avec le F_6H_2-malt, mais il est donné dans la littérature pour un composé à tête maltose, et une chaîne composée de 6 carbones fluorés et 3 carbones hydrogénés (équivalent du F_6H_3-malt selon la nomenclature adopté dans ce manuscrit) [125], pour lequel une bande très diffuse avait été obtenue (cf. 2.46). Comme le F_6H_2-malt, le F_6H_3-malt forme de grosses micelles en solution qui semblent grossir avec la concentration (pour le F_6H_3-malt : Rh=10 nm à 2 CMC à 4 °C, et 12.5 nm à 25 CMC à 4 °C), et ce sont ces caractéristiques qui avaient été pointées du doigt par les auteurs pour expliquer l'obtention de ces complexes protéiques très hétérogènes. Il est donc possible que le F_6H_2-malt produise des résultats similaires au F_6H_3-malt en présence de protéine avec la formation de complexes hétérogènes en taille.

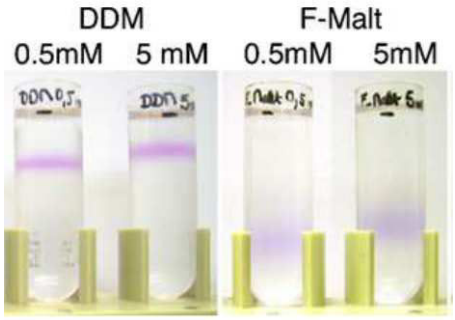


Figure 2.46 – Migration de la bactériorhodopsine en gradient de sucrose 10-30% en présence de DDM, F_6H_3-malt. Repris de [125].

5.2.3 Conclusion

Le F_2H_9-malt, le F_4H_5-malt et le PCC-malt sont tous les trois capables de se lier à la partie hydrophobe des protéines membranaires, et de les maintenir en solution sous leur forme native. Les durées de stabilisation de protéines modèles avec ces tensioactifs sont comparables à celles obtenues en présence de DDM, voire même supérieure dans le cas du PCC-malt utilisé à forte concentration. Ces trois tensioactifs apparaissent donc tout à fait adaptés pour la manipulation des protéines membranaires.

La relation entre hétérogénéité de la micelle et hétérogénéité du complexe protéique ne semble pas évidente d'un point de vue colloïdal, avec la technique de gradient qui est cependant peu résolutive. Mais puisque ce n'est pas la protéine qui s'insère dans la micelle, mais le tensioactif qui vient former une bouée autour de la protéine, il est possible que ce nouvel assemblage soit mieux défini, comme ça à l'air d'être le cas pour le F_4H_5-malt. La forme de la bouée va donc dépendre de la forme et de la taille de la micelle initiale (une grosse micelle a plus de chance de former une grosse bouée), mais aussi de la surface hydrophobe de la protéine à couvrir. Nous n'avons pas eu l'occasion d'effectuer les essais de stabilisation de la BR avec le F_6H_2-malt. Il forme de grosses micelles dont la masse augmente avec la concentration en tensioactif, mais dans une moindre mesure que le F_6H_3-malt, puisque cette évolution n'est pas visible en DLS. Il est donc difficile de prédire quel sera son comportement lors de la formation du complexe PDL avec la BR.

5.3 Les interactions

Les critères de stabilité des micelles en solution et de stabilisation des protéines membranaires modèles nous permettent, à ce stade, de définir en plus du DDM, les meilleurs candidats pour la cristallisation parmi les tensioactifs étudiés comme étant le PCC-malt, le F_8TAC et le F_2H_9-malt. Malheureusement, suite aux difficultés rencontrées lors de la synthèse des FH-malt, nous n'avons pas eu le temps d'étudier les interactions du F_2H_9-malt, mais cette étape a pu être réalisée sur les deux autres tensioactifs et le DDM.

Les résultats obtenus lors de l'étude des interactions du DDM par SAXS sont cohérents avec cette théorie puisque ce détergent classique de la cristallisation des protéines membranaires, présente des micelles qui deviennent de plus en plus attractives lors de l'ajout de PEG. Ce comportement est bien une caractéristique inhérente du détergent puisque nous avons montré avec le F_8TAC, que tous les tensioactifs ne donnaient pas forcément un régime attractif en PEG, ou du moins, pas sur les mêmes gammes de concentrations en tensioactif et/ou en agent cristallisant. Dans ces conditions, le PCC-malt qui possède une évolution de ses interactions similaires au DDM, apparaît être un bon candidat pour les essais de cristallisation de protéines membranaires. A l'inverse la capacité du F_8TAC à augmenter la solubilité des complexes PDL est mise en avant par ses interactions répulsives en présence de PEG. De tels tensioactifs sont donc moins favorables à la cristallisation des PM. A notre connaissance, la seule référence bibliographique faisant état d'essais de cristallisation avec un composé de la famille du F_8TAC (le F_6TAC qui possède deux carbones fluorés de moins) indique que ceux-ci ont été infructueux [119].

En terme d'interaction, de tels tensioactifs répulsifs pourraient toutefois être utilisés en partenariat avec un autre tensioactif, favorable lui à la cristallisation, pour permettre d'atteindre des concentrations plus fortes en protéine avant les essais de cristallisation. Une meilleure solubilisation de la protéine a l'avantage d'augmenter la sursaturation (c'est à dire de se placer dans des conditions initiales plus éloignées de la courbe de solubilité dans le diagramme de phase) avant cristallisation. Il y a alors plus de marge de manœuvre pour tomber sur les conditions de nucléation, puisque le "chemin parcouru dans le diagramme de phase" est plus grand. L'objectif serait alors de trouver un mélange de tensioactifs qui permettrait une meilleure répulsion en absence d'agent cristallisant, pour pouvoir concentrer au maximum la protéine purifiée, mais qui resterait sensible au phénomène de déplétion, pour passer en régime attractif en condition de cristallisation.

L'aspect quantitatif de la mesure du A_2 permet d'aller encore plus loin dans l'analyse en remarquant que les interactions attractives sont légèrement plus fortes dans le cas du PCC-malt que dans le cas du DDM. Ce résultat signifie que pour une protéine cristallisant en DDM, il est fortement probable qu'elle cristallise aussi en PCC-malt dans des conditions similaires (composition du tampon), mais avec des concentrations en agent cristallisant moins importantes. Nous allons donc nous appuyer sur cette hypothèse pour mener des essais de cristallisation du RC-LH1-puf X en PCC-malt. Ces essais se placent dans le cadre d'une étude biochimique détaillée dans la deuxième partie de ce manuscrit ayant pour objectif d'améliorer la qualité des cristaux du RC-LH1-puf X par l'optimisation de la bouée en tensioactif. Les deux voies envisagées sont :

- la modulation de la bouée du DDM avec lequel des cristaux à 8 Å de résolution ont déjà été obtenus
- l'échange du DDM par un tensioactif aux caractéristiques voisines.

Dès lors pour pouvoir contrôler la modification de la bouée, il est apparu indispensable de pouvoir quantifier la quantité de détergent (et/ou tensioactif, dans le cas de l'échange) liée à la protéine. Le chapitre suivant présente donc le développement d'une méthode de

dosage des tensioactifs par HPTLC.

CHAPITRE 3

Mise au point d'une méthode de dosage des tensioactifs par HPTLC

La quantité de détergent est un paramètre très important à prendre en compte lors de la manipulation des protéines membranaires. En effet, une trop forte concentration en détergent peut causer la dénaturation de la protéine ou gêner les contacts entre protéines lors de la formation de cristaux [44, 169, 170]. A l'inverse une trop faible quantité de détergent ne permettra pas le maintien en solution de la protéine. Mais connaître exactement la concentration en détergent dans une solution de protéines est de prime abord compliquée puisqu'elle évolue au cours des étapes de purification. Ainsi lors de la réalisation de chromatographie d'affinité, ou lors de la concentration de la protéine, via des concentreurs d'ultrafiltration, la quantité de détergent est modifiée dans des proportions souvent inconnues. Différentes stratégies ont déjà été développées pour pouvoir déterminer la concentration en détergent et tensioactif dans les solutions de protéines membranaires comme par exemple l'utilisation de détergent radiomarqué [171], la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier [172], un dispositif de mesure des angles de contact [173], un dosage des détergents glycosilés par spectrophotométrie [174, 175], un dosage colorimétrique dérivé de la méthode de Bradford [176], une méthode par chromatographie gazeuse [177], ou une méthode par chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC en anglais) [178]. Toutefois ces différentes techniques nécessitent souvent de longs pré-traitements d'échantillons avant l'analyse, ou des volumes importants de protéine ce qui limite fortement leur utilisation. Avec nos tensioactifs dérivés du DDM, la méthode du dosage des détergents glycolsylés qui ne nécessite qu'une simple dérivation des sucres, par de l'acide sulfurique à chaud, pouvait sembler être adaptée et relativement facile à mettre en œuvre. Mais dans notre cas, nous avions deux contraintes majeures supplémentaires : (i) nous voulions réaliser des échanges de détergents et pouvoir doser indépendamment les deux tensioactifs en cas d'échange partiel et (ii) le complexe protéique RC-LH1-pufX

contient des pigments dont les spectres d'absorption spectrométrique interfèrent avec le dosage des détergents glycosilés à 490 nm.

Nous avons donc cherché à développer une nouvelle méthode avec pour objectif de mettre au point un dosage à la fois simple, pour être utilisé "en routine", performant, pour ne consommer que de faibles volumes d'échantillon, mais aussi efficace, pour obtenir des résultats significatifs et comparables d'un essai à l'autre. Nous allons dans ce chapitre exposer la démarche qui a permis d'aboutir à la mise au point d'une méthode de dosage des détergents et tensioactifs par HPTLC (High performance Thin Layer Chromatography). Après avoir déterminer la méthode de révélation la plus appropriée pour la quantification de tensioactifs sur plaque HPTLC, nous nous sommes employés à trouver la composition de la phase mobile et les conditions de migration optimales pour la séparation de deux tensioactifs qui ne varient structurellement que par leur partie hydrophobe. Enfin nous avons dû adapter le système de dépôt automatique de échantillons aux contraintes particulières des solutions aqueuses de tensioactifs (dissolution de la silice, diffusion dans la plaque, présence de mousse) pour obtenir une bonne reproductibilité de cette méthode quantitative. Ces résultats ont par ailleurs fait l'objet d'un article publié dans Journal of Chromatography A [179], qui se trouve en annexe de ce manuscrit.

1 La technique HPTLC

1.1 Principe

La technique de "high performance thin layer chromatography" (HPTLC) ou chromatographie sur couche mince haute performance est une forme automatisée et standardisée de la CCM classiquement utilisée dans les laboratoires de chimie. Elle repose donc sur les mêmes principes chromatographiques, avec en particulier, l'utilisation d'une phase stationnaire déposée sur plaque. Dans la pratique, l'échantillon est déposé sur la bas de cette plaque qui est ensuite placée dans une cuve contenant la phase mobile. Celle-ci monte à travers la phase stationnaire par capillarité, provoquant la migration de l'échantillon. Il se produit alors des équilibres d'adsorption/désorbtion entre l'échantillon et la phase stationnaire avec des fréquences spécifiques pour chaque constituant de l'échantillon. Chaque espèce migre ainsi à sa propre vitesse en fonction de son affinité pour la phase mobile (solubilité) et la phase stationnaire (forces électrostatiques). Au final ceci se traduit par une différence de distance de migration des composés sur la plaque et donc à leur séparation qui peut être visualisée après révélation de la plaque.

L'HPTLC permet ensuite de quantifier chacune des espèces à l'aide de standards. En effet, l'automatisation des dépôts ainsi que le contrôle systématique des conditions de migration et de révélation permettent d'obtenir pour chaque espèce, des spots (ou bandes) dont l'intensité est proportionnelle à la quantité présente initialement dans le dépôt.

1.2 Schéma de montage

Par rapport à la CCM, l'HPTLC utilise des plaques de silice dont la granulométrie est plus fine et plus homogène. Les dépôts manuels sous forme de spots, sont remplacés par des dépôts automatisés en bandes par pulvérisation sous flux azote pour limiter la diffusion des composés dans la plaque. La cuve de migration fixe les temps de saturation, la hauteur de migration du solvant et le taux d'humidité de la cuve, afin de travailler dans des conditions similaires d'une plaque à l'autre. L'appareillage d'HPTLC est complété par un dispositif qui permet de contrôler la vitesse et le temps d'immersion de la plaque dans le réactif de révélation et par une plaque chauffante calibrée pour chauffer uniformément la plaque HPTLC lors de sa révélation. Enfin un densitomètre permet de scanner la plaque et de mesurer la densité optique de chaque point. Les résultats sont alors enregistrés par l'ordinateur et permettent de tracer les gammes d'étalonnage ainsi que de réaliser la quantification de chaque espèce. La figure 3.1 présente les différents appareils CAMAG utilisés pour la réalisation d'une plaque HPTLC. La liaison entre chaque appareil (flèches bleues) se fait par l'opérateur, l'HPTLC est donc une technique séquentielle ("off-line") où s'enchaînent plusieurs étapes automatisées élémentaires.

1.3 Pourquoi avoir choisi l'HPTLC ?

L'HPTLC offre beaucoup d'avantages d'ordre général par rapport aux autres techniques analytiques comme par exemple sa simplicité, sa rapidité ou encore son faible coût de revient par analyse, tout en permettant la quantification de substances avec une grande sensibilité (en terme de quantité détectable) et une bonne sélectivité entre espèces. Dans notre cas, trois autres arguments majeurs nous ont fait opter pour le choix de cette technique :

- L'HPTLC ne requiert pas de pré-traitement des échantillons. Ils peuvent être appliqués même s'ils sont aqueux ou si leur matrice est complexe (cas des échantillons biologiques). Cette particularité est la conséquence de l'utilisation de phase stationnaire à usage unique.
- La grande flexibilité de l'HPTLC nous permettait d'envisager de trouver rapidement une méthode pour séparer deux tensioactifs de structures proches et de les quantifier indépendamment (en cas d'échange non total du détergent par un tensioactif)
- L'utilisation de l'HPTLC étant déjà décrite dans la littérature pour doser les lipides [180], nous doter de cette technique nous donnait la possibilité de quantifier à la fois le détergent et les lipides de la bouée entourant le complexe RC-LH1-puf X.

Par ailleurs le dosage de la bouée de DDM d'une protéine de transport du citrate dans la mitochondrie, réalisé par Eriks [178] par chromatographie sur couche mince, validait la faisabilité d'une méthode HPTLC pour le dosage de détergent dans les échantillons de protéines membranaires. Cet article montrant aussi les limites de la CCM pour une telle analyse (nécessité d'une grande quantité de protéine et sélectivité insuffisante pour

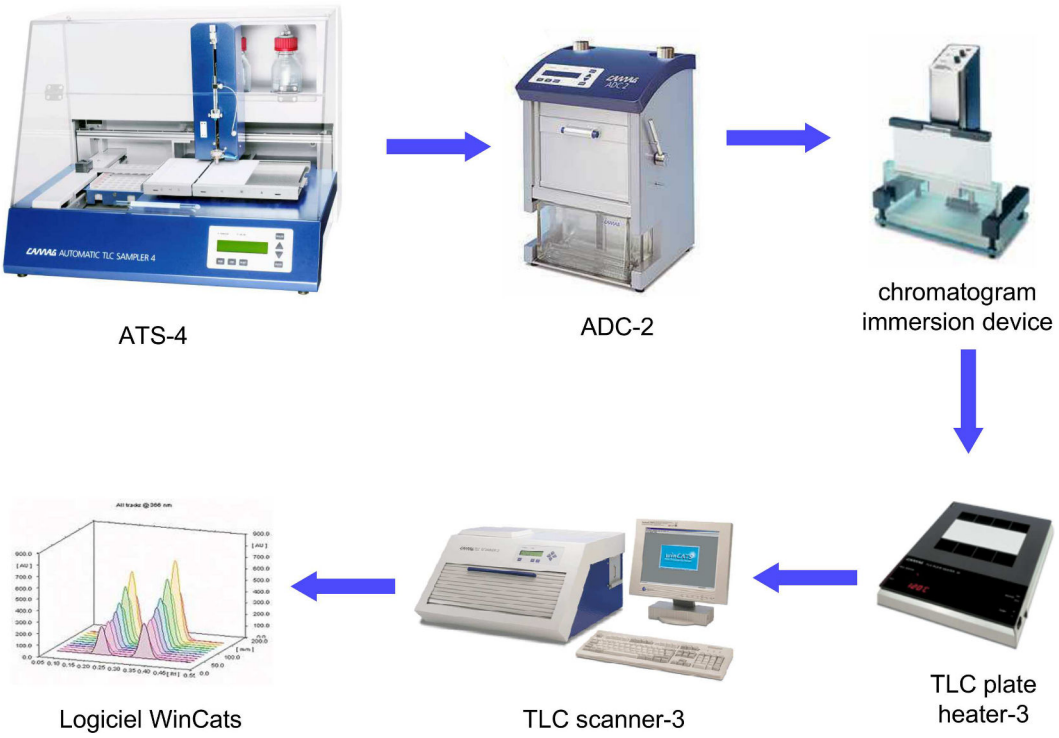


Figure 3.1 – Appareillage HPTLC de chez CAMAG tel que disponible au laboratoire LBC : les échantillons sont déposés par un automate ("automatic TLC sampler, ATS-4) sur une plaque de silice HPTLC. La plaque est ensuite placée dans la cuve de migration ("auromatic developing chamber, ADC-2), qui contrôle les conditions d'élution de la plaque. Le "chromatogram immersion device" permet d'imbiber la plaque de la solution de révélation de façon reproductible, avant l'étape de révélation par chauffage sur le "TLC plate heater". Enfin le scanner permet la mesure de la densitométrie de la plaque, pour le traitement informatique par le logiciel "winCats".

les tensioactifs de structures proches), la mise au point d'une méthode de dosage des détergents sur HPTLC semblait être la meilleure des solutions pour s'affranchir de ces difficultés.

2 Détermination du système chromatographique

2.1 Détermination de la phase stationnaire

2.1.1 Objectifs et choix possibles

Notre objectif étant de séparer des tensioactifs de structure chimique proches (DDM *vs.* PCC-malt et DDM *vs.* FH-malt), à partir d'échantillons aqueux, le choix de la phase stationnaire s'est porté sur 3 types de silice :

– Les plaques à phase "normale" de gel de silice HPTLC 60 Å, les plus couramment

utilisées.

- Les plaques de silice de type WR ("*wettable und reinst*") mouillables et prénettoyées qui résistent mieux à l'eau que les phases de silice classiques. Elles permettent ainsi une meilleure définition des bandes sur la plaque notamment dans la partie supérieure de la migration où s'accumulent les impuretés lors de l'utilisation de plaques non prénettoyées.
- Les plaques de silice "inverse" de type RP qui utilisent du gel de silice 60 Å modifié, greffé par des hydrocarbures aliphatiques. Ces plaques ont une haute tolérance à l'eau (jusqu'à 60-80%, voir 100% pour le plaque RP-W). Elles sont mieux adaptées pour les séparations complexes ou l'élution de composés non polaires.

2.1.2 Résultats

Deux raisons principales ont guidé notre choix vers l'utilisation de plaques de silice à phase normale. Tout d'abord parce que celles-ci sont les plus courantes, et les moins chères ce qui est un paramètre important lorsque le but est de pouvoir utiliser cette méthode pour des dosages en routine. Par ailleurs Eriks a montré [178] qu'il était tout à fait possible d'utiliser ce type de plaque pour doser des tensioactifs en solution dans l'eau sans devoir les extraire au préalable. Dès lors l'utilisation d'échantillons aqueux ne semblait pas imposer de précautions particulières dans le choix de la phase stationnaire.

2.2 Détermination de la méthode de révélation

2.2.1 La démarche adoptée

Bien qu'étant l'étape finale du processus d'HPTLC, la méthode de révélation a très vite nécessité d'être étudiée. Il était en effet primordial d'avoir une bonne visualisation des composés sur la plaque pour pouvoir envisager l'optimisation de la migration et la séparation de deux tensioactifs proches. Le seul pré-requis pour tester les différentes méthodes de révélation est d'obtenir une ou plusieurs bandes de tensioactifs purs et séparées ce qui a pu être réalisé en utilisant un standard de DDM seul en solution dans l'eau. Ainsi il a été possible de travailler avec une phase mobile non optimisée et composée de chloroforme/méthanol (20/18 : v/v). La migration du DDM dans la plaque ainsi obtenue, était suffisante pour permettre les essais de coloration.

Comme les suivis de synthèse par CCM des PCC- et FH-malt ont été réalisés en utilisant une révélation à l'acide sulfurique dans l'eau, l'utilisation de cet acide pour la révélation des plaques HPTLC semblait logique. En effet que ce soit le DDM, les FH-malt ou le PCC-malt, ces tensioactifs présentent tous un motif de type sucre au niveau de leur tête polaire qui est révélé par une coloration brune après pulvérisation d'acide sulfurique et chauffage. Ainsi trois solutions ont été testée :

1. une solution d'acide sulfurique à 50% dans l'eau
2. une solution d'acide sulfurique à 10 % dans l'éthanol

3. une solution de sulfate de cuivre à 10% dans le méthanol, contenant 0,4% d'acide sulfurique et 0,4% d'acide ortho-phosphorique, utilisée pour la révélation des lipides [180].

2.2.2 Résultats et discussion

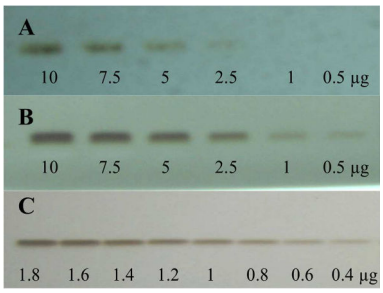


Figure 3.2 – Comparaison des différentes méthodes de révélation du DDM sur plaques HPTLC A : Pulvérisation d'une solution à 50% d'acide sulfurique dans l'eau, suivi d'un chauffage à 120°C pendant 10 minutes. B : Immersion dans une solution à 10 % d'acide sulfurique dans l'éthanol, suivi d'un chauffage à 120°C pendant 10 minutes. C : Immersion dans une solution acidifiée de sulfate de cuivre (II) dans du méthanol, et chauffage à 120°C pendant 6 minutes.

La figure 3.2 montre les plaques HPTLC obtenues pour des gammes de DDM avec les trois méthodes de révélation. L'utilisation de la pulvérisation de l'agent de coloration donnant un aspect granuleux au chromatogramme (figure 3.2 A), cette méthode a rapidement été abandonnée au profit de l'immersion dans la solution de révélation. Toutefois l'emploi de plaque de silice "normale" nécessitait alors le remplacement de l'eau, diluant du premier réactif de coloration, par un solvant organique. Ainsi l'immersion dans une solution d'acide sulfurique dans l'éthanol (figure 3.2 B) donne de bien meilleurs résultats, en terme d'homogénéité des bandes et de quantités détectables. Dans l'optique d'améliorer encore les résultats, la solution de révélation non spécifique utilisée usuellement pour les lipides a aussi été testée car elle contient de l'acide sulfurique en solution dans un solvant organique mais aussi du cuivre (II) qui peut apporter un gain d'intensité de coloration.

Au final la solution de révélation offrant les meilleurs résultats est celle utilisée pour les lipides (figure 3.2 C), nous avons choisi d'adopter ce réactif avec les mêmes conditions d'immersion des plaques que celles optimisées au laboratoire pour l'analyse de lipides, à savoir une immersion de 6 secondes avec une vitesse de descente de 2,5 cm/s. En revanche contrairement à la révélation des lipides, la coloration des tensioactifs apparait rapidement sur la plaque lors du chauffage. Nous avons donc choisi d'utiliser un chauffage plus doux (120 °C au lieu de 140) et plus court (6 à 10 minutes au lieu de 30) afin de limiter un bruit de fond trop important.

La longueur d'onde permettant d'obtenir le maximum d'absorption pour les bandes du F_4H_5-malt et du DDM après révélation a été déterminée grâce au TLC scanner 3. Nous

avons choisi de retenir la longueur d'onde de 366 nm qui peut être sélectionnée en utilisant la lampe à mercure du densitomètre. Les paramètres d'intégration accessibles sur le logiciel winCats (vitesse de scan, fenêtre de scan, type de filtre, et résolution) ont été testés en analysant des plaques en faisant varier ces critères, mais aucune différence significative dans les résultats n'a été obtenue. Les valeurs par défaut ont donc été conservées comme indiqué dans le tableau récapitulatif global de la figure 3.6.

2.3 Détermination de la méthode d'élution

2.3.1 Détermination de la phase mobile

Principe de la méthode : Pour séparer deux substances par HPTLC, la méthode classique de recherche de la phase mobile se base sur le triangle de Snyder [181, 182] qui classe les solvants en fonction de leur sélectivité. Pour ce classement trois critères entrent eu jeu : la capacité du solvant à accepter des protons, sa capacité à en donner, et sa capacité à créer des interactions dipolaires. Les huit groupes obtenus peuvent être visualisés aisément en représentant ces trois caractéristiques par un diagramme en triangle (figure 3.3). Les solvants d'un même groupe auront la même aptitude à séparer deux composés.

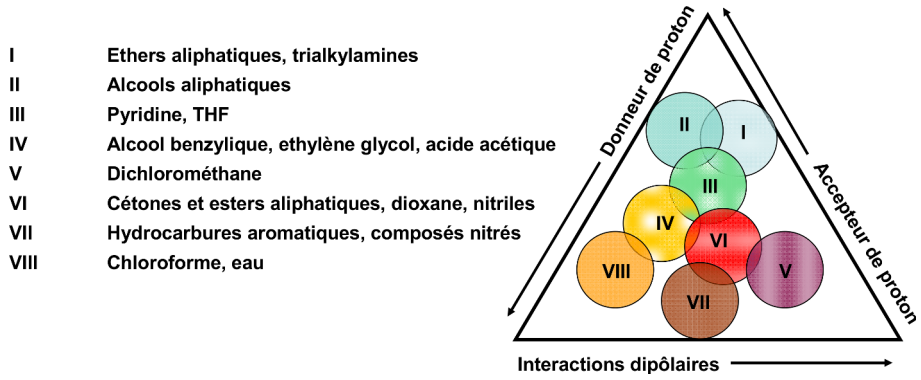


Figure 3.3 – Les groupes de sélectivité des solvants selon le triangle de Snyder. Le classement des solvants, selon leur caractère de dipôle et de donneur ou accepteur de proton, permet de séparer huit groupes.

Pour déterminer la composition d'une phase mobile, la première étape revient à faire un "screening" rapide des solvants, en faisant migrer les composés à séparer avec des solvants purs, en utilisant au moins un représentant de chaque groupe de Snyder. La deuxième étape consiste à réduire (ou respectivement augmenter) la force éluante des solvants pour lesquels les composés ont migré au niveau du front de migration (ou sont restés au niveau du dépôt) par ajout d'hexane ou cyclohexane (ou d'eau ou méthanol). A la fin de ces deux étapes, les solvants permettant une séparation, même légère, des composés sur la plaque HPTLC sont sélectionnés ainsi que ceux donnant des bandes non

diffuses. La troisième étape consiste alors à tester des mélanges de ces "meilleurs" solvants dans différentes proportions, avec l'ajout éventuel de modificateur de pH (acide ou base). Au bout de quelques essais il est alors possible de déterminer le "meilleur" mélange.

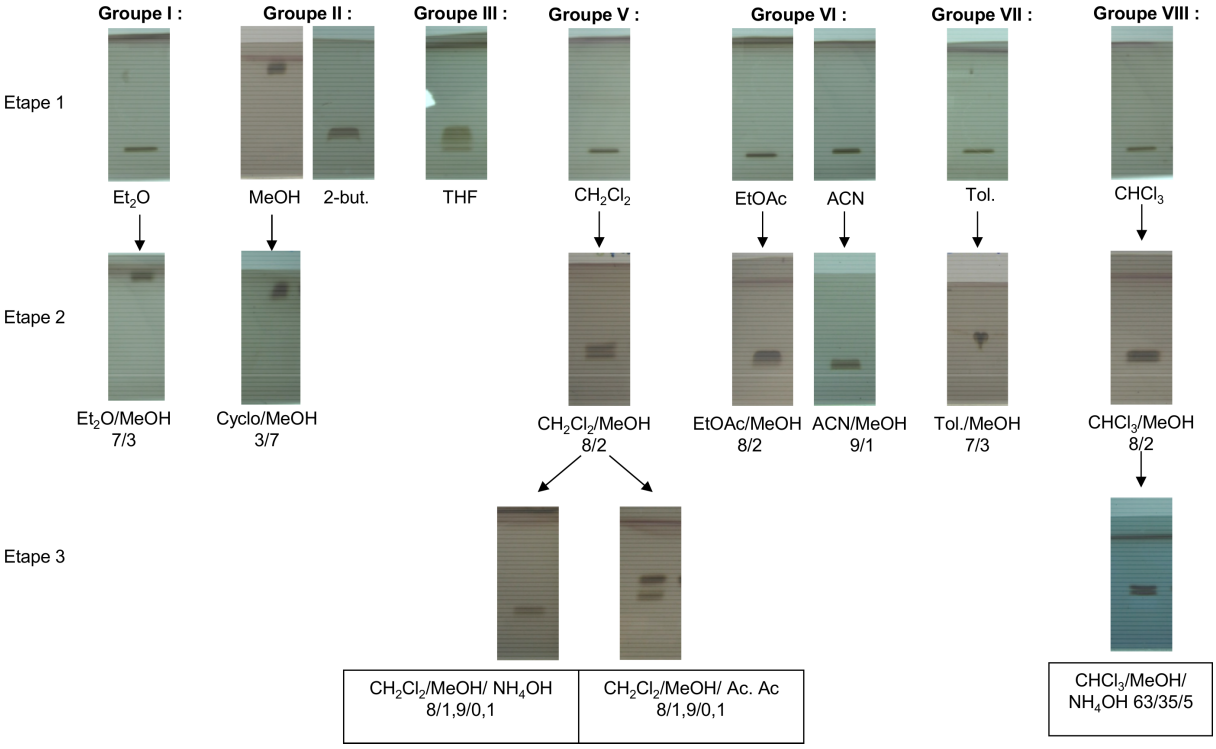


Figure 3.4 – Détermination de la phase mobile selon le principe du triangle de Snyder. Solvants : éther diéthylique (Et_2O), méthanol (MeOH), 2-butanol (2-but.), tétrahydrofurane (THF), dichlorométhane (CH_2Cl_2), acétate d'éthyle (EtOAc), acétonitrile (ACN), toluène (Tol.), chloroforme ($CHCl_3$), cyclohexane (Cyclo), hydroxyde d'ammonium 37 % (NH_4OH), et acide acétique (Ac. Ac.). Les compositions sont données en volumes.

Résultats et discussion : La figure 3.4 montre les principaux résultats obtenus lors de la mise au point de la phase mobile pour la séparation du DDM et du F_4H_5. Les solvants purs testés lors de la première étape de la mise au point sont : l'éther diéthylique (groupe I), les 1-butanol, 2-propanol, 2-butanol et le méthanol (groupe II), le tétrahydrofuran (groupe III), le dichlorométhane (groupe V), acétonitrile et l'acétate d'éthyle (groupe VI), le toluène (groupe VII) et le chloroforme (groupe VIII). Lors de la première étape quatre de ces solvants ont été éliminés à cause de la diffusion des bandes obtenues, il s'agit du 2-butanol, 2-propanol, 1-butanol et le tetrahydrofuran. L'eau n'étant pas miscible avec la plupart des solvants organiques nous avons utilisé le méthanol pour augmenter la force éluante des solvants n'ayant pas permis la migration des composés. Ainsi à l'étape 2 le dichlorométhane et, dans une moindre mesure le chloroforme en présence de méthanol, sont apparus comme les solvants les plus adaptés pour obtenir la

séparation de nos deux tensioactifs. Lors de l'étape 3, l'ajout de 1% d'acide acétique ou d'hydroxyde d'ammonium en tant que modificateur de pH a permis de sélectionner le mélange dichlorométhane/méthanol/acide acétique comme étant le solvant le plus efficace pour la séparation par HPTLC du DDM et du F_4H_5-malt.

La figure 3.4 montre que la phase mobile utilisée par Eriks *et al.* en CCM (chloroforme/méthanol/hydroxyde d'ammonium 63/35/5) permet d'obtenir des bandes de tensioactifs sans diffusion par HPTLC. Toutefois la séparation obtenue n'est pas suffisante dans l'optique d'une quantification de ces deux tensioactifs testés.

2.3.2 Détermination des conditions de migration

Méthode : L'utilisation d'une chambre de migration automatisée permet le contrôle des paramètres de saturation de la cuve et de la plaque de façon à travailler dans des conditions similaires d'un essai à l'autre. Les conditions utilisées peuvent par ailleurs, en fonction des composés à analyser, influer sur la qualité de leur séparation et sur leur diffusion dans la plaque. L'ADC-2 offre la possibilité de contrôler cinq paramètres : l'humidité de la cuve, le temps de saturation de la cuve, la méthode de saturation de la cuve (avec ou sans papier absorbant de saturation), le temps de pré-conditionnement de la plaque et la hauteur de migration.

Dans un premier temps, trois plaques furent préparées avec des dépôts identiques de DDM et F_4H_5-malt seuls ou en mélange afin de tester les conditions de saturation. Pour la plaque A de la figure 3.5, la cuve a simplement été laissée 15 minutes en saturation avant l'introduction de la plaque. Pour la plaque B de la figure 3.5, la saturation a aussi été de 15 minutes mais avec utilisation cette fois d'un papier de saturation dans la cuve. La plaque C de la figure 3.5 a, quant à elle, été introduite dans la partie supérieure de la cuve au début des 10 minutes de saturation de celle-ci (sans papier de saturation), afin de réaliser un pré-conditionnement de la plaque avant la migration. La migration de chacune de ces plaques s'est faite sur 7 cm, paramètre que nous avons amélioré dans un second temps en réalisant une double migration de 5 cm pour la plaque D de la figure 3.5. L'utilisation d'une distance de migration plus courte est en effet un moyen de limiter la diffusion de bandes sur la plaque, mais peut aussi réduire aussi la qualité de leur séparation. C'est pourquoi il est souvent préférable de réaliser alors deux migrations identiques consécutives.

Résultats : Les résultats présentés sur la figure 3.5 indiquent que la réalisation d'un pré-conditionnement de la plaque avec les vapeurs du solvant de migration (plaque C) diminue fortement les interactions des tensioactifs avec la phase stationnaire. Ces derniers sont alors très peu retenus ce qui augmente leurs distances de migration et les phénomènes de diffusion. Cette étape est donc à éviter pour le dosage de tensioactifs par HPTLC. La saturation de la cuve avec ou sans papier (plaque A et B) de saturation est un choix moins évident car les deux permettent la séparation de nos deux composés. Dans le cas où la saturation se fait en présence d'un papier absorbant (plaque B), les

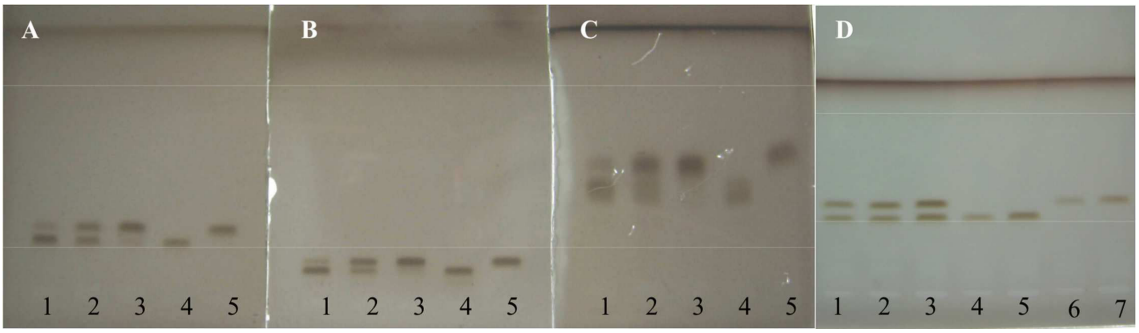


Figure 3.5 – Optimisation des conditions de migration HPTLC. A : saturation de la cuve de 15 minutes. B : saturation de la cuve de 15 minutes en présence d'une papier absorbant. C : saturation de la cuve pendant 10 minutes avec préconditionnement de la plaque. D : double migration avec saturation de la cuve.

tensioactifs migrent à des distances plus faibles sous forme de bandes bien focalisées. Sans le papier de saturation (plaque A), la diffusion des bandes est plus importante mais leur séparation est meilleure car la distance de migration est plus grande. Ce désavantage a pu être contourné en réalisant une double migration sur une plus faible distance dans une cuve saturée sans l'utilisation de papier de saturation (plaque D). Comme la phase mobile utilisée est la même pour les deux migrations, la saturation de 15 minutes de la première migration peut être réduite à 5 minutes pour la seconde migration. De plus afin d'éviter de retrouver les phénomènes résultant d'un pré-conditionnement de la plaque au cours de la deuxième migration, il a été choisi de sécher la plaque 5 minutes par flux d'air entre les deux migrations. Les bandes obtenues sont alors parfaitement définies et séparées. Cette séparation étant suffisante pour permettre la quantification indépendante des deux espèces, ces conditions de double migration ont été retenues.

Par ailleurs lors de la répétition des plaques, il a été remarqué que bien que les distances relatives de migration des composés variaient en fonction de l'humidité ambiante, la séparation restaient tout à fait satisfaisante. Nous avons donc décidé de ne pas fixer ce paramètre d'humidité, dont l'optimisation par la recherche de la nature du sel adéquat et de sa concentration d'usage, peut être assez longue. Au final sur la plaque D, les distances de migration relatives obtenues sont de 0,37 et 0,44 pour respectivement le F_4H_5-malt et le DDM, avec une première migration qui a été réalisée à 23,5°C et 54,8 % d'humidité relative et une seconde migration à 27,3°C et 46,17% d'humidité relative dans la cuve de migration.

3 Optimisation des conditions d'utilisation du robot déposeur d'échantillons et de la reproductibilité

Malgré la détermination des paramètres chromatographiques les résultats obtenus à ce niveau de développement ne permettaient qu'une analyse qualitative des résultats, les quantifications de tensioactifs donnant des résultats non reproductibles. Nous avons donc cherché la cause de ce problème au niveau du dépôt des échantillons, seule étape du procédé d'HPTLC que nous n'avions pas encore optimisé.

3.1 Méthode de lavage de la seringue

Problématique L'observation du fonctionnement du robot ATS-4 nous a permis de cibler deux anomalies occurrentes lors du prélèvement de l'échantillon que nous avons dû corrigé avant de pouvoir obtenir des dépôts reproductibles : lorsque la seringue se remplissait, (i) elle se chargeait également en bulles d'air et (ii) présentait une certaine turbidité de la solution, notamment au début du prélèvement. Or le premier solvant de lavage utilisé était composé d'un mélange chloroforme/méthanol (1/1 : v/v) qui permettait un compromis entre une bonne volatilité pour un séchage efficace de la seringue après lavage (par le chloroforme) et un bon pouvoir solubilisant des tensioactifs pour une élimination complète des traces de tensioactifs entre deux prélèvements (par le méthanol). L'observation de ce trouble dans l'échantillon aqueux lors de son prélèvement semblait donc être la conséquence de la présence, dans la seringue, de chloroforme de lavage résiduel, non miscible dans l'eau et donc dans les échantillons. Ce solvant de rinçage a donc été remplacé par un mélange eau/méthanol (1/1 : v/v).

Résultats La présence de l'eau dans ce nouveau solvant de lavage rend le solvant miscible aux échantillons ce qui permet d'obtenir une meilleure solubilisation des résidus de sels, protéines et tensioactifs et donc un meilleur nettoyage. Avec ce solvant de lavage, plus aucun trouble n'est détectable dans les échantillons prélevés par la seringue. En revanche ce mélange eau/méthanol présente une très mauvaise volatilité et une quantité non négligeable reste sur les parois de la seringue après lavage ce qui dilue le prélèvement suivant. L'ATS-4 ne disposant malheureusement pas de système de séchage de la seringue après lavage, nous avons été obligé de programmer un premier chargement de l'échantillon dans la seringue dans le seul but de mettre celle-ci en équilibre de concentration. Le volume d'échantillon nécessaire à cette précaution d'usage (environ 40 μL) est ainsi jeté à la poubelle et ne peut servir pour réaliser un dépôt sur la plaque.

3.2 Méthode de prélèvement

Problématique Si la présence du trouble dans la seringue a pu être rapidement reliée à l'utilisation d'un solvant de lavage inapproprié, plusieurs hypothèses, quant à

l'origine des bulles d'air dans le corps de la seringue, ont été formulées :

- une obstruction de l'aiguille
- une mauvaise étanchéité du piston de la seringue
- un mauvais positionnement de l'aiguille dans le vial (plaquée contre la paroi du vial)
- une trop grande vitesse de prélèvement
- la présence de bulles au sein des solutions de tensioactifs

Nous avons donc, après avoir changé la méthode de lavage de la seringue, étudié ces différentes hypothèses pour cibler les corrections à réaliser afin d'éviter la présence de ces bulles d'air dans la seringue.

Résultats Pour pallier aux problèmes d'ordre matériel, l'aiguille a été soumise aux ultrasons dans l'eau pendant plusieurs heures, afin d'éliminer d'éventuels bouchons et la seringue a été vérifiée par un test automatique proposé par l'ATS-4. Ce test consiste à plaquer l'embout de l'aiguille sur une bande de silicone et l'ATS-4 remonte alors le piston de la seringue sur toute sa longueur. Cette opération lui permet d'évaluer l'étanchéité de la seringue et de signaler à l'opérateur si celle-ci nécessite d'être remplacée ou non. L'appareil jugeant l'état de la seringue comme satisfaisant, nous avons orienté nos investigations sur le positionnement de l'aiguille dans la solution à prélever.

En effet les échantillons de protéines étant obtenus en quantité limitée, nous avons dès le début miniaturisé les volumes des échantillons nécessaires à l'analyse HPTLC par l'utilisation d'inserts à l'intérieur des vials HPTLC. Pour éviter que l'aiguille ne soit trop près du fond de l'insert lors du prélèvement, sa position a été réajustée de façon à avoir au moins 1 mm entre la paroi inférieure interne de l'insert et l'extrémité de l'aiguille. Cette opération a permis de réduire la quantité de bulles lors du prélèvement d'échantillon mais pas de les éliminer totalement. Il n'a en revanche pas été remarqué de différence en fonction de la géométrie de l'insert utilisé (fond plat ou conique, avec ou sans ressort en plastique, diamètre de 5 ou 6 mm).

Les paramètres d'appareillage ayant été mis hors de cause ou rectifiés, la présence de ces bulles d'air résiduelles était donc aussi la conséquence des caractéristiques inhérentes des échantillons. Bien que peu concentrées, ces solutions de tensioactifs dans l'eau ont tendance à mousser dans des conditions de manipulations trop vigoureuses. Ainsi il a été possible d'éliminer la formation de ces bulles d'air en réduisant fortement la vitesse de prélèvement (3 μl/s) et en forçant l'automate à reverser, dans le vial, le surplus d'échantillon prélevé qu'en toute fin de dépôt et non après chaque prélèvement. La réalisation des dépôts immédiatement après leur préparation ou après 2 heures de repos, n'a pas apporté d'amélioration particulière.

L'ensemble de ces changements a abouti à l'élimination des bulles d'air visibles dans la seringue. Toutefois par crainte de la présence de micro-bulles invisibles à l'œil, un délai de 2 secondes a été ajouté, pour le remplissage de la seringue, afin de permettre l'élimination de la partie supérieure du prélèvement où s'accumulent les bulles d'air. Ce délai supplémentaire de remplissage et la mise en équilibre de concentration de la seringue

sont des précautions consommatrices d'échantillons (environ 40 à 50 μL par échantillon, sont ainsi "jetés") mais néanmoins nécessaires pour obtenir des dépôts reproductibles.

3.3 Méthode de dépôt des échantillons sur la plaque

Problématique : Après avoir lavé et rincé le système puis chargé l'échantillon dans la seringue, le robot se déplace pour effectuer le dépôt sur la plaque par pulvérisation sous flux d'azote. L'ATS-4 permet de réaliser cette étape en chauffant l'extrémité de l'aiguille afin d'éliminer plus rapidement le solvant de dilution des échantillons et de limiter la diffusion dans la plaque. Bien que travaillant avec des échantillons dans l'eau, propice à la diffusion de par sa faible volatilité, nous avons choisi de ne pas utiliser cette option car les protéines aussi bien que nos détergents glycosylés risquaient de se détériorer lors du chauffage et donc de fausser les résultats du dosage. En revanche il fallait déterminer le volume de rétractation, le volume de prédosage et les conditions de répartition des échantillons sur la plaque qui permettaient d'obtenir la meilleure reproductibilité des résultats. Cette reproductibilité est estimée par le logiciel winCats avec le calcul du coefficient de variation (CV) des résultats obtenus pour 6 ou 12 dépôts de 2 μL de standard de DDM à 0,1 mg/mL sur une même plaque.

Résultats : Le volume de rétractation permet de remonter légèrement de l'échantillon dans la seringue avant son déplacement, pour éviter la concentration locale des substances au bout de l'aiguille par évaporation du solvant. Réglé par défaut à 200 nL, sa diminution a entrainé une très faible augmentation du CV et l'augmentation de ce volume n'a pas modifié de façon significative la reproductibilité des résultats. Pour limiter la consommation inutile d'échantillon, le volume de rétractation a donc été fixé à 200 nL. Le volume de prédosage correspond au volume déposé sur la plaque "poubelle" du robot pour enlever la première goutte d'échantillon qui a pu subir une variation de concentration locale malgré l'usage d'un volume de rétractation. Sa valeur par défaut est de 200 nL et des volumes de 600 nL et 800 nL ont aussi été testés. Si le prédosage de 600 nL améliore sensiblement la reproductibilité des résultats, l'augmenter à 800 nL n'a pas montré de gain supplémentaire. La valeur de 600 nL a donc été retenue. Concernant la répartition des dépôts, l'obtention systématique de premiers dépôts hors de gamme lorsque ceux-ci étaient situés à moins de 20 mm du bord de la plaque a mis en évidence la présence "d'effets de bords" dans nos conditions chromatographiques. Il a donc été choisi de laisser au minimum 2 cm entre les dépôts et les bords latéraux de la plaque. Un dépôt à 8 mm du bas de plaque est apparu adéquat. Ainsi sur une plaque HPTLC de 20 cm de large, 22 à 23 dépôts, en bandes de 6 mm, peuvent être réalisés sans perturbation inter-bande.

4 Résultats

4.1 Tableau récapitulatif des conditions HPTLC

Dépôts des échantillons
Rinçage système
- Solvant : eau/méthanol 1/1, v/v
- Nombre de cycle : 1
- Durée du cycle : 8 sec
Remplissage seringue
- Hauteur aiguille dans le vial : - 2 mm
- Nombre de cycles : 2
- Vitesse : 3 µL/s
- Temps supplémentaire : 2 sec
- Charger uniquement le volume programmé : Non
- Remettre l'excès d'échantillon dans vial : Oui
Préparation du dépôt
- Volume de rétractation : 200 nL
- Volume de prédosage : 600 nL
Répartition sur plaque
- Position application en Y : 8 mm
- Position 1ère application en X : 20 mm
- Nombre de pistes : < 23
- Distance entre piste : automatique
- Mode d'application : bande (6 mm)

Développement		
	1ère migration	2ème migration
Prétraitement de la plaque		
- Séchage des dépôts :	Oui	Non
- Pré-conditionnement :	Non	Non
Phase mobile		
- Volume :	10 mL	
- Eluant :	Dichlorométhane/méthanol/Acide Acétique 32/7,6/0,4	
Saturation de la cuve		
- Contrôle de l'humidité :	Non	Non
- Volume eluant :	25 mL	25 mL
- Durée	15 min	5 min
- Avec Papier de saturation	Non	Non
Migration		
- Distance	5 cm	5 cm
- Durée séchage final	5 min	5 min

Révélation
Solution de révélation de sulfate de cuivre
- $CuSO_4$: 20 g
- Méthanol : 200 mL
- Acide phosphorique : 8 mL
- Acide sulfurique : 8 mL
Immersion
- Vitesse : 2,5 cm/s
- Durée : 6 sec
Chauffage sur plaque
- Température : 120 °C
- Durée : 6 min

Scan et intégration
Scan
- Longueur d'onde : 366 nm
- Type de lampe : Hg
- Taille fenêtre : 4 * 0,1 mm
- Vitesse : 20 mm/s
- Résolution : 100 µm/pas
Intégration
- Facteur de filtre : Savitsky-Golay 7
- Correction ligne de base : minimale

Figure 3.6 – Paramètres HPTLC pour la méthode de dosage des tensioactifs

La figure 3.6 reprend l'ensemble des paramètres HPTLC déterminés après optimisation de la méthode de dosage des tensioactifs et détergents.

4.2 Gamme étalon du DDM dans l'eau

La figure 3.7 A montre la plaque HPTLC d'une gamme étalon de DDM dans l'eau. Le standard est à 0,1 mg/mL et la gamme est réalisée par dépôt de volumes croissants de cette solution. Le premier dépôt à droite sur la plaque A, de 0,05 μg de DDM, est à peine visible à l'œil mais donne un signal qui sort du bruit de fond sur le scan du densitomètre. Cette quantité représente donc la limite de détection de la méthode. En traçant l'aire ou la hauteur de pic estimée sur le logiciel d'intégration winCATS en fonction de la quantité de DDM déposée sur la plaque, une droite de calibration est obtenue entre 0,1 et 1,6 μg. L'écart à la linéarité donné par la déviation standard calculée par le logiciel est de 2,2%, ce qui est tout à fait acceptable.

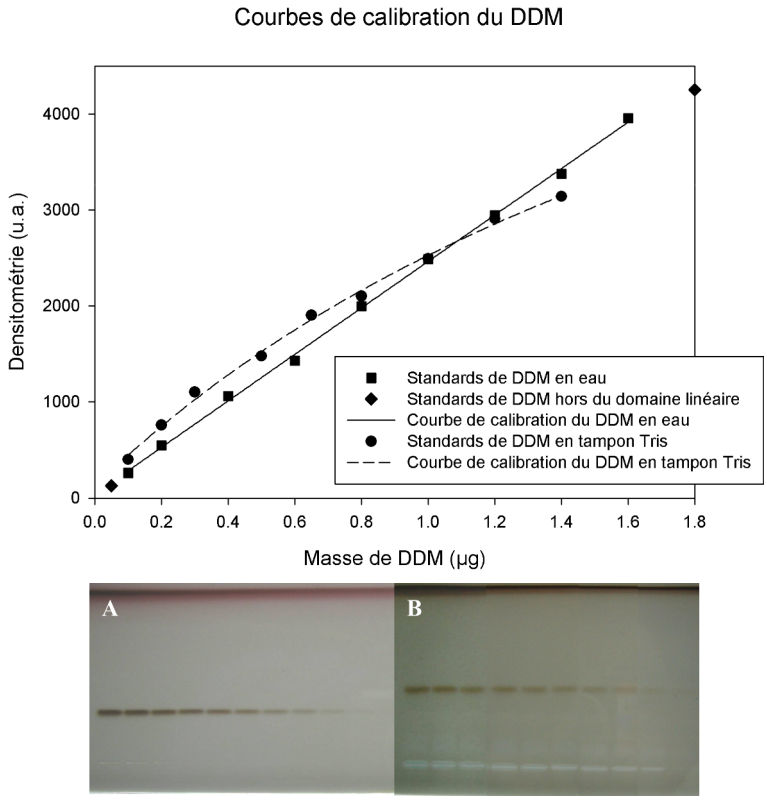


Figure 3.7 – **Gamme étalon et plaques HPTLC** obtenues pour des standards de DDM (0,05-1,8 μg) dans l'eau ou en tampon

4.3 Influence des sels : gamme étalon du DDM dans les conditions d'élution du RC-LH1-puf X

Dans notre étude les échantillons analysés par HPTLC sont des solutions de protéines directement issues de colonne échangeuse d'anions. Le solvant de ces fractions n'est donc pas de l'eau mais un tampon Tris-HCl 20 mM pH 8 auquel s'ajoute 375mM de chlorure de sodium. Ces conditions salines sont imposées par le processus d'élution du complexe protéique RC-LH1-pufX lors de sa purification sur colonne FPLC. Or la présence de sel peut perturber les interactions de type électrostatiques entre les composés et la phase stationnaire des plaques HPTLC et ainsi modifier les résultats chromatographiques. Une gamme étalon de standard de DDM a donc été réalisée dans ces conditions de salinité, figure 3.7 B, afin de connaître l'influence de la présence de ces sels. Au niveau de la plaque HPTLC après révélation, le sel cause un blanchiment de la position du dépôt et une modification de la distance relative de migration. Les composés sont moins retenus par la phase stationnaire et migrent plus loin. La courbe de calibration tracée dans ces conditions peut être modélisée par une équation de type Mickaëlis-Menten, en tenant compte des phénomènes de saturation de la silice, sur une gamme allant de 0,1 à 1,4 μg de DDM avec une déviation standard de 3,97 %. Les tests de reproductibilité réalisés

pour du DDM à 0,1mg/mL dans du tampon (Tris-HCl 20 mM pH 8 375 mM NaCl) ont donné des CV similaires à ceux obtenus dans l'eau (4,5 %). Cette étude montre que cette méthode de dosage est applicable pour quantifier les tensioactifs des solutions de protéines membranaires mais qu'il est nécessaire de préparer des standards dans des conditions similaires à celles des échantillons.

5 Conclusion

5.1 Un exemple de dosage de la bouée de détergent

5.1.1 Principe

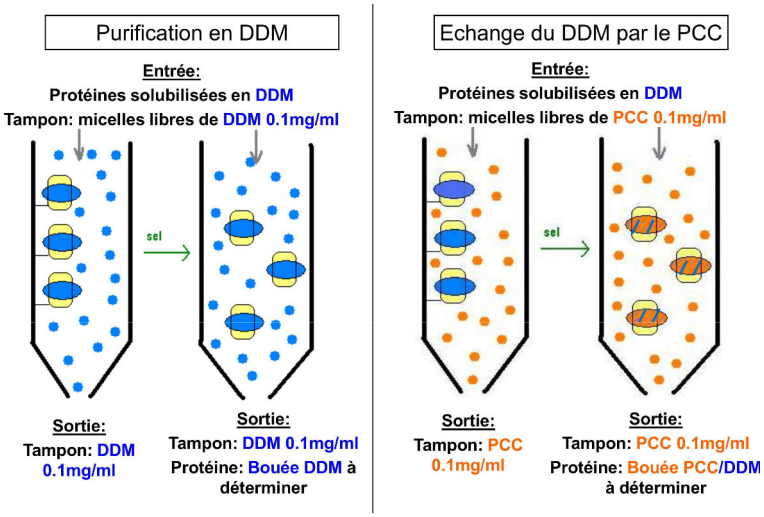


Figure 3.8 – Principe du dosage de la bouée avec ou sans échange du détergent. La protéine, immobilisée sur colonne dans sa bouée initiale, est éluée de la colonne avec un tampon de concentration connue en tensioactif et une gradient de sel.

La figure 3.8 montre le principe de dosage de la bouée de détergent ou du tensioactif après échange pour des échantillons en sortie de colonne échangeuse d'anions. Dans le cas d'une simple purification, la protéine solubilisée grâce à une bouée de DDM, est introduite dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 8, DDM 0,15 mg/mL et est retenue sur la colonne grâce à ses groupements anioniques. La colonne est lavée avec le même tampon de façon à éliminer les liaisons non spécifiques. Puis un gradient de sel permet d'éluer les protéines à des concentrations en sel précises et différente. Le dosage de la fraction contenant la protéine d'intérêt permet de déterminer la quantité de DDM total (DDM libre et lié à la protéine). La quantité de DDM en micelles libres peut être analysée par dosage d'une fraction éluée ne contenant pas de protéine. Sa valeur doit être proche de la concentration du tampon d'élution préparé. Par soustraction de ces deux résultats il est alors possible d'estimer la quantité de DDM formant la bouée de détergent entourant la protéine.

Lors de l'échange du détergent par un tensioactif, on procède de la même façon sauf que le lavage et l'élution de la protéine est réalisé avec le deuxième tensioactif : le PCC-malt. Le DDM minoritaire est échangé avec le PCC-malt et est relargué au fur et à mesure en sortie de colonne jusqu'à son retrait total. Ainsi l'échange pourra être complet ou partiel, et la bouée finale contenir ou non une portion de DDM. Le principe de dosage par HPTLC est alors le même que précédemment. Le dosage de la fraction contenant la protéine donne la quantité totale de chacun des tensioactifs. Le DDM correspond alors directement à la quantité liée à la protéine. Pour la quantité de PCC-malt liée, il faut retrancher la quantité de PCC-malt libre dosée à partir d'une fraction sans protéine ni DDM.

5.1.2 Résultats

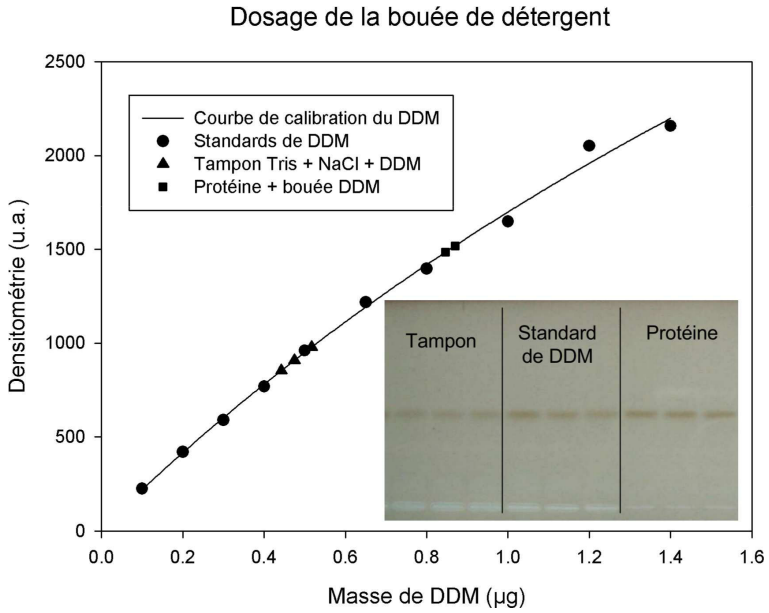


Figure 3.9 – Dosage de la bouée de détergent du RC-LH1-Puf X. Courbes de calibration (cercles) avec les points correspondant au dosage du tampon d'élution en sortie de colonne en absence de protéine (triangles), et de la fraction du dimère de RC-LH1-puf X après dilution (carrés).

La figure 3.9 indique le positionnement dans la gamme étalon de DDM des mesures tripliquées faites sur une fraction de RC-LH1-puf X purifiée en DDM (correspondant au DDM total) et sur une fraction sans protéine représentant la quantité des micelles libres de DDM. Les résultats ainsi obtenus estiment un tampon à 0,096 mg/mL (en accord avec le tampon à 0,1 mg/mL de l'élution) et une bouée de DDM de 1070 (± 160) molécules par dimère de RC-LH1-puf X, soit 1,1 gramme de détergent par gramme de protéine. Ce ratio d'un gramme de détergent par gramme de protéine est en accord avec les ordres de grandeur obtenus sur d'autres protéines membranaires [173, 183].

L'insert de cette figure montre le type de plaque HPTLC obtenue lors du dosage de la bouée de détergent d'une solution. Il permet de vérifier que la distance relative de migration du DDM est bien la même entre le standard préparé dans un tampon similaire à la protéine, la fraction de tampon élué et la fraction de RC-LH1-pufX. Il est aussi important de remarquer qu'aucune autre bande n'apparait sur la plaque, ce qui signifie (i) que la totalité du DDM migre au niveau de la bande analysée et que (ii) la bande du DDM ne subit pas d'interférence de la part d'autres espèces (l'absence d'un second composé migrant au même niveau que le DDM a été vérifiée par ailleurs en variant la composition de l'éluant). Ce résultat améliore de façon significative la technique CCM développée Ericks où une partie du DDM reste associée à la protéine au niveau du dépôt [178]. Ce défaut est certainement la cause de la grande quantité devant être chargée sur la plaque CCM par rapport à l'HPTLC.

5.2 Comparatifs avec les autre méthodes de dosage de détergents

Méthode	Dosage colorimétrique	GC	FTIR	Angle de contact[a]	CCM	HPTLC
Référence bibliographique	[176]	[177]	[172]	[173]	[178]	[179]
Pré-traitement échantillon	Non	Oui	Non	Non	Oui	Non
Volume minimal requis (μL)	50	-	10	20	-	150
Domaine de quantification (μg)	4-20	0,01-2,5	18-584[b]	0,2-2	10-350	0,1-1,4
Limite de détection (μg)	2,45	0,01	3	-	-	0,05
Détection des échanges	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui

Tableau 3.1 – Comparatif des caractéristiques des principales méthodes de dosage des détergents en routine [a] dispositif non commercialisé, [b] gamme sur l'octylglucoside au lieu du DDM

Plusieurs méthodes de dosage ont été développées pour déterminer la quantité de détergent liée aux protéines membranaires, comme par exemple la spectroscopie infra rouge [172], la chromatographie gazeuse [177] ou sur couche mince [178], dosage colorimétrique [176] ou la mesure de l'angle de contact [173]. Le tableau 3.1 présente un rapide survol des caractéristiques de ces techniques en terme de limites de détection, domaine de

quantification, qualité de la préparation des échantillons et de leur aptitude à doser les échange de détergent.

Ce tableau met en lumière que les méthodes déjà publiées sont souvent moins rapides à cause de l'étape de pré-traitement de l'échantillon que l'HPTLC. Elles présentent aussi des domaines de quantification qui nécessitent de travailler sur des concentrations plus élevées en tensioactifs. Par ailleurs l'HPTLC est la seule méthode avec la CCM qui offre la possibilité de doser, en routine, deux tensioactifs simultanément et indépendamment dans une même solution lors d'échange de détergents. Toutefois la méthode HPTLC permet de quantifier des quantités 100 fois plus faibles que la CCM classique. A priori, le seul désavantage de l'HPTLC est qu'elle requiert un volume plus grand d'échantillon de protéine, à cause des précautions de rinçage et de mise en équilibre de concentration du robot déposeur d'échantillon. Mais cette contrainte est contrebalancée par le domaine de quantification qui permet travailler sur de très faibles concentrations. Ce sont bien des contraintes de volume, et non de quantité de matière. Ainsi il est bien souvent possible d'utiliser des fractions de protéine diluées, alors que d'autres méthodes imposent de les concentrer. Les quantités de protéines sont donc au finale similaires, voire inférieures aux autres méthodes. La méthode HPTLC de dosage des tensioactifs présentée dans ce chapitre est une méthode de routine permettant l'analyse directe d'échantillons de protéines en sortie de colonne de purification et pourra donc être utilisée pour une étude plus approfondie de la composition de la bouée de détergent en fonction des conditions initiales de solubilisation des protéines.

CHAPITRE 4

Étude des lipides et tensioactifs liés au complexe RC-LH1-puf X de *Rhodobacter blasticus*

Dans le chapitre 2, nous avons étudié une série de tensioactifs seuls en solution ce qui nous a permis de cibler deux d'entre eux, le DDM et PCC-malt, comme étant les plus intéressants pour la cristallisation de protéines membranaires. Nous allons dans ce chapitre, les tester sur le complexe RC-LH1-pufX en déterminant la quantité de tensioactifs et de lipides liés au complexe RC-LH1-pufX lorsque celui-ci est purifié en présence de DDM ou de PCC-malt. Ce résultat devrait nous permettre de mieux contrôler les conditions de cristallisation de ce complexe de façon à pouvoir optimiser la bouée autour de la protéine, dans le but d'améliorer la qualité de la diffraction des cristaux du complexe RC-LH1-pufX.

Pour caractériser le complexe PDL, il faut tout d'abord identifier les différents composés en présence et choisir une méthode analytique qui nous permet de les doser indépendamment. Dans notre cas, nous avons :

- le complexe protéique RC-LH1-pufX quantifiable par la méthode classique du dosage de Bradford (kit commercial),
- le tensioactif (DDM ou PCC-malt), quantifiable par HPTLC avec la méthode développée au chapitre de ce manuscrit.
- les lipides qui peuvent être quantifiés indépendamment les uns des autres par HPTLC selon une méthode décrite dans la littérature [180]. Toutefois la composition en lipides des membranes de *Rb. basticus* n'ayant pas été décrite dans la littérature, nous avons donc cherché dans un premier temps à identifier les lipides constitutifs des membranes de cette bactérie.

1 Étude de la composition en lipides chez *Rb. blasticus*

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Dr. Frédéric Beisson et M. Stéphan Cuiné du laboratoire LB3M du CEA-Cadarache qui ont accepté de mettre à notre disposition les appareillages nécessaires à l'extraction et à la transméthylation des lipides, ainsi que leurs équipements de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectromètrie de masse (GC-MS). Ils ont par ailleurs pris en charge l'analyse de nos échantillons par chromatographie en phase liquide couplée à la spectromètrie de masse (HPLC-MS). Avant de présenter nos résultats, nous allons brièvement présenter les différentes techniques que nous avons utilisées pour l'étude des lipides pour bien comprendre quelles sont les informations auxquelles elles donnent accès.

1.1 Les techniques utilisées pour l'étude des lipides

1.1.1 L'HPTLC

L'utilisation de l'HPTLC pour l'analyse de lipides a fait l'objet de plusieurs revues scientifiques [180, 184]. Avant d'être déposés sur plaque HPTLC, les échantillons sont extraits dans une phase organique par des techniques du type Bligh and Dyer [185]. Diverses phases mobiles, décrites dans ces revues, peuvent alors être utilisées en fonction des classes de lipides à séparer et à analyser. Les distances de migrations obtenues étant spécifiques de chaque classe de lipide, la quantification peut être réalisée grâce à des solutions de lipides standards. Il est cependant difficile d'identifier un lipide inconnu directement par HPTLC puisque cela suppose de trouver un standard qui migre exactement à la même position quelque soit le solvant de migration. L'analyse de lipides par HPTLC est donc une méthode simple et rapide pour la quantification des lipides mais nécessite souvent l'identification au préalable de ceux-ci pour travailler avec les bons standards.

1.1.2 La GC-MS

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectromètrie de masse (GC-MS) permet l'identification et la quantification des acides gras des lipides. Elle requiert un pré-traitement des échantillons où les lipides en milieux aqueux sont traités par de l'acide sulfurique en présence de méthanol pour cliver et transméthyler les chaînes d'acide gras. Les méthylesters ainsi formés sont des espèces suffisamment volatiles pour pouvoir être séparées par GC après leur extraction en milieu organique. A la sortie de la colonne de GC chaque fraction est divisée en deux. La première est analysée par le spectromètre de masse. La seconde moitié de la fraction passe devant un détecteur à ionisation de flamme (FID, en anglais) : les composés sont brûlés dans une flamme air-hydrogène, et une électrode collecte les ions carbone formés ce qui génèrent un courant d'ionisation. L'amplification

de ce courant permet de détecter un signal proportionnel à la masse du soluté. Lorsqu'un étalon interne est ajouté en quantité connue aux échantillons avant transméthylation, le FID permet d'obtenir la quantité de chaque type de méthylester en tenant compte du rendement de transméthylation. En pratique les TAG (triacylglycérol) avec des chaînes de 15 ou 17 carbones (C15 ou C17) sont souvent utilisés en étalon interne car les chaînes d'acide gras à nombre de carbones impair étant très rares à l'état naturel dans le monde bactérien, elles ne vont donc pas interférer avec les chaînes constitutives des membranes de bactéries. Les profils de fragmentation obtenus en masse sont caractéristiques quant à eux de chaque chaîne d'acide gras et permettent de différencier deux chaînes similaires à une insaturation près.

1.1.3 L'HPLC-MS

La technique de choix pour l'identification de la composition en lipide d'un échantillon inconnu est sans doute la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) qui renseigne aussi bien sur la structure de la tête polaire que sur celle des chaînes d'acide gras. En pratique, les lipides extraits des échantillons sont séparés sur colonne de chromatographie liquide. Pour chaque composé en sortie de colonne HPLC, la masse de l'ion moléculaire est mesurée et les ions les plus abondants sont fragmentés pour obtenir leurs spectres de masse. La comparaison de ces spectres, à des banques de données permet l'identification des lipides. En résumé, la figure 4.1 représente les différentes sous unités structurelles des lipides analysées par GC-MS et HPLC-MS.

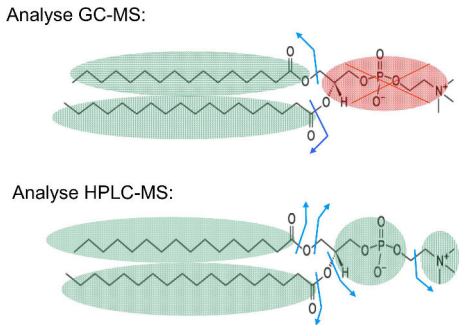


Figure 4.1 – Analyse des lipides par GC-MS *vs.* HPLC-MS : l'information est obtenue sur les fragments des lipides. La tête polaire du lipide n'est pas analysée par GC-MS.

1.2 Identification des lipides liés au RC-LH1-puf X de *Rb. blasticus*

1.2.1 Analyse HPTLC d'extraits de dimères

Dans un premier temps, pour identifier les différents lipides associés aux dimères de RC-LH1-pufX, nous avons testés différentes conditions d'élution décrites dans la littéra-

ture. Par analogie au complexe protéique RC-LH1-pufX de *Rb. sphaeroïdes*, nous nous attendions à retrouver dans la composition des membranes de *Rb. Blasticus* quatre lipides majoritaires : le PC(Phosphatidylcholine) , PE (Phosphatidylethanolamine), PG (Phosphatidylglycerol) et CL (cardiolipine) [186]. Les résultats obtenus (figure 4.2) montrent que les distances de migration de standards de ces 4 phospholipides ne correspondent pas à celles des lipides contenus dans nos échantillons. Par conséquent, seule la bande du DDM peut être identifiée directement par HPTLC. Par ailleurs, ces résultats indiquent que la condition "migration acide" présente la meilleure séparation des différents lipides, elle a donc été retenue pour la suite des expériences par HPTLC.

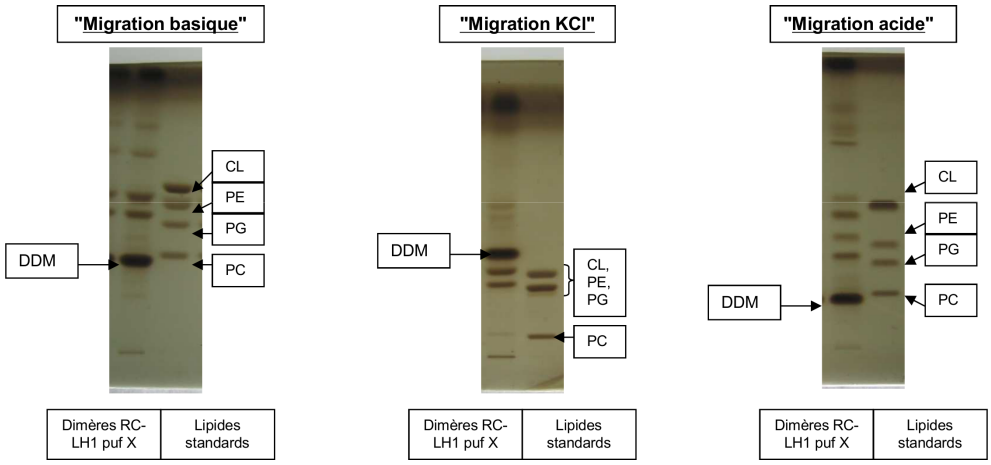


Figure 4.2 – Identification des lipides par variation de la phase mobile sur HPTLC. Profils d'élution HPTLC d'extraits de dimères RC-LH1 puf X purifiés (pistes à gauche), et de standards de PE, PG, PC et CL (pistes à droite). Les phases mobiles sont issus de la littérature pour l'analyse de lipides polaires [180] : "Migration acide" : chloroforme/méthanol/acide acétique/eau (30/5,2/3,6/1,6 : v/v/v/v). "Migration basique" : Chloroforme/méthanol/eau/hydroxyde d'ammonium (24/13,6/1,6/0,8 : v/v/v/v). "Migration KCl" : Acétate de méthyle/propan-1-ol/chloroforme/méthanol/chlorure de potassium 0,25% (10,5/10,5/11,8/4,2/3 : v/v/v/v).

Cette bande de DDM étant très intense, nous avons cherché à vérifier que sa présence n'affectait pas les distances de migration des composés dans l'échantillon de dimères par un effet matrice. Ce phénomène pourrait, en effet, expliquer la différence de migration observée entre les standards et les échantillons. Pour vérifier cette hypothèse, l'analyse HPTLC a été réalisée sur des extraits de membranes photosynthétiques qui présentent l'avantage de ne pas contenir de DDM.

1.2.2 Analyse HPTLC d'extraits de membranes

Les profils d'élution sur plaque HPTLC d'extraits de membranes et de complexes de RC-LH1-pufX (figure 4.3) présentent des bandes aux mêmes niveaux de migration. La

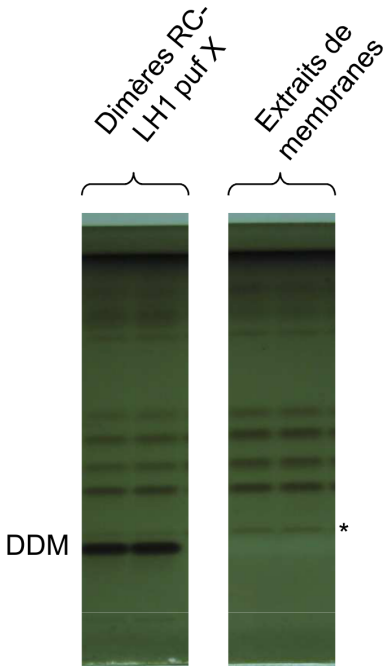


Figure 4.3 – **Plaque HPTLC de l'analyse des lipides chez *Rb. blasticus***. Profils d'élution HPTLC d'extraits de dimères RC-LH1 pufX purifiés (gauches) et de membranes après cassage des cellules (droite). Phase mobile : chloroforme/méthanol/acide acétique/eau (30/5,2/3,6/1,6 : v/v/v/v)

migration des lipides n'est donc pas modifiée par la présence du DDM dans les échantillons de dimères. Par ailleurs, ce résultat indique clairement que bien qu'il puisse y avoir un enrichissement local de la quantité de certains lipides au contact de la protéine membranaire [187], il n'y a pas d'exclusion totale d'un lipide particulier. Tous les lipides composant la membrane se retrouvent bien associés au dimère purifié dans la bouée. Identifier les lipides liés au RC-LH1-puf X revient donc à identifier les lipides composant les membranes invaginées de *Rb. blasticus*.

Nous observons toutefois qu'une bande supplémentaire (marquée $*$ sur la figure) est obtenue dans les échantillons de membranes extraites qui n'apparait pas (ou peu) dans les échantillons de dimères extraits puisqu'elle est masquée par la bande du DDM. Nous avons donc choisi de continuer la recherche de l'identification des lipides sur des extraits de membranes, plutôt que de dimères, de façon à travailler sur des extraits plus riches en lipides et avoir accès sur HPTLC, à cette nouvelle bande qui est aussi, sans doute, un lipide.

L'identification des lipides présents chez *Rb. blasticus* n'ayant pas été possible par HPTLC, nous avons utilisé les techniques de GC-MS et d'HPLC-MS.

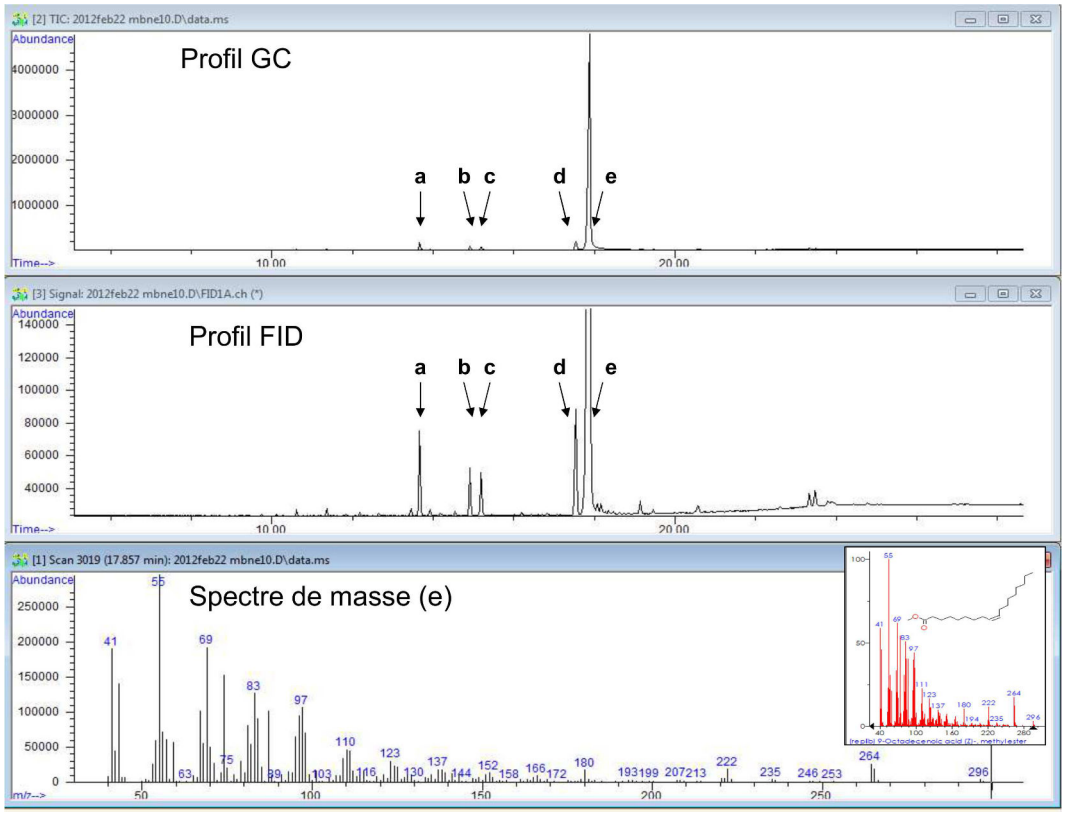


Figure 4.4 – Résultats de l'analyse GC-MS. Le profil d'élution en sortie de colonne de chromatographie gazeuse (haut), et le profil de détection par FID (milieu) indiquent la présence de 5 composés notés de a à e, qui peuvent être identifiés par fragmentation en spectrométrie de masse (bas) et comparaison à la base de donnée (spectre dans l'insert). Les composés sont des méthylesters en C15:0 (a), C16:0 (b), C16:1 (c), C18:0 (d) et C18:1 (e).

1.2.3 Analyse GC-MS

Les échantillons biologiques étant souvent de composition complexe avec la présence de multiples espèces, l'usage direct d'une technique aussi performante que l'HPLC-MS aboutit à l'obtention d'une multitude d'informations qu'il est parfois difficile d'analyser lorsque les espèces chimiques recherchées n'ont pas été ciblées au préalable. C'est pourquoi nous avons dans un premier temps réalisé uniquement l'étude des acides gras par GC-MS. En effet l'étape de transméthylation et d'extraction permet d'isoler et de recueillir uniquement les acides gras de l'échantillon biologique initial, ce qui simplifie grandement le système à analyser et donc les résultats obtenus. Dans notre cas c'est un moyen de s'affranchir du signal des différentes protéines des membranes et de leurs cofacteurs (pigments, quinones, etc).

La figure 4.4 montre les résultats obtenus à partir d'un extrait de membranes transméthylé de *Rb. blasticus* auquel a été rajouté un étalon interne d'acide gras C15:0. Sur le profil GC il est possible de remarquer la simplicité du signal obtenu en sortie de colonne,

avec la présence de seulement cinq espèces chimiques, identifiables par spectrométrie de masse. Le *composé a* correspond à l'étalon interne en C15:0 alors que les autres espèces proviennent de l'échantillon qui contient des acides gras en C16:0 (*composé b*), en C16:1 (*composé c*), en C18:0 (*composé d*) et en C18:1 (*composé e*). La détection par ionisation de flamme permet de conclure que les chaînes d'acides gras en C18:1 sont largement majoritaires devant les chaîne en C18:1 puis en C16. Ce résultat obtenu pour les lipides membranaires de l'espèce *Rb. blasticus* est cohérent avec la composition en acides gras des membranes d'autres bactéries pourpres [188].

1.2.4 Analyse HPLC-MS

Une fois la composition en acide gras déterminée, nous avons pu analyser des extraits de membranes totales par HPLC-MS et rechercher un certain nombre de lipides que nous avions prédéfinis : des glycerophospholipides (PC, PE, PG, PI, PS et CL) [1], des sphingolipides (SM, Cer) [2] et des glycerolipides (MAG, DAG, TAG, MGDG, DGDG, SQDG) [3].

La figure 4.5 (en haut) donnant le chromatogramme HPLC obtenu pour un échantillon de membranes extraites superposé à celui d'un échantillon "blanc" montre bien la complexité du signal obtenu par rapport au profils GC des acides gras. Un scan automatique des résultats a été réalisé dans les régions du chromatogramme où le signal de l'échantillon se différencie du blanc. La recherche se fait par comparaison des profils de fragmentation obtenus lors de l'analyse de l'échantillon avec les profils théoriques des composés prédéfinis, répertoriés dans la base de donnée.

Ainsi la présence de trois lipides, PE (Phosphatidylethanolamine), PG (Phosphatidylglycerol) et PC (Phosphatidylcholine) a été mise en évidence, avec majoritairement des chaînes globales en C36:2 (histogramme en bâton de la figure 4.5) qui peuvent être interprétées comme deux chaînes C18:1 en accord avec les résultats de GC-MS.

1.2.5 Identification des bandes HPTLC par HPLC-MS

L'analyse HPLC-MS d'un extrait total de membrane n'ayant permis de déceler que 3 types de lipides (PE, PC et PG) alors que 5 composés sont révélés lors de l'élution HPTLC, il a été décidé de réaliser une HPLC-MS de chacune de ces 5 bandes présentes sur plaque HPTLC. L'objectif est de, non seulement confirmer la présence des trois phospholipides déjà identifiés, mais également de déterminer la nature des deux autres bandes. L'analyse nous permettra ainsi de conclure si l'obtention de ces cinq bandes correspond

1. PC : Phosphatidylcholine , PE : Phosphatidylethanolamine, PG : Phosphatidylglycerol, PI : Phosphatidylinositol, PS : Phosphatidylserine, CL : cardiolipine
2. SM : sphingomyéline, Cer : céramide
3. MAG, DAG, TAG : mono-, di- et tri-acylglycérol, MGDG, DGDG : mono- et di-galactosyl diglycerides, SQDG : sulfoquinovosyl diglycerides

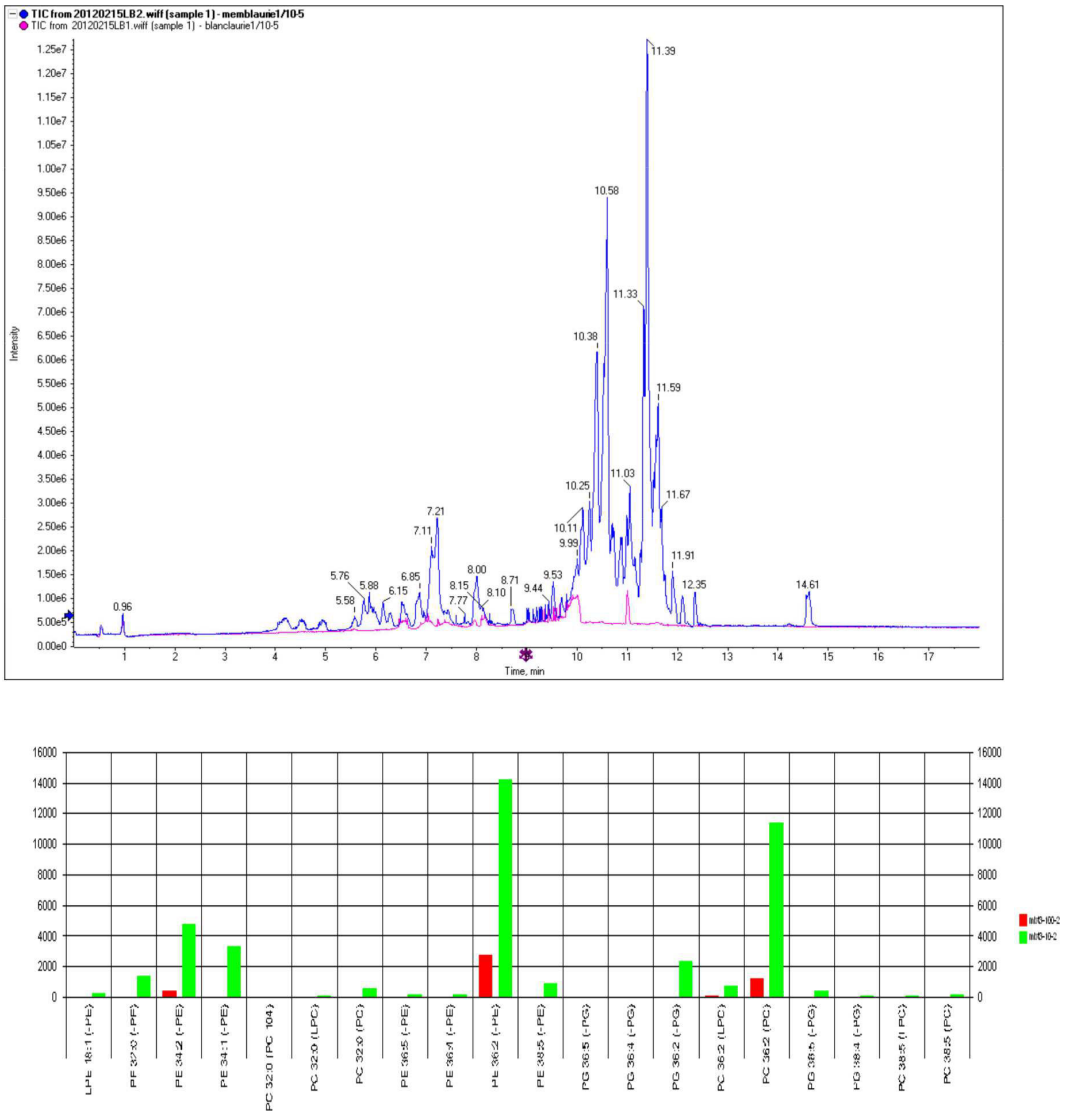


Figure 4.5 – **Résultats HPLC-MS de l'analyse de membranes de *Rb. blasticus***. Haut : Profils d'élution HPLC d'un extrait de membrane (bleu) par rapport au blanc (rose). Bas : histogramme en bâton représentant la fréquence d'identification des structures des lipides recherchés lors du scan automatique des résultats (l'échantillon gris clair est 10 fois plus dilué que le gris foncé).

à la séparation de ces trois lipides en fonction de leurs chaînes d'acides gras (hypothèse peu probable) ou si nous sommes en présence d'autres lipides.

L'exemple de l'analyse de la bande 2 (figure 4.6) montre que cette bande contient du PG avec différentes compositions en acide gras. Chaque bande correspond donc bien à une classe de lipide. La séparation se fait selon la nature de la tête polaire et non en fonction des chaînes d'acide gras. Cette analyse sur chacune des 5 bandes a permis d'attribuer la bande 1 (la plus basse) au PC, la bande 2 au PG et la bande 4 au PE

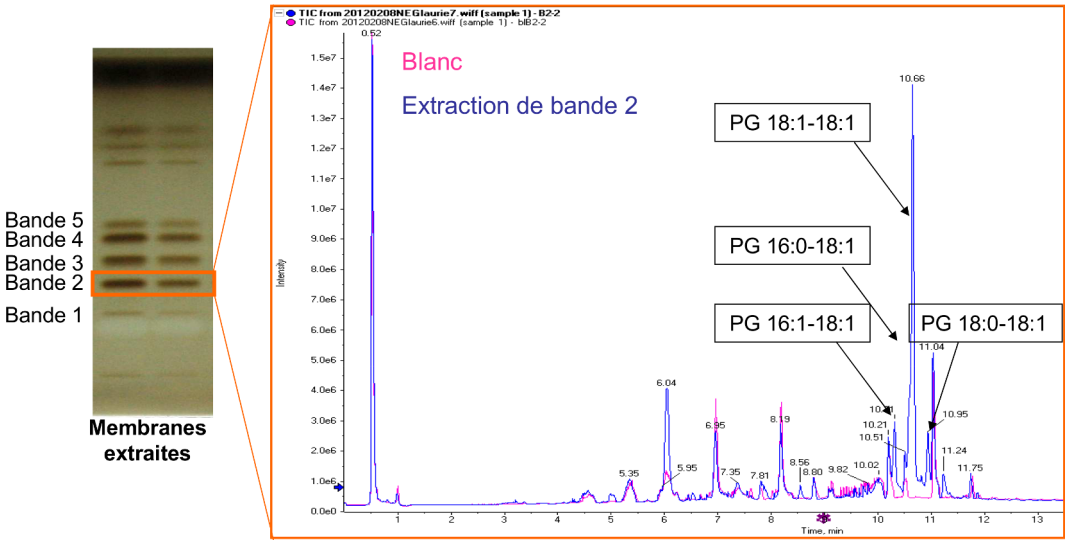


Figure 4.6 – Analyse par HPLC-MS de la bande 2 de l'HPTLC. *Gauche* : profil d'élution HPTLC d'extraits de membranes de *Rb. blasticus*. Phase mobile : chloroforme/méthanol/acide acétique/eau (30/5,2/3,6/1,6 : v/v/v/v). *Droite* : Analyse HPLC-MS de l'extraction de la bande 2. Le signal de l'extrait de la bande 2 (en gris foncé) se différencie du signal du blanc (en gris clair) pour des temps de rétention entre 10,5 et 11,5 minutes. Le fragmentation des composés sortant dans cette zone a permis d'identifier le PG avec différentes compositions de ses chaînes d'acide gras.

(figure 4.7). Par ailleurs, la comparaison du profil de fragmentation en masse du composé de la bande 3 avec la base de données, a permis d'identifier un $4^{ième}$ lipide : le MMPE (monométhyle PE). En revanche aucune référence de la base de données ne correspond au profil de fragmentation obtenu pour la bande 5 (la plus haute), ce composé reste donc non identifié. Pour les quatre lipides identifiés les différentes combinaisons d'acides gras en 16:0, 16:1, 18:0 et 18:1 ont été retrouvées, avec pour tous une large majorité de lipides à deux chaînes en 18:1, en accord avec les résultats précédents. La composition en acides gras est la même pour tous les lipides de la membrane photosynthétique et il n'y a donc pas de lipide possédant une chaîne particulière par rapport aux autres. L'ensemble de ces résultats est résumé sur la figure 4.7.

1.2.6 La question de la cinquième bande et l'absence de cardiolipine

L'analyse HPLC-MS de la bande 5 n'a malheureusement pas permis d'identifier quel était la nature de ce composé. Les spectres de fragmentation obtenus ne présentent pas les pertes de masse caractéristiques des chaînes d'acide gras de lipides et aucune correspondance avec les références des bases de données utilisées n'a été trouvée. Ce résultat indique soit que le composé 5 n'est pas un lipide, soit que la méthode de fragmentation MS n'est pas adaptée à l'analyse de ce composé, soit que l'extraction de la bande HPTLC n'a pas fonctionné.

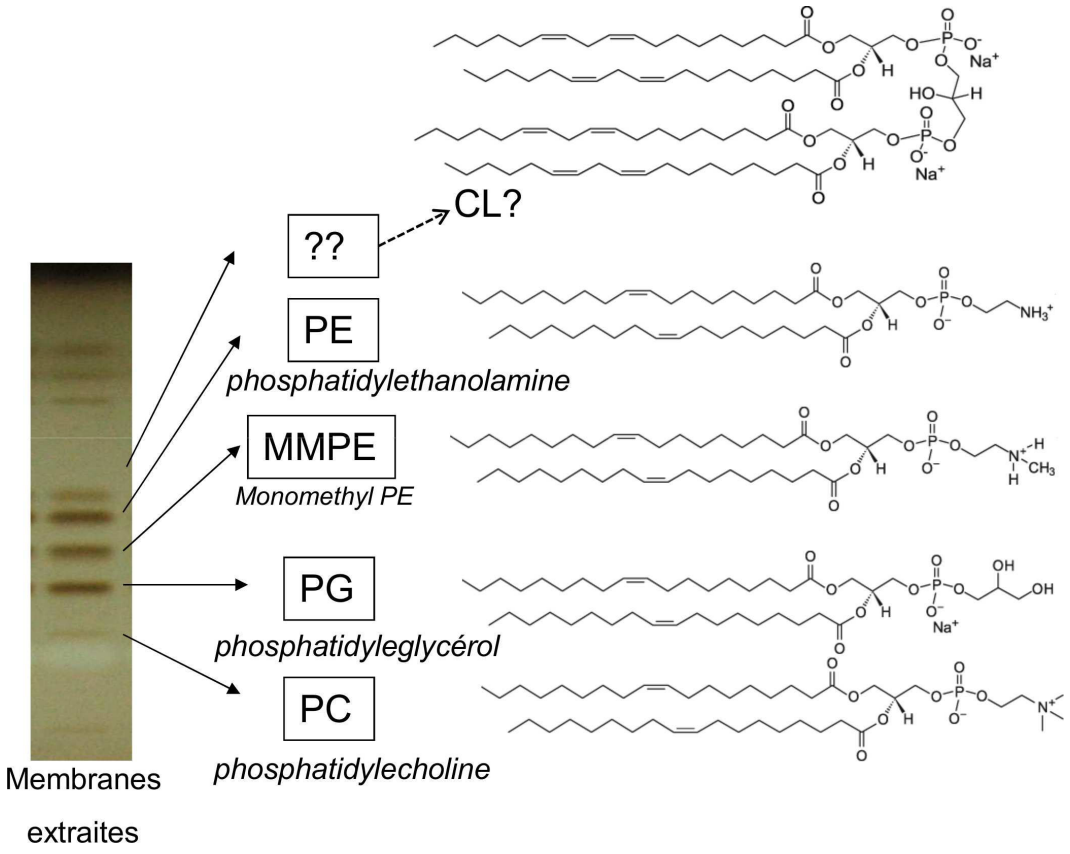


Figure 4.7 – Identification des bandes de lipides sur plaque HPTLC. Profil d'élution HPTLC d'extraits de membranes de *Rb. blasticus*. Phase mobile : chloroforme/méthanol/acide acétique/eau (30/5,2/3,6/1,6 : v/v/v/v).

Par ailleurs en comparant avec les autres souches de la famille de *Rhodobacter* dont la composition lipidique a été décrite dans la littérature [186], il est surprenant de ne pas retrouver la présence de cardiolipine dans nos analyses sur la souche de *Rb. blasticus*. Ce phospholipide est, en effet, non seulement présent chez *Rb. sphaeroides* mais jouerait aussi un rôle dans le transfert des quinones au cours du cycle photosynthétique [187]. Or d'après la figure 4.2, dans les conditions dans lesquelles ont été éluées les membranes ("migration acide"), le standard de cardiolipine migre au dessus du standard de PE. Cette donnée tend à indiquer que le composé 5 pourrait être de la CL, ce que nous avons cherché à vérifier de différentes manières malheureusement sans succès.

La première stratégie utilisée a consisté comparer les échantillons avec des standards. Mais comme nous l'avons vu figure 4.2, le standard de CL présente une légère différence de distance de migration par rapport à la bande 5 ce qui ne permet pas de confirmer l'identité du composé 5. A l'inverse elle ne permet pas non plus d'affirmer que ce n'est pas de la cardiolipine car une très légère différence de migration est aussi obtenue entre les standards (PE, PG et PC) et les lipides des échantillons. En effet même si la séparation

des phospholipides se fait en fonction de leurs têtes polaires, le fait que les échantillons contiennent des mélanges d'acide gras modifie légèrement leurs distances de migration par rapport aux standards uniquement composés de chaînes en C18:1. Or la cardiolipine présente quatre chaînes d'acide gras, ce qui augmente la probabilité d'avoir des mélanges de longueur de chaîne par rapport au PE, PG ou PC qui n'en possèdent que deux. Ainsi la différence de distance de migration entre l'échantillon et le standard en C18:1 est potentiellement amplifiée dans le cas de la CL.

Dans une deuxième temps, nous avons essayé de montrer que ce composé 5 pouvait être un phospholipide par coloration de la plaque HPTLC au bleu de molybdène, spécifique des fonctions phosphates. Malheureusement les quantités de lipides analysées par HPTLC étant très faibles, la coloration obtenue pour les bandes de PE, PC ou PG sortait à peine du bruit de fond et aucune coloration de la bande 5 n'est apparue. Comme ce composé se colore beaucoup moins bien au sulfate de cuivre, il est difficile savoir si ce résultat provient de la nature du composé 5 (qui dans ce cas, ne serait pas un phospholipide) ou simplement de sa faible quantité (qui serait inférieure à la limite de détection par le bleu de molybdène). Le chargement d'une plus grande quantité d'extrait membranaire entrainant une augmentation de la diffusion et une perte de la séparation des bandes de la plaque HPTLC, il n'a pas été possible de conclure sur la coloration au bleu de molybdène de cette bande 5.

Dans une troisième approche, nous avons comparé les profils HPTLC des membranes de *Rb. blasticus* avec des membranes "témoins" possédant (*Rb. sphaeroides*) ou ne possédant pas (*Rb. capsulatus*) de CL (figure 4.8). Mais la qualité de l'élution des extraits membranaires de *Rb. sphaeroides* est altérée par des interférences entre les différents composés présents (*cf.* le front de migration sur la plaque). La migration des lipides se retrouve fortement perturbées et empêche la comparaison avec le profils d'élution des membranes de *Rb. blasticus*. Quant à *Rb. capsulatus*, son profil présente une bande qui migre à peu près au même niveau que la bande 5. Ces deux composés pourraient donc être identiques et ne seraient dans ce cas pas de la CL puisqu'elle est absente chez *Rb. capsulatus*.

Au niveau de l'analyse HPLC-MS nous avons tout d'abord vérifié et confirmé que la méthode utilisée était bien capable de détecter et analyser des solutions de standard de cardiolipine. Toutefois l'analyse d'un mélange de standards de lipides PE, PC, PG et CL, tous en concentrations égales, montre clairement que même si la CL est retrouvée et analysée, elle est détectée en bien plus faible quantité que les trois autres lipides. Ceci pourrait être dû à un faible rendement d'ionisation de la CL par rapport aux autres lipides, du fait de sa masse deux fois plus élevée. Cette difficulté est amplifiée dans les échantillons biologiques, plus complexes, puisque nous n'avons pas réussi à détecter la présence de CL dans des extraits de membranes de *Rb. sphaeroides*, pourtant sensées contenir de la CL. Pour identifier la CL en HPLC-MS il semble qu'il faille travailler avec des échantillons relativement purs et concentrés. L'analyse de bandes HPTLC permet de répondre au critère de pureté puisque les autres composés de l'échantillon sont exclus de la bande. Mais il faut posséder une méthode d'extraction de la silice suffisamment

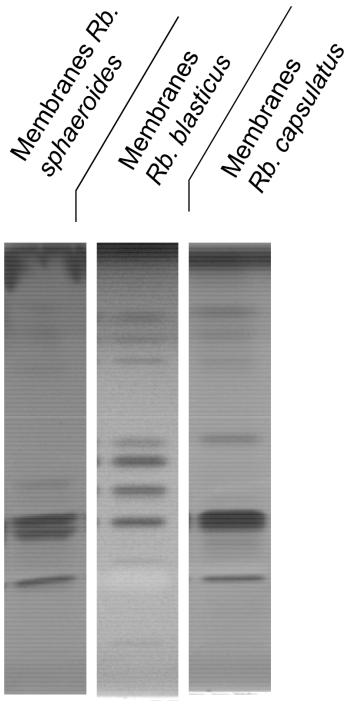


Figure 4.8 – Analyse des lipides des membranes de *Rhodobacter* par HPTLC. De gauche à droite : profils d'élution HPTLC d'extraits de membranes de *Rb. sphaeroides* (possédant CL), d'extraits de membranes de *Rb. blasticus*, d'extraits de membranes de *Rb. capsulatus* (déficientes en CL). Phase mobile : chloroforme/méthanol/acide acétique/eau (30/5,2/3,6/1,6 : v/v/v/v). Les contrastes ont été modifiés numériquement pour un meilleure visibilité.

efficace pour recueillir le lipide en grande quantité. La méthode d'extraction manuelle employée sur la bande 5 n'a pas permis d'obtenir suffisamment de composé pour pouvoir l'identifier. Cette bande a été récemment prélevée par l'appareil de couplage HPTLC-MS qui permet d'optimiser les rendements d'extraction, et de diminue le rapport signal/bruit lors de l'analyse en spectrométrie de masse (figure 4.9). Nous espérons ainsi pouvoir disposer d'une quantité suffisante du composé 5 pour que son analyse MS aboutisse à son identification. Malheureusement à ce jour, nos collaborateurs ne nous ont pas encore communiqué les résultats de l'analyse par la masse du prélèvement et nous ne sommes toujours pas en mesure d'identifier le composé 5. Lors de cette analyse nous avons profité du prêt du "TLC visualizer" qui permet une détection plus sensible que la révélation utilisée en routine au sulfate de cuivre, pour comparer les membranes de *Rb. blasticus* à celles d'autres bactéries pourpres (*Rhodobaca bogoriensis* (LBB1), *Rhodopseudomonas rubrum* et *Rb. capsulatus*), dans l'espoir de trouver une espèce qui présente aussi cette bande 5, afin de facilité son identification. Mais encore une fois, aucune des souches testées ne possède de composé qui migre à la même distance que la bande 5.

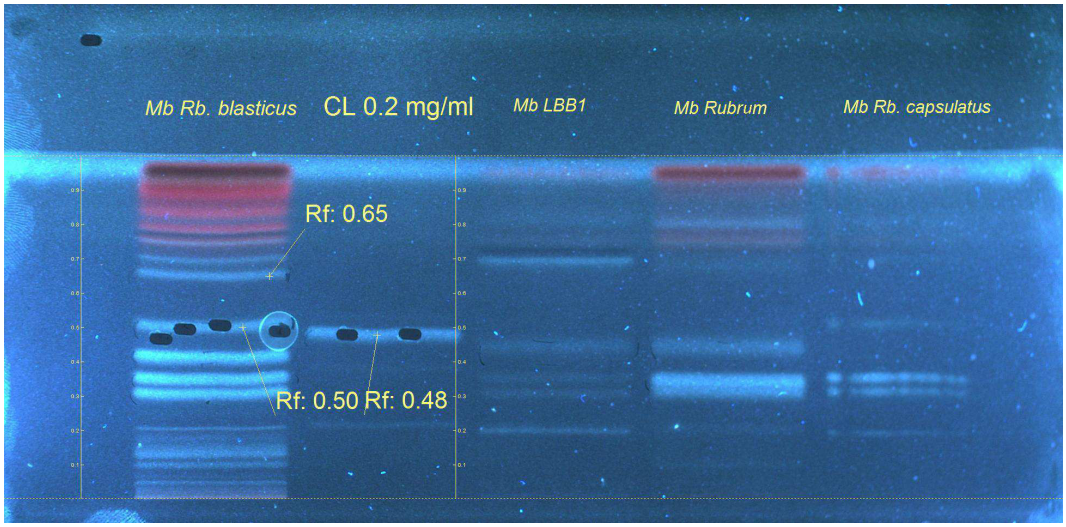


Figure 4.9 – Plaque HPTLC pour la couplage HPTLC-MS. Phase mobile : chloroforme/méthanol/acide acétique/eau (30/5,2/3,6/1,6 : v/v/v/v). Détection à la primuline lue à 366 nm par le "TLC visualizer". Aucune des autres espèces testées (*Rhodobaca bogoriensis* (LBB1), *Rhodopseudomonas rubrum* et *Rb. capsulatus*) ne présente de composé au niveau de la bande 5 de *Rb. blasticus* (Rf=0,50). Le standard de CL migre à Rf=0,48). Les zones noires correspondent aux zones prélevées et désorbées par le "TLC-MS interface".

1.2.7 Discussion et choix des lipides analysés

Lors de cette analyse nous avons donc pu caractériser quatre lipides présents avec des compositions en acides gras majoritairement en à 16 ou 18 carbones, saturés ou monoinsaturés. Trois d'entre eux étaient attendus (PE, PG et PC) alors qu'un quatrième lipide a été identifié comme étant du MMPE. Ce résultat est surprenant car ce lipide n'avait jusqu'à présent jamais été formellement identifié dans la composition des membranes de *Rhodobacter*. Cependant il avait certainement été observé si l'on se réfère au profil d'élution CCM d'extraits de lipides de *Rb. sphaeroides* et *Rb. capsulatus* [186] pour lesquels un spot, légèrement décalé par rapport à celui du PE, avait été attribué à un "aminophospholipide inconnu". Le MMPE possède une structure intermédiaire entre le PE et le PG, avec au niveau de sa tête polaire un groupement méthyl de plus que la PE (voir figure 4.7). La question du rôle de ce lipide au sein des membranes reste entière à ce jour. Peut-être intervient-il dans la détermination de la forme des membranes invaginées, lamellaires chez *Rb. blasticus* alors qu'elles sont vésiculaires pour la majorité des bactéries pourpres. Parmi ces quatre lipides, l'intensité des bandes nous indique d'ores et déjà que le PC (bande la plus basse) est très minoritaire par rapport aux trois autres lipides.

De même l'intensité faible de la bande 5 tend à signifier que ce composé est minoritaire par rapport aux PG, PC et MMPE. Cette remarque est d'autant plus vraie si l'on considère qu'il s'agit de CL puisque les standards, en conditions de "migration acide " montrent, qu'à concentration égale, la CL est beaucoup plus colorée. L'hypothèse selon laquelle la

bande 5 serait un composé présent en très grande quantité mais se colorant faiblement au sulfate de cuivre est peu probable au regard des difficultés que nous avons eu pour analyser ce produit par HPLC-MS.

Nous avons donc choisi de concentrer notre étude sur la quantité de lipides liés au RC-LH1-pufX en se focalisant uniquement sur les trois espèces majoritaires : PE, PG et MMPE. Leur quantification est possible en une analyse par la méthode HPTLC avec les conditions de la "migration acide" en présence des standards correspondants. Nous l'avons réalisée dans un premier temps sur les membranes photosynthétiques complètes.

1.3 Quantification des PE, PG et MMPE dans les membranes de *Rb. blasticus*

L'analyse par HPTLC des lipides à partir des solutions stocks de membranes de *Rb. blasticus* (ajustées à une concentration en RC-LH1-pufX de 10 mg/mL), montre que ces préparations contiennent en moyenne 1,223 mg/mL de PE, 1,315 mg/mL de MMPE et 1,971 mg/mL de PG. Les proportions relatives de ces trois lipides sont indiquées dans le tableau 4.1. Le PG est le lipide majoritaire des membranes et la quantité de PE et de MMPE est à peu près équivalente.

Lipide	Proportion
PE	27%
MMPE	29%
PG	44%

Tableau 4.1 – Composition lipidique relative des membranes de *Rb. blasticus*

Maintenant que nous connaissons tous les composés majoritaires du complexe PDL du RC-LH1-puf X et que nous possédons pour chacun d'entre eux une méthode de dosage, nous pouvons aborder sa caractérisation. Afin d'optimiser la bouée autour du RC-LH1-puf X, nous avons tout d'abord cherché à comprendre l'influence des conditions de purification sur la quantité de lipides et de détergents liés lors de purifications en présence de DDM.

2 Étude de l'influence des conditions de purification sur la bouée de détergent du RC-LH1 puf X

2.1 Principe de l'étude

La composition du complexe PDL purifié a été étudiée en fonction de trois paramètres : la quantité de DDM utilisée pour solubiliser les membranes, la concentration en DDM du gradient de sucrose, et la concentration du tampon d'élution de la colonne mono Q finale. Pour cela quatre purifications ont été réalisées sur une même quantité initiale

de membranes de *Rb. blasticus*, issues du même lot de production, dans les conditions suivantes :

1. **manipulation A** : solubilisation avec 10 mg de DDM par mg de protéine, gradient en présence de 0,15 mg/mL de DDM et purification mono Q en présence de 0,15 mg/mL de DDM
2. **manipulation B** : solubilisation avec 10 mg de DDM par mg de protéine, gradient en présence de 0,1 mg/mL de DDM et purification mono Q en présence de 0,15 mg/mL de DDM
3. **manipulation C** : solubilisation avec 10 mg de DDM par mg de protéine, gradient en présence de 0,1 mg/mL de DDM et purification mono Q en présence de 0,1 mg/mL de DDM
4. **manipulation D** : solubilisation avec 5 mg de DDM par mg de protéine, gradient en présence de 0,15 mg/mL de DDM et purification mono Q en présence de 0,15 mg/mL de DDM

Ainsi en comparant les manipulations deux à deux, il est possible d'estimer l'influence de chacun des paramètres sur la quantité finale de protéine obtenue, la quantité de DDM dans la bouée et la quantité de lipides liés. La comparaison de A *vs.* B informe sur l'influence de la concentration en détergent du gradient, A *vs.* D renseigne sur l'impact de la quantité de détergent lors de la solubilisation et B *vs.* C met en évidence l'influence de sa concentration lors de la purification sur colonne mono Q. Par ailleurs un test de cristallisation a été réalisé en fin de chaque purification pour avoir une indication sur les conditions favorables à la nucléation.

2.2 Résultats et discussion

2.2.1 Tableau des résultats

Le tableau 4.2 reprend les conditions des quatre purifications et les résultats obtenus pour chacune d'entre elles en indiquant la quantité de protéine pure obtenue et les quantités de DDM, PE, MMPE et PG contenues dans la bouée (exprimées en nombre de molécules par complexe protéique du RC-LH1-pufX). Les deux dernières lignes du tableau indiquent si des cristaux ont été obtenus à partir de ces purifications et le facteur de concentration appliqué pour concentrer la protéine à 10 mg/mL pour ces essais.

2.2.2 Quantité de protéine purifiée

La première ligne des résultats du tableau 4.2 présente les masses totales de protéines pures obtenues. Une première observation importante montre que la masse de protéine chute de 4,1 mg (manipulation A) à 0,9 mg/mL (manipulation C) lorsque les purifications (gradient et mono Q) sont faites en présence de 0,1 mg/mL de DDM. Le choix d'un tampon contenant du DDM à une concentration (0,1 mg/mL) à peine supérieure à la

Purif. en DDM	manip. A	manip. B	manip. C	manip. D
Quantité de DDM par mg de protéine dans les membranes	10 mg	10 mg	10 mg	5 mg
Conc. en DDM dans le gradient de sucrose	0,15 mg/mL	0,1 mg/mL	0,1 mg/mL	0,15 mg/mL
Conc. en DDM dans l'éluant de la colonne monoQ	0,15 mg/mL	0,15 mg/mL	0,1 mg/mL	0,15 mg/mL
Quantité de protéine pure obtenue	4,1 mg	3,3 mg	0,9 mg	1,5 mg
Molécules de DDM par dimère	973 ± 94	1052 ± 164	736 ± 176	1019 ± 136
Molécules de PE par dimère	24±1	29±1	31 ± 2	34 ± 1
Molécules de MMPE par dimère	20± 2	25±1	29 ±3	30 ±5
Molécules de PG par dimère	31±2	38 ±2	42 ±5	30 ±3
Facteur de concentration	6,2	6,0	10,7	9,7
Obtention de cristaux	Oui	Oui	Non	Non

Tableau 4.2 – Influence des conditions de purification sur la bouée du RC-LH1 puf X

CMC (0,08 mg/mL pour le DDM) aurait pu paraître intéressant dans le but de minimiser la quantité de DDM libre en solution dont l'excès peut gêner la formation des cristaux. Or il apparaît ici que l'utilisation d'un tampon juste au dessus de la CMC n'est pas suffisante pour maintenir efficacement la protéine en solution. De plus le profil d'élution dans la condition C montre l'apparition d'un second pic après celui du dimère, témoin d'une agrégation importante de la protéine qui explique cette chute de la quantité de protéine obtenue. L'utilisation d'un tampon à 0,1 mg/ml semble donc à éviter pour obtenir une plus grande quantité de protéine pure. La deuxième observation que nous pouvons faire à partir de ces résultats concerne le rendement de solubilisation entre les manipulations A et D. Le fait de doubler la quantité de DDM ajoutée aux membranes lors de l'extraction de la protéine permet d'obtenir plus de 2,5 fois plus de protéine pure au final.

2.2.3 Quantité de DDM liés

En regardant maintenant l'effet de ces conditions de purification sur la bouée de détergent, il apparait que les conditions A, B et D ne présentent pas de différences significatives, avec environ 1000 molécules de DDM par dimère de RC-LH1-puf X. En revanche, la condition C (0,1 mg/mL de DDM) aboutit à la plus faible quantité de protéine pure ainsi qu'à la formation d'une bouée de DDM d'environ 740 molécules de détergent par protéine, soit 25% de moins que les autres conditions. Il semble donc qu'une bouée constituée de moins de 1000 molécules de DDM ne soit pas suffisante pour maintenir correctement le complexe en solution. Le risque d'agrégation est augmenté. En revanche avec un millier de molécules de DDM, la protéine se maintient en solution. Ce nombre de molécules de DDM est donc nécessaire pour une substitution optimale de la membrane native : l'espace autour de la partie transmembranaire de la protéine semble correctement rempli.

Pour optimiser la solubilisation il est donc conseillé de travailler dans des conditions qui permettent de maintenir ce millier de molécules de DDM dans la bouée, ce qui ne semble pas être le cas en travaillant avec un tampon à 0,1 mg/mL lors de l'élution finale (par comparaison de B *vs.* C). Ainsi on peut supposer que l'écart de masse de protéine pure obtenue entre les manipulations A et B s'explique par les mêmes raisons. Dans le gradient de saccharose de la condition B (0,1 mg/mL de DDM), il est probable que le nombre de molécules de DDM dans la bouée n'ait pas été suffisant pour empêcher totalement l'agrégation de la protéine en solution. En revanche, l'étape de purification en colonne monoQ avec un tampon contenant 0,15 mg/mL de DDM a permis de reconstituer une bouée à 1052 molécules de DDM, évitant ainsi l'agrégation de la protéine et aboutissant à un bien meilleur rendement que la condition C.

A l'inverse en utilisant les conditions de purification de la manipulation C, il semble possible d'obtenir une bouée plus petite qui pourrait être plus favorable à la cristallisation dans la mesure où elle gênerait moins la création des contacts cristallins entre les protéines (augmentation de la surface protéique accessible et/ou diminution de la gène stérique entre complexe PDL dans le réseau cristallin). Toutefois cet avantage peut être contrebalancé par la concentration de protéine obtenue dans ces conditions où une grande partie de la protéine est perdue lors de la purification. En effet, si la concentration est trop faible, il faudra concentrer d'avantage la protéine en vue des essais de cristallisation comme nous le verrons par la suite.

2.2.4 Quantité de lipides liés

Avant de commenter les résultats en fonction des conditions de purification, il est intéressant de remarquer que, comme pour l'analyse des membranes, nous trouvons que le PG est majoritaire au contact du dimère et que PE et MMPE sont présents en quantités équivalentes. Pour la manipulation A nous obtenons 75 lipides liés au RC-LH1-puf X pour une composition relative de 41% en PG, 27% en MMPE et 32% en PE, ce qui reste proche de la composition observée dans les membranes (tableau 4.1). Sachant que nous n'avons

pas analysé ici la quantité de PC et l'éventuelle CL, cette quantité de 75 lipides par dimère est en accord avec la littérature qui dénombre 80 à 90 phospholipides par complexe RC-LH1-puf X de *Rb. sphaeroides*. Il faut noter que dans la condition D, nous n'avons pas tenu compte du nombre de molécules de PG très différent des autres résultats. En effet, la manipulation n'ayant pas pu être reproduite, il nous est délicat de commenter ce résultat qui apparaît pour le moins surprenant et pourrait être dû à un problème de manipulation.

Par rapport aux différentes purifications, nous venons de le voir, l'utilisation d'une plus grande quantité de DDM permet une meilleure extraction des protéines et un meilleur maintien en solution de celles-ci mais elle a tendance aussi à éliminer plus de lipides de la bouée. La comparaison des résultats indique que la délipidation a lieu aussi bien au cours du gradient de sucrose (A *vs.* B) que lors du passage sur colonne de purification (B *vs.* C). La quantité de détergent utilisée pour la solubilisation des membranes a aussi son importance puisque la diviser par deux permet de conserver jusqu'à un tiers de lipides supplémentaires (A *vs.* D).

2.2.5 Essais de cristallisation

Pour identifier les conditions les plus favorables à la cristallogénèse du RC-LH1-pufX, nous avons réalisé un test de cristallisation des protéines pures de chaque manipulation. La nucléation n'a été initiée que dans les conditions A et B où les quantités de lipides sont les plus faibles et où la bouée de DDM est complète. La manipulation C qui permet d'obtenir une protéine avec légèrement plus de lipides et une bouée de détergent, à priori, plus favorable à la cristallogénèse n'a pas permis d'obtenir de cristaux. Ce résultat met en avant l'importance du facteur de concentration de la protéine. En effet si la protéine est obtenue en très faible concentration, ce qui est notre cas ici, elle doit être davantage concentrée pour aboutir à la concentration de 10 mg/mL que nous utilisons pour nos tests de cristallisation. Or l'usage de concentreur d'ultrafiltration concentre aussi les micelles libres de détergents qui se retrouvent alors en quantité trop importante ce qui empêche la nucléation du cristal. Ce phénomène explique certainement aussi les résultats des essais de cristallisation de la manipulation D auquel pourrait s'ajouter l'influence de la plus grande quantité de lipides liés au RC-LH1-puf X (en supposant que la valeur pour le PG soit un artefact) et qui pourrait être à l'origine d'une bouée plus volumineuse.

2.2.6 Utilisation de Bio-Beads pour éliminer l'excès de détergent

Nous l'avons déjà évoqué, la bouée obtenue dans les conditions C n'est pas incompatible avec des essais de cristallisation puisqu'elle permet de conserver un environnement plus proche des conditions natives avec plus de lipides et moins de détergent au contact de la protéine. Mais lorsque la perte de la protéine est très importante, il faut concentrer d'avantage l'échantillon avant les essais de cristallisation. Le facteur de concentration des micelles de détergent se retrouvent alors, lui aussi, augmenté ce qui peut empêcher la cristallisation. L'avantage d'avoir une bouée plus petite est de ce fait mal exploité. Un des

moyens d'y parvenir consiste à enlever l'excès de détergent, obstacle à la cristallisation, par l'utilisation Bio-beads.

Afin de déterminer les conditions à employer pour éliminer l'excès du détergent d'échantillons de RC-LH1-puf X avec des Bio-Beads, nous avons réalisé le suivi du retrait du DDM par HPTLC pour des solutions concentrées à 10 mg/mL de complexes protéiques purifiés en utilisant deux concentrations en Bio-beads. La figure 4.10 montre que la cinétique du retrait du DDM dépend aussi bien de la concentration en Bio-Beads que de la température. Or pour limiter la déstabilisation de la protéine, il semble préférable de se placer dans des conditions où le retrait est progressif. Ainsi lorsque l'équilibre entre les fractions de tensioactifs libres et liés sera modifié, le passage des tensioactifs de la bouée à la solution sera moins brutal. Parmi les trois conditions testées celle utilisant 270 mg/mL de Bio-Beads à 22 °C paraît donc la plus adaptée.

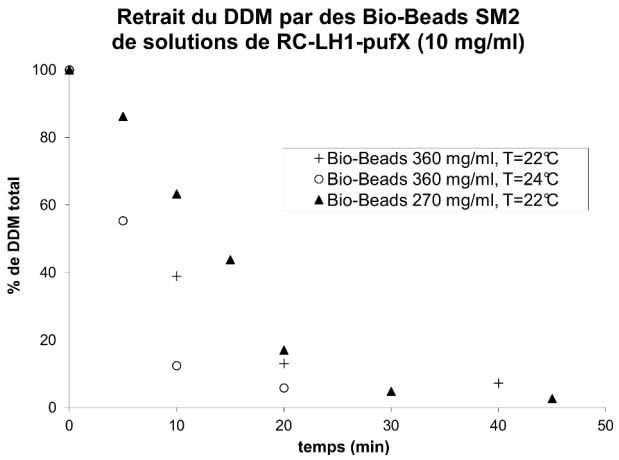


Figure 4.10 – Cinétique de retrait du détergent par les Biobeads à différentes concentrations et températures sur des solutions à 10 mg/mL de RC-LH1-puf X purifiés dans les conditions A.

Ayant déterminé la cinétique du retrait du détergent dans ces conditions là, nous avions pour objectif de nous placer en différents points de ce graphique, pour réaliser des essais de cristallisation après élimination de différentes quantités de détergent. Nous avons donc choisi de réaliser des prélèvements à 5 et 10 minutes correspondant respectivement au retrait d'environ 15 et 40 % du DDM total. Malheureusement, aucun des échantillons prélevés et donc mis en contact avec les bio-beads n'ont cristallisé, à l'inverse de la protéine-témoin. Par ailleurs, au cours de cette expérience, la protéine a précipité en contact des Bio-Beads en moins de 20 minutes au lieu de 45 minutes lors de l'essai pour l'établissement de la courbe de cinétique. Cette observation montre que les conditions entre ces deux manipulations n'étaient pas reproductibles. Or le principal changement entre ces deux tests concerne le modèle des concentreurs d'ultrafiltration utilisé (le fournisseur ayant entre temps arrêté la production des concentreurs "anciens modèles" avec lesquels nous avions réalisé la courbe de cinétique). Il est possible que le facteur de

concentration des micelles de détergent diffère entre ces deux systèmes. La proportion de détergent libre initiale est probablement modifiée et de ce fait, la cinétique de retrait du détergent déterminée avec les "anciens modèles" n'est plus adaptée à cette nouvelle situation. Malheureusement nous n'avons pas eu le temps de déterminer une cinétique avec les nouveaux modèles de concentreurs. Par ailleurs dans le cas où le facteur de concentration influerait sur la cinétique de retrait du détergent, il faudrait en fait doser le détergent par HPTLC et vérifier l'état natif de la protéine via son spectre UV, pour tous les échantillons que l'on souhaite cristalliser. Cette option est tout à fait réalisable techniquement mais il faudrait prévoir dans ce cas une purification différente pour chaque temps testé afin d'avoir une quantité suffisante de protéine. Et nous n'avons pas eu le temps de réaliser ces essais.

2.3 Conclusion

Lors d'une élution finale en présence de 0,15 mg/mL de DDM, il se forme un complexe protéique stable avec environ un millier de molécules de DDM par molécules de dimère, et ce quelles que soient les conditions des étapes réalisées en amont de la purification. En revanche la quantité finale de lipides semble dépendre de toutes les étapes de la purification. Plus la protéine est mise en présence de fortes concentrations en DDM, plus la délipidation est importante.

Travailler à une concentration de 0,1 mg/mL de DDM permet de former une bouée moins importante autour de la région transmembranaire du complexe RC-LH1-pufX. Mais ceci aboutit à l'obtention d'une très faible concentration en protéine en sortie de colonne et par voie de conséquence à l'augmentation du nombre de micelles libres lors des essais de cristallisation du fait de la concentration de la protéine à 10 mg/mL. Cet excès pourrait être éliminé par l'utilisation de Bio-Beads mais nous n'avons pas eu le temps de mettre au point une méthode d'utilisation des Bio-Beads sur le complexe RC-LH1-pufX.

Pour moduler la taille de la bouée nous avons testé une autre stratégie par la réalisation de l'échange du DDM par le PCC-malt, tout en regardant les conséquences que cela impliquait au niveau de la composition du complexe PDL du RC-LH1-pufX. Nous avons pour cela utilisé comme référence la condition A qui est permet d'obtenir un rendement maximal de la protéine et une bonne propension de la protéine à cristalliser.

3 Étude de l'échange PCC-malt vs. DDM

3.1 Principe de l'étude

Notre premier objectif a été de définir les conditions d'échange du DDM par le PCC-malt, avec en premier lieu une réflexion sur la quantité de PCC-malt à utiliser. La CMC cinq fois plus faible du PCC-malt par rapport au DDM (0,033 mmol/L contre 0,170 mmol/L) étant favorable à la réalisation d'échanges entre ces deux espèces, nous avons

décidé de réaliser cet échange lors de l'étape de purification sur colonne mono Q. Les étapes de solubilisation et de purification sur gradient de sucrose sont donc réalisées avec du DDM alors que l'élution de la protéine immobilisée sur colonne MonoQ est réalisée avec un tampon exclusivement constitué de PCC-malt. Afin de travailler dans des conditions comparables entre le DDM et le PCC-malt, nous avons choisi de conserver le même nombre de micelles libres dans le tampon.

Une purification en DDM à 0,15 mg/mL (condition A du paragraphe 2.1) correspond à une concentration de DDM de 0,2937 mmol/L. En retranchant une fois la CMC correspondant à la concentration en tensioactifs libres, on obtient une concentration de 0,1237 mmol/L de DDM formant des micelles libres. D'après le nombre d'agrégation moyen des micelles de DDM, cette concentration équivaut à $0{,}966.10^{-3}$mmol/L de micelles libres de DDM dans le tampon. Par un raisonnement inverse sur le PCC-malt, une concentration de 1.10^{-3}mmol/L de micelles libres de PCC, correspond à 0,165mmol/L de PCC libre (N_{agg}=165), soit 0,198 mmol/L de PCC total ou encore 0,11 mg/mL.

La purification d'une fraction de dimère solubilisée en DDM a donc été réalisée dans des conditions similaires à la purification A du paragraphe 2.1 servant de référence en remplaçant simplement les 0,15mg/mL de DDM du tampon d'élution par 0,11 mg/mL de PCC-malt (la concentration en sel et en tampon Tris ainsi que les paramètres de la méthode FPLC sont gardés constants). L'objectif est, dans un premier temps, de vérifier le bon échange du DDM avec le PCC-malt, en faisant une analyse qualitative par HPTLC de la composition en tensioactifs de chaque fraction en sortie de colonne mono Q. Et dans un deuxième temps, d'étudier le comportement de la protéine en PCC-malt, d'une part par le réalisation d'un gel natif qui permet de vérifier que la protéine ne s'est pas monomérisée, et d'autre part par un profil d'absorption caractéristique de l'état de la protéine.

3.2 Résultats et discussion

3.2.1 Suivi qualitatif de l'échange

La figure 4.11 montre le profil obtenu lors de la purification du dimère de RC-LH1 puf X avec échange du DDM par le PCC-malt. L'analyse par HPTLC des différentes fractions recueillies indique qu'en début d'échange il n'y a pas de PCC-malt relargué en sortie de colonne, ce qui signifie que tout le PCC-malt du tampon est "consommé" pour réaliser l'échange avec le DDM des bouées de protéines. Ce dernier libéré dans le tampon de tampon se retrouve en sortie de colonne. Dans les conditions testées (4.11), tout le DDM a pratiquement été échangé après le passage de 35 mL de tampon de PCC-malt. Puis l'échange ralentit, les fractions recueillies contiennent à la fois du PCC-malt et du DDM. Enfin après l'élution de 42 mL de tampon, tout le DDM a été échangé et éliminé. La fraction de dimères de RC-LH1-pufX sortant entre 46 et 48 mL de tampon, elle ne contient donc que du PCC-malt. Dans ces conditions d'élution l'échange du DDM par le PCC-malt est donc complet.

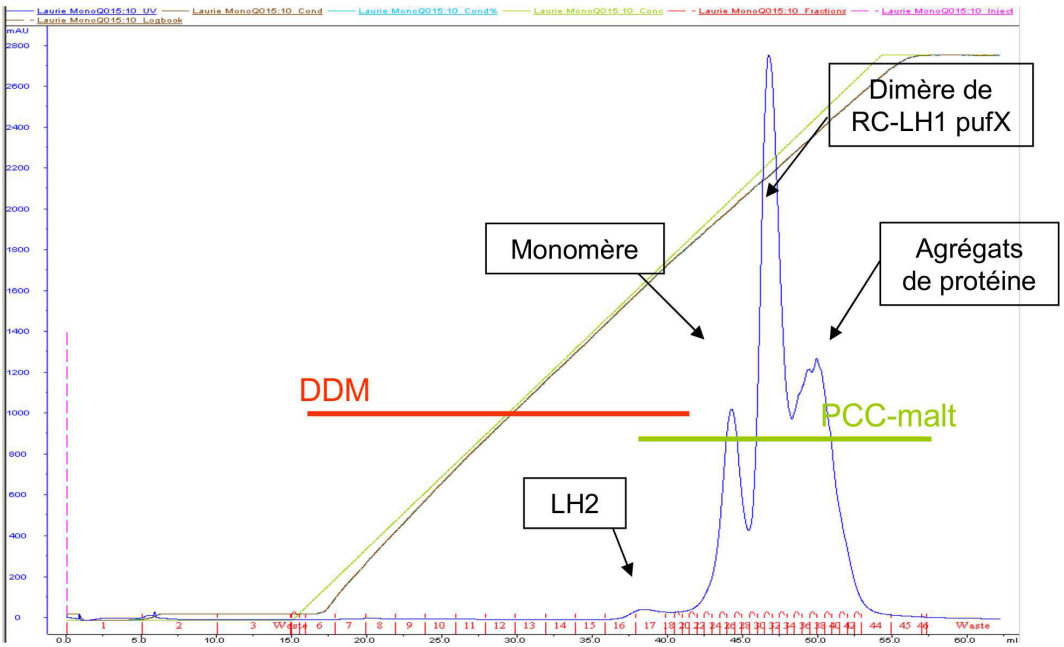


Figure 4.11 – Suivi qualitatif de l'échange du DDM par le PCC-malt (0,11 mg/mL) lors de l'élution sur colonne mono Q. La ligne gris foncé indique les fractions contenant du DDM et la ligne gris clair celles contenant du PCC-malt.

Si ce résultat montre l'échange total du PCC-malt avec le DDM, le profil d'élution fait apparaitre un pic d'agrégat de protéine après celui du dimère qui n'est pas présent lors d'une purification en DDM 0,15 mg/mL mais qui ressemble au pic obtenu lors d'une élution à 0,1 mg/mL de DDM (condition de purification C du paragraphe 2.1). Par analogie avec les résultats obtenus pour les purification en DDM, la présence de ces agrégats semble indiquer que la quantité de PCC-malt utilisée dans le tampon (0,11mg/mL) est trop faible pour arriver à recouvrir complètement la région transmembranaire et permettre une bonne solubilisation de la protéine. Bien que travaillant à nombre de micelles libres équivalent dans le tampon, 0,11 mg/mL de PCC-malt est une concentration trop faible pour maintenir en solution tous les dimères purifiés du gradient de saccharose. En augmentant cette concentration à 0,15 mg/mL le profil d'élution ne présente plus ce pic d'agrégat de protéine (Figure 4.12) ce qui confirme l'hypothèse précédente. Comme le PCC-malt n'est pas dénaturant envers les protéines, travailler avec une concentration élevée de celui-ci n'est pas aussi problématique que pour le DDM. Par la suite nous avons donc travaillé avec les deux concentrations en PCC-malt (0,11 et 0,15 mg/mL). La concentration de 0,11 mg/mL permet de raisonner à nombre de micelles équivalent et 0,15 mg/mL correspond à une capacité équivalente de la bouée à maintenir le complexe protéique en solution.

L'échange du DDM par 0,15 mg/mL de PCC-malt est aussi complet lorsque la protéine est éluée de la colonne de purification. Toutefois, le complexe protéique est relaché en sortie de colonne à 70 % de sel au lieu de 75-76 % pour le complexe en DDM, soit 350 mM de

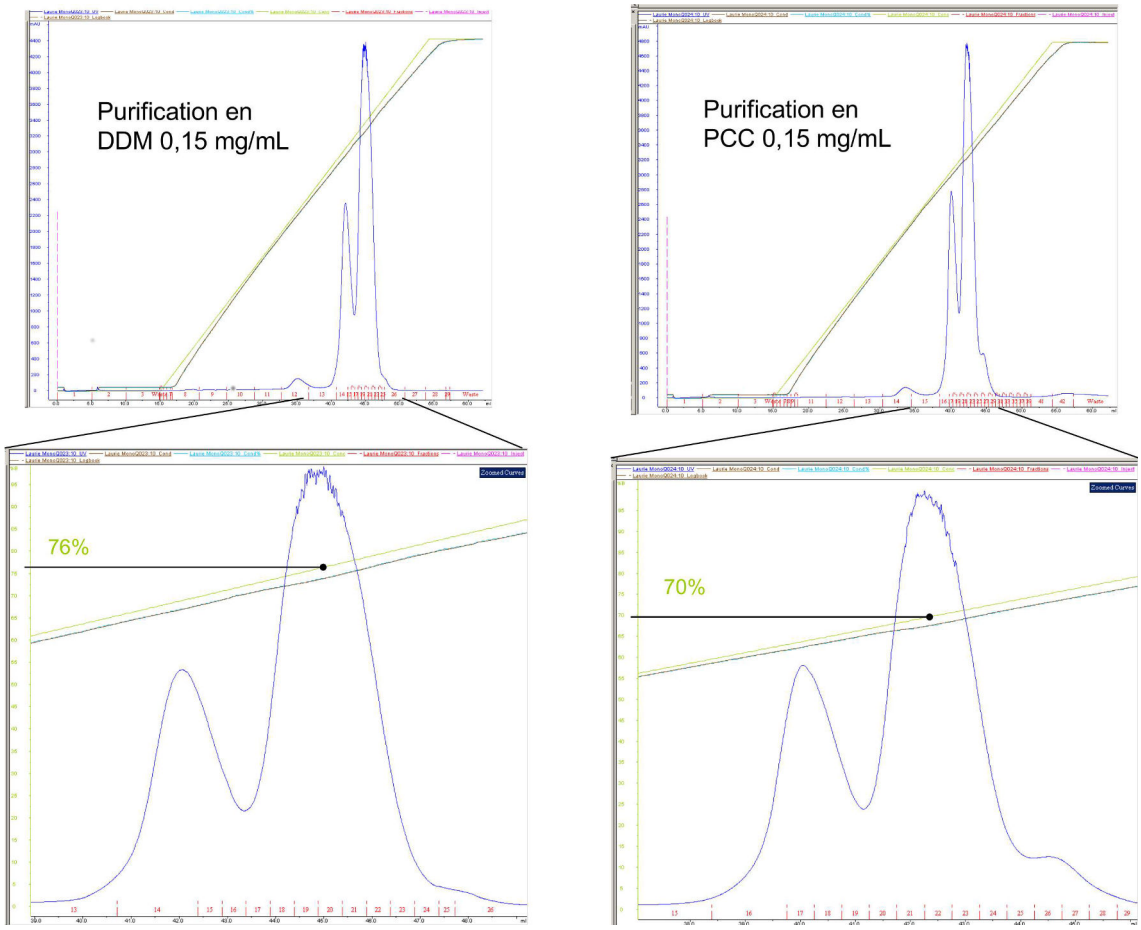


Figure 4.12 – Profils d'élution de complexe de RC-LH1 puf X en PCC-malt et DDM. Le zoom sur le pic de dimère permet de lire la proportion de tampon à 500mM de NaCl dans le gradient.

NaCl au lieu de 375 mM. La présence de la bouée de de PCC-malt a donc légèrement modifié les interactions électrostatiques entre la protéine et la colonne mono Q puisqu'une quantité inférieure de sel est nécessaire pour écranter les charges et rompre ces interactions. Il semble donc que le complexe PDL du RC-LH1-pufX soit légèrement différent s'il est composé de PCC-malt ou du DDM. C'est ce que nous avons cherché à vérifier par la caractérisation plus particulière de la protéine.

3.2.2 Caractérisation de la protéine solubilisée en PCC-malt

Les spectres d'absorbance du complexe RC-LH1 puf X en DDM et en PCC-malt (figure 4.13) ont une allure générale similaire. Le rapport d'intensité du pic des antennes LH1 ($\lambda \approx 875$ nm) sur l'intensité du centre réactionnel ($\lambda \approx 802$ nm) est identique quelque soit le tensioactif composant la bouée. Ces observations signifient que la proportion d'antennes LH1 entourant chaque centre réactionnel est la même dans les deux cas. L'échange du

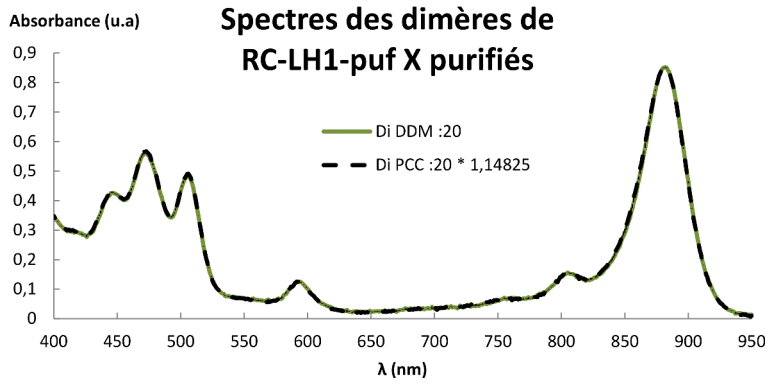


Figure 4.13 – Spectres d'absorbance du complexe RC-LH1-puf X solubilisé en DDM et PCC-malt, après purification sur colonne. Les spectres sont normalisés à la concentration pour une meilleure comparaison des signaux.

DDM par le PCC-malt ne modifie donc pas l'état de la protéine.

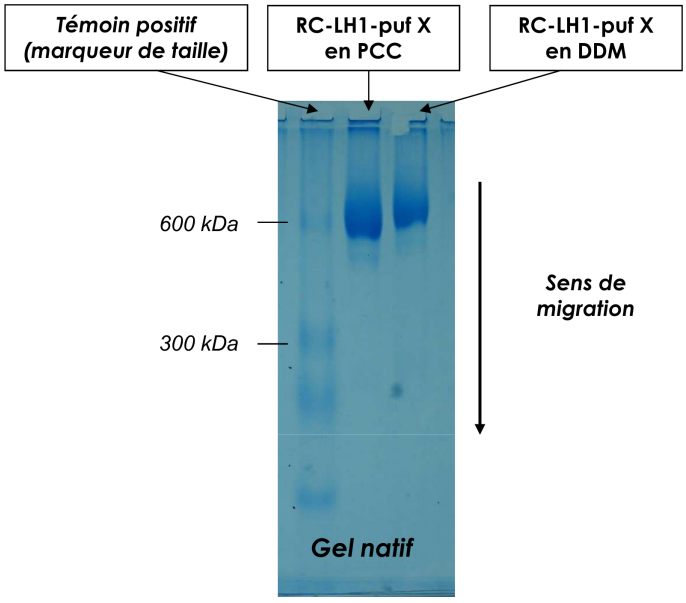


Figure 4.14 – Gel natif du RC-LH1 puf X en DDM et en PCC-malt. Le complexe protéique solubilisé en PCC-malt (piste du milieu) est plus petit que le complexe protéique avec une bouée de DDM

Le gel natif (figure 4.14) réalisé sur un complexe purifié en PCC-malt 0,15 mg/mL et un complexe purifié en DDM montre que dans les deux cas la protéine se retrouve à l'état de dimère puisqu'une seule bande migrant au niveau du marqueur de taille de 600 kDa est obtenue. L'absence d'une seconde bande minoritaire autour de 300 kDa souligne la qualité de la purification qui a permis d'éliminer l'intégralité de la forme monomérique de la protéine. D'autre part le complexe en PCC-malt migre légèrement plus loin que celui

de DDM, il présente donc à priori une taille légèrement plus compacte que le complexe en DDM.

3.3 Conclusion

En utilisant une concentration de 0,15 mg/mL de PCC-malt dans le tampon d'élution, il est possible de réaliser un échange complet du DDM et d'obtenir le dimère du RC-LH1-pufX sans perte majeure de la protéine sous forme d'agrégat ou de monomère. La pureté du dimère obtenu est très satisfaisante et la protéine est bien sous une forme native comparable à celle obtenue en DDM. Toutefois le complexe protéique global en PCC-malt présente quant à lui une légère différence de forme par rapport à celui en DDM puisqu'il semble plus compact. Cette différence entre les deux complexes protéiques n'étant pas causée par une différence de la protéine RC-LH1-pufX en elle-même, une étude plus approfondie de la composition de la bouée a été réalisée.

4 Influence des tensioactifs sur la bouée de détergent du RC-LH1-pufX

4.1 Principe de l'étude

Le but de cette étude est de comparer la composition du complexe PDL de RC-LH1-pufX dans le cas d'une purification en DDM et d'un échange avec le PCC-malt. Dans le paragraphe précédant nous avons vu que des échanges avec un tampon de PCC-malt à 0,15 mg/mL ou 0,11 mg/mL permettaient de remplacer totalement le DDM autour du complexe. Nous allons à présent doser ces bouées de tensioactif et quantifier les lipides PE, MMPE et PG présents dans le complexe protéique purifié.

4.2 Résultats et discussion

4.2.1 Détermination de la quantité de tensioactifs dans la bouée

L'ensemble des résultats est repris dans le tableau 4.3. Le dosage de la bouée des dimères RC-LH1-puf X, après une purification dans un tampon de PCC-malt à **0,11mg/ml** indique que celle-ci est constituée de **1240 ±177 molécules de PCC-malt**. Cette condition de purification correspond à un nombre de micelles équivalent dans le tampon initial, à une purification en DDM à **0,15 mg/mL** pour laquelle la bouée a été estimée à **1021 ± 184 molécules de DDM**. Ainsi la bouée de PCC-malt contient plus de molécules de tensioactif que dans le cas d'une bouée de DDM. Cet écart a tendance à s'accentuer en utilisant un tampon à **0,15 mg/mL** de PCC-malt puisque la bouée a été mesurée à **1490 ±172 molécules de PCC-malt**. En tenant compte des barres d'erreur, il convient toutefois de remarquer que cet écart n'est peut être pas aussi important qu'il ne parait.

	DDM 0,15 mg/mL	PCC-malt 0,11 mg/mL	PCC-malt 0,15 mg/mL
molécules de tensioactif dans la bouée	1021 ± 184	1240 ±177	1490 ± 172

Tableau 4.3 – Composition en tensioactif du complexe PDL

Comme dans le cas du DDM, le passage d'un tampon d'élution de 0,11mg/mL à 0,15 mg/mL de PCC-malt a permis d'éliminer le pic d'agrégat de protéine sur le profil d'élution en sortie de colonne et d'augmenter le nombre de molécules de tensioactif dans la bouée. Pour ces deux tensioactifs il semble qu'une concentration minimale de 0,15 mg/mL dans le tampon de purification soit nécessaire pour obtenir une bouée complète autour du RC-LH1-pufX. Avoir une concentration équivalente en micelles libres de tensioactifs ne signifie donc pas que le recouvrement de la région transmembranaire sera identique. Par ailleurs, comme il est préférable de travailler avec un minimum de tensioactif dans l'optique de cristalliser une protéine membranaire, nous n'avons pas cherché à augmenter les concentrations initiales des tampons d'élution pour voir si la bouée grossirait encore.

Le complexe du RC-LH1-pufX est donc plus petit en taille avec une bouée de PCC-malt (cf. § 3.3) bien que celle-ci contienne plus de tensioactifs en comparaison à une bouée en DDM. Ce résultat est cohérent avec celui obtenu sur les micelles libres puisque nous avons montré que les micelles de PCC-malt présentaient aussi un caractère plus dense que les micelles de DDM. L'anomérie α et/ou la rigidité accrue de la chaîne hydrophobe du PCC-malt par rapport à la chaîne aliphatique du DDM semblerait donc imposer une meilleure organisation de l'arrangement du tensioactif aussi bien dans la micelle qu'autour de la région hydrophobe des protéines membranaires. L'empilement des molécules de PCC-malt se ferait de façon plus ordonnée ce qui aboutirait à la formation de structures plus denses et compactes.

4.2.2 Détermination de la quantité de lipides liés

	manipulation 1		manipulation 2		manipulation 3	
	DDM 0,15 mg/mL	PCC 0,11 mg/mL	DDM 0,15 mg/mL	PCC 0,15 mg/mL	DDM 0,15 mg/mL	PCC 0,15 mg/mL
PE	22 ±2	27 ±2	17 ± 2	20±3	21 ±2	22±2
MMPE	20± 1	26 ± 1	18±2	25±3	21 ± 2	22±2
PG	30±4	41 ± 1	25±3	29±2	28±2	30±3

Tableau 4.4 – Influence du tensioactif sur la quantité de lipides

L'analyse par HPTLC des lipides présents dans le complexe protéique après purifi-

cation tend à montrer que la quantité de lipides résiduels est plus importante lorsque la purification est faite avec un tampon contenant du PCC-malt. On retrouve ici le caractère moins solubilisant du PCC-malt par rapport au DDM. En effet les solutions de protéines sont des systèmes dynamiques où s'opèrent continuellement des échanges de tensioactifs entre la bouée et le tampon. Ainsi, lors d'une purification, ces phénomènes d'échange ont tendance à déstabiliser le complexe protéique et favoriser la solubilisation et la perte des lipides. L'utilisation d'un tensioactif comme le PCC-malt plus rigide et volumineux permet de réduire la fréquence de ces échanges. Les lipides sont moins déstabilisés et se retrouvent conservés en plus grande quantité. Néanmoins, le PCC-malt n'empêche pas complètement la solubilisation des lipides puisque comme pour le DDM, plus la quantité de PCC-malt utilisée est élevée, plus la quantité de lipides éliminés est importante. Par ailleurs il ne semble pas y avoir d'enrichissement en lipides entre une bouée en DDM ou PCC-malt, la proportion relative du PE, MMPE et PG semble être indépendante du tensioactif utilisé.

4.3 Conclusion

En conclusion, par rapport au DDM, le PCC-malt permet d'une part, une meilleure conservation des lipides dans la bouée du complexe protéique et d'autre part la formation d'une bouée plus dense et plus compacte autour de la protéine. Ces observations semblent être la conséquence directe de la différence de structure de ces deux tensioactifs. L'apport d'une certaine rigidité à la partie hydrophobe oblige, d'une part, le PCC-malt à adopter une organisation plus ordonnée et compacte et limite, d'autre part, les phénomènes de délipidation.

Le PCC-malt présente donc l'avantage de maintenir légèrement plus de lipides au contact de la protéine sans pour autant changer l'environnement du RC-LH1-pufX qui a déjà cristallisé en DDM. L'obtention d'une bouée moins volumineuse et plus dense est un facteur très intéressant pour la cristallisation car il laisse supposer que les contacts entre les parties hydrophiles des protéines seront facilités. Enfin le caractère plus rigide et structuré de la bouée en PCC-malt pourrait apporter un avantage sur la qualité des cristaux obtenus. La réalisation d'essais de cristallisation de la protéine RC-LH1-pufX est donc l'étape suivante de cette étude du complexe protéique en solution, et est présentée dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 5

La cristallisation du complexe RC-LH1-pufX

Bien avant le début de cette thèse, Colette Jungas et Eva Pebay-Peroula avaient entrepris, lors d'une collaboration, des essais de cristallisation 3D du complexe RC-LH1-pufX. Leur travail, basé en grande partie sur un "screening" de multiples conditions de cristallisation avait mis en avant une composition d'agents cristallisants favorable à la cristallisation, contenant 8 % de PEG 3350, 90 mmol/L de chlorure de magnésium ($MgCl_2$) et 10 % de glycérol dans l'eau. Des cristaux diffractant à 8 Å de résolution avaient ainsi été obtenus selon la méthode de la goutte suspendue à partir d'une protéine solubilisée et purifiée en DDM puis concentrée à 10 mg/mL (figure 30 dans l'introduction). Cette diffraction est toutefois insuffisante pour obtenir la structure 3D de la protéine. Ce résultat bien que prometteur semble être le maximum que l'on puisse atteindre grâce au criblage de conditions et montre les limites de l'approche empirique. L'amélioration de la qualité des cristaux semblait nécessiter de passer par la rationalisation de la cristallisation grâce à une meilleure maîtrise de l'influence des paramètres physico-chimiques. C'est ce que nous avons essayé de mettre en place au cours de cette thèse.

Lors de ce travail, nous avons tout d'abord sélectionné quatre familles de tensioactifs adaptées à la manipulation des protéines membranaires, en se basant sur des considérations structurales puis nous les avons synthétisées. Dans un deuxième temps, l'étude du comportement de ces composés en solution, par SAXS, nous a permis d'éliminer ceux qui ne forment pas des assemblages bien définis du point de vue de leur nombre d'agrégation (les tripodes C3- et C4Glu3 et le F_4H_5-malt) et ceux dont la taille des micelles évolue avec la concentration en tensioactifs (le tripode C5Glu3 et le F_6H_2-malt). Les propriétés physico-chimiques des trois autres tensioactifs (le F_8TAC, le PCC-malt et le F_2H_9-malt) ont été comparées à celles du DDM pour estimer leur intérêt pour la cristallisation des protéines membranaires. Il a ainsi été mis en évidence, via les mesures du second coefficient du viriel que le F_8TAC est un composé à privilégier pour augmenter la solubilité

des complexes PDL alors que le PCC-malt présente, comme le DDM, une bonne aptitude pour la cristallisation des protéines membranaires. A partir de ces résultats, nous avons donc décidé de retenir le PCC-malt et le DDM dans l'optique de cristalliser le complexe RC-LH1-pufX. En ce qui concerne le F_2H_9-malt, les difficultés rencontrées lors de sa synthèse ne nous ont pas laissé le temps de réaliser l'étude des interactions de ce tensioactif, ni de le tester sur le complexe RC-LH1-pufX. Toutefois les caractéristiques de sa micelle (taille, forme et masse) et son comportement lors du test de stabilité de la BR ne sont pas incompatibles avec son utilisation sur les protéines membranaires. Dans l'objectif de mieux contrôler les conditions de cristallisation, la troisième partie de la thèse a été consacrée à la mise en place d'une stratégie nous permettant d'analyser la composition des complexes PDL purifiés, en dosant les tensioactifs et les lipides liés par HPTLC. Cela a permis, d'une part, de vérifier la bonne adéquation entre les propriétés attendues de par la structure du PCC-malt et les mesures expérimentales (meilleure conservation de lipides, bouée mieux organisée par rapport au DDM). D'autre part, nous avons à présent un outil qui nous permet d'aborder l'étape de la cristallisation avec une meilleure vision des différents paramètres mis en jeu, dans le but de pouvoir déterminer le rôle des tensioactifs dans la cristallisation du complexe RC-LH1-pufX. Le dernier volet de la thèse est donc naturellement consacré aux essais de cristallisation du complexe RC-LH1-pufX et à leur rationalisation qui implique une meilleure gestion du diagramme de phases du complexe PDL. C'est pourquoi nous allons commencer ce chapitre par quelques rappels théoriques pour mieux comprendre la place du diagramme de phases dans la cristallisation de complexe PDL.

1 La cristallisation

La cristallisation d'un protéine peut être divisée en trois étapes : la création de la sursaturation, la création de la nucléation (ou germination) et la croissance. L'étude des interactions en solution (via le A_2) que nous avons réalisée au chapitre physico sur les micelles de tensioactifs, permet de rationaliser la première de ces étapes en donnant une représentation de l'évolution de la sursaturation. Nous allons à présent nous intéresser aux conséquences de ces variations de A_2 sur l'étape de la nucléation afin de voir comment elle peut, elle aussi, être mieux appréhendée.

1.1 La nucléation

L'initiation de la cristallisation, ou ***nucléation***, d'une macromolécule se produit quand la sursaturation est suffisante, dans une zone où l'équilibre thermodynamique est rompu : le potentiel chimique de la phase soluté devient supérieur à celui de la phase cristalline qui est par conséquent la phase la plus stable. Dans le diagramme de phases du complexe PDL (figure 5.1), la nucléation peut se produire lorsque le système se situe dans la zone de nucléation (nucléation primaire) ou la zone métastable (nucléation secondaire).

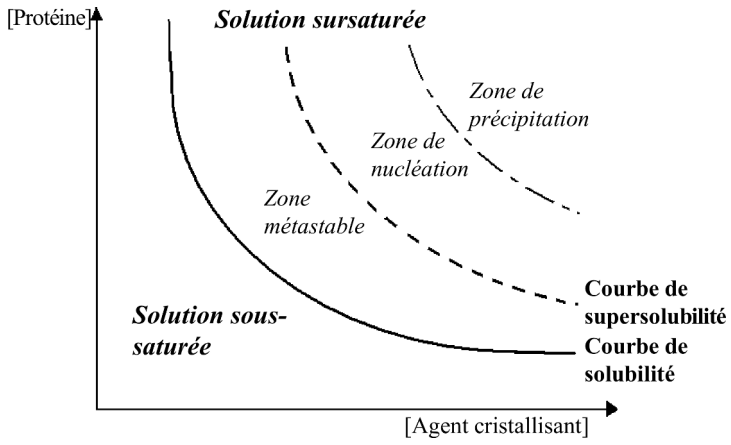


Figure 5.1 – Diagramme de phases d'une protéine pour la cristallisation. Le diagramme de phases se divise en deux de part et d'autre de la courbe de solubilité : la zone de sous-saturation (pas de cristaux possible) et la zone de sursaturation. Cette dernière est à son tour divisée en trois : la zone métastable (aucun cristal ne nuclée mais un cristal existant reste stable et peut se développer), séparée, par la courbe de supersolubilité, de la zone de de nucléation (il y a formation et développement de noyaux cristallins) et enfin la zone de précipitation (la protéine précipite, au lieu de cristalliser).

Il existe, en effet, différents types de nucléation :

- *La nucléation primaire homogène* : Les noyaux (ou germes) se forment au sein même de la solution
- *La nucléation primaire hétérogène* : Les noyaux se forment sur une surface solide extérieure (cristallisoir, poussière, débris de verre...)
- *La nucléation secondaire* : De nouveaux noyaux se forment à partir de cristaux existants (cas de la technique de cristallisation par ensemencement)

Dans la zone de nucléation, la sursaturation est élevée et permet la nucléation spontanée du cristal. Cependant la barrière énergétique à franchir pour obtenir une nucléation primaire homogène est élevée, ce processus de nucléation est en concurrence avec la nucléation hétérogène, moins coûteuse en énergie et qui est donc prépondérante lorsque la sursaturation n'est pas assez élevée. Dans la zone métastable (entre la courbe de solubilité et la courbe de supersolubilité que nous définirons par la suite) la sursaturation est relativement faible. Elle ne permet pas la nucléation spontanée mais elle est suffisante pour qu'un cristal pré-formé puisse exister et/ou croître. Il est donc possible d'y obtenir des cristaux en ensemençant des noyaux cristallins pour initier la cristallisation. La poursuite de leur croissance sera alors guidée par la sursaturation et non par l'empilement cristallin des germes ensemencés. D'une manière générale les valeurs de sursaturation nécessaires à la cristallisation de macromolécules biologiques sont nettement supérieures à celles observées pour les cristaux inorganiques, expliquant la plus grande complexité pour les cristalliser. C'est pourquoi aussi, il n'est pas rare d'obtenir des phases amorphes ou précipitées en plus des cristaux de protéines.

La nucléation primaire homogène est donc la plus difficile à obtenir. Elle est le fruit des variations de concentrations locales induites par les échanges thermiques qui provoquent en permanence l'apparition et la disparition de noyaux cristallins en solution. L'énergie nécessaire à la création d'un noyau de volume V et de surface S s'écrit :

$$\Delta G = \frac{V}{\Omega}\Delta\mu + S\gamma \tag{5.1}$$

avec :

- ΔG : enthalpie de la réaction de cristallisation
- Ω : volume de la molécule dans le cristal
- $\mu = \mathrm{k}_B \mathrm{T} \ln\beta$ potentiel chimique où k_B est la constante de Boltzmann ($1.381.10^{-23}$ $\mathrm{J.K^{-1}}$), T la température, et β la sursaturation)
- γ tension interfaciale entre le germe et la solution

Le premier terme correspond à l'énergie associée à la création du volume du germe. Il est thermodynamiquement favorable à l'initialisation de la cristallisation, contrairement au second, qui correspond à l'énergie nécessaire à la création de la surface du germe. En faisant l'hypothèse que le germe créé est sphérique de rayon r, l'équation (5.1) devient :

$$\Delta G = \frac{1}{\Omega}\frac{4}{3}\pi r^3\Delta\mu + 4\pi r^2\gamma \tag{5.2}$$

Dans une condition expérimentale donnée l'enthalpie de réaction est alors maximale pour une valeur critique de r, notée r* :

$$r^* = \frac{2\Omega\gamma}{\Delta\mu} \quad avec \quad \Delta G(r^*) = \frac{16\pi\Omega^2\gamma^3}{3\Delta\mu^2} \tag{5.3}$$

D'après l'expression de l'enthalpie (5.3), la création de germes est favorisée quand $\Delta\mu$ est important et/ou γ est faible. Ainsi il est d'autant plus probable d'obtenir une nucléation que la sursaturation (β) et la température (T) sont élevées, et/ou que la tension interfaciale (γ) est faible. En pratique cela se traduit par une augmentation du nombre de noyaux dans la solution.

Par ailleurs pour pouvoir exister et se développer le germe doit atteindre un rayon égal au rayon critique r* pour être en équilibre thermodynamique alors que pour un rayon inférieur à r* le germe se dissout spontanément. A ce r* correspond donc une sursaturation critique β* qui définie la courbe de supersolubilité dans la zone de sursaturation (figure 5.1).

La séparation de phase solide-liquide responsable de la nucléation est due au passage de la région sous-saturée à la région sursaturée par la variation d'un ou plusieurs paramètres physico-chimiques (tels que le pH, la température, les concentrations en agents cristallisants). Un autre mécanisme décrit plus récemment dans la littérature rapporte un

phénomène de nucléation induit suite à une séparation de phase liquide-liquide qui est en générale métastable par rapport à une phase cristalline [189, 190]. Il se forme dans le milieu une phase pauvre en protéines et une autre riche en protéines dans laquelle vont se créer les noyaux cristallins. La nucléation est moins coûteuse en énergie lorsqu'elle est précédée par la formation d'une micro-gouttelette dense en protéines [191].

Une fois que le noyau de nucléation est formé, les mécanismes de croissance et les vitesses de croissance des cristaux dépendent des conditions et du milieu de croissance (sursaturation, température, proportion d'impuretés, solvant, etc) mais aussi de la nature interne du cristal (défauts, formations de liaisons intermoléculaires dans le cristal, etc). Ainsi par exemple, plus la sursaturation est élevée, plus la croissance est rapide.

L'arrêt de la croissance est, dans le meilleur des cas, la conséquence du retour à l'équilibre du système au niveau de la courbe de solubilité, c'est à dire qu'il y a autant de molécules qui se détachent du cristal pour repasser en solution, que de molécules qui font le chemin inverse. Toutefois la fin de la croissance peut aussi se produire avant d'atteindre la solubilité lorsqu'un cristal présente trop de défauts et d'impuretés empêchant l'adsorption de nouvelles molécules, on parle alors d'"empoisonnement".

1.2 Les différentes méthodes expérimentales de cristallisation

Plusieurs méthodes ont été développées pour la cristallisation des biomacromolécules afin de les mener en conditions de sursaturation sans les dénaturer. Pour ce faire, la solution de protéines est mise au contact (direct ou indirect) d'une solution contenant les agents cristallisants et dont l'augmentation de concentration va initier la cristallisation. Le choix de l'une ou l'autre des méthodes sera guidé d'une part, par la quantité de protéines disponibles et d'autre part, par le "chemin" que l'on souhaite parcourir dans le diagramme de phases, ce qui modifiera la cinétique de croissance des cristaux.

Les additifs de cristallisation classiques pour les protéines en solution aqueuse sont des sels, des polymères, des acides ou des bases et des petites molécules organiques (phénol, acétone, etc). Leur rôle est de faire varier la solubilité de la protéine d'intérêt pour mener à sa cristallisation. Ce passage d'une solution sous-saturée à une solution sursaturée est un phénomène continu jusqu'à l'apparition de cristaux.

1.2.1 En "batch"

La méthode dite "en batch" est la plus simple d'un point de vue expérimental puisqu'elle consiste à mélanger directement la protéine à la solution d'agents cristallisants. La goutte ainsi formée est isolée de l'atmosphère par l'usage d'huile inerte, ce qui présente l'avantage de travailler avec une solution dont la composition est parfaitement connue. La protéine se retrouve directement en sursaturation et seule la concentration en protéine évolue au cours du temps après nucléation (figure 5.2). Cette méthode présente toutefois deux inconvénients : (i) il faut que l'état initial se situe déjà dans la zone de nucléation car

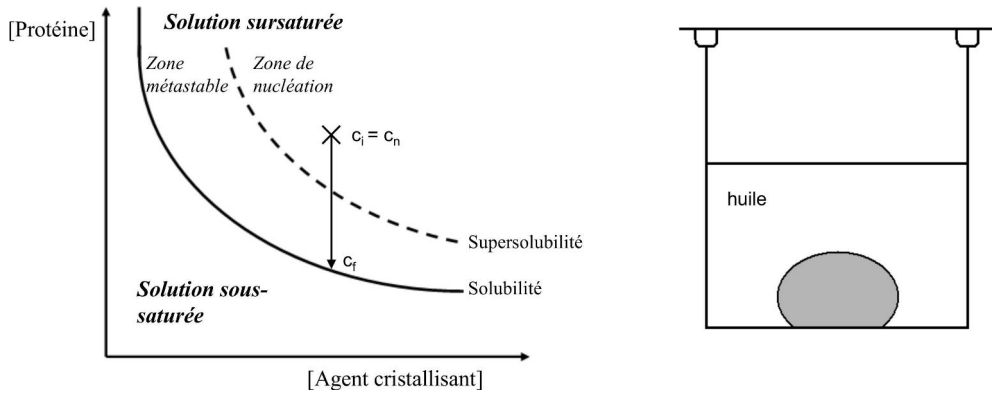


Figure 5.2 – A gauche, **diagramme de phases pour une cristallisation en "batch"** : le système va de l'état initial, C_i, à l'état final, C_f. La nucléation a lieu au point C_n, équivalant au point C_i en "batch". A droite, **principe de la cristallisation en batch** : la goutte, en gris, composée d'un mélange de protéines et d'agents cristallisants est complètement isolée du milieu extérieur par de l'huile.

il n'y a pas de cheminement exploratoire dans le diagramme de phase. (ii) Le changement d'environnement de la protéine est un peu "brutal". Les méthodes de dialyse et de diffusion de vapeur permettent quant à elles, d'augmenter progressivement la concentration en agents cristallisants et donc de se déplacer dans le diagramme de phase afin de maximiser les chances de franchir la courbe de supersolubilité.

1.2.2 Par dialyse

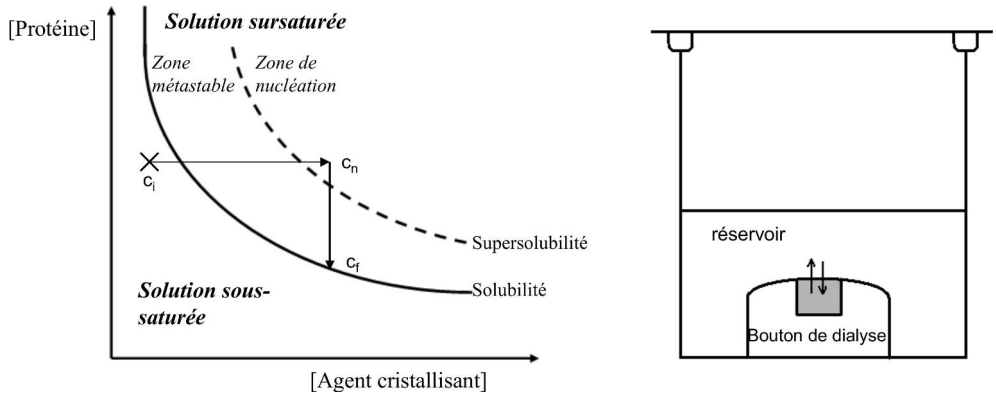


Figure 5.3 – **Diagramme de phases pour une cristallisation par dialyse** : le système va de l'état initial, C_i, à l'état final, C_f. La nucléation primaire a lieu en un point C_n, situé plus ou moins loin dans la phase de nucléation. A droite, **principe de la cristallisation par dialyse** : la goutte de protéines en gris est retenue dans le bouton de dialyse et échange avec le réservoir contenant les agents cristallisants.

Pour la cristallisation par dialyse la protéine contenue dans un dispositif de dialyse

(bouton ou boudin, en fonction du volume) est placée au cœur d'une solution d'agents cristallisants (figure 5.3). La membrane de dialyse étant imperméable aux grosses molécules, la protéine reste dans le dispositif alors que les espèces de bas poids moléculaires s'échangent de part et d'autre de la membrane. Cette méthode est notamment utilisée pour changer le tampon d'une protéine tout en gardant sa concentration constante, lors d'un changement de pH ou d'une diminution de la concentration en sel.

1.2.3 Par diffusion de vapeur

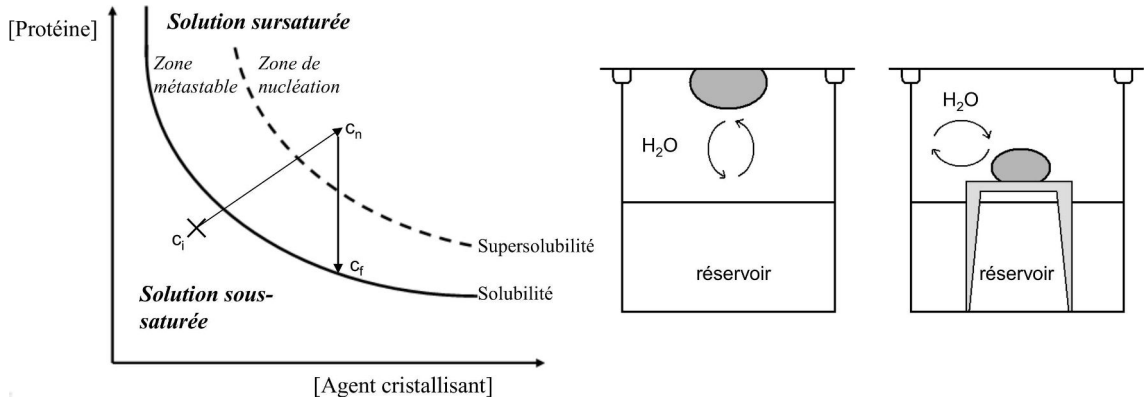


Figure 5.4 – Diagramme de phases pour la cristallisation par diffusion de vapeur : le système va de l'état initial, C_i, à l'état final, C_f. La nucléation primaire a lieu en un point C_n, situé plus ou moins loin dans la phase de nucléation. A droite, **principe de la cristallisation par diffusion de vapeur** : une goutte, en gris foncé, composée d'un mélange de protéines et d'agents cristallisants est mise en équilibre dans une enceinte close avec la solution d'agents cristallisants du réservoir. Les échanges entre la goutte et le réservoir se font par la diffusion de vapeur d'eau de la goutte vers le réservoir.

La diffusion de vapeur est peut être la méthode la plus populaire pour les premiers essais de cristallisation d'une nouvelle protéine. En effet elle présente l'avantage d'augmenter simultanément la concentration en protéine et en agents cristallisants, tout en restant très simple d'exécution (par rapport à la dialyse) et adaptable aux petits volumes. Dans une enceinte hermétique, un réservoir, rempli d'une solution contenant le tampon et les agents cristallisants, est mis en équilibre avec une goutte formée d'un mélange de la solution de protéines et de celle du réservoir. En fonction du design de l'enceinte on parlera de goutte suspendue (la goutte est au dessus du réservoir, sur le couvercle de l'enceinte) ou de goutte assise (la goutte est déposée dans un compartiment latéral ou en surplomb du réservoir) (figure 5.4).

La force motrice de diffusion des espèces est la différence de tension de vapeur entre la goutte et le réservoir. Initialement la goutte est plus diluée que le réservoir, ce qui entraîne la diffusion des composés volatils tel que l'eau, de la goutte vers le réservoir. Au final, la goutte se retrouve ainsi concentrée en espèces qui ne diffusent pas (protéines, agents

cristallisants, etc). Par ailleurs pour faciliter les échanges de la goutte vers le réservoir, le volume du réservoir est supérieur à celui de la goutte, d'un à trois ordre(s) de grandeur. L'inconvénient majeur de cette méthode est l'absence complète de contrôle de l'évolution dans le diagramme de phase. Il n'est pas possible de connaître les conditions exactes de nucléation et la cristallisation peut s'avérer difficile à reproduire.

2 L'approche de la cristallisation par le A_2

La difficulté de la cristallisation est que le diagramme de phase de la protéine d'intérêt n'est jamais connu initialement et qu'il requière pour sa détermination l'obtention de cristaux. C'est pourquoi les essais de cristallisation se font majoritairement par une approche empirique basée sur des méthodes essais/erreurs. Cependant l'étude du second coefficient du viriel est un moyen d'avoir accès à des informations sur le diagramme de phase, sans devoir obtenir de cristaux. Il est mesuré en solution et permet de connaître l'évolution de la sursaturation en fonction des conditions physico-chimiques. Dans le cas plus particulier des protéines membranaires, nous avons vu dans l'introduction que le diagramme de phase du tensioactif s'ajoutait à celui du complexe PDL. Dans les années 2000, les travaux de Loll et Berger sur le cas particulier des PM intégrales tendent à montrer que ces deux diagrammes de phases suivent une évolution globalement similaire. Ainsi ils font l'hypothèse que la bouée de détergent jouerait un rôle important dans la modulation du diagramme de phases du complexe PDL [67, 69]. L'étude des interactions faibles (via le A_2) entre micelles de tensioactifs serait donc un outil pour la prédiction des conditions favorables à la cristallisation des complexes PDL puisqu'il permet d'appréhender le comportement des complexes PDL en solution.

Nous avons vu au chapitre 2 que les micelles de PCC-malt étaient légèrement plus attractives que celles du DDM. D'après ce résultat, on peut donc s'attendre à ce que les diagrammes de phases de ces deux tensioactifs soient différents. La courbe de "cloud point" du PCC-malt devrait être décalée vers les plus faibles concentrations en polymère par rapport à celle du DDM. Nous allons donc vérifier la validité de l'approche de la cristallisation des protéines membranaires par le paramètre du A_2.

En effet, la corrélation interactions faibles/diagramme de phases est très importante pour la cristallisation des protéines membranaires, dans la mesure où les complexes PDL ont d'autant plus de chances de cristalliser que les conditions sont proches du "cloud point" du détergent [15, 192]. Cette constatation empirique a d'ailleurs été utilisée pour concevoir une méthode de criblage de conditions de cristallisation qui a porté ses fruits sur une douzaine de protéines membranaires différentes [193].

2.1 La corrélation interaction/diagramme de phase

Comme nous avons vu au chapitre 2 que seul le PEG avait une influence sur les interactions inter-micellaires, nous avons testé des solutions de DDM et PCC-malt à différentes

concentrations en tensioactifs et en PEG 3350 (de 6,5 à 10 %). Pour ces deux composés nous avons pu observer par microscopie optique le passage d'une phase liquide homogène à un état biphasique. Les courbes de "cloud point" ainsi obtenues sont représentées sur la figure 5.5. Pour une concentration en PEG donnée, le PCC-malt présente une solubilité plus faible que le DDM sur le domaine étudié, ce qui est bien en accord avec l'étude du A_2 qui indique que la micelle de PCC-malt est plus attractive.

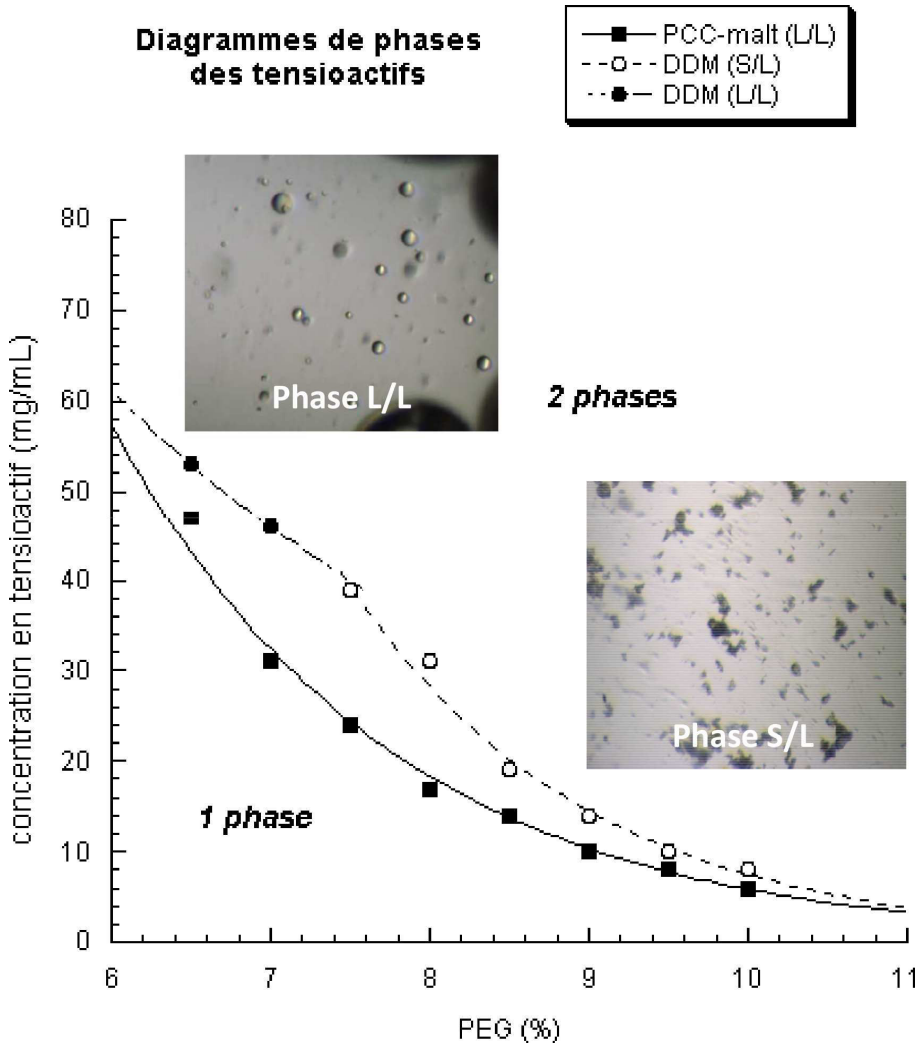


Figure 5.5 – Diagrammes de phases du DDM et du PCC-malt en fonction de la concentration en PEG. Les transitions de phases ont été étudiées à 20°C pour des concentrations en PEG variant de 6,5 à 10%, et des concentrations en tensioactifs de 5 à 55 mg/mL.

Par ailleurs lors de l'observation des transitions de phases opérées par chacun de ces deux tensioactifs, nous avons pu remarquer que dans le cas du DDM l'état biphasique obtenu était de type liquide/liquide à 6,5 et 7 % PEG puis liquide/solide à plus forte concentration en PEG. Pour le PCC-malt en revanche toutes les transitions de phases observées sont de type liquide/liquide. Ce résultat met en évidence la présence de deux

domaines différents dans le diagramme de phases du DDM. Un domaine avec des gouttelettes riches en micelles en solution (phase liquide/liquide) et un domaine avec des agrégats solides de tensioactifs (phase liquide/solide). Sur cette même gamme de concentrations, le PCC-malt possède un domaine liquide/liquide. Toutefois comme nous avons travaillé à une concentration en PEG donnée et augmenté la concentration en tensioactif, nous nous sommes arrêtés à la première transition de phase rencontrée, il n'est donc pas impossible qu'à plus forte concentration en tensioactif le PCC-malt possède une phase liquide/solide.

Ce résultat est à rapprocher de la présence de pics de diffraction que nous avons pu observer sur les profils de SAXS des solutions à fortes concentrations en DDM et en PEG (figure 5.6), phénomène que nous n'avons jamais observé pour le PCC-malt.

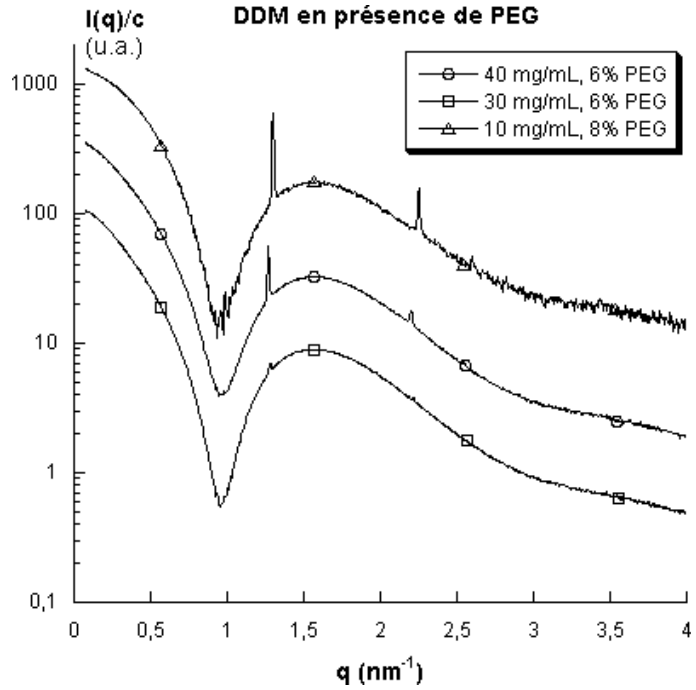


Figure 5.6 – Courbes de diffusion de solutions de DDM à fortes concentrations en PEG à 20 °C. Les courbes ont été décalées pour une meilleure visibilité.

La phase liquide/solide du DDM, présente donc un certain degré d'organisation des micelles de DDM, qui peut être le signe de la présence d'une phase hexagonale ou semi-cristalline (*cf.* le diagramme de phases générique de tensioactifs, figure 1.5 48). Le rapport des vecteurs de diffusion, q, auxquels sont obtenus les deux pics de diffraction pour les courbes à 6 et 8 % est constant, indiquant que nous avons bien à faire à la même phase dans ces deux conditions. Il apparait ici une seconde différence importante entre le DDM et le PCC-malt. Cette transition de phases liquide/solide du DDM peut-elle influencer la croissance des cristaux de RC-LH1-pufX ? La question reste ouverte. En revanche cet abaissement du cloud point du PCC-malt suggère que le cristallisation du RC-LH1-pufX purifié en PCC-malt, pourrait être initiée à des concentrations plus faibles en agents

cristallisants par rapport à un complexe purifié en DDM. C'est ce que nous avons cherché à vérifier en étudiant les morphodromes du complexe RC-LH1-pufX en DDM et PCC-malt. On parlera de morphodrome pour visualiser les différents essais de cristallisation ou les propriétés optiques des solutions plutôt que de diagramme de phases puisque nous ne mesurons pas stricto sensu des solubilités.

2.2 Les morphodromes des cristaux de RC-LH1-pufX en goutte suspendue

Dans le chapitre 2 nous avons mis en évidence que beaucoup de caractéristiques physico-chimiques du DDM et PCC-malt en solution sont similaires (taille et forme des micelles, ordre de grandeur et évolution du A_2). Ces résultats laissent donc penser que les DDM et le PCC-malt sont deux tensioactifs à priori facilement "interchangeables" lors d'essais de cristallisation : des conditions donnant des cristaux avec l'un de ces deux tensioactifs devraient fonctionner avec l'autre. Nous avons pu le vérifier par l'observation des morphodromes obtenus du complexe RC-LH1-pufX. Après 7 jours en boîte de cristallisation selon la technique de la goutte suspendue, le complexe PDL de RC-LH1-pufX en PCC-malt (figure 5.8) cristallise dans des conditions similaires à celles définies sur un complexe PDL en DDM (figure 5.7). Il a donc été possible de cristalliser le complexe RC-LH1-pufX en PCC-malt, sans devoir réaliser de "screening" des conditions de cristallisation, simplement en se basant sur les résultats obtenus en présence de DDM.

Cependant comme l'on pouvait s'y attendre, les premiers cristaux de la protéine purifiée dans 0,15 mg/mL de DDM sont obtenus à plus forte concentration en PEG que pour la protéine purifiée dans 0,11 mg/mL en PCC-malt. Ces résultats confirment que dans le diagramme de phases du complexe de RC-LH1-pufX, la courbe de solubilité du complexe en PCC-malt se retrouverait en dessous de celle du complexe en DDM. Toutefois il faut noter que l'usage de la méthode de cristallisation par diffusion de vapeur ne nous permet pas de tracer la courbe de solubilité des complexes directement sur les morphodromes, puisque comme nous venons de le voir dans la première partie de ce chapitre il y a une évolution concomitante de la concentration en protéine et en PEG dans la goutte de cristallisation. Les courbes en pointillés ne sont données qu'à titre indicatif. Elles correspondent à un visuel de la courbe de supersolubilité au dessus de laquelle se réalise la nucléation spontanée. En dessous de cette courbe se trouve la zone métastable dans laquelle des cristaux peuvent être obtenus après ensemencement.

Toutefois la question de la qualité de la diffraction de ces cristaux reste entière. Pour aller au bout de ce travail il faudrait savoir s'il est intéressant pour la diffraction d'avoir des cristaux à plus basse concentration en PEG ou si au contraire trop d'attraction nuit à la croissance de cristaux de qualité. Est ce que les attractions entre micelles peuvent induire directement des attractions entre complexes PDL ? Est ce qu'il ne faudrait pas un peu de répulsion pour augmenter la solubilité initiale des complexes PDL et pouvoir ainsi avoir une plus grande latitude dans le diagramme de phase pour la croissance des

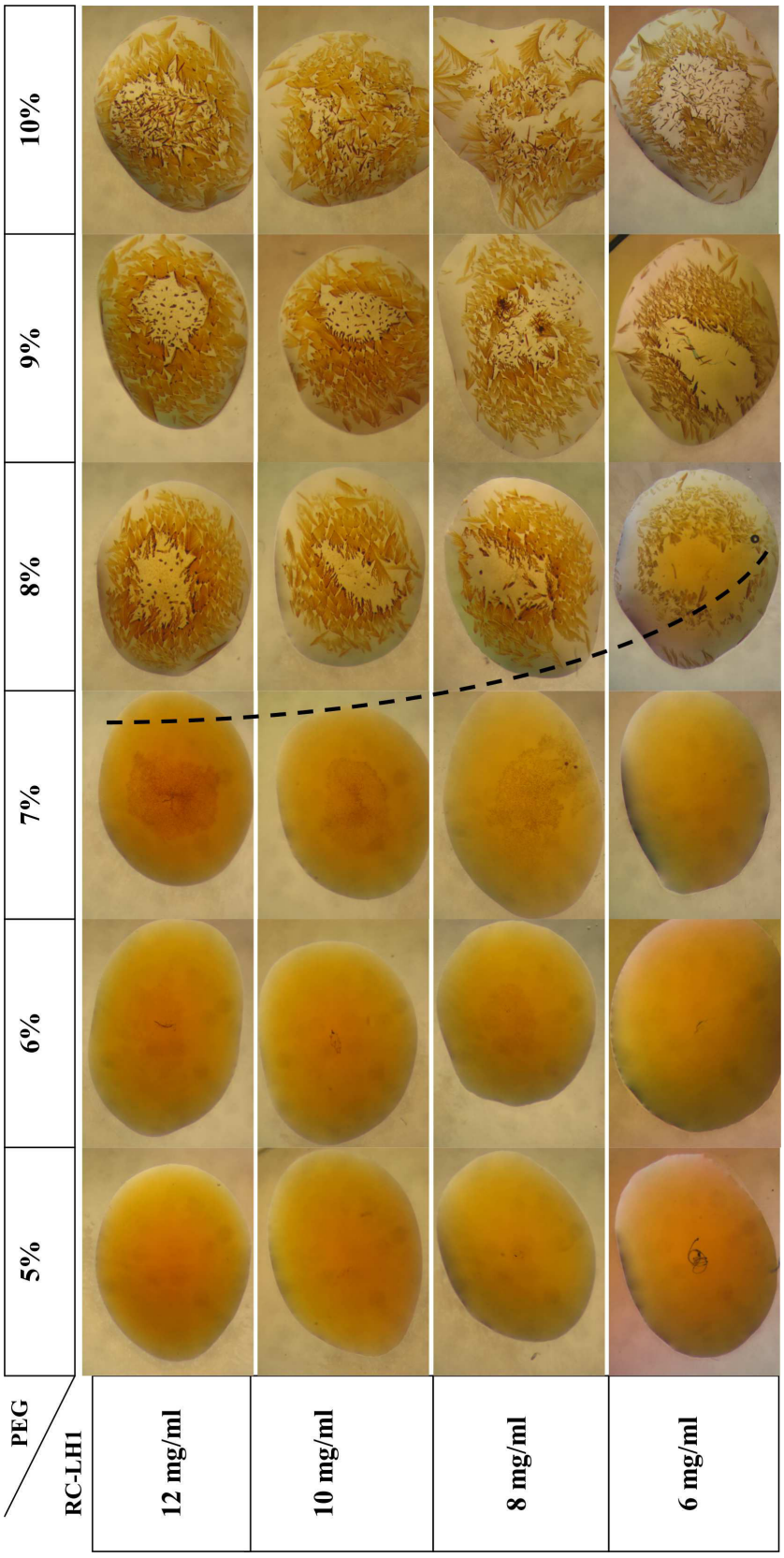


Figure 5.7 – **Morphodrome du RC-LH1-puf X en DDM** en fonction de la concentration en protéine et en PEG. Technique de la goutte suspendue.

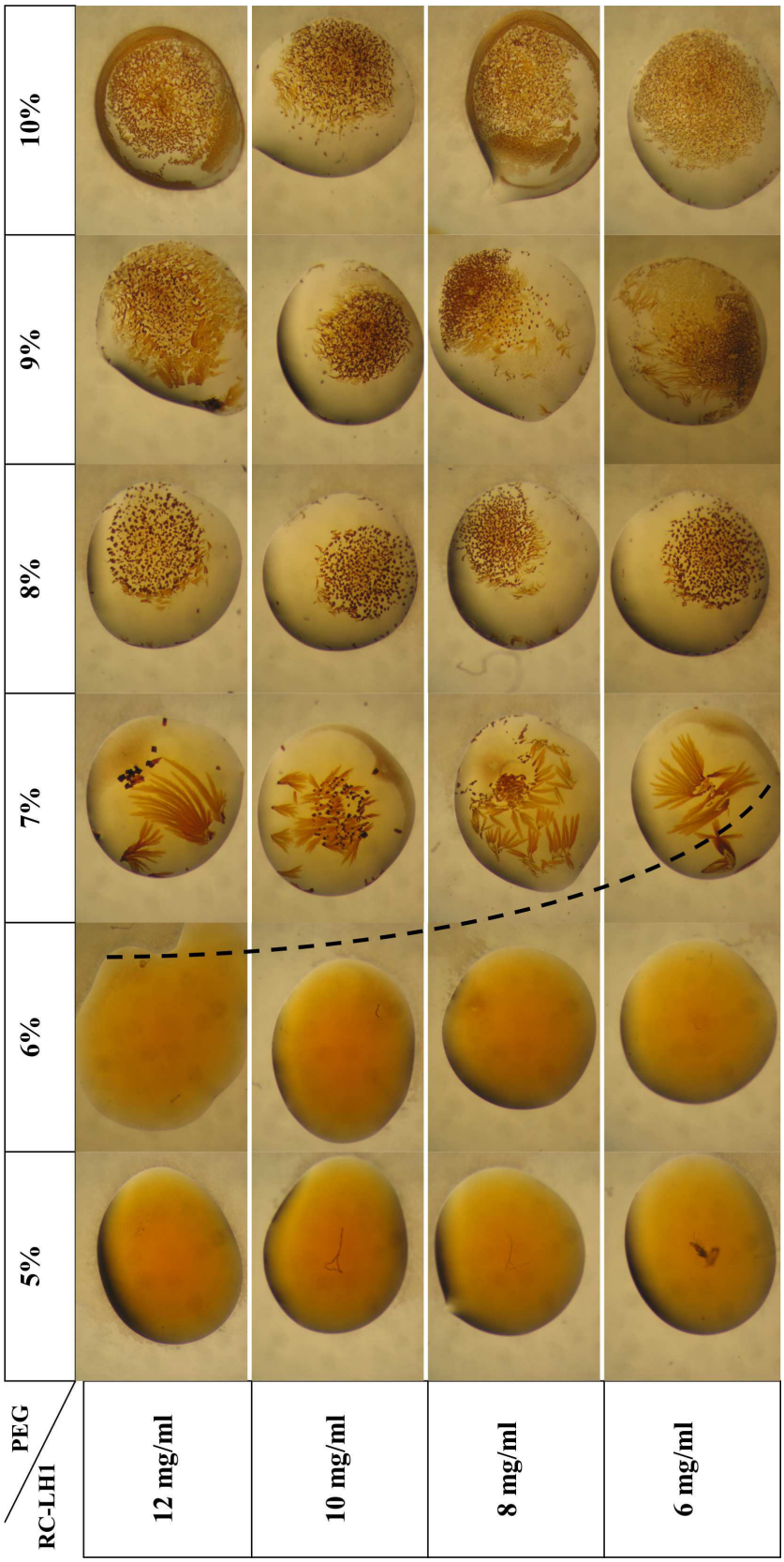


Figure 5.8 – **Morphodrome du RC-LH1-puf X en PCC-malt** en fonction de la concentration en protéine et en PEG. Technique de la goutte suspendue.

cristaux ?

2.3 Quid de la diffraction des cristaux de RC-LH1-pufX ?

Parmi tous les cristaux obtenus pendant cette thèse, nous n'avons réussi qu'une seule fois à produire des cristaux plus prometteurs pour la diffraction que ceux montrés dans les morphodromes. Contre toute attente, ils ont été obtenus lors d'essais de cristallisation réalisés "à tout hasard" sur le restant de complexes protéiques purifiés d'une ancienne manipulation, conservé pendant plus d'un mois au froid. Malgré le caractère non maîtrisé de ces essais (pas de détermination de la composition de la bouée), nous avons décidé de tester la diffraction de ces cristaux de RC-LH1-pufX en présence de DDM et PCC-malt puisqu'ils avaient subi les mêmes conditions de conservation.

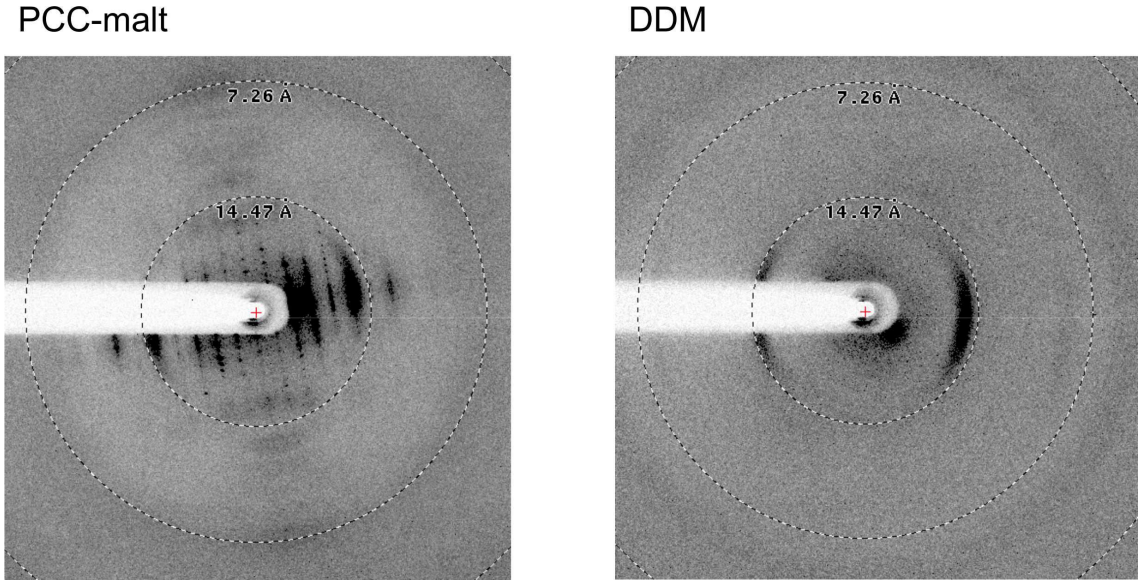


Figure 5.9 – Clichés de diffractions de cristaux de RC-LH1pufX en DDM et PCC-malt, obtenus en conditions non contrôlées. Communication personnelle de Marina Siponen (LBC). Les tests ont été réalisé sur la ligne ID29 de l'ESRF à Grenoble.

Ces cristaux ont donc été congelés dans l'azote liquide et analysés par Marina Siponen du LBC à l'ESRF de Grenoble. Dans ces conditions loin d'être optimales, les cristaux de RC-LH1-pufX en présence de DDM n'ont pas donné de tâches de diffraction, contrairement aux cristaux de RC-LH1-pufX en PCC-malt qui ont diffractés à une résolution très moyenne (environ 15 Å) (figure 5.9). Ce résultat confirme l'intérêt du PCC-malt pour la cristallisation des protéines membranaires, en accord avec ce qui avait été pressenti sur le cytochrome b_6f [114]. Dans les mêmes conditions de purification et de conservation du complexe RC-LH1-pufX, le PCC-malt a donc permis d'obtenir des cristaux de meilleure qualité que ceux obtenus en DDM. Cela pourrait être la conséquence de la capacité du PCC-malt à former des assemblages plus compacts que le DDM qui pourraient faciliter

la création de contacts cristallins et/ou une meilleure stabilisation de la protéine pendant sa conservation.

En conclusion, l'ensemble de l'étude des interactions faibles entre micelles de tensioactifs, le tracé des diagramme de phases des tensioactifs et les morphodromes du complexe RC-LH1-pufX renforcent encore une fois l'hypothèse de l'existence d'une corrélation forte entre la solubilité d'un tensioactif, son second coefficient du viriel et sa capacité à conduire un complexe PDL à la cristallisation. Il est ainsi possible de déterminer des conditions pour lesquelles la probabilité d'obtenir des cristaux sera plus grande. La poursuite de ces études est toutefois nécessaire pour pouvoir à l'avenir mieux comprendre l'influence des conditions de cristallisation et de la quantité de lipides, sur la qualité des cristaux obtenus.

Conclusion générale

Les protéines membranaires interviennent dans un grand nombre de processus biologiques majeures comme la signalisation cellulaire, la transduction d'énergie ou le transport de métabolites. Toutefois, malgré leurs rôles physiologiques essentiels, peu de structures de protéines membranaires ont été résolues à cause de la difficulté rencontrée pour obtenir des cristaux. La méthode de cristallisation *in surfo* est aujourd'hui la plus utilisée, cependant il existe peu de travaux sur l'étude approfondie du tensioactif.

Ce travail a proposé une approche originale et pluridisciplinaire de l'étude des tensioactifs pour la cristallisation des protéines membranaires. Il est né de la volonté de coordonner les expertises scientifiques dans un même projet pour aborder le tensioactif sous tous ses aspects, de sa conception à son utilisation. Ainsi, dans le but de chercher à rationaliser la cristallisation des protéines membranaires par une meilleure compréhension du rôle des tensioactifs, nous nous sommes attachés dans la mesure du possible à :

- Réaliser la synthèse de différents tensioactifs
- Étudier leurs propriétés physico-chimiques et structurales dans l'eau
- Caractériser leur influence sur la stabilité de la bactériorhodopsine mais surtout sur la composition du complexe protéique RC-LH1-pufX dont l'amélioration de la cristallisation pour la résolution structurale est l'objectif ultime
- Réaliser des essais de cristallisation de ce complexe avec les tensioactifs montrant les meilleures aptitudes à conduire à la cristallisation de PM.

Nous avons commencé par choisir plusieurs familles de tensioactifs parmi ceux développés au sein de l'équipe CBSA afin de disposer d'une large variété de structures pour notre étude. Nous avons ainsi retenu : le F_8TAC, les tripodes (C3-, C4- et C5Glu3) et deux types de composé dérivés du DDM, détergent classique de la cristallisation des protéines membranaires, le PCC-malt et les FH-malt. Nous avons ensuite réalisé les synthèses des tensioactifs que nous voulions comparer au DDM, hormis pour les tripodes dont la synthèse a été réalisée par le Dr Julien Dauvergne lors de sa thèse dans l'équipe CBSA.

Le F_8TAC est un tensioactif fluoré utilisé avec succès depuis une vingtaine d'année pour la manipulation des protéines membranaires. Le caractère lipophobe des atomes de fluor de sa chaîne lui confère des propriétés de non détergence qui permettent de préserver l'intégrité et la fonctionnalité des protéines membranaires dans l'eau [118, 119, 121]. Sa synthèse se fait par une réaction de télomérisation du THAM sur un thiol fluoré et aboutit à l'obtention d'une tête polaire polymérique [117].

Les tripodes sont une famille d'amphiphiles faciaux dont la géométrie novatrice n'avait jamais été testée sur les protéines membranaires. Leur structure est construite autour d'un noyau central aromatique persubstitué de manière alternée par trois groupements glucosides qui assurent l'hydrophilie et trois chaînes alkyles pour apporter l'hydrophobie au tensioactif [127].

Le PCC-malt a été conçu sur le modèle du DDM, avec une chaîne rigidifiée par la présence d'un groupement bicyclohexyl. L'objectif est de créer ainsi moins de contact avec la partie hydrophobe de la protéine que le DDM pour être moins déstabilisant. Il est obtenu par une réaction de glycosylation entre la maltose et un groupement propylbicyclohexamol [114].

Les FH-malt sont une famille d'amphiphiles originaux développés dans le cadre de cette thèse avec pour objectif de déterminer l'impact de la proportion e fluor sur les interactions tensioactifs-protéine. Le design du F_2H_9-malt et du F_4H_5-malt a donc été imaginé pour intégrer un segment fluoré, respectivement de 2 et 4 carbones, à la chaîne hydrophobe de ces tensioactifs et la longueur du segment hydrogéné a été calculé pour conserver la même hydrophobie théorique que la chaîne du DDM. La synthèse du F_4H_5-malt consiste à synthétiser, tout d'abord, la chaîne hydrophobe par une réaction d'addition/élimination d'un iodure fluoré sur un alcool vinylique, avant de la greffer au maltose par glycosylation. La synthèse du F_2H_9-malt s'est avérée en revanche plus complexe. Finalement elle a pu être réalisée en 4 étapes, en commençant par la glycosylation du penténol par le maltose. Le segment fluoré est ensuite inséré par addition radicalaire d'un iodure perfluoré sur le groupement vinyl de la chaîne et l'iode est ensuite éliminé en milieu basique pour donner une chaîne insaturée. La dernière étape consiste à réduire cette double liaison par hydrogénation catalytique. Enfin un dernier composé, commercial, dont la structure répond aux mêmes critères que le F_2H_9-malt et le F_4H_5-malt, a été ajouté à l'étude (F_6H_2-malt).

L'étude physico-chimique de ces composés a permis de déterminer la CMC, la taille, la masse et la forme des assemblages de ces tensioactifs en solution aqueuse et de les comparer avec le DDM. Le premier résultat important de cette étude a été de remettre en question, suite aux résultats de CMC, la règle d'équivalence d'hydrophobie $1CF_2 \approx 1{,}6\ CH_2$. La contribution hydrophobe des carbones fluorés est en effet moins grande que celle qui est décrite dans la littérature. Par ailleurs l'analyse SAXS a permis de mettre en évidence que trois des tensioactifs étudiés, le C3 et C4Glu3 et le F_4H_5-malt forment des agrégats dont la forme générale et le nombre d'agrégation évoluent avec la concentration

en tensioactif. Pour les deux premiers cette caractéristique semble être la conséquence de la trop faible longueur de leur chaîne hydrophobe, alors que dans le cas du F_4H_5-malt il pourrait plutôt s'agir d'une difficulté d'organisation de la chaîne mi-hydrogénée, mi-fluoré dans la micelle. Le C5Glu3 et le F_6H_2-malt forment, quant à eux, des micelles cylindriques qui s'allongent quand la concentration en tensioactif augmente. Et les trois derniers tensioactifs, le F_8TAC, le PCC-malt et le F_2H_9-malt forment, comme le DDM, des micelles globulaires dont la taille n'évolue pas en fonction de la concentration. Nous avons choisi de limiter cette première étude aux tensioactifs possédant des caractéristiques de taille et de forme de micelles identiques au DDM. Toutefois les difficultés de synthèse du F_2H_9-malt qui ont retardé son obtention, ne nous ont pas permis de l'inclure dans la suite du travail.

Nous nous sommes donc concentrés sur le F_8TAC, le PCC-malt et le DDM en focalisant notre attention sur l'étude des interactions faibles inter-micellaires, via le second coefficient du viriel (A_2) qui est un moyen potentiel d'estimer le potentiel d'un tensioactif à faciliter la cristallisation d'un complexe PDL. Nous avons ainsi pu montrer que les micelles de F_8TAC exercent entres elles des interactions répulsives malgré l'ajout de PEG, sans doute à cause de leur tête polaire polymérisée. La répulsion des micelles rimant avec l'augmentation de la solubilité des complexes PDL, ce résultat est une explication du fait que l'obtention de cristal de PM en présence de F_8TAC n'a jamais été décrite dans la littérature à ce jour. A l'inverse le PCC-malt et le DDM ont des micelles qui deviennent attractives en présence de PEG de façon similaire, mais avec une attraction légèrement supérieure pour le PCC-malt.

Ce résultat indique que l'effet de déplétion n'est pas seulement un phénomène de surface puisque la différence d'attraction entre le PCC-malt et le DDM provient de la variation de la partie hydrophobe du tensioactif et donc de la variation du cœur de la micelle. Dans notre cas, elle pourrait être la conséquence de la plus grande compacité de la micelle de PCC-malt dont la rigidité de sa chaîne hydrophobe et/ou l ?anomérie de sa partie polaire glycosidique semble(nt) imposer une meilleure organisation des molécules de tensioactifs entre elles. D'autre part l'attraction favorisant la cristallisation, cette étude du A_2 montre l'intérêt de ces deux tensioactifs pour la cristallisation des protéines membranaires et ouvre une nouvelle approche du design des futurs détergents. Leur structure serait déterminée en tenant compte de leur paramètre de "packing", de leur interaction avec la région transmembranaire des protéines mais aussi des phénomènes d'attraction et/ou répulsion qu'elles génèrent.

L'étape suivante de notre travail a consisté à chercher à connaître l'influence du DDM et du PCC-malt sur la nature et la quantité des tensioactifs et lipides qui constituent la bouée de solubilisation du complexe RC-LH1-pufX. Pour cela nous avons mis au point une méthode simple et rapide de dosage des tensioactifs par HPTLC qui permet de quantifier les tensioactifs liés à la protéine en sortie de colonne de purification [179]. Le choix de cette technique analytique a été fait pour permettre le dosage indépendant des

tensioactifs lors d'échange de détergents. Il a donc été important de porter une attention particulière à la détermination de la phase mobile pour permettre la séparation des tensioactifs de structures voisines. L'autre difficulté du développement de cette méthode a été d'adapter les conditions de dépôt du robot déposeur d'échantillon en fonction des spécificités des solutions aqueuses de tensioactifs.

Pour caractériser la composition du complexe PDL de RC-LH1-pufX de façon plus complète, nous avons, par ailleurs, identifié les trois lipides majoritaires constitutifs des membranes photosynthétiques de *Rb. blasticus* : PE, PG et MMPE. Ils sont eux aussi quantifiables par une méthode HPTLC après extraction des échantillons selon le protocole de Bligh and Dyer [180]. La caractérisation des complexes PDL du RC-LH1-pufX a montré qu'en présence de PCC-malt, il contient plus de molécules de tensioactifs et de lipides qu'en présence de DDM alors qu'il serait de taille légèrement plus petite. Ces résultats confirment l'aptitude du PCC-malt à former des assemblages compacts que ce soit dans une micelle ou autour d'une protéine membranaire. D'autre part ils renforcent l'idée qu'augmenter le volume de la chaîne hydrophobe d'un tensioactif permet de limiter la délipidation du complexe PDL.

Dans une dernière partie nous avons réalisé l'étude des diagrammes de phases du DDM et du PCC-malt ainsi que les morphodromes de cristaux de complexes RC-LH1-pufX, obtenus en présence de ces deux tensioactifs, pour faire le lien entre la détermination du A_2 des micelles de tensioactifs et les essais de cristallisation. Nos résultats corroborent bien la thèse de l'existence d'une corrélation forte entre le diagramme de phases du détergent, les interactions faibles entre micelles de détergent et la cristallisation des complexes PDL [67–69]. L'étude des interactions entre micelles apparaît donc bien comme un moyen d'accès à l'évolution du diagramme de phase des complexes PDL pour rationaliser la cristallisation des protéines membranaires. Grâce à elle, il a par exemple été possible de prévoir que les cristaux de RC-LH1-pufX seraient obtenus en PCC-malt dans des conditions similaires à ceux obtenus en présence de DDM mais à partir de plus faibles concentrations en PEG.

Ce travail a permis de mettre en place tous les outils nécessaires au contrôle des conditions de cristallisation des PM, aussi bien au niveau physico-chimique, par la caractérisation des micelles en solution, qu'au niveau biochimique, par le dosage des lipides et des tensioactifs liés par HPTLC. Il ouvre la voie à la réalisation de nombreuses études dans l'avenir.

La suite directe du travail décrit dans ce manuscrit serait d'utiliser, pour le F_2H_9-malt, la même approche de caractérisation des interactions faibles de ses micelles en solution et d'étudier son comportement sur le complexe RC-LH1-pufX après échange du DDM. Il serait alors possible d'estimer l'influence de sa chaîne faiblement fluorée sur la composition du complexe protéique et l'intérêt de ces micelles de petites tailles dans la cristallisation du

complexe RC-LH1-pufX. Un autre aspect que nous aurions aimé développer est l'intérêt de travailler avec moins de PEG pour la diffraction du cristal mais il requiert d'augmenter tout d'abord la qualité des cristaux de RC-LH1-pufX ou d'utiliser une autre protéine membranaire..

Pour les cristaux du RC-LH1-pufX, il faudrait, par rapport à nos essais, pouvoir diminuer la sursaturation afin d'éviter la formation de germes de nucléation en trop grande quantité. Cela devrait aussi permettre de ralentir la croissance des cristaux pour obtenir, peut être, une meilleure organisation du cristal. L'abaissement de la sursaturation (β=$\frac{C}{C_s}$) peut être réalisée en diminuant la concentration (C) en protéine mais il risque alors de ne plus y avoir assez de protéines pour former le cristal. Il semble donc plus logique d'essayer plutôt d'augmenter la solubilité du complexe PDL (C_s) en jouant sur la température, sur l'addition de sels et le pH (solubilité du domaine extramembranaire), sur la concentration en glycérol, ou autres petites molécules amphiphiles, ou sur la bouée de tensioactif [61]. L'utilisation de mélange de tensioactifs peut être une solution pour apporter à la fois la répulsion nécessaire à la solubilité des complexes PDL et l'attraction impliquée dans l'initiation de la cristallisation. Une autre piste pour abaisser la sursaturation serait de travailler dans la zone métastable (conditions avec la concentration la plus haute en PEG qui ne donne pas de cristaux) et de réaliser un ensemencement.

L'amélioration du cristal peut aussi venir de la variation de l'empilement cristallin. Pour cela il faudrait tester d'autres agents cristallisants car pour une même valeur de A_2, ne correspond pas forcément une configuration cristalline unique [156]. D'autres types de PEG ou sels permettraient peut être d'améliorer la diffraction des cristaux. Une autre solution serait de travailler sur la réduction de l'excès de tensioactif par l'utilisation par exemple des Bio-Beads ou sur l'influence des lipides sur la cristallisation et la qualité diffractante. Les conditions de purification que nous avons testé n'ont pas permis de varier grandement le nombre de lipides présents dans le complexe mais la réalisation d'une étape supplémentaire de purification par chromatographie d'exclusion stérique devrait accentuer la délipidation. A l'inverse il est aussi possible d'augmenter la quantité de lipides liés en réalisant du dopage d'échantillon par des lipides standards.

Pour améliorer la compréhension des paramètres contrôlant la cristallisation, il faudrait aussi étudier les complexes PDL de façon similaire à ce que nous avons réalisé sur les micelles. En effet, l'analyse par SAXS des complexes semble désormais accessible avec la nouvelle ligne bio-SAXS BM29 de l'ESRF (ancienne ligne ID14eh3) depuis qu'ils ont installé un système de chromatographie d'exclusion stérique, couplé à une détection UV et un réfractomètre en amont de la cellule échantillon. Ce système permet de séparer les micelles libres de la fraction protéique et ainsi de s'affranchir de leur contribution dans le tampon à retrancher au signal. L'information de la forme globale du complexe PDL (protéine + bouée) peut ainsi être déterminée. En travaillant avec une protéine de structure résolue, il devient possible de remonter à la forme et aux dimensions de la bouée uniquement. Pour les protéines de structure inconnue, l'obtention de la forme de la bouée pourrait se faire en couplant les techniques de SAXS et de diffusion des neutrons aux petits

angles (SANS). En masquant la bouée (utilisation d'un tensioactif deutéré) on pourrait obtenir la forme de la protéine que l'on peut réinjecter dans les résultats de SAXS pour déterminer la forme de la bouée. L'étude des interactions entre complexes PDL devient elle aussi possible, au moins en théorie, car cette étude requiert de travailler avec des concentrations variables et relativement élevées en complexes PDL et il faudrait vérifier que cela est possible malgré les phénomènes de dilution sur colonne. Mais elle serait un moyen de franchir un cap supplémentaire dans la compréhension des mécanismes de la cristallisation en permettant la comparaison des A_2 de micelles de détergent avec ceux de complexes PDL.

Une dernière piste de réflexion que nous proposons ici serait d'étudier d'autres tensioactifs, selon la même approche, pour accumuler les renseignements sur l'apport en terme d'interaction, de multiples motifs structuraux des tensioactifs. Par exemple, pour commencer à élargir la réflexion aux parties hydrophiles, il peut être intéressant d'étudier le F6DiGlu qui est un tensioactif possédant une chaîne fluorée et une tête composée de deux motifs glucose fixés en parallèle, contrairement aux maltosides où les deux motifs glucose sont alignés. Il est aussi envisageable de s'intéresser aux tensioactifs qui forment des micelles non sphériques. Nous avons rejeté le F_6H_2-malt qui forme des micelles cylindriques bien définies qui s'allongent en fonction de la concentration et le F_4H_5-malt aux micelles allongées de forme variable mais qui forme pourtant avec la BR un complexe homogène d'un point de vue colloïdal. Nous estimions qu'ils sortaient du cadre de notre étude où nous voulions établir une comparaison des tensioactifs avec le DDM qui forme des micelles globulaires. Mais il n'est pas interdit de penser qu'une micelle cylindrique, même si elle s'allonge, soit compatible avec la cristallisation. Est-il possible alors de former des assemblages avec plusieurs protéines membranaires dans une même bouée allongée, pour pourquoi pas, aller vers une cristallisation 2D ? Enfin parmi les tensioactifs qu'il serait aussi intéressant d'étudier par cette approche via les A_2 se trouvent les NAPols. Ces polymères amphiphiles non ioniques sont capables de maintenir en solution les protéines membranaires en l'absence de polymères libres en solution. Permettent-il d'obtenir de l'attraction en solution pour envisager de cristalliser des protéines membranaires ? Et dans ce cas seraient-ils un moyen de simplifier le diagramme de phase la cristallisation des protéines membranaires en s'affranchissant du diagramme de phases du tensioactif ?

Partie expérimentale

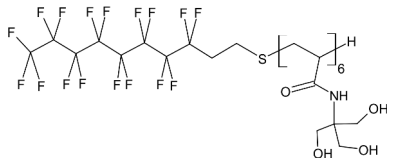
1 Partie synthèse

Procédures générales

- Les solvants utilisés pour les synthèses sont préalablement distillés sous atmosphère d'argon sur Na/benzophénone (THF), sur du sodium (MeOH, EtOH) ou sur de l'hydrure de calcium CaH_2 (AcOEt, CH_2Cl_2, CH_3CN, cyclohexane).
- Les réactions ont été suivies par chromatographie sur couche mince Merck $60F_{254}$. Les plaques de gel de silice ont été révélées par la lumière UV à 254 nm, et parfois à 366 nm. La révélation peut être complétée par un spray d'une solution éthanolique d'H_2SO_4 à 5%, de $KMNO_4$ à 0,05%, ou de ninhydrine à 5% suivi d'un chauffage à 150°C.
- Les chromatographies sur colonne de gel de silice ont été effectuées avec de la silice Merck silica gel Geduran Si 60 (40 - 63 μm).
- Les spectres RMN ont été enregistrés sur un appareil BRUCKER AC-250. Les acquisitions des spectres ^1H, ^{13}C et ^{19}F se sont réalisées respectivement à 250, 62,8 et 235 MHz. Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au signal du triméthylsilane (TMS), référence interne dans les solvants deutérés ($CDCl_3$ ou DMSO). Les abréviations suivantes ont été utilisées afin de caractériser les signaux observés : s (singulet), d (doublet), q (quadruplet), td (triplet dédoublé), m (multiplet).
- tous les composés finaux sont lyophilisés avant les études physico-chimiques et biochimique, pour éliminer toutes traces de solvant résiduel.

Synthèse et RMN des composés

Synthèse du composé 8 : F8TAC



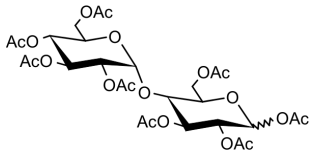
10 g de THAM **7** sont solubilisés sous atmosphère d'argon dans 290 ml de méthanol distillé. Le milieu est chauffé par un bain d'huile à ébullition jusqu'à dissolution complète du THAM (ne pas utiliser de bain de sable qui crée des points chaud où la télomérisation n'est plus contrôlée et aboutie à de gros DPn). 5,49 g de perfluorooctanethiol **6**, solubilisés dans 10 ml de tétrahydrofurane/méthanol (8/2 : v/v) distillés, sont ajoutés au milieu, ainsi que 0,251 g d'AIBN recristallisé. Le milieu devient blanc dès l'ajout d'AIBN. La réaction est laissée au reflux pendant une nuit puis refroidie à TA. La fraction soluble est récupérée et concentrée jusqu'à ce qu'il ne reste que 20-30 ml de milieu, qui sont alors ajoutés goutte à goutte dans 200 ml d'éther diéthylique froid, sous vive agitation. Le milieu est filtré, puis le précipité est séché sous pression réduite, pour obtenir 6,49 g de F_8TAC DPn 6 sous forme de poudre blanche. La purification du produit se fait par resolubilisation à 50°C dans le méthanol et reprécipitation dans 300 ml d'éther diéthylique froid. 5,89 g de F8TAC DPn 6 sont ainsi obtenus, sous forme de poudre blanche. La lyophilisation se fait à une concentration de 10 mM, ce qui correspond à l'ajout de 385 ml d'eau pour 5,89 g de produit pur.

MM : 1530 g.mol^{-1}, DPn 6

^{1}H-NMR: δ (ppm, 250 MHz, DMSO) : 7,0-7,5 (massif, 6H, NH), 4,8-5,2 (massif, 18H, OH) 3,7 (m, protons de la tête poly Tris) ; 2,7 (m, 3H, dont SH_2) ; 1,2-2,5 (protons chaîne polymérique)

^{19}F NMR δ (ppm, DMSO) : -122 à -127 (6 CF2, chaîne fluorée) ; -115 (t, CF2, CF_2-$\mathit{CF_2}$-CH_2)) ; -82 (t, 3F, CF3).

Synthèse du composé 10 : maltose peracétylé

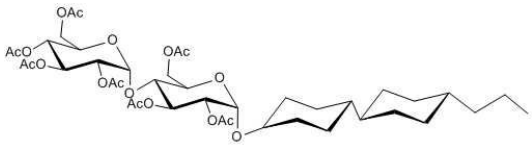


40 g de maltose monohydraté **9** sont dissouts à 0°C dans 470 ml d'un mélange anhydride acétique/Pyridine (1/1 : v/v). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24h. La pyridine est neutralisée par ajout de 250 ml d'HCl 3N, et le maltose peracétylé est extrait à l'acétate d'éthyle (3 fois 300 ml). Les phases organiques sont regroupées, et lavées à l'HCl 1N, jusqu'à obtention d'un pH 2. Le milieu est ensuite ramené à pH neutre par lavage par une solution saturée de $NaHCO_3$, et est séché sur Na_2SO_4, filtré et concentré pour donner un produit brut sous forme de poudre blanche. Le produit brut est purifié par deux recristallisations successives dans 200 ml d'EtOH, pour obtenir du maltose peracétylé **10** à 97% α. Rendement : 39%

$C_{28}H_{38}O_{19}$, MM : 678,6 g.mol^{-1}

^{1}H-NMR: δ (ppm, 250 MHz, $CDCl_3$) : δ 1,9-2,25 (m, 22H, protons acétyls) ; 3,55-4,2 (m, 4H, *CH2*-OAc) ; 4,2-4,3 (m, 2H) ; 4,4-4,55 (d, 1H$_1$) ; 4,7-5,2 (m, 3H) ; 5,25-5,5 (m, 3H) ; 5,25 (d ,1H$_{1'}$)

Synthèse du composé 12 : PCC-α-malt protégé



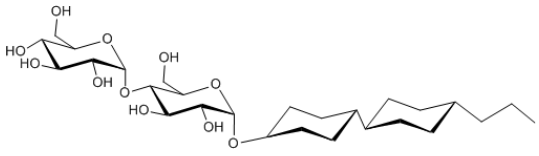
L'alcool trans-4-(trans-4'-propyl)bicyclohexanol **11** a été fourni par Quingdao Hong Jin Trading Co. Ltd (china). 1 g d'alcool (1eq) **11** et 4,5 g (1,5 éq) de maltose peracétylé **10** sont solubilisés dans 30 ml de CH_2Cl_2 fraichement distillé. 0,84 mL (1,5 éq) de BF_3-Et_2O sont ajoutés goutte à goutte sous argon et à 0°C. Le milieu est agité une dizaine de jours, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le milieu est ensuite rallongé par du CH_2Cl_2, jusqu'à 100 ml, lavé par une solution de $NaHCO_3$ saturée, puis à l'eau. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée, et concentrée pour donner 4.7 g de produit brut, qui est purifié par chromatographie flash sur gel de silice avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (7/3 : v/v) pour donner 1,4 g de PCC maltoside **12** (1,69 mmol ; 38%) sous la forme de poudre blanche contenant un mélange α/β de 89/11 pour 12 jours de réaction, et 81/18 pour 7 jours de réaction. L'enrichissement en α se fait par recristallisation successives dans l'éthanol, jusqu'à obtenir un composé pur en α. Le nombre de recristallisations nécessaires dépendant du ratio α/β initial, chacune ayant un rendement de 75-85%. Le rendement global de la manipulation est de 10-25% pour obtenir le composé 99% α.

$C_{41}H_{62}O_{18}$, MM : 842,92 g.mol^{-1}

^{1}H-NMR: δ (ppm, 250 MHz, $CDCl_3$) : 5,52-5,48 (dd, H$_{3'}$, J$_{H3'-H4'}$= 9Hz, J$_{H3'-H2'}$= 9Hz, 1H) ; **5,43-5,42 (d, H$_1$, J$_{H1-H2}$= 3,9Hz, 1H)** ; 5,44-5,34 (dd, H$_3$, J$_{H3-H4}$= 9Hz, J$_{H3-H2}$= 9Hz, 1H) ; 5,14 (d, H$'_1$, J$_{H1'-H2'}$= 3,8Hz, 1H) ; 5,13-5,05 (dd, H$_4$, J$_{H4-H5}$= 9,7Hz, J$_{H4-H3}$= 9Hz, 1H) ; 4,92-4,86 (dd, H$_2$, J$_{H2-H3}$= 9Hz, J$_{H2-H1}$= 3,9Hz, 1H) ; 4,70-4,61 (dd, H$_{2'}$, J$_{H2'-H3'}$= 9Hz, J$_{H2'-H1'}$= 3,9Hz, 1H) ; 4,50-4,44 (dd, H$_{6'a}$, J$_{H6'a-H6'b}$= 12Hz, J$_{H6'a-H5'}$= 2,3Hz, 1H) ; 4,31-3,9 (m, H$_{6'b}$, H$_{5'}$, 2H$_6$, H$_{4'}$,H$_5$, 6H) ; 3,43 (m, CHO cyclohexyl, 1H), 2,15-0.81 (m, groupes acétyle, cyclohexyle, et chaîne propyle, 47H).

^{13}C-NMR: δ (ppm, 162 MHz, $CDCl_3$) : 170,7-169,5 (CO acetyl) ; 95,6 C_1 ; 94,0 $C_{1'}$; 78,3 (CHO cyclohexyl), 73,9 ; 72,7 ($C_{3'}$; $C_{4'}$) ; 71.2 $C_{2'}$; 70,0 ; 69,4 ; 68,4 ; 68,0 ; 67,4 (C_2 ; C_3 ; C_4 ; C_5 ; $C_{5'}$), 62,8 ; 61,4 (C_6 ; $C_{6'}$) ; 42,7 ; 42,2 ; 37,5 (CH cyclohexyl), 39,76 ; 33,4 ; 31,8 ; 30,1 ; 28,2 ; 27,9 ; 20,02 (CH_2 groupement cyclohexyle et chaîne propyle) ; 21,01 ; 20,8 ; 20,7 ; 20,67 ; 20,62 ; 20,60 (CH_3 acétyles) ; 14,2 (CH_3 chaîne propyle).

Synthèse du composé 13 : PCC-α-malt



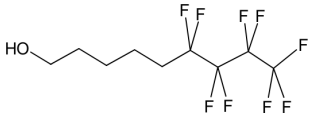
0.97 g de PCC-α-maltoside protégé **12** sont solubilisés dans 40 ml de MeOH distillé et sont agités en présence d'une quantité catalytique de CH_3ONa pendant environ 2h, jusqu'à obtenir un pH basique (pH10). Le milieu est ensuite ramené à pH légèrement acide (pH5), par ajout de résine IRC-50, et agitation pendant 1h. Le milieu est ensuite filtré, et concentré pour obtenir 0.667 g de produit final, le PCC-*alpha*-malt **13** sous forme de poudre blanche, qui est solubilisé dans 122 ml d'eau (10mM) pour être lyophilisé avant utilisation.

$C_{27}H_{48}O_{11}$, MM : 548,66 g.mol^{-1}

^{1}H-NMR: δ (ppm, 250 MHz, DMSO) : 5,45 (d, OH, 1H) ; 5,35 (d, OH, 1H) **4,99 (d, H_1, J_{H1-H2}= 3,7Hz, 1H)** ; 4,90 (m, OH, 2H) ; 4,66 (d, H'_1, $J_{H1'-H2'}$= 3,7Hz, 1H) ; 4,52 (d, OH, 1H) ; 4,52 (t, OH, 1H) ; 4,44 (t, OH, 1H) ; 3,63-3,17 (m, H du sucre, 12H) ; 3,08 (m, $H_{6'b}$, $H_{5'}$, $2H_6$, $H_{4'}$,H_5, 6H) ; 3,43 (m, CHO CHO cyclohexan, 1H), 1,99-0.81 (m, groupe cyclohexyle, et chaîne propyle, 26H).

^{13}C-NMR: δ (ppm, 162 MHz, $CDCl_3$) : 101,3 C_1 ; 97,3 $C_{1'}$; 80,7 (CHO cyclohexyl), 76,6 ; 73,9 ; 73,8 ; 73,4 ; 73,0 ; 71,8 ; 71,5 ; 70,3 (C_5 ; $C_{5'}$; C_4 ; $C_{4'}$; C_3 ; $C_{3'}$; C_2 ; $C_{2'}$), 61,2 ; 60,8 (C_6 ; $C_{6'}$) ; 42,8-14,8 (groupement cyclohexyle et chaîne propyle).

Synthèse du composé 16 : bras hydrophobe du F_4H_5-malt



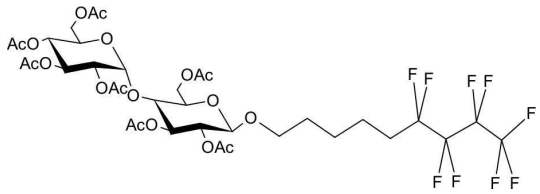
Dans un ballon 1,02 g (11 mmol) de 4-penten-1-ol **14** (sigma) et 5,29 g (15 mmol) de l'iodure fluoré (perfluorubutyl iodid, 98%, sigma) **15** sont dissous dans 10 ml de CH_2Cl_2. Sous atmosphère inerte 4 g de zinc activé sont ajoutés à la solution, le milieu réactionnel est agité. Le produit d'addition (l'iodure) est visible en UV sur plaque CCM. La disparition de la fonction vinyle (en RMN) sert de témoin de la réaction complète d'addition. La réduction de l'iodure est effectuée par 50 mL d'un mélange d'acide (eau/acide acétique/HCl (12N), 30/15/5 ; v/v/v). L'acidification du milieu entraine la dissolution complète du zinc et sa transformation en sel. La réaction est suivi en CCM (observation de la disparition de la tâche en UV correspondant à l'iodure). Le milieu réactionnel est filtré (élimination des traces de zinc), lavé 3 fois avec 25 mL $NaCO_3$ jusqu'à pH 5, 2 fois avec 25 mL d'eau, séché sur $NaSO_4$, filtré et évaporé. Le produit brut est purifié par chromatographie flash (gradient de cyclohexane/acétate d'éthyl). 2,2 g (7,7 mmol) de produit pur sont obtenus sous forme d'huile, soit un rendement global de 70%.

$C_9H_{11}OF_9$, MM : 306,17 g.mol^{-1}

^{1}H-NMR: δ (ppm, 250 MHz, $CDCl_3$) :1,4-1,8 (m, CF_2-CH_2-CH_2-CH_2-, 6H) ; 1,8-2,7 (m, 2H, CH_2-CH_2-OH, 2H) ; 3,5-3.9 (m, OH, 1H).

^{19}F NMR δ (ppm, $CDCl_3$) : -127 (t, 2F, CF_2-CF_2-*CF_2*-CF_3) ; -124 (t, 2F, CF_2-*CF_2*-CF_2-CF_3) ; -115 (t, 2F, CH_2-*CF_2*-CF_2-CF_2-CF_3)) ; -80 (s, 3F, -CF3)

Synthèse du composé 17 : Glycosylation du F_4H_5-malt



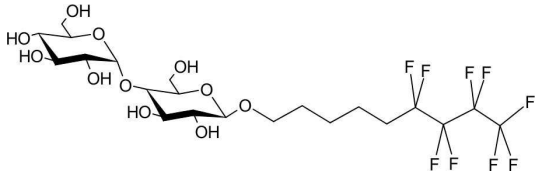
3,43 g de maltose acétylé **10** (5 mmol) sont solubilisés dans 10 ml de CH_2Cl_2 distillé, puis 1,55 g de l'alcool fluoré **16** (5mmol) sont ajoutés à la solution. Le milieu est agité 10 min, puis refroidi dans un bain de glace avant l'ajout progressif à la seringue sous atmosphère d'argon de 0,8 mL de BF_3-OEt_2 (sigma). La solution se teinte légèrement en rose, le milieu réactionnel est alors laissé à température ambiante sous agitation pendant 48 heures, toujours sous atmosphère inerte et à l'abri de la lumière. 1 ml d'anhydride acétique est ajouté à la solution foncée obtenue afin d'acétyler les fonctions alcool qui auraient subies des réactions de transesterification. La réaction est suivie par CCM. Après 1h30 d'agitation, le brut réactionnel est lavé par 15 ml de solution saturée en $NaHCO_3$. La phase aqueuse est extraite avec 2 fois 20 ml de CH_2Cl_2. Les phases organiques sont regroupées, séchées avec Na_2SO_4 et évaporées. Le produit brut (huile brune) est purifiée sur colonne de silice dans un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (1/1 ; v/v). 1,5g de produit pur **17** (1,6 mmol) sont obtenus sous forme de poudre blanche (rdt = 32%).

$C_{35}H_{44}O_{11}F_9$, MM : 924,71 g.mol^{-1}

^{1}H-NMR: δ (ppm, 250 MHz, $CDCl_3$) : 1,3-1,65 (m, 8H, CH2-CH2-CH2-) ; 1,9-2,1 (m, 21H, groupements acétyles) ; 3,4-3,9(m, 1H, O-CH_2) ; 3,65 (m, 1H, H_5) ; 3,8 (m, 1H, O-CH_2) ; 3,9-4,1 (m ,3H, $H_{4'}$, $H_{5'}$, H_{6a}) ; 4,15-4,35 (m, 2H, H_{6b}, $H_{6'a}$) ; 4,45(d, 1H, $H_{6'b}$) ; *4,5-4,55 (m, 1H, H_1)* ; 4,75-4,95 (m, 2H, H_2, $H_{2'}$) ; 5-5,15 (d, 1H, H_4) ; 5,2-5,4(m, 2H, $H_{1'}$, H_3) ; 5,45(d, 1H, $H_{3'}$).

^{19}F NMR δ (ppm, $CDCl_3$) : -126 (t, 2F, CH_2-CF_2-CF_2-*CF_2*-CF_3) ; -124,5 (t, 2F, CF_2-*CF_2*-CF_2-CF_3)) ; -115 (t, CF2, CH_2-*CF_2*-CF_2-CF_2-CF_3)) ; -81 (t, 3F, CF3).

Synthèse du composé 18 : F_4H_5-β-malt



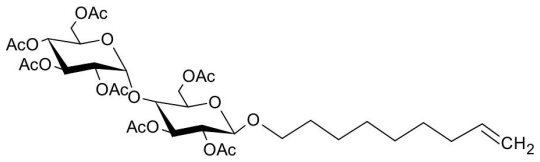
500 mg (0,54 mmol) de F_4H_5-β-malt protégé **17** sont solubilisés dans 15 ml de MeOH et une pointe de spatule de méthylate de sodium MeONa est ajouté à la solution. La réaction est laissée sous agitation pendant 3 heures à température ambiante (suivi CCM). Le milieu est ensuite ramené à pH acide (pH5), par ajout de résine IRC-50, et agitation pendant 1h. Le milieu est ensuite filtré, et évaporé. 380 mg de poudre blanche sont purifiés par chromatographie flash sur colonne de silice avec un mélange MeOH/CH_2Cl_2. 310 mg (0,5 mmol) de produit pur **18** (poudre blanche) sont obtenus.

$C_{21}H_{31}O_{11}F_9$, MM : 630,45 g.mol^{-1}

^{1}H-NMR: δ (ppm, 250 MHz, MeOD) : 1,9-2,2 (m, 9H, O-*(CH_2)$_4$*-CH2-CF2-) ; 1,5-1,75 (m, 2H, *CH2*-CF2-) ; 3-4 (m, 17H, H du sucre) ; 4,25 (d, 1H, H_1) ; 5,25 (d, 1H, $H_{1'}$).

^{19}F NMR δ (ppm, MeOD) : -126 (t, 2F, CH_2-CF_2-CF_2-*CF_2*-CF_3) ; -124,5 (t, 2F, CF_2-*CF_2*-CF_2-CF_3)) ; -115 (t, CF2, CH_2-*CF_2*-CF_2-CF_2-CF_3)) ; -81 (t, 3F, CF3).

Synthèse du composé 23 : Maltose peracétylé à chaîne vinylique

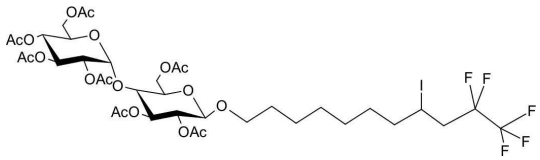


Dans un ballon, 5 g de maltose acétylé **10** (7,3 mmol) sont solubilisés dans 6 mL de dichlorométhane, avant l'ajout de 3,49 g (11,3 mmol) de nonenol (sigma) **22**. La milieu est refroidi dans un bain de glace et placé sous atmosphère inerte avant l'ajout progressif de BF_3-OEt_2. Le milieu réactionnel devient rose et la solution est agitée pendant 48 heures à température ambiante à l'abri de la lumière. La réaction est suivie par CCM qui montre la déprotection de certaines fonctions acétyles. Pour acétyler entièrement le composé, 6 ml d'anhydride acétique sont ajoutés, à froid, à la fin de la réaction. Le milieu est agité ainsi pendant 2 heures. Le brut réactionnel est évaporé, le liquide orange obtenu est lavé par une solution d'HCl 1 N à froid jusqu'à obtenir un pH acide (lavage par environ 100 mL). Le milieu est extrait avec de l'acétate d'éthyle, puis lavé avec un solution saturée de $NaHCO_3$ jusqu'à neutralité du pH. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée et évaporée. Le produit brut est purifié sur colonne de gel de silice (acétate d'éthyle /cyclohexane 6/4). 2,07 g (2.5 mmol) du produit glycosylé **23** (poudre blanche) est obtenu (rdt =34,2%).

$C_{35}H_{52}O_{18}$, MM : 760,78g.mol^{-1}

^{1}H-NMR: δ (ppm, 250 MHz, MeOD) : 1,2-1,7 (m, 12H, chaine aliphatique) ; 1.9-2,2 (m, 21H, protons acétyls) ; 3,45 (m, 1H, OCH_2) ; 3,7 (m, 1H, H_5) ; 3,8 (m, 1H, OCH_2) ; 3,9-4,2 (m, 4H) ; 4,25 (m, 2H) ; 4,5 (m, 2H, dont H_1, J=7,5 Hz) ; 4,75-4,9 (m, 2 H) ; 5,0-5,1 (m, 1H), 5,2-5,3 (m, 1H) ; 5,3-5,45 (m, 2H, dont H_1') ; 5,58 (m, 3H, fonction vinyl).

Synthèse du composé 25 : F_2H_9-malt protégé à chaîne iodée



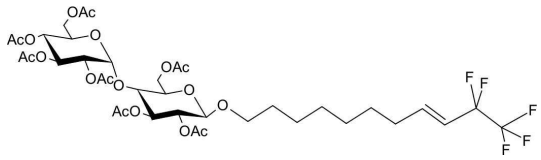
1,9 g de composé glycosylé **23** (2,5mmol) est solubilisé dans un minimum de THF dans un tube hermétique puis 2,6 mL de pentafluoroiodoethane **24** (sigma) sont progressivement ajoutés à froid. La solution est agitée toujours à froid sous atmosphère inerte pendant 5 min avant l'addition de 1 mL de triéthyle borane (1 ml ; 1 mmol). La solution se teinte alors en jaune foncé. Le milieu réactionnel est ramené à température ambiante et laissé sous agitation pendant 48h. L'avancement de la réaction est suivi par RMN du proton avec la disparition du signal de l'oléfine à 5,58 ppm et l'apparition du signal du CHI à 2,75 ppm. Le brut est lavé 2 fois à l'eau, extrait 3 fois par de l'acétate d'éthyle, séché et évaporé. Enfin il est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (acétate d'éthyle/cyclohexane 1/1). 2 g de produit **25** pur sont obtenus. (rdt=93%)

$C_{37}H_{52}O_{18}F_5I$, MM : 1008.69 g.mol^{-1}

^{1}H-NMR: δ (ppm, 250 MHz, $CDCl_3$) : 1,2-1,9 (m, 16H, 8CH_2- de la chaîne) ; 1,9-2,1 (m, 21H, protons acétyléniques) ; 3,45 (m, 1H, OCH_2) ; 3,7 (m, 1H, H_5) ; 2,75 (m, 1H, -CHI) ; 3,8-4,25 (m, 7H, dont OCH_2) ; 4,5 (m, 2H, dont H_1, J=7,5 Hz) ; 4,75-4,95 (m, 2 H) ; 5,0-5,15 (m, 1H), 5,2-5,5 (m, 3H, dont H_1').

^{19}F NMR δ (ppm, $CDCl_3$) : -118.5 (t, 2F, -CF_2-CF_3) ; - 85,5 (s, 3F, CF_2-CF_3).

Synthèse du composé 26 : F_2H9-malt protégé à chaîne insaturée



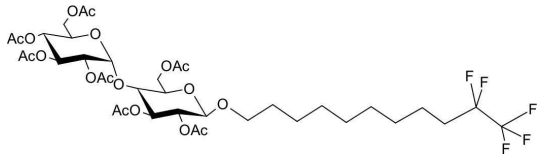
2 g du dérivé iodé **25** (2 mmol) sont solubilisés dans 11 mL de toluène puis 0,4g de DBU sont ajoutés au mélange. La solution est portée à 70 °C pendant 16 heures. La réaction est suivie par RMN avec la disparition du signal CHI à 2,75 ppm et l'apparition du signal de l'oléfine à 5,5 et 6,4 ppm. Le brut réactionnel est lavé, séché et évaporé, puis purifié par chromatographie flash avec un gradient d'acétate d'éthyle/cyclohexane. 1,93 g (2mmol) d'oléfine **26** sont obtenus. Rendement quantitatif.

$C_{37}H_{51}O_{18}F_5$, MM : 878,78 g.mol^{-1}

^{1}H-NMR: δ (ppm, 250 MHz, $CDCl_3$) : 1,2-1,9 (m, 16H, 8CH_2- de la chaîne) ; 1,9-2,1 (m, 21H, protons acétyls) ; 3,45 (m, 1H, OCH_2) ; 3,7 (m, 1H, H_5) ; 3,85 (m, 1H, OCH_2) ; 3,9-4,3 (m, 6H) ; 4,5 (m, 2H, dont H_1, J=7,5 Hz) ; 4,75-4,9 (m, 2 H) ; 5,0-5,1 (m, 1H), 5,2-5,3 (m, 1H), 5,3-5,5 (m, 2H, dont H_1') ; 5,5-5,65 (m, 1H, -CH oléfine) ; 6,35-6,45 (m, 1H, -CH oléfine).

^{19}F NMR δ (ppm, $CDCl_3$) : -115,0 (t, 2F, -CF_2-CF_3) ; - 85,5 (s, 3F, CF_2-CF_3).

Synthèse du composé 27 : F_2H9-malt protégé



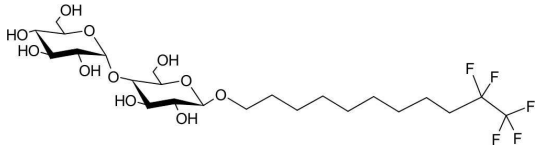
Dans un réacteur d'hydrogénation, 1 g de l'oléfine **26** est solubilisée dans 20 ml de MeOH, en présence d'une spatule de palladium sur charbon. Le réacteur est mis sous 7 bars de pression pendant 48 heures à température ambiante. La solution est filtrée sur célite. Le filtrat est évaporé, et le produit brut est purifié sur colonne de gel de silice cyclohexane/acétate d'éthyle (7/3) et recristallisé dans le méthanol à chaud. Le produit **27** pur est obtenu avec un rendement quantitatif. Il est alors recristallisé dans le méthanol à chaud pour éliminer les traces de stéréoisomère α.

$C_{37}H_{53}O_{18}F_5$, MM : 880.80 g.mol^{-1}

^{1}H-NMR: δ (ppm, 250 MHz, $CDCl_3$) : 1,2-1,9 (m, 16H, 8CH_2- de la chaîne) ; 1,9-2,1 (m, 21H, protons acétyléniques) ; 3,45 (m, 1H, OCH_2) ; 3,7 (m, 1H, H_5) ; 3,8 (m, 1H, OCH_2) ; 3,9-4,3 (m, 6H) ; 4,5 (m, 2H, dont H_1, J=7,5 Hz) ; 4,75-4,9 (m, 2H) ; 5,0-5,1 (m, 1H), 5,2-5,3 (m, 1H), 5,3-5,5 (m, 2H, dont H_1').

^{19}F NMR δ (ppm, $CDCl_3$) : -115,0 (t, 2F, -CF_2-CF_3) ; - 85,5 (s, 3F, CF_2-CF_3).

Synthèse du composé 28 : F_2H_9-β-malt



500 mg (0,56 mmol) de F_2H_9-β-malt protégé **27** sont solubilisés dans 15 mL de MeOH en présence d'une pointe de spatule de méthylate de sodium MeONa. La réaction est laissée sous agitation pendant 3 heures à température ambiante (suivi CCM). Le milieu est ensuite ramené à pH acide (pH 5), par ajout

de résine IRC-50, et agitation pendant 1h. Le milieu est ensuite filtré, et évaporé. 380 mg de poudre blanche sont purifiés par chromatographie flash sur colonne de silice avec un mélange MeOH/CH_2Cl_2. 300 mg de produit **28** pur (poudre blanche) sont obtenus. Rdt=78%.

$C_{23}H_{39}O_{11}F_5$, MM : 586,54 g.mol^{-1}

^{1}H-NMR: δ (ppm, 250 MHz, MeOD) : 1,2-1,8 (m, 14H, 7CH_2- de la chaîne) ; 2,0-2,2 (m, 2H, CH_2-CF_2), 3,2-4,0 (m, 17H), 4,25 (d, 1H, H_1, J=7,5Hz), 5,1 (d, 1H, $H_{1'}$).

^{19}F NMR δ (ppm, MeOD) : -119,5 (t, 2F, -CF_2-CF_3) ; - 87 (s, 3F, CF_2-CF_3).

2 Partie physico-chimie

Mesures de CMC

Une solution de tensioactif dans de l'eau milli-Q, à environ exactement 5 ou 10 fois la CMC attendue, est préparée dans une fiole jaugée de 25 ml, mais le trait de jauge n'est ajusté qu'après avoir laissée la solution à 20°C pendant 24 heures (élimination de la mousse). 20 mL de la solution obtenue sont placée dans la cuve du tensiomètre, et les 5 mL restant servent à rincer la tuyauterie et le flacon collecteur du tensiomètre. La plaque de Wilhemy est chauffée à blanc, et installée au dessus de la cuve, lorsqu'elle est revenue à température ambiante. La mesure par le logiciel Krüss est alors lancée. Les mesures sont lancées sur 4 à 6 heures avec la réalisation d'une centaine de point.

Analyses de DLS

Une solution mère de tensioactif est préparée à 30 mg/mL dans de l'eau milli Q puis filtrée sur filtre Millipore de 0,2 μm de porosité dans un eppendorf. Une série de solutions de 200 μL est préparée dans des eppendorf par dilution de la solution mère par de l'eau milli Q préalablement filtrée. Toutes les solutions sont alors centrifugées à 15000 tours/min pendant 1h (température ambiante). Les mesures de DLS se font dans une cuve quartz microvolume (50 μL) préalablement lavée à l'eau milli Q filtrée, et séchée par un système d'aspiration. Les mesures sont réalisées à température ambiante après avoir laissé le système s'équilibrer 2 min dans la cuve. Chaque mesure est constituée de 10 analyses de 30 secondes chacune.

Mesure de densité et du volume partiel spécifique

Le volume partiel spécifique v_p (cm^3.g^{-1}) a été calculé à partir de mesures de la densité de solutions de tensioactif de 0,1 à 10 mg/mL dans de l'eau milli Q, sur un densitomètre Anton Paar DMA4500M. Ces solutions sont préparées par dilution à partir d'une solution mère à 10 mg/mL et centrifugée à 15000 tours/min pendant 30 minutes à température ambiante avant analyse.

Mesure de l'incrément d'indice de réfraction

L'incrément d'indice de réfraction $\frac{\partial n}{\partial c}$ (mL.g^{-1}) a été déterminé par mesure de l'indice de réfraction, avec un réfractomètre Optilab T-rEX^{TM} de Wyatt Technology, de solutions de tensioactif de 0,1 à 5 mg/mL, et analysé avec le logiciel ASTRA V (Wyatt Technology).

Analyses par SEC-MALLS

La détermination de la masse absolue de micelles de tensioactifs par analyse SEC-MALS a été réalisée sur une colonne BioSep^{TM} 5 μm SEC-s2000 (Phenomenex) couplée à un réfractomètre Optilab T-rEX^{TM}, et le détecteur miniDawn^{TM} TREOS Multi Angle Laser Light Scattering (MALLS) (Wyat Technology). Pour chaque tensioactif, la colonne a été équilibrée par un flux de 0,4 mL/min avec une solution de tensioactif dans l'eau à 2 fois la CMC. Des solutions à différentes concentrations en tensioactif ont alors été injectées.

Détermination des diagrammes de phases

Les diagrammes de phase du DDM et du PCC-malt, ont été déterminés en réalisant des gouttes de 10 μL, composées de 6,5 à 10 % de PEG 3350, et de 5 à 55 mg/mL de tensioactif dans l'eau milli Q. Ces microgouttes préparées dans des plaques de cristallisation microbatch sont alors observées par microscope optique pour détecter une transition de phase. Les concentrations en PEG, et en DDM ont

été augmentées par pas de 1 mg/mL. Les photos des transitions de phases ont été réalisées sur le Carl Zeiss SteREO Discovery V12 microscope.

Analyses par SAXS
Les données de diffusion des rayons X ont été collectées sur la ligne ID14-eh3 bioSAXS de l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble-France). Les profils de diffusion ont été mesurés à 20°C pour des solution en tensioactif de 0,25 à 40 mg/mL dans l'eau ou dans du Tris/HCl 20mM pH 8 ou 10, avec des pourcentages de PEG 3350 de 0, 2, 4 ou 6%. Les solutions ont été préparées par dilution en cascade à partir d'une solution stock à 100 ou 80 mg/mL de tensioactifs. Le domaine des q sondé était de 0,05 à 4 nm^{-1}, pour une distance échantillon/détecteur de 2,425m et une longueur d'onde de rayons X de λ=0,0931 nm. La ligne était équipée d'un détecteur 2D (Pilatus 1M), et d'un passeur automatique d'échantillons. Pour éviter la dégradation de l'échantillon par les radiations, 30μL sont prélevés et passés en flux, pendant l'acquisition des 10 mesures de 10 secondes par donnée. Les mesures individuelles sont ensuite moyennées et normalisées par rapport à l'intensité du rayon incident, corrigée en fonction de la réponse du détecteur. La courbe de diffusion d'un tensioactif est obtenue par soustraction de la courbe de diffusion du tampon à la courbe brute et normalisation par la concentration. Le traitement des données a été réalisé par des procédures standards du logiciel PRIMUS [194].

3 Partie biochimie

Préparation des membranes photosynthétiques
Les bactéries de *Rhodobacter blasticus* sont cultivées à 30°C en anaérobiose/lumière (75 W/m^2 d'intensité lumineuse) en milieu liquide "hutner", préalablement dégazé et en présence de vitamine B12. La récolte des membranes est effectuée au début de la phase stationnaire de croissance de la bactérie (4 à 6 jours après avoir repiquer la souche). Le milieu est centrifugé 20 minutes à 5000g à 4°C pour récupérer les cellules dans le culot. Celui-ci est remis en suspension dans du tampon Tris-HCl 20mM pH 8, pour rincer les cellules. Celles-ci sont alors de nouveau culotées (20 minutes à 5000g, 4°C), et remises en suspension dans du tampon Tris-HCl 20mM pH 8 auquel est ajouté 1mM de DNAase I, et d'anti-protéase (AEBSF) ainsi que du $MgCl_2$. Les cellules bactériennes sont alors cassées par double passage à la presse de French, sous une pression de 10^7 Pa. Les débris cellulaires et le restant de cellules entières sont éliminés par centrifugation (1h, 20000g, 4°C) dans le culot. Le surnageant contenant les membranes photosynthétique est ultracentrifugé (1h, 45000rpm, 4°C) pour séparer les membranes (culot) des fractions solubles de la cellule (surnageant). Les membranes sont remises en suspension, lavées par 3M de bromure de sodium et ultracentrifugées. Les membranes (culot) reprises dans du tampon Tris-HCl 20mM pH 8, glycérol 25% pour atteindre une concentration de 10mg/ml en RC-LH1, et stockées ainsi à -18 °C. Les mesures d'absorption ont été réalisées sur un spectrophotomètre Varian Cary 50.

Préparation des dimères de RC-LH1-puf X
Les membranes décongelées sont solubilisées par ajout de DDM en solution à 10 %, et incubation à 4 °C pendant 20 minutes à 4řC, avec agitation régulière au vortex. Les membranes non solubilisées sont éliminées par ultracentrifugation (30 min, 60 000g, 4°C). Le surnageant est dilué par quatre dans du Tris-HCl 20mM pH 8 (dilution du glycérol), avant d'être déposé sur gradient de saccharose (0,1-1M) Tris-HCl 20mM pH 8, DDM 0,01 ou 0,015 % Les tubes sont ultracentrifugés sur un rotor swing à 150 000g, pendant 16h à 4řC pour séparer les protéines selon leurs masses. Quatre bandes sont obtenues à l'issue du gradient, correspondant de haut en bas au complexe bc1, aux antennes LH2, aux monomères de RC-LH1 et aux dimères de RC-LH1. La bande du dimère est ensuite prélevée et purifiée par FPLC (fast performance liquide chromatographie) sur colonne Mono Q 5/50 GL (GE Healthcare) dans un tampon Tris-HCl 20mM pH 8, DDM (ou PCC-malt) à 0,01 ou 0,015%. La méthode effectue tout d'abord un lavage par 15 mL de ce tampon, avant d'éluer les complexes protéiques par un gradient de NaCl entre 0 et 500mM sur 35mL (débit 1 ml/mn). La protéine est alors doser soit en utilisant le protocole standard du BCA Protein Assay Reagent (Kit Pierce), soit par réalisation du spectre d'absorbance de la protéine, puisqu'il a été déterminé par dosage BCA, qu'une concentration de 0,1 mg/mL correspondait

à une unité d'absorbance à 881nm.

Essais de cristallisation
La protéine purifiée est diluée par 4 fois par du tampon de purification sans sel, afin de se placer à une concentration en NaCl de 75 mM. La protéine est alors concentrée par ultrafiltration (Amicon Ultracel-30K) avec un seuil de coupure à 100kDa, à des concentration allant de 6 à 12 mg/mL. Les essais de cristallisation sont réalisés en plaque 24 puits par la technique de la goutte suspendue à 20 °C. Le puis est rempli par 500 μL de tampon, et la goutte de cristallisation est constituée par le mélange d'un μL de la solution du réservoir avec un μL de protéine concentrée. Les 500 μL du réservoir sont composés de 90 mmol/L de chlorure de magnésium ($MgCl_2$), 8 % de glycérol et 5 à 12% de PEG 3350 dans l'eau.

Préparation de la solution de révélation au sulfate de cuivre pour analyse HPTLC
20g de $CUSO_4$ pentahydraté sont solubilisés dans 200 ml de méthanol. 8 ml d ?acide ortho phosphorique (85%) sont ajoutés lentement sous agitation. puis 8 ml d ?acide sulfurique (99,9%) sont ajoutés lentement sous agitation. La solution est conservée à 4°C pendant une semaine.

Dosage du détergent par HPTLC
L'appareillage HPTLC utilisé est composé du déposeur automatique d'échantillon ATS4, de la chambre de migration (ADC2), du densitomètre (TLC scanner 3), du système d'immersion (Chromatogram immersion device III), de la plaque chauffante (TLC Plate Heater III) et du logiciel WinCats. Tous ces systèmes sont fabriqués par la société CAMAG.

L'analyse des tensioactifs se fait sur des échantillons de dimères directement après élution sur colonne de chromatographie ou des standards de DDM ou PCC-malt à 0,1 mg/mL dans l'eau ou du tampon Tris/HCl 20 mM, pH8. Les dépôts sont faits à 3 μL/s, après rinçage et mise en équilibre de concentration de la seringue. Le solvant de rinçage est eau/méthanol (1/1 : v/v). Une double migration sur 5 cm est réalisée avec le solvant de migration dichlorométhane/méthanol/acide acétique (32/7,6/0,4 : v/v/v). 25 mL de solvant sont placés dans la cuve, dans le compartiment de saturation, et 10 mL dans le compartiment de migration. La première migration est précédée d'une saturatiuon de la cuve de 15 minutes, et la deuxième d'une présaturation de 5 minutes, sans changer le solvant. La plaque est séchée 5 minutes sous flux d'air avant d'être immergée 6 secondes dans une solution de sulfate de cuivre. Elle est alors laissée 5 minutes à température ambiante, avant d'être chauffée à 120°C pendant 10 minutes. La lecture optique de la plaque se fait à 366 nm par un lampe Hg.

Dosage des lipides par HPTLC
L'analyse se fait sur des échantillons de dimères ou de membranes extraites ou des standards de lipides à 0,1 mg/mL dans le chloroforme. Les dépôts sont faits à 10 μL/s, après rinçage de la seringue par du chloroforme/méthanol (1/1 : v/v) Les conditions de migrations requièrent la mise en place d'un papier buvard dans le fond la cuve, et la réalisation d'une présaturation de la cuve de 15 minutes avec le solvant de migration chloroforme/méthanol/acide acétique/eau (30/5,2/3,6/1,2 : v/v/v/v). 25 mL de solvant sont placés dans la cuve, dans le compartiment de saturation, et 10 mL dans le compartiment de migration. La migration est réalisée sur 70 mm. La plaque est séchée 5 minutes sous flux d'air avant d'être immergée 6 secondes dans une solution de sulfate de cuivre. Elle est alors laissée 5 minutes à température ambiante, avant d'être chauffée à 140°C pendant 30 minutes. La lecture optique de la plaque se fait à 360 nm par un lampe D_2 & W.

Préparation des échantillons pour analyse HPTLC ou HPLC-MS
L'extraction des lipides se fait sur 800 μL de dimères de RC-LH1-puf X sortis de colonne (à environ 1-1,5 mg/mL) ou 100ţl de membranes à 10 mg/mL dilués par 700 μL d'eau. Dans des tubes rincés préalablement au chloroforme et en utilisant des pipettes pasteur, elles aussi rincées au chloroforme (élimination des traces d'acide gras sur la verrerie), 3 mL de chloroforme/méthanol (1/2 : v/v). Le tube est soumis au vortex 10 min. 1ml de chloroforme sont ajoutés (vortex 30 secondes) et 1mL de NaCl 0,9 %. Les tubes sont vortexés 10 min puis centrifugés (5 min, 4000 rpm, 4 °C). La phase organique (inférieure) est récupérée. La phase aqueuse est de nouveau extraite deux fois avec 1 mL de chloroforme. Les phases organiques sont rassemblées, et évaporées sous flux d'azote. Les lipides sont alors repris

dans 300 μL de chloroforme pour l'analyse HPTLC, ou 60 μL du tampon HPLC pour l'analyse par HPLC-MS.

Récupération des composés sur plaque de silice
Pour l'analyse des bandes HPTLC, une plaque est réalisée en conditions classiques d'analyse de lipides, mais en révélant la plaque à la primuline au lieu de la solution de sulfate de cuivre. Après pulvérisation de la primuline à 2% dans l'acétone, la plaque est visualisée en UV à 366 nm, et les bandes sont repérées directement sur la plaque. A l'aide d'un ciseau à bois, la silice est découpée et grattée au niveau de chacune des bandes, et recueillie sur un carré de papier. Elle est ensuite placée dans une pipette pasteur (rincée au chloroforme) et obstruée par de la laine de verre. La silice ainsi retenue est éluée par 5 mL d'un mélange $CHCl_3$/MeOH/eau (5 :5 :1). L'éluat est évaporé sous azote et est repris dans 60 μL du solvant d'HPLC-MS pour analyse des lipides totaux.

Transméthylation des acides gras par GC
Une solution de transméthylation est préparée avec un mélange standard TAG C15 :0 (1 mg/mL), et BHT (6,5 μL/mL) dans de l'acide sulfurique à 5% dans du méthanol. 100 μL de membranes sont séchées sous flux d ?azote, reprises dans 1 mL de cette solution (vortex 30 sec) et incubées pendant 1h à 80°C. 1 mL de NaCl 0,9% sont alors ajoutés. Les tubes sont vortexés 10 min avant ajout de 1,5 mL d'hexane. Les tubes sont vortexés 10min, et centrifugés. La phase organique (supérieure) est collectée. La phase aqueuse est de nouveau extraite à l'hexane. Les phases organiques sont regroupées et évaporées sous flux d'azote. Les acides gras sont alors repris dans 100 μL d'hexane.

Utilisation des Bio-Biodeads SM2
Les Bio-Beads SM2 (Biorad) sont lavés dans une solution de méthanol 20%, rincés à l'eau et séchés sur papier Watman avant d'être pesés. Il sont alors ajoutés à différentes concentration (270 ou 360 mg/mL) à la protéine concentrée (10 mg/mL). L'eppendorf est placé dans un thermomixer où il est maintenu à température (22 ou 24 °C) et agiter. Les prélèvements sont faits à la pipette dans le surnageant après 1 minutes de centrifugation à 13000rpm. La protéine est soit utilisée directement pour les essais de cristallisation, soit diluée dans de l'eau pour quantifier la quantité de DDM par HPTLC.

4 Rapport AUC (Dr. Christine Ebel)

Caractérisation par AUC de F2H9-Malt

Les expériences d'AUC ont été faites à 8, 6, 4, 2, 1 et 0.5 mg/ml.

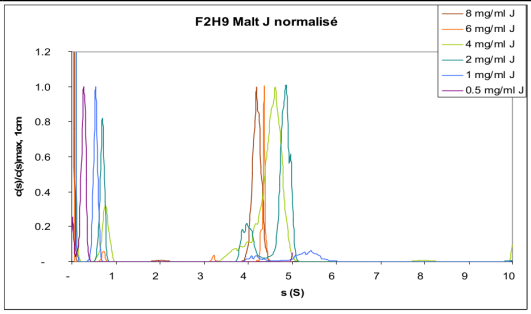
∞ Une contribution en dessous de 1S est attribuée aux monomères ou petits agrégats. Cependant, la valeur de s=0.7S est un peu forte pour un monomère de tensioactif fluoré (s=0.22S attendu, voir table plus bas). Nous avions déjà observé ceci avec les FTAC (rapport Ziad Ibrahim M2). Le nombre de franges d'interférence est constante, 0.7, pour c>1-2 mg/mL et correspond à 0.44 mg/mL (avec dn/dc determiné plus bas ; i.e. plus faible mais bon ordre de grandeur/ CMC déterminée plus bas).

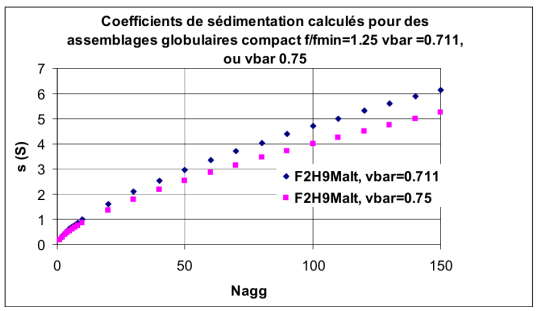
∞ Une contribution à 4-5S est attribuée aux micelles (on n'a pas considéré les données du point à 1 mg/mL de faible intensité et peu précis dans les analyses ci-dessous, on considère les données en interférence plus précises)

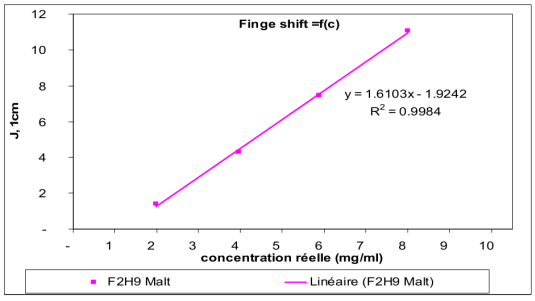
- Nous analysons l'intensité du signal en fonction de la concentration pour déterminer la CMC= 1.195 mg/mL= 2.04 mM, $E_{0.1\%\ 280nm}$=0.012 $cm^{-1}(mg\ /mL)^{-1}$ et le dn/dc=0.105 mL/g.
- Le coefficient de sédimentation diminue alors que la concentration augmente, avec s_0= 4.7 S déterminé par extrapolation linéaire à dilution infinie de micelle. La baisse modérée (-0.08S par mg/mL) s'explique sans doute par des effets de volume exclus : on attend une baisse de *s* quand *c* augmente pour une micelle de même taille (je n ai pas recherché à quelle valeur de d*s*/d*c* on attend un pur effet de répulsion stérique). La valeur de 4.7S correspond à une micelle globulaire compacte de 100 monomères (plus si la forme est allongée) avec vbar=0.711 (127 en considérant le vbar de 0.75 ml/g déterminé expérimentalement par F. Bonnete)

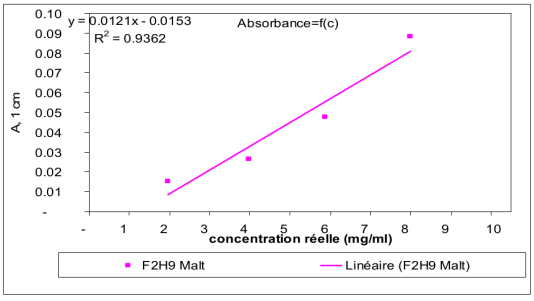
F2H9 malt

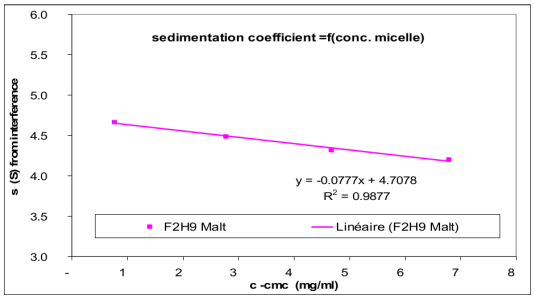
conc	c réelle	Pic 0.65 +/- 0.1S						Pic micelle						Agrégats					
mg/ml	mg/ml	s A	A 1cm	% A	s J	J 1cm	% J	s A	A 1cm	% A	s J	J 1cm	% J	s A	A 1cm	% A	s J	J 1cm	% J
8	8.00	1.39	0.06	39				3.70	0.09	61	4.20	11.07	99						1
6	5.88				0.72	0.60	7	3.79	0.05	99	4.32	7.45	92			1			
4	3.97	2.33	0.01	17	0.76	0.52	11	3.97	0.03	83	4.48	4.28	88				8.88	0.05	1
2	1.97				0.69	0.42	23	4.49	0.02	97	4.66	1.41	77			3			
1	0.97				0.54	0.46	71	5.39	0.00	80	5.07	0.19	29	9.19	0.00	17			
0.5	0.50				0.26	1.09	99	6.56	0.00	53				9.61	0.00	34	4.79	0.01	1





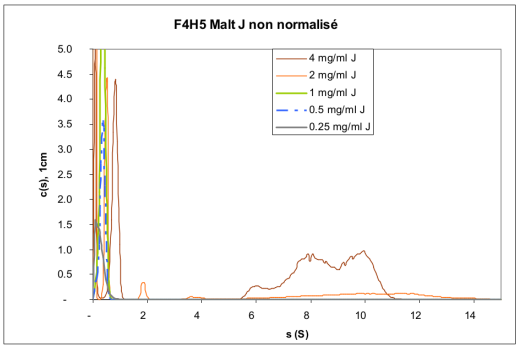


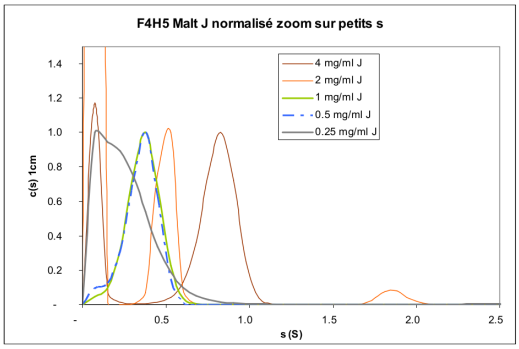




Caractérisation par AUC de F4H5-Malt

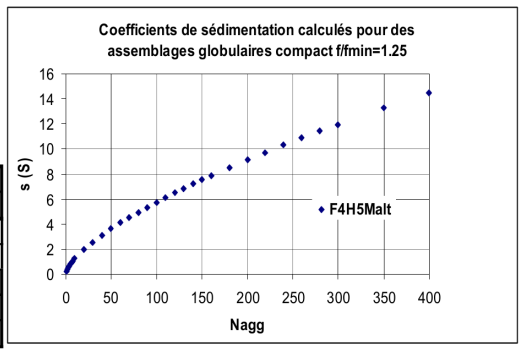
Les expériences d'AUC ont été faites à 4, 2, 1, 0.5 et 0.25 mg/ml pour F4H5 Malt. Elles montrent une contribution lente entre 0.2 et 0.8S (monomère ou petits agrégats), et pour les fortes concentrations un massif large pour les micelles s'étendant entre 2 et 15S a 2 mg/mL et 5 et 11S a 4 mg/mL. On a donc des micelles hétérogènes et de grandes tailles (voir la figure avec les s calculés avec vbar=0.669 et 0.63 ml/g pour des assemblages globulaires compacts ; s=10S correspond à Nagg= 230 et 190, respectivement, si la forme était anisotrope, le nombre de monomères pour une valeur de s donnée serait plus important que dans la figure). Les analyses sont effectuées en considérant le *s* moyen pour la micelle à partir de ces deux points à 2 et 4 mg/mL, sachant que les données à 2 mg/mL sont peu précises. *s* augmente quand *c* augmente , ce qui suggère que la taille de la micelle augmente avec la concentration en surfactant. On utilise les deux points, pour calculer un dn/dc de 0.067 mL :g, et une cmc de 1.03 mg/mL=1.63 mM.

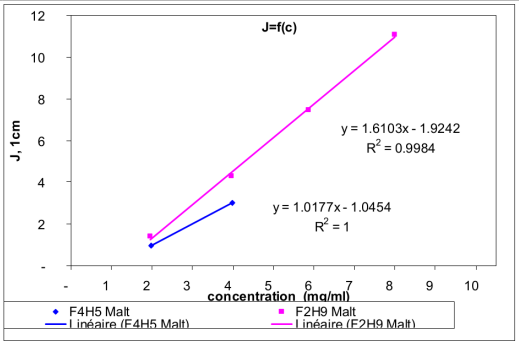


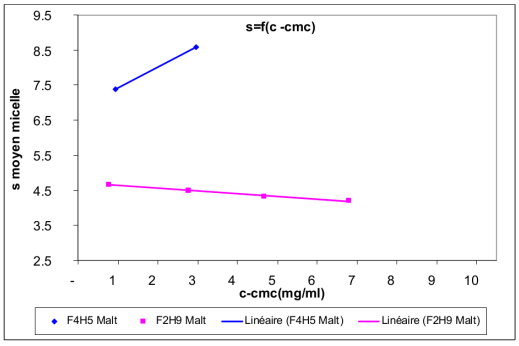


F4H5 malt

c réelle mg/ml	Monomère		Pic micelle	
	s J	J 1cm	s J	J 1cm
3.98	0.81	1.10	8.60	3.01
1.98	0.41	0.76	7.39	0.97
1.02	0.36	1.94		
0.53	0.35	0.99		
0.24	0.26	0.69		







∞

Bibliographie

[1] Engelman, D. M. Membranes are more mosaic than fluid *Nature* **2005**, *438*, 578–580.

[2] Kolbilka, B. K. ; Dixon, R. ; Frielle, T. ; Dohlman, H. G. ; Bolanowski, M. A. ; Sigal, Y.-F. T. L., Irvin S. ; Francke, U. ; Caron, M. G. ; Lefkowitz, R. J. cDNA for the human .2-adrenergic receptor : A protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor *PNAS* **1987**, *84*, 46–50.

[3] Wallin, E. ; Heijne, G. V. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms *Protein Science* **1998**, *7*, 1029–1038.

[4] Deisenhofer, J. ; Epp, O. ; Miki, K. ; Huber, R. ; Michel, H. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of Rhodopseudomonas viridis at 3 A resolution *Nature* **1985**, *318*, 618–624.

[5] Fernandez, C. ; Wuthrich, K. NMR solution structure determination of membrane proteins reconstituted in detergent micelles. *FEBS Lett* **2003**, *555*, 144–150.

[6] MacKenzie, K. R. ; Prestegard, J. H. ; Engelman, D. M. A transmembrane helix dimer : structure and implications. *Science* **1997**, *276*, 131–133.

[7] De Rosier, D. J. ; Klug, A. Reconstruction of Three Dimensional Structures from Electron Micrographs *Nature* **1968**, *217*, 130–134.

[8] Henderson, R. ; Baldwin, J. M. ; Ceska, T. A. ; Zemlin, F. ; Beckmann, E. ; Downing, K. H. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J Mol Biol* **1990**, *213*, 899–929.

[9] Breyton, C. ; Haase, W. ; Rapoport, T. A. ; Kühlbrandt, W. ; Collinson, I. Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. *Nature* **2002**, *418*, 662–665.

[10] Binnig, G. ; Quate, C. ; Gerber, C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* **1986**, *56*, 930–933.

[11] Engel, A. ; Müller, D. J. Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope. *Nat Struct Biol* **2000**, *7*, 715–718.

[12] Fotiadis, D. ; Liang, Y. ; Filipek, S. ; Saperstein, D. A. ; Engel, A. ; Palczewski, K. Atomic-force microscopy : Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature* **2003**, *421*, 127–128.

[13] Chabre, M. ; Cone, R. ; Saibil, H. Biophysics : is rhodopsin dimeric in native retinal rods ? *Nature* **2003**, *426*, 30–1 ; discussion 31.

[14] Ash, W. L. ; Zlomislic, M. R. ; Oloo, E. O. ; Tieleman, D. P. Computer simulations of membrane proteins *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2004**, *1666*, 158 – 189, Lipid-Protein Interactions.

[15] Iwata, S. *Methods and results in crystallization of membrane proteins IUL Biotechnology Series ; 4* ; International University Line, 2003.

[16] Ducruix, A. ; Giegé, R. *Crystallization of nucleic acids and Proteins. A pratical approach* ; Oxford university press, New York, 1992.

[17] Seddon, A. M. ; Curnow, P. ; Booth, P. J. Membrane proteins, lipids and detergents : not just a soap opera *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2004**, *1666*, 105 – 117.

[18] Junge, F. ; Schneider, B. ; Reckel, S. ; Schwarz, D. ; Dötsch, V. ; Bernhard, F. Large-scale production of functional membrane proteins. *Cell Mol Life Sci* **2008**, *65*, 1729–1755.

[19] Spirin, A. S. ; Baranov, V. I. ; Ryabova, L. A. ; Ovodov, S. Y. ; Alakhov, Y. B. A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science* **1988**, *242*, 1162–1164.

[20] Berrier, C. ; Park, K.-H. ; Abes, S. ; Bibonne, A. ; Betton, J.-M. ; Ghazi, A. Cell-free synthesis of a functional ion channel in the absence of a membrane and in the presence of detergent. *Biochemistry* **2004**, *43*, 12585–12591.

[21] Klammt, C. ; Schwarz, D. ; Löhr, F. ; Schneider, B. ; Dötsch, V. ; Bernhard, F. Cell-free expression as an emerging technique for the large scale production of integral membrane protein *FEBS Journal* **2006**, *273*, 4141–4153.

[22] Tandford, C. *The hydrophobic effect : Formation of micelles and biological membranes* ; John Wiley and sons : New York, 1980.

[23] Zana, R. *Dynamics of surfactant self-assemblies. Micelles, microemulsions, vesicules and lyotropic phases* ; Taylor and Francis group, 2005.

[24] Gunnarsson, G. ; Joensson, B. ; Wennerstroem, H. Surfactant association into micelles. An electrostatic approach *The Journal of Physical Chemistry* **1980**, *84*, 3114–3121.

[25] le Maire, M. ; Champeil, P. ; Moller, J. V. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim Biophys Acta* **2000**, *1508*, 86–111.

[26] Pebay-Peyroula, E. ; Garavito, R. M. ; Rosenbusch, J. P. ; Zulauf, M. ; Timmins, P. A. Detergent structure in tetragonal crystals of OmpF porin. *Structure* **1995**, *3*, 1051–1059.

[27] Durbin, S. D. ; Feher, G. Protein crystallization. *Annu Rev Phys Chem* **1996**, *47*, 171–204.

[28] Landau, E. M. ; Rosenbusch, J. P. Lipidic cubic phases : a novel concept for the crystallization of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93*, 14532–14535.

[29] Misquitta, Y. ; Cherezov, V. ; Havas, F. ; Patterson, S. ; Mohan, J. M. ; Wells, A. J. ; Hart, D. J. ; Caffrey, M. Rational design of lipid for membrane protein crystallization. *J Struct Biol* **2004**, *148*, 169–175.

[30] Nollert, P. ; Qiu, H. ; Caffrey, M. ; Rosenbusch, J. P. ; Landau, E. M. Molecular mechanism for the crystallization of bacteriorhodopsin in lipidic cubic phases. *FEBS Lett* **2001**, *504*, 179–186.

[31] Luecke, H. ; Schobert, B. ; Richter, H.-T. ; Cartailler, J.-P. ; Lanyi, J. K. Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 A resolution *Journal of Molecular Biology* **1999**, *291*, 899 – 911.

[32] Nollert, P. ; Royant, A. ; Pebay-Peyroula, E. ; Landau, E. M. Detergent-free membrane protein crystallization *FEBS Letters* **1999**, *457*, 205 – 208.

[33] Czerski, L. ; Sanders, C. R. Functionality of a Membrane Protein in Bicelles *Analytical Biochemistry* **2000**, *284*, 327 – 333.

[34] Faham, S. ; Bowie, J. U. Bicelle crystallization : a new method for crystallizing membrane proteins yields a monomeric bacteriorhodopsin structure *Journal of Molecular Biology* **2002**, *316*, 1 – 6.

[35] Roth, M. ; Arnoux, B. ; Ducruix, A. ; Reiss-Husson, F. Structure of the detergent phase and protein-detergent interactions in crystals of the wild-type (strain Y) Rhodobacter sphaeroides photochemical reaction center. *Biochemistry* **1991**, *30*, 9403–9413.

[36] Salvay, A. G. ; Santamaria, M. ; le Maire, M. ; Ebel, C. Analytical ultracentrifugation sedimentation velocity for the characterization of detergent-solubilized membrane proteins Ca++-ATPase and ExbB. *J Biol Phys* **2007**, *33*, 399–419.

[37] Penel, S. ; Pebay-Peyroula, E. ; Rosenbusch, J. ; Rummel, G. ; Schirmer, T. ; Timmins, P. A. Detergent binding in trigonal crystals of OmpF porin from Escherichia coli. *Biochimie* **1998**, *80*, 543–551.

[38] Nussberger, S. ; Dörr, K. ; Wang, D. N. ; Kühlbrandt, W. Lipid-protein Interactions in Crystals of Plant Light-harvesting Complex *Journal of Molecular Biology* **1993**, *234*, 347 – 356.

[39] Lemieux, M. J. ; Reithmeier, R. A. F. ; Wang, D.-N. Importance of detergent and phospholipid in the crystallization of the human erythrocyte anion-exchanger membrane domain. *J Struct Biol* **2002**, *137*, 322–332.

[40] Toyoshima, C. ; Nakasako, M. ; Nomura, H. ; Ogawa, H. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 A resolution. *Nature* **2000**, *405*, 647–655.

[41] Jidenko, M. ; Nielsen, R. C. ; Sørensen, T. L.-M. ; Møller, J. V. ; le Maire, M. ; Nissen, P. ; Jaxel, C. Crystallization of a mammalian membrane protein overexpressed in Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 11687–11691.

[42] Guan, L. ; Smirnova, I. N. ; Verner, G. ; Nagamori, S. ; Kaback, H. R. Manipulating phospholipids for crystallization of a membrane transport protein *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 1723–1726.

[43] Hunte, C. ; Michel, H. Crystallisation of membrane proteins mediated by antibody fragments. *Curr Opin Struct Biol* **2002**, *12*, 503–508.

[44] Li, L. ; Nachtergaele, S. ; Seddon, A. M. ; Tereshko, V. ; Ponomarenko, N. ; Ismagilov, R. F. Simple host-guest chemistry to modulate the process of concentration and crystallization of membrane proteins by detergent capture in a microfluidic device. *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 14324–14328.

[45] Rigaud, J. L. ; Mosser, G. ; Lacapere, J. J. ; Olofsson, A. ; Levy, D. ; Ranck, J. L. Bio-Beads : an efficient strategy for two-dimensional crystallization of membrane proteins. *J Struct Biol* **1997**, *118*, 226–235.

[46] Dahout-Gonzalez, C. ; Brandolin, G. ; Pebay-Peyroula, E. Crystallization of the bovine ADP/ATP carrier is critically dependent upon the detergent-to-protein ratio *Acta Crystallographica Section D* **2003**, *59*, 2353–2355.

[47] Lemieux, M. J. ; Song, J. ; Kim, M. J. ; Huang, Y. ; Villa, A. ; Auer, M. ; Li, X.-D. ; Wang, D.-N. Three-dimensional crystallization of the Escherichia coli glycerol-3-phosphate transporter : A member of the major facilitator superfamily *Protein Sci.* **2003**, *12*, 2748–2756.

[48] George, A. ; Wilson, W. W. Predicting protein crystallization from a dilute solution property *Acta Crystallographica Section D* **1994**, *50*, 361–365.

[49] Guo, B. ; Kao, S. ; McDonald, H. ; Asanov, A. ; Combs, L. ; Wilson, W. W. Correlation of second virial coefficients and solubilities useful in protein crystal growth *Journal of Crystal Growth* **1999**, *196*, 424 – 433.

[50] Bonneté, F. ; Finet, S. ; Tardieu, A. Second virial coefficient : variations with lysozyme crystallization conditions *Journal of Crystal Growth* **1999**, *196*, 403 – 414.

[51] Finet, S. ; Tardieu, A. alpha-crystallin interaction forces studied by small angle X-ray scattering and numerical simulations *Journal of Crystal Growth* **2001**, *232*, 40 – 49.

[52] Kulkarni, A. ; Zukoski, C. Depletion interactions and protein crystallization *Journal of Crystal Growth* **2001**, *232*, 156 – 164.

[53] Kulkarni, A. M. ; Chatterjee, A. P. ; Schweizer, K. S. ; Zukoski, C. F. Effects of polyethylene glycol on protein interactions *The Journal of Chemical Physics* **2000**, *113*, 9863–9873.

[54] Velev, O. ; Kaler, E. W. ; Lenhoff, A. M. Protein interaction in solution characterized by light and neutron scattering : comparison of lysozyme and chymotrypsinogen *Biophys J* **1998**, *75*, 2682–2697.

[55] Petsev, D. N. ; Thomas, B. R. ; Yau, S. ; Vekilov, P. G. Interactions and aggregation of apoferritin molecules in solution : effects of added electrolytes. *Biophys J* **2000**, *78*, 2060–2069.

[56] Budayova, M. ; Bonneté, F. ; Tardieu, A. ; Vachette, P. Interactions in solution of a large oligomeric protein *Journal of Crystal Growth* **1999**, *196*, 210 – 219.

[57] Hitscherich, C. ; Allaman, M. ; Wiencek, J. ; Kaplan, J. ; Loll, P. J. Static light scattering studies of OmpF porin : Implications for integral membrane protein crystallization *Protein Science* **2000**, *9*, 1559–1566.

[58] Demoruelle, K. ; Guo, B. ; Kao, S. ; McDonald, H. M. ; Nikic, D. B. ; Holman, S. C. ; Wilson, W. W. Correlation between the osmotic second virial coefficient and solubility for equine serum albumin and ovalbumin *Acta Crystallographica Section D* **2002**, *58*, 1544–1548.

[59] Tessier, P. M. ; Johnson, H. R. ; Pazhianur, R. ; Berger, B. W. ; Prentice, J. L. ; Bahnson, B. J. ; Sandler, S. I. ; Lenhoff, A. M. Predictive crystallization of ribonuclease A via rapid screening of osmotic second virial coefficients. *Proteins* **2003**, *50*, 303–311.

[60] Casselyn, M. ; Perez, J. ; Tardieu, A. ; Vachette, P. ; Witz, J. ; Delacroix, H. Spherical plant viruses : interactions in solution, phase diagrams and crystallization of brome mosaic virus *Acta Crystallographica Section D* **2001**, *57*, 1799–1812.

[61] Bonneté, F. In *Macromolecular Crystallization Controlled by Colloidal Interactions : The Case of Urate Oxidase, Crystallization - Science and Technology, Dr. Marcello Andreeta (Ed.)* ; 2012 ; Chapter 13.

[62] Haas, C. ; Drenth, J. ; Wilson, W. W. Relation between the Solubility of Proteins in Aqueous Solutions and the Second Virial Coefficient of the Solution *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103*, 2808–2811.

[63] Zulauf, M. ; Rosenbusch, J. P. Micelle clusters of octylhydroxyoligo(oxyethylenes) *The Journal of Physical Chemistry* **1983**, *87*, 856–862.

[64] Rosenbusch, J. P. The critical role of detergents in the crystallization of membrane proteins *Journal of Structural Biology* **1990**, *104*, 134 – 138.

[65] Garavito, R. M. ; Picot, D. The art of crystallizing membrane proteins *Methods* **1990**, *1*, 57 – 69.

[66] Song, L. ; Gouaux, J. Membrane protein crystallization : Application of sparse matrices to the alpha-hemolysin heptamer. In *Macromolecular Crystallography Part A* ; Charles W. Carter, J., Ed. ; Academic Press, 1997 ; Vol. 276, pp 60 – 74.

[67] Loll, P. ; Allaman, M. ; Wiencek, J. Assessing the role of detergent/detergent interactions in membrane protein crystallization *Journal of Crystal Growth* **2001**, *232*, 432 – 438.

[68] Loll, P. J. ; Hitscherich, C. ; Aseyev, V. ; Allaman, M. ; Wiencek, J. Assessing Micellar Interaction and Growth in Detergent Solutions Used to Crystallize Integral Membrane Proteins *Crystal Growth and Design* **2002**, *2*, 533–539.

[69] Berger, B. W. ; Gendron, C. M. ; Robinson, C. R. ; Kaler, E. W. ; Lenhoff, A. M. The role of protein and surfactant interactions in membrane-protein crystallization *Acta Crystallographica Section D* **2005**, *61*, 724–730.

[70] Frank, H. A. ; Cogdell, R. J. Carotenoids in Photosynthesis *Photochemistry and Photobiology* **1996**, *63*, 257–264.

[71] Scheuring, S. ; Sturgis, J. N. Chromatic Adaptation of Photosynthetic Membranes *Science* **2005**, *309*, 484–487.

[72] Law, C. J. ; Roszak, A. W. ; Southall, J. ; Gardiner, A. T. ; Isaacs, N. W. ; Cogdell, R. J. The structure and function of bacterial light-harvesting complexes *Mol. Membr. Biol.* **2004**, *21*, 183–191.

[73] Cohen-Bazire, G. ; Kunisawa, R. The fine structure of Rhodospirillum rubrum. *J cell biol* **1963**, *16*, 401–419.

[74] Kaiser, I. ; Oelze, J. Growth and adaptation to phototrophic conditions of Rhodospirillum rubrum and Rhodopseudomonas sphaeroides at different temperatures *Archives of Microbiology* **1980**, *126*, 187–194.

[75] Kaplan, S. ; Cain, B. D. ; Donohue, T. J. ; Shepherd, W. D. ; Yen, G. S. Biosynthesis of the photosynthetic membranes of Rhodopseudomonas sphaeroides. *J Cell Biochem* **1983**, *22*, 15–29.

[76] Scheuring, S. AFM studies of the supramolecular assembly of bacterial photosynthetic core-complexes. *Curr Opin Chem Biol* **2006**, *10*, 387–393.

[77] Miller, K. R. Three-dimensional structure of a photosynthetic membrane *Nature* **1982**, *300*, 53–55.

[78] Jungas, C. ; Ranck, J. L. ; Rigaud, J. L. ; Joliot, P. ; Verméglio, A. Supramolecular organization of the photosynthetic apparatus of Rhodobacter sphaeroides. *EMBO J* **1999**, *18*, 534–542.

[79] Comayras, F. ; Jungas, C. ; Lavergne, J. Functional Consequences of the Organization of the Photosynthetic Apparatus in Rhodobacter sphaeroides : I. quinone domains and excitation transfert in chromatophores and reaction center-antenna complexes *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 11203–11213.

[80] McDermott, G. ; Prince, S. M. ; Freer, A. A. ; Hawthornthwaite-Lawless, A. M. ; Papiz, M. Z. ; Cogdell, R. J. ; Isaacs, N. W. Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from *Nature* **1995**, *374*, 517–521.

[81] Koepke, J. ; Hu, X. ; Muenke, C. ; Schulten, K. ; Michel, H. The crystal structure of the light-harvesting complex II (B800-850) from Rhodospirillum molischianum. *Structure* **1996**, *4*, 581–597.

[82] Walz, T. ; Jamieson, S. J. ; Bowers, C. M. ; Bullough, P. A. ; Hunter, C. N. Projection structures of three photosynthetic complexes from Rhodobacter sphaeroides : LH2 at 6 A, LH1 and RC-LH1 at 25 A. *J Mol Biol* **1998**, *282*, 833–845.

[83] Janosi, L. ; Keer, H. ; Kosztin, I. ; Ritz, T. Influence of subunit structure on the oligomerization state of light-harvesting complexes : A free energy calculation study *Chemical Physics* **2006**, *323*, 117 – 128.

[84] Katona, G. ; Andréasson, U. ; Landau, E. M. ; Andréasson, L.-E. ; Neutze, R. Lipidic cubic phase crystal structure of the photosynthetic reaction centre from Rhodobacter sphaeroides at 2.35A resolution. *J Mol Biol* **2003**, *331*, 681–692.

[85] Karrasch, S. ; Bullough, P. A. ; Ghosh, R. The 8.5 A projection map of the light-harvesting complex I from textitRhodospirillum rubrum reveals a ring composed of 16 subunits *EMBO J* **1995**, *14 (4)*, 631–638.

[86] Roszak, A. W. ; Howard, T. D. ; Southall, J. ; Gardiner, A. T. ; Law, C. J. ; Isaacs, N. W. ; Cogdell, R. J. Crystal Structure of the RC-LH1 Core Complex from Rhodopseudomonas palustris *Science* **2003**, *302*, 1969–1972.

[87] Holden-Dye, K. ; Crouch, L. I. ; Jones, M. R. Structure, function and interactions of the PufX protein *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2008**, *1777*, 613 – 630.

[88] Farchaus, J. W. ; Barz, W. ; Grünberg, H. ; Oesterhelt, D. Studies on the expression of the pufX polypeptide and its requirement for photoheterotrophic growth in Rhodobacter sphaeroides *EMBO J.* **1992**, *11 (8)*, 2779–2788.

[89] Francia, F. ; Wang, J. ; Venturoli, G. ; Melandri, B. A. ; Barz, W. P. ; Oesterhelt, D. The reaction center-LH1 antenna complex of Rhodobacter sphaeroides contains one PufX molecule which is involved in dimerization of this complex *Biochemistry* **1999**, *38*, 6834–6845.

[90] Recchia, P. A. ; Davis, C. M. ; Lilburn, T. G. ; Beatty, J. T. ; Parkes-Loach, P. S. ; Hunter, C. N. ; Loach, P. A. Isolation of the PufX protein from Rhodobacter capsulatus and Rhodobacter sphaeroides : Evidence for its interaction with the alpha-polypeptide of the core light-harvesting complex. *Biochemistry* **1998**, *31*, 11055–11063.

[91] Ratcliffe, E. C. ; Tunnicliffe, R. B. ; Ng, I. W. ; Adams, P. G. ; Qian, P. ; Holden-Dye, K. ; Jones, M. R. ; Williamson, M. P. ; Hunter, C. N. Experimental evidence that the membrane-spanning helix of PufX adopts a bent conformation that facilitates dimerisation of the Rhodobacter sphaeroides RC-LH1 complex through N-terminal interactions *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2011**, *1807*, 95 – 107.

[92] Qian, P. ; Hunter, C. N. ; Bullough, P. A. The 8.5A projection structure of the core RC-LH1-PufX dimer of Rhodobacter sphaeroides. *J Mol Biol* **2005**, *349*, 948–960.

[93] Scheuring, S. ; Busselez, J. ; Lévy, D. Structure of the Dimeric PufX-containing Core Complex of Rhodobacter blasticus by in Situ Atomic Force Microscopy *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 1426–1431.

[94] Crouch, L. I. ; Jones, M. R. Cross-species investigation of the functions of the Rhodobacter PufX polypeptide and the composition of the RC-LH1 core complex *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2012**, *1817*, 336 – 352.

[95] Semchonok, D. A. ; Chauvin, J.-P. ; Frese, R. N. ; Jungas, C. ; Boekema, E. J. Structure of the dimeric RC-LH1-PufX complex from Rhodobaca bogoriensis investigated by electron microscopy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2012**, *367*, 3412–3419.

[96] Corrin, M. L. ; Harkins, W. D. The Effect of Salts on the Critical Concentration for the Formation of Micelles in Colloidal Electrolytes1 *Journal of the American Chemical Society* **1947**, *69*, 683–688.

[97] Mukerjee, P. The nature of the association aquilibria and hydrophobic bonding in aqueous solutions of association colloids *Adv. Colloid. Interface Sci.* **1967**, *1*, 241–275.

[98] Hong, W.-X. ; Baker, K. A. ; Ma, X. ; Stevens, R. C. ; Yeager, M. ; Zhang, Q. Design, Synthesis, and Properties of Branch-Chained Maltoside Detergents for Stabilization and Crystallization of Integral Membrane Proteins : Human Connexin 26 *Langmuir* **2010**, *26*, 8690–8696.

[99] Israelachvili, J. N. ; Mitchell, D. J. ; Ninham, B. W. Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1977**, *470*, 185–201.

[100] Linke, D. Chapter 34 Detergents : An Overview. In *Guide to Protein Purification, 2nd Edition* ; Burgess, R. R., Deutscher, M. P., Eds. ; Academic Press, 2009 ; Vol. 463, pp 603 – 617.

[101] Garavito, R. M. ; Rosenbusch, J. P. [25] Isolation and crystallization of bacterial porin. In *Biomembranes Part M* ; Sidney Fleischer, B. F., Ed. ; Academic Press, 1986 ; Vol. 125, pp 309 – 328.

[102] Rosenbusch, J. ; Lustig, A. ; Grabo, M. ; Zulauf, M. ; Regenass, M. Approaches to determining membrane protein structures to high resolution : do selections of subpopulations occur ? *Micron* **2001**, *32*, 75 – 90.

[103] Stubenrauch, C. ; Claesson, P. ; Rutland, M. ; Manev, E. ; Johansson, I. ; Pedersen, J. ; Langevin, D. ; Blunk, D. ; Bain, C. Mixtures of n-dodecylmaltoside and hexaoxyethylene dodecyl ether : Surface properties, bulk properties, foam films, and foams *Advances in Colloid and Interface Science* **2010**, *155*, 5 – 18.

[104] Tribet, C. ; Audebert, R. ; Popot, J.-L. Amphipols : Polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, *93*, 15047–15050.

[105] Popot, J.-L. et al. Amphipols : polymeric surfactants for membrane biology research. *Cell Mol Life Sci* **2003**, *60*, 1559–1574.

[106] Popot, J.-L. et al. Amphipols from A to Z. *Annu Rev Biophys* **2011**, *40*, 379–408.

[107] Sharma, K. S. ; Durand, G. ; Giusti, F. ; Olivier, B. ; Fabiano, A.-S. ; Bazzacco, P. ; Dahmane, T. ; Ebel, C. ; Popot, J.-L. ; Pucci, B. Glucose-based amphiphilic telomers designed to keep membrane proteins soluble in aqueous solutions : synthesis and physicochemical characterization. *Langmuir* **2008**, *24*, 13581–13590.

[108] Bazzacco, P. ; Billon-Denis, E. ; Sharma, K. S. ; Catoire, L. J. ; Mary, S. ; Le Bon, C. ; Point, E. ; Baneres, J.-L. ; Durand, G. ; Zito, F. ; Pucci, B. ; Popot, J.-L. Nonionic Homopolymeric Amphipols : Application to Membrane Protein Folding, Cell-Free Synthesis, and Solution Nuclear Magnetic Resonance *Biochemistry* **2012**, *51*, 1416–1430.

[109] Chae, P. S. ; Wander, M. J. ; Bowling, A. P. ; Laible, P. D. ; Gellman, S. H. Glycotripod Amphiphiles for Solubilization and Stabilization of a Membrane-Protein Superassembly : Importance of Branching in the Hydrophilic Portion *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1706–1709.

[110] Yu, S. M. ; McQuade, D. T. ; Quinn, M. A. ; Hackenberger, C. P. ; Gellman, S. H. ; Krebs, M. P. ; Polans, A. S. An improved tripod amphiphile for membrane protein solubilization *Protein Science* **2000**, *9*, 2518–2527.

[111] Dauvergne, J. Ph.D. thesis, Universite d'Avignon et des pays du Vaucluse, 2010.

[112] Chae, P. S. et al. Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins *Nat Meth* **2010**, *7*, 1003–1008.

[113] Ostermeier, C. ; Harrenga, A. ; Ermler, U. ; Michel, H. Structure at 2.7 A resolution of the Paracoccus denitrificans two-subunit cytochrome c oxidase complexed with an antibody fragment *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, *94*, 10547–10553.

[114] Hovers, J. et al. A class of mild surfactants that keep integral membrane proteins water-soluble for functional studies and crystallization. *Mol Membr Biol* **2011**, *28*, 171–181.

[115] Breyton, C. ; Chabaud, E. ; Chaudier, Y. ; Pucci, B. ; Popot, J.-L. Hemifuorinated surfactants : a non-dissociating environment for handling membrane proteins in aqueous solutions ? *FEBS Lett* **2004**, *564*, 312–318.

[116] Kissa, E. *Fluorinated surfactants and repellents. 2nd Edition* ; Marcel Dekker, Inc. New York, 2001.

[117] Pavia, A. ; Pucci, B. ; Riess, J. G. ; Zarif, L. New perfluoroalkyl telomeric non-ionic surfactants : synthesis, physicochemical and biological properties *Die Makromolekulare Chemie* **1992**, *193*, 2505–2517.

[118] Chabaud, E. ; Barthelemy, P. ; Mora, N. ; Popot, J. ; Pucci, B. Stabilization of integral membrane proteins in aqueous solution using fluorinated surfactants *Biochimie* **1998**, *80*, 515 – 530.

[119] Talbot, J.-C. ; Dautant, A. ; Polidori, A. ; Pucci, B. ; Cohen-Bouhacina, T. ; Maali, A. ; Salin, B. ; Brèthes, D. ; Velours, J. ; Giraud, M.-F. Hydrogenated and fluorinated surfactants derived from Tris(hydroxymethyl)-acrylamidomethane allow the purification of a highly active yeast F1-F0 ATP-synthase with an enhanced stability. *J Bioenerg Biomembr* **2009**, *41*, 349–360.

[120] Palchevskyy, S. S. ; Posokhov, Y. O. ; Olivier, B. ; Popot, J.-L. ; Pucci, B. ; Ladokhin, A. S. Chaperoning of insertion of membrane proteins into lipid bilayers by hemifluorinated surfactants : application to diphtheria toxin. *Biochemistry* **2006**, *45*, 2629–2635.

[121] Blesneac, I. ; Ravaud, S. ; Juillan-Binard, C. ; Barret, L.-A. ; Zoonens, M. ; Polidori, A. ; Miroux, B. ; Pucci, B. ; Pebay-Peyroula, E. Production of UCP1 a membrane protein from the inner mitochondrial membrane using the cell free expression system in the presence of a fluorinated surfactant. *Biochim Biophys Acta* **2012**, *1818*, 798–805.

[122] Barthelemy, P. ; Ameduri, B. ; Chabaud, E. ; Popot, J. L. ; Pucci, B. Synthesis and preliminary assessments of ethyl-terminated perfluoroalkyl nonionic surfactants derived from tris(hydroxymethyl)acrylamidomethane. *Org Lett* **1999**, *1*, 1689–1692.

[123] Chaudier, Y. ; Zito, F. ; Barthélémy, P. ; Stroebel, D. ; Améduri, B. ; Popot, J.-L. ; Pucci, B. Synthesis and preliminary biochemical assessment of ethyl-terminated perfluoroalkylamine oxide surfactants *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1587–1590.

[124] Lebaupain, F. ; Salvay, A. G. ; Olivier, B. ; Durand, G. ; Fabiano, A.-S. ; Michel, N. ; Popot, J.-L. ; Ebel, C. ; Breyton, C. ; Pucci, B. Lactobionamide Surfactants with Hydrogenated, Perfluorinated or Hemifluorinated Tails : Physical-Chemical and Biochemical Characterization *Langmuir* **2006**, *22*, 8881–8890.

[125] Polidori, A. ; Presset, M. ; Lebaupain, F. ; Ameduri, B. ; Popot, J.-L. ; Breyton, C. ; Pucci, B. Fluorinated and hemifluorinated surfactants derived from maltose : Synthesis and application to handling membrane proteins in aqueous solution *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 5827 – 5831.

[126] Breyton, C. ; Gabel, F. ; Abla, M. ; Pierre, Y. ; Lebaupain, F. ; Durand, G. ; Popot, J.-L. ; Ebel, C. ; Pucci, B. Micellar and Biochemical Properties of (Hemi)Fluorinated Surfactants Are Controlled by the Size of the Polar Head *Biophysical Journal* **2009**, *97*, 1077 – 1086.

[127] Dauvergne, J. ; Bendjeriou, A. ; Bonneté, F. ; Kohlbrecher, J. ; Pucci, B. ; Barret, L.-A. ; Polidori, A. Tripod facial surfactants with benzene as the central core : design, synthesis and self-assembly study *New J. Chem.* **2012**, *36*, 1170–1179.

[128] Requirand, N. ; Blancou, H. ; Commeyras, A. F-alkylation de l'acide undécyclenique *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1993**, *130*, 798–806.

[129] Konradsson, P. ; Udodong, U. E. ; Fraser-Reid, B. Iodonium promoted reactions of disarmed thioglycosides *Tetrahedron Letters* **1990**, *31*, 4313 – 4316.

[130] Khiar, N. ; Martin-Lomas, M. A Highly Convergent Synthesis of the Tetragalactose Moiety of the GPI Anchor of the VSG of Trypanosoma brucei *The Journal of Organic Chemistry* **1995**, *60*, 7017–7021.

[131] Deng, S. ; Gangadharmath, U. ; Chang, C.-W. T. Sonochemistry : a powerful way of enhancing the efficiency of carbohydrate synthesis. *J Org Chem* **2006**, *71*, 5179–5185.

[132] Mukherjee, C. ; Tiwari, P. ; Misra, A. K. Synthesis of thio- and selenoglycosides by cleavage of dichalconides in the presence of zinc/zinc chloride and reaction with glycosyl bromides *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 441 – 445.

[133] Delon, L. ; Laurent, P. ; Blancou, H. New synthesis of polyfluoroalkyl racemic α-amino acids *Journal of Fluorine Chemistry* **2005**, *126*, 1487 – 1492.

[134] Kalyanasundaram, K. ; Thomas, J. K. Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99*, 2039–2044.

[135] VanAken, T. ; Foxall-VanAken, S. ; Castleman, S. ; Ferguson-Miller, S. Alkyl glycoside detergents : synthesis and applications to the study of membrane proteins. *Methods Enzymol* **1986**, *125*, 27–35.

[136] Greiner, M. A., J. ; Riess, J. synthesis and preliminary evaluation of 2-(F-alkyl)-ethyl glucosides, a series of new F-alkylated surfactants for in vivo uses *New J. Chem.* **1989**, *13*, 247–254.

[137] Abla, M. ; Durand, G. ; Pucci, B. Glucose-Based Surfactants with Hydrogenated, Fluorinated, or Hemifluorinated Tails : Synthesis and Comparative Physical-Chemical Characterization *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, 8142–8153.

[138] Menger, F. M. ; Portnoy, C. E. Chemistry of reactions proceeding inside molecular aggregates *Journal of the American Chemical Society* **1967**, *89*, 4698–4703.

[139] Sadtler, V. M. ; Giulieri, F. ; Krafft, M. P. ; Riess, J. G. Micellization and Adsorption of Fluorinated Amphiphiles : Questioning the 1 CF2 = 1.5 CH2 Rule *Chemistry A European Journal* **1998**, *4*, 1952–1956.

[140] Guinier, A. ; Fournet, G. *Small-angle scattering of X-rays* ; New-York, Wiley, 1955.

[141] Svergun, D. I. ; Koch, M. H. J. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution *Reports on Progress in Physics* **2003**, *66*, 1735.

[142] Vachette, P. ; Koch, M. H. ; Svergun, D. I. Looking behind the Beamstop : X-Ray Solution Scattering Studies of Structure and Conformational Changes of Biological Macromolecules. In *Macromolecular Crystallography, Part D* ; Charles W. Carter, J., Sweet, R. M., Eds. ; Academic Press, 2003 ; Vol. 374, pp 584 – 615.

[143] Svergun, D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria *Journal of Applied Crystallography* **1992**, *25*, 495–503.

[144] Orthaber, D. SAXS experiments on absolute scale with Kratky systems using water as a secondary standard *Journal of applied crystllography* **2000**, *33*, 218–225.

[145] Solovyova, A. ; Schuck, P. ; Costenaro, L. ; Ebel, C. Non-ideality by sedimentation velocity of halophilic malate dehydrogenase in complex solvents. *Biophys J* **2001**, *81*, 1868–1880.

[146] Tessier, P. M. ; Lenhoff, A. M. ; Sandler, S. I. Rapid measurement of protein osmotic second virial coefficients by self-interaction chromatography. *Biophys J* **2002**, *82*, 1620–1631.

[147] Bonneté, F. ; Malfois, M. ; Finet, S. ; Tardieu, A. ; Lafont, S. ; Veesler, S. Different Tools to Study Interaction Potentials in γ-Crystallin Solutions : Relevance to Crystal Growth *Acta Crystallographica Section D* **1997**, *53*, 438–447.

[148] Israelaschvili, J. N. *Intermolecular and surface forces* ; Elsevier, 1994.

[149] Malfois, M. ; Bonneté, F. ; Belloni, L. ; Tardieu, A. A model of attractive interactions to account for liquid-liquid phase separation of protein solution *Journal of Chemical Physics* **1996**, *105*, 3290–3300.

[150] Hofmeister, F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze *Arch Exp Pathol Pharmakol* **1888**, *24*, 247–260.

[151] Zhang, Y. ; Cremer, P. S. Interactions between macromolecules and ions : the Hofmeister series *Current Opinion in Chemical Biology* **2006**, *10*, 658 – 663.

[152] Budayova-Spano, M. ; Bonneté, F. ; Astier, J.-P. ; Veesler, S. Investigation of aprotinin (BPTI) solutions during nucleation *Journal of Crystal Growth* **2002**, *235*, 547 – 554.

[153] Asakura, S. ; Oosawa, F. On Interaction between Two Bodies Immersed in a Solution of Macromolecules *The Journal of Chemical Physics* **1954**, *22*, 1255–1256.

[154] Vrij, A. Polymers at interfaces and the interactions in colloidal dispersions *Pure and Applied Chemistry* **1976**, *48*, 471–483.

[155] Lekkerkerker, H. N. W. ; Poon, W. C.-K. ; Pusey, P. N. ; Stroobants, A. ; Warren, P. B. Phase Behaviour of Colloid + Polymer Mixtures *Europhysics Letters* **1992**, *20*, 559.

[156] Vivares, D. ; Bonnete, F. X-ray scattering studies of *Aspergillus flavus* urate oxidase : towards a better understanding of PEG effects on the crystallization of large proteins *Acta Crystallographica Section D* **2002**, *58*, 472–479.

[157] Berger, B. W. ; Gendron, C. M. ; Lenhoff, A. M. ; Kaler, E. W. Effects of additives on surfactant phase behavior relevant to bacteriorhodopsin crystallization *Protein Science* **2006**, *15*, 2682–2696.

[158] Durchschlag, H. Determination of the partial specific volume of conjugated proteins *Colloid and Polymer Science* **1989**, *267*, 1139–1150.

[159] Chae, P. S. ; Gotfryd, K. ; Pacyna, J. ; Miercke, L. J. W. ; Rasmussen, S. G. F. ; Robbins, R. A. ; Rana, R. R. ; Loland, C. J. ; Kobilka, B. ; Stroud, R. ; Byrne, B. ; Gether, U. ; Gellman, S. H. Tandem Facial Amphiphiles for Membrane Protein Stabilization *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 16750–16752.

[160] Kwon, G. S. ; Kataoka, K. Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles *Advanced Drug Delivery Reviews* **1995**, *16*, 295 – 309.

[161] Kohlbrecher, J. *User guide for the SASfit software package* ; 2011.

[162] Lipfert, J. ; Columbus, L. ; Chu, V. B. ; Lesley, S. A. ; Doniach, S. Size and shape of detergent micelles determined by small-angle X-ray scattering. *J Phys Chem B* **2007**, *111*, 12427–12438.

[163] Bauer, C. ; Bauduin, P. ; Girard, L. ; Diat, O. ; Zemb, T. Hydration of sugar based surfactants under osmotic stress : A SAXS study *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* **2012**, *413*, 92 – 100.

[164] Abel, S. ; Dupradeau, F.-Y. ; Raman, E. P. ; MacKerell, A. D. ; Marchi, M. Molecular Simulations of Dodecyl-β-maltoside Micelles in Water : Influence of the Headgroup Conformation and Force Field Parameters *The Journal of Physical Chemistry B* **2011**, *115*, 487–499.

[165] Tanaka, S. ; Ataka, M. ; Onuma, K. ; Kubota, T. Rationalization of Membrane Protein Crystallization with Polyethylene Glycol Using a Simple Depletion Model *Biophys J.* **2003**, *84*, 3299–3306.

[166] Slotboom, D. J. ; Duurkens, R. H. ; Olieman, K. ; Erkens, G. B. Static light scattering to characterize membrane proteins in detergent solution *Methods* **2008**, *46*, 73 – 82.

[167] Barthélémy, P. ; Tomao, V. ; Selb, J. ; Chaudier, Y. ; Pucci, B. Fluorocarbon-Hydrocarbon Nonionic Surfactants Mixtures : A Study of Their Miscibility *Langmuir* **2002**, *18*, 2557–2563.

[168] Clapperton, R. M. ; Ottewill, R. H. ; Ingram, B. T. A study of fluorocarbon-hydrocarbon surface active agent mixtures by NMR spectroscopy *Langmuir* **1994**, *10*, 51–56.

[169] Wiener, M. C. A pedestrian guide to membrane protein crystallization. *Methods* **2004**, *34*, 364–372.

[170] Privé, G. G. Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. *Methods* **2007**, *41*, 388–397.

[171] Le Maire, M. ; Kwee, S. ; Andersen, J. P. ; Møller, J. V. Mode of interaction of polyoxyethyleneglycol detergents with membrane proteins. *Eur J Biochem* **1983**, *129*, 525–532.

[172] daCosta, C. J. B. ; Baenziger, J. E. A rapid method for assessing lipid :protein and detergent :protein ratios in membrane-protein crystallization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2003**, *59*, 77–83.

[173] Kaufmann, T. C. ; Engel, A. ; Rémigy, H.-W. A novel method for detergent concentration determination. *Biophys J* **2006**, *90*, 310–317.

[174] Lau, F. W. ; Bowie, J. U. A Method for Assessing the Stability of a Membrane Proteineă *Biochemistry* **1997**, *36*, 5884–5892.

[175] Urbani, A. ; Warne, T. A colorimetric determination for glycosidic and bile salt-based detergents : applications in membrane protein research. *Anal Biochem* **2005**, *336*, 117–124.

[176] Ostuni, M. A. ; Iatmanen, S. ; Teboul, D. ; Robert, J.-C. ; Lacapère, J.-J. Characterization of membrane protein preparations : measurement of detergent content and ligand binding after proteoliposomes reconstitution. *Methods Mol Biol* **2010**, *654*, 3–18.

[177] Shi, C. ; Shao, W. ; Xiong, Y. ; Tian, C. A gas chromatographic method for quantification of detergents frequently used in membrane protein structural studies. *Anal Biochem* **2008**, *383*, 326–328.

[178] Eriks, L. R. ; Mayor, J. A. ; Kaplan, R. S. A strategy for identification and quantification of detergents frequently used in the purification of membrane proteins. *Anal Biochem* **2003**, *323*, 234–241.

[179] Barret, L.-A. ; Polidori, A. ; BonnetÃĬ, F. ; Bernard-Savary, P. ; Jungas, C. A new high-performance thin layer chromatography-based assay of detergents and surfactants commonly used in membrane protein studies *J. Chromatogr. A* **2013**, *1281*, 135 – 141.

[180] Handloser, D. ; Widmer, V. ; Reich, E. Separation of Phospholipids by HPTLC - An Investigation of Important Parameters *Journal of liquid chromatography and Related Technologies* **2008**, *31*, 1857–1870.

[181] Snyder, L. R. Classification of the Solvent Properties of Common Liquids *J. Chromatogr. Sci.* **1978**, *16*, 223–234.

[182] Johnson, A. R. ; Vitha, M. F. Chromatographic selectivity triangles. *J Chromatogr A* **2011**, *1218*, 556–586.

[183] Salvay, A. ; Ebel, C. Analytical Ultracentrifuge for the Characterization of Detergent in Solution. In *Analytical Ultracentrifugation VIII* ; Wandrey, C., CÃűlfen, H., Eds. ; Springer Berlin Heidelberg, 2006 ; Vol. 131, pp 74–82.

[184] Fuchs, B. ; Süss, R. ; Teuber, K. ; Eibisch, M. ; Schiller, J. Lipid analysis by thin-layer chromatography–a review of the current state. *J Chromatogr A* **2011**, *1218*, 2754–2774.

[185] Bligh, E. ; Dyer, W. A rapid method for total lipid extraction and purification *Can.J.Biochem.Physiol.* **1959**, *37*, 911–917.

[186] Imhoff, J. Polar Lipids and Fatty Acids in the Genus Rhodobacter *Systematic and Applied Microbiology* **1991**, *14*, 228 – 234.

[187] Dezi, M. ; Francia, F. ; Mallardi, A. ; Colafemmina, G. ; Palazzo, G. ; Venturoli, G. Stabilization of charge separation and cardiolipin confinement in antenna-reaction center complexes purified from Rhodobacter sphaeroides. *Biochim Biophys Acta* **2007**, *1767*, 1041–1056.

[188] Casadio, R. ; Melandri, B. A. ; Piretti, M. V. ; Serrazanetti, G. P. Phospholipid composition of photosynthetic membranes of Rhodopseudomonas capsulata. *Ital J Biochem* **1979**, *28*, 183–193.

[189] Taratuta, V. G. ; Holschbach, A. ; Thurston, G. M. ; Blankschtein, D. ; Benedek, G. B. Liquid-liquid phase separation of aqueous lysozyme solutions : effects of pH and salt identity *The Journal of Physical Chemistry* **1990**, *94*, 2140–2144.

[190] Thomson, J. A. ; Schurtenberger, P. ; Thurston, G. M. ; Benedek, G. B. Binary liquid phase separation and critical phenomena in a protein/water solution *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1987**, *84*, 7079–7083.

[191] ten Wolde, P. R. ; Frenkel, D. Enhancement of protein crystal nucleation by critical density fluctuations. *Science* **1997**, *277*, 1975–1978.

[192] Garavito, R. M. ; Picot, D. ; Loll, P. J. Strategies for crystallizing membrane proteins. *J Bioenerg Biomembr* **1996**, *28*, 13–27.

[193] Koszelak-Rosenblum, M. ; Krol, A. ; Mozumdar, N. ; Wunsch, K. ; Ferin, A. ; Cook, E. ; Veatch, C. K. ; Nagel, R. ; Luft, J. R. ; DeTitta, G. T. ; Malkowski, M. G. Determination and application of empirically derived detergent phase boundaries to effectively crystallize membrane proteins *Protein Science* **2009**, *18*, 1828–1839.

[194] Konarev, P. V. ; Volkov, V. V. ; Sokolova, A. V. ; Koch, M. H. J. ; Svergun, D. I. *PRIMUS* : a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis *Journal of Applied Crystallography* **2003**, *36*, 1277–1282.

Communications

A ce jour, le travail rapporté dans ce mémoire en vue de l'obtention du titre de docteur de l'Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse a donné lieu à :

– Cinq communications orales :

1. "Influence des tensioactifs sur la cristallisation des protéines membranaires". **Laurie-Anne Barret**, Françoise Bonneté, Colette Jungas, Ange Polidori. Journées jeunes chercheurs de la Société de chimie thérapeutique, Romainville, **2013**. ***Prix SCT communication orale JJC 2013 :*** *invitation aux Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutiques (RICT) à Nice en juillet 2013*
2. "Influence des agents amphiphiles sur la cristallisation du complexe membranaire photosynthétique RC-LH1-pufX". **Laurie-Anne Barret**, Françoise Bonneté, Colette Jungas, Ange Polidori. GdR 3334 Assemblages Supramoléculaires et protéines membranaires, Fournols, **2012**.
3. "Utilisation de l'HPTLC pour la caractérisation du complexe membranaire photosynthétique RC-LH1-pufX en vue de sa cristallisation". **Laurie-Anne Barret**, Ange Polidori, Françoise Bonneté, Pierre Bernard-Savary, Colette Jungas. Club CCM, Tours, **2012**.
4. "Influence des agents amphiphiles sur la cristallisation du complexe membranaire photosynthétique RC-LH1-pufX".**Laurie-Anne Barret**, Françoise Bonneté, Colette Jungas, Ange Polidori. Séminaire interne à l'institut de biologie environnementale et biotechnologie (IBEB), CEA Cadarache, **2012**.
5. "Utilisation et caractérisation de nouveaux amphiphiles pour la cristallisation du complexe membranaire photosynthétique RC-LH1-pufX". **Laurie-Anne Barret**, Françoise Bonneté, Colette Jungas, Ange Polidori. GDR 3334 - Assemblages supramoléculaires et membranes biologiques, L'Isle sur la Sorgue, **2010**.

– Cinq communications par affiche :

1. "Role of surfactants for membrane proteins crystallization". **Laurie-Anne Barret**, Françoise Bonneté, Colette Jungas, Ange Polidori. RICT, Nice, **2013**.
2. "Interactions et cristallisations des protéines membranaires dans des environnements amphiphiles". **Laurie-Anne Barret**, Ange Polidori, Colette Jungas, Françoise Bonneté. GTBio, Montpellier, **2012**.
3. "Use and characterization of new surfactants for the crystallization of the photosynthetic membrane complex RC-LH1-pufX". **Laurie-Anne Barret**, Françoise Bonneté, Ange Polidori, Colette Jungas. Journées de la société française de photosynthèse, Paris, **2012**.

4. "Use of modern HPTLC densitometric assay for membrane phospholipids at trace levels and related analysis in the membrane protein area". **Laurie-Anne Barret**, Pierre Bernard-Savary, Colette Jungas. GERLI Lipidomics Meeting "Membranes and Bioactive lipids", Lyon, **2011**.
5. "New developments of HPTLC for the assay of detergents used for membrane proteins elucidation, crystallization, characterization ; and related studies". **Laurie-Anne Barret**, Ange Polidori, Françoise Bonneté, Pierre Bernard-Savary, Colette Jungas. International Symposium for HPTLC, Bâle (Suisse), **2011**.

– Quatre publications :

1. "Influence of hydrophobic micelle structure on crystallization of the photosynthetic RC-LH1-pufX complex from Rhodobacter blasticus". **L-A. Barret**, C. Barrot-Ivolot, S. Raynal, C. Jungas, A. Polidori and F. Bonneté. J. Phys. Chem B, **2013**. Accepté.
2. "A new high-performance thin layer chromatography-based assay of detergents and surfactants commonly used in membrane protein studies". **L-A. Barret**, A. Polidori, F. Bonneté, P. Bernard-Savary, C. Jungas. J. of Chromatogr. A, **2013**, 1281 :135-141
3. "Tripod facial surfactants with benzene as central core : design, synthesis and self-assembly study". J. Dauvergne, A. Bendjeriou, F. Bonneté, J. Kohlbrecher, B. Pucci, **L-A. Barret**, A. Polidori. New J. Chem., **2012**, 36 :1170-1179
4. "Production of UCP1 a membrane protein from the inner mitochondrial membrane using the cell free expression system in the presence of a fluorinated surfactant". I. Blesneac, S. Ravaud, C. Juillan-Binard, **L-A. Barret**, M. Zoonens, A. Polidori, B. Miroux, B. Pucci, E. Pebay-Peyroula. Biochim Biochim Acta, **2012**, 1818(3) :798-805

Influence of hydrophobic micelle structure on crystallization of the photosynthetic RC-LH1-pufX complex from *Rhodobacter blasticus*.

Laurie-Anne Barret [1,2], Cherone Barrot-Ivolot [1], Simon Raynal [1], Colette Jungas [2], Ange Polidori [1] and Françoise Bonneté [1]*

[1] Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) UMR 5247 CNRS-Universités Montpellier 1 et 2, Chimie Bioorganique et Systèmes Amphiphiles, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, 33 rue Louis Pasteur, F-84000 Avignon, France

[2]CEA DSV IBEB Lab Bioenerget Cellulaire, CNRS UMR Biol Veget & Microbiol Environ, Aix-Marseille Université, Saint-Paul-lez-Durance, F-13108, France

* Corresponding author: francoise.bonnete@univ-avignon.fr

ABSTRACT

Small Angle X-ray scattering (SAXS) experiments are performed on two non ionic surfactants, the DoDecyl β-Maltoside (DDβM) and the Propyl(bi)Cyclohexyl α-Maltoside (PCCαM), a maltoside derivative containing a rigid bicyclohexyl group as hydrophobic chain, in order to compare the influence of both hydrophobic moiety structure and anomeric form on micelle form factors and intermicellar interactions relevant for membrane protein crystallization. Density and refractive index measurements as a function of surfactant concentration have been performed in order to determine volumetric and optical properties of surfactants, essential for determination of absolute molar mass and thereby micelle aggregation number by SAXS and Size Exclusion Chromatography coupled to Multi-Angle Laser Light Scattering (SEC-MALLS), respectively. SAXS form factors are analyzed by the Guinier approximation and the inverse Fourier Transformation, which give the radius of gyration (R_G) and the pair distribution function (P(r)), respectively. Form factor model fitting are also performed to describe the shape and the assembly of both surfactant micelles. Second virial coefficients are finally measured from variation of SAXS forward intensity as a function of surfactant concentration at different percentages of polyethylene glycol 3,350, in order to correlate surfactant intermicellar interactions and RC-LH1-pufX phase diagram. It is found that while size, shape and dimensions of micelles are slightly similar for the two surfactants, their molar mass and aggregation number differ significantly. PCCαM presents a larger density number than DDβM, which induces 1/ an increase in van der Waals contacts between PCCαM hydrophobic chains in the micelle bulk and 2/ a supplementary intermicellar attraction compared to DDβM. Finally the addition of PEG, which induces a depletion attraction favorable to crystallization in both surfactant solutions, decreases the solubility of the RC-LH1-pifX complex in PCCαM.

KEYWORDS Surfactant micelle, Small Angle X-ray Scattering, Light Scattering, Weak interactions, Membrane protein, Crystallization.

INTRODUCTION

Membrane proteins (MPs) play a fundamental role in biology as they are at the heart of all communications and transfers between the inside of living cells and their immediate environment. They represent roughly 30 % of the proteome of *E. coli* or humans and 60 % of current drug targets. Despite their importance in many cellular processes, knowledge of their structure and details of their molecular mechanisms remain at best sketchy - PMs represent about 2 % of known structures in the Protein Data Bank. This lack of structural information is related to a number of difficulties: production of sufficient quantities, purification while conserving the structure/function/activity and 3D crystallization for atomic resolution by crystallography. Regardless of how they are produced, MPs are usually purified using standard biochemical techniques, but require the use of detergents, surfactants which solubilize membrane lipids and make possible handling of membrane proteins in a hydrophobic environment. While increasing successes are obtained using *in meso* crystallization methods, i.e. by reconstitution in lipidic environment after solubilisation and purification in detergents, growing high diffracting MP crystals directly in surfactant micelles - *in surfo* – a long-established method, remains a challenge in structural biology. Despite the use of high-throughput robotic platforms in combination with commercial or lab-made crystallization screens, crystallization by these trial-and-error methods are not frequently successful. Moving beyond empirical approaches requires a better understanding of the physics of these complex solutions containing both

surfactant-solubilized MPs and surfactant micelles, whether it be for the supersaturation or the crystal growth step. In the 90's, fundamental approaches have proven highly successful for the crystallization of soluble proteins [1]. Based on the study of interaction potentials between macromolecules in solution and second virial coefficient (A_2) measurements [2, 3], knowledge of crystallization mechanisms has much progressed thanks to a better understanding and control of physico-chemical parameters that govern solution properties during supersaturation and crystal growth [4]. It has thus been shown that proteins crystallize in a regime where protein-protein interactions are attractive (or at least not strongly repulsive). By using various model proteins (different structures, isoelectric point, size and compactness), we have shown that crystallization depends mainly on short or medium-range attractions [5, 6, 7]. Salts induce an attractive term, which depends on the nature of anions and cations and follows either the direct or the inverse order of the Hofmeister series, depending on whether the protein is studied with a pH above or below its pI [8, 9, 10]. Other precipitants such as polyethylene glycol (PEG) induce a depletion attraction, which depends on the size and concentration of the polymer [11]. Recently, triblock amphiphilic polymers have also proven efficacy for soluble protein crystallization [12]. Whereas these amphiphilic polymers induce repulsion between soluble proteins at concentration below cmc (critical micelle concentration), increasing their solubility, they induce attraction at concentration above cmc, making protein crystallization possible. For membrane protein crystallization, interactions between surfactant micelles have also proven interest. Results obtained with the integral membrane protein OmpF showed that characterizing interaction forces, via second virial coefficient measurements, between detergent micelles in presence of crystallizing agents may be helpful to determine crystallization conditions for protein-detergent complexes (PDCs) [13, 14, 15]. Berger *et al*. also characterized the phase behavior (consolute boundary and cloud point), micelle size, and second virial coefficient (PDC–PDC interaction) of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin in β-octylglucoside [16, 17, 18]. In most cases, solution conditions that led to integral membrane protein crystallization fell within a similar range of negative A_2 values for detergent micelles and PDCs, suggesting that weakly attractive interactions are important in the control of membrane protein phase diagram, just as they are for soluble proteins. However, difficulties of MP crystallization remain essentially linked to the choice of detergent or surfactant type and concentration used to maintain the protein in a native folded state and the membrane protein-surfactant complex homogeneous, monodisperse and stable for several days. Indeed the use of surfactants is ubiquitous and necessary in membrane protein biochemistry, in particular to extract and solubilize proteins from membranes since it mimics the lipidic environment. Nature (polar head and hydrophobic chain) and concentration of surfactant are essential parameters to be controlled to optimize MP stabilization and crystallization. Surfactants in presence of membrane proteins are under three forms: monomers, micelles and surfactant bound to the protein, namely the surfactant belt. Excess of protein-free surfactant micelles or too large surfactant belt may interfere with crystallization and crystal growth by preventing contacts between exposed polar surfaces [19, 20]. Moreover, in crystallization methods such as vapor diffusion, the concentration step by concentrating both membrane protein-surfactant complexes and surfactant micelles may destabilize the protein by intrusion of alkyl chains in the membrane protein structure or by removing essential protein-bound lipids [21] or co-factors. To overcome these problems, different strategies have been developed for two decades to synthesize new surfactants, which make it possible *in vitro* synthesis [22, 23], solubilization and purification [24, 25], trapping and stabilization [26] of membrane proteins. Most surfactants developed up to now are valuable for solubilizing and stabilizing MPs, while the number of effective surfactants for crystallization and X-ray crystallography studies is rather limited. Only rarely new surfactants are conceived, synthesized and tested for membrane protein crystallization. Propyl(bi)cyclohexyl α-maltoside (PCCαM) was deliberately designed to provide a more rigid environment for membrane protein crystallization, in order to improve the homogeneity of the protein-surfactant complex and its stabilization [27]. It is clear that a hydrophobic chain, which is less lipophilic for residual lipids and cofactors, less intrusive in transmembrane region of the protein, would be probably more favorable for crystallization by keeping MPs in their native form. Furthermore, new successful surfactants for crystallization would be able to favor protein-protein contacts in the crystal. In order to better understand MP crystallization with new amphiphiles, we have studied the particular case of PCCαM by characterizing micelle structure and intermicellar interactions to know how it acts on the crystallization of a membrane protein of biological interest, the RC-LH1-pufX core complex from *Rhodobacter blasticus* [28]. Crystals of RC-LH1-PufX were previously obtained in a reproducible manner in PEG 3,350 using dodecyl-β-maltoside (DDβM), a common detergent used in biochemistry for solubilization, purification and stabilization of MPs because of its long alkyl chain. However like most MP crystals obtained in DDβM, which diffract low to moderate resolution, RC-LH1-PufX crystals diffract in DDβM low resolution of 8-10 Å at room temperature (Jungas, personal communication). This poor diffraction may be due i) to a too large belt around the protein, which may prevent suitable polar-

polar contacts in crystal for high diffraction, ii) to the flexible, dynamic detergent micelle that surrounds the membrane protein, or iii) to loss of cofactors due to intrusion of the long detergent alkyl chain, which destabilize the protein. The use of PCCαM, which possesses a rigid, less intrusive (bi)cyclohexyl group as hydrophobic part could be an interesting way for obtaining diffracting RC-LH1-pufX crystals. This surfactant has already been shown to be more stabilizing than DDβM detergent for some membrane proteins, such as the cytochrome b_6f complex from *Chlamydomonas reinhardtii* and two GPCRs [27].

Our objective in this paper is to compare physico-chemical properties of these two mild surfactants for membrane proteins, DDβM and PCCαM (Figure 1) and determine conditions for the growth of diffracting crystals. A thorough understanding of surfactant properties, structure and interactions, is essential for the determination of optimal conditions for membrane protein crystallization.

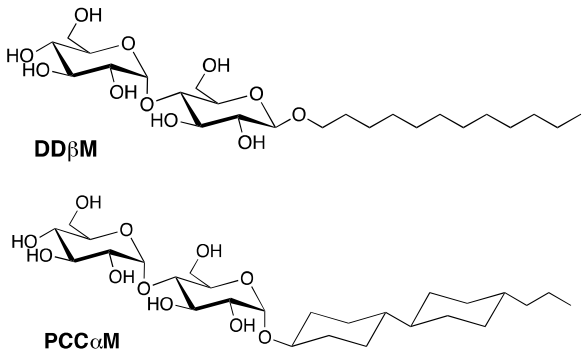


Figure 1 Chemical structure of Dodecyl β-maltoside (DDβM) and Propyl(bi)cyclohexyl α-maltoside (PCCαM)

EXPERIMENTAL SECTION

Solutions for experiments

All salt and buffer reagents were purchased from Sigma Aldrich and Polyethylene glycol 3,350 monodisperse (50% w/v solution) from Hampton Research. Dodecyl-β-D-maltoside (with percent α < 0.2%) was purchased from Affymetrix (Anatrace products). Propyl (bi)cyclohexyl-α-D-maltoside, the stable anomeric form, was synthesized at CBSA/ IBMM (Avignon) following the protocol from Hovers *et al* [27]. For SAXS and SEC-MALLS experiments, all solutions were prepared with Milli-Q water, filtered on 0.2μM Millipore filters.

RC-LH1-pufX preparation

Dimeric RC-LH1-pufX complex was isolated from *Rb. blasticus* photosynthetic membranes according to the procedure described in Comeyras et al.[28]. The protein solubilized in DDβM 0.015% was eluted from monoQ 5/50 GL column (GE Healthcare, Glattbrugg, Switzerland) with 20 mM Tris-HCl pH 8, DDβM 0.015%, NaCl 375 mM or with 20 mM Tris-HCl pH 8, PCCαM 0.01%, NaCl 375 mM in case of surfactant exchange. Protein fractions were diluted with a Tris-surfactant buffer (at the same concentrations than elution buffer) to reduce salt concentration at 75mM and concentrated to a final protein concentration ranging from 6 to 12 mg/mL.

Surfactant phase diagram and RC-LH1-pufX crystallization trials

Crystals of RC-LH1-pufX were grown by vapour diffusion (Linbro plates) at 20°C with a reservoir solution containing 90 mM of $MgCl_2$, 10% of glycerol, and 5-10% of PEG 3,350 in water. Crystallization drops were formed by mixing 1μL of purified protein (6-12 mg/mL) with 1 μL of the reservoir solution. Surfactant phase diagrams were determined in 10μL droplets of 6.5-10% PEG 3,350 and 5-55mg/mL surfactant in water using microbatch plates. For each PEG concentration, surfactant concentration was increased by 1 mg/mL step until obtaining a phase transition, observed by optical microscopy (Carl Zeiss SteREO Discovery.V12 microscope).

Density and partial specific volume measurements

Surfactant micelle partial specific volumes $\bar{v}_p$ in $cm^3.g^{-1}$ were calculated from the precise measurement, with a density-meter Anton Paar DMA4500M, of ρ and ρ°, respectively the densities of surfactant solutions at different concentrations ranging from 0.1 to 10 $mg.mL^{-1}$ and H_2O. The stock surfactant solutions were prepared by precisely weighting both the surfactant and the solvent at about 10 $mg.mL^{-1}$. Surfactant solutions were obtained by successive dilutions from stock solutions. The partial specific volume was then obtained from the slope of the following expression:

$$\frac{\rho - \rho^\circ}{c} = 1 - \bar{v}_p.\rho^\circ \qquad (1)$$

Refractive index and refractive index increment measurements

Surfactant micelle refractive index increments, $\frac{\partial n}{\partial c}$ in $mL.g^{-1}$, were determined from the precise measurement, with an Optilab® T-rEX™ refractometer from Wyatt Technology, of n the refractive index of surfactant solutions at different concentrations ranging from 0.1 to 5 $mg.mL^{-1}$ and analyzed with ASTRA V software (Wyatt Technology).

$$\frac{\partial n}{\partial c} = \frac{n - n_0}{c} \qquad (2)$$

SEC-MALLS analysis of surfactant micelles

Size Exclusion Chromatography (SEC) for absolute mass determination of surfactant micelles was carried out on a Shimadzu HPLC system using a silica gel BioSep™ 5 μm SEC-s2000 column (Phenomenex) coupled to an Optilab® T-rEX™ refractometer and a miniDawn™ TREOS Multi Angle Laser Light Scattering (MALLS) detector (Wyatt Technology). For each surfactant, the column was equilibrated, at a flow rate of 0.4 mL.min^{-1} with Milli-Q water containing the surfactant at a concentration of 2 x cmc. Different concentrations of surfactant were injected.

Molar weight determination was performed with the ASTRA V software using the determined dn/dc values for each surfactant and the expression:

$$M_{mic} = \frac{\left(\frac{I_\theta}{I_0}\right)_{mic} - \left(\frac{I_\theta}{I_0}\right)_{buf}}{K\left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \left(RI_{mic} - RI_{buf}\right)} \quad (3)$$

With $K = \frac{2\pi^2 n^2}{N_a \lambda^4}\left(\frac{1+\cos^2\theta}{r^2}\right)$, an optical constant, which depends on the refractive index n of the buffer, λ the wavelength of the light, θ the angle between the incident (I_0) and the scattered light (I_θ), the distance r between the molecule and the detector and the Avogadro number.

SAXS (Small Angle X ray scattering)

Synchrotron radiation X-ray scattering data were collected on the ID14-eh3 bioSAXS beamline at the ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble-France). Surfactant scattering patterns were measured at 293K at several concentrations ranging from 2 to 40 mg.mL^{-1} in H_2O with addition of different percentages of PEG 3,350 (0, 2, 4 and 6%). For the sample–detector distance of 2,425 m and the X-ray wavelength $\lambda = 0.0931$ nm, the achievable q-range was 0.05 - 4 nm^{-1}. The beamline was equipped with a 2D detector (Pilatus 1M) and an automated sample changer. To prevent radiation damage during the scattering experiments, the data were collected in 10 successive 10sec-frames and the solution was moved in the capillary during exposure. The individual frames were averaged after normalization to the intensity of the incident beam and corrected for the detector response, and the scattering of the appropriate buffer was subtracted. The difference curves were scaled for the solute concentration. All data manipulations were performed using standard procedures by the program package PRIMUS [29].

THEORETICAL SECTION

Form factor

The total normalized intensity I(c,q)/c, scattered by a solution of interacting monodisperse particles at a scattering angle 2θ, can be expressed as a function of the particle concentration c and the modulus of the scattering vector q, $q = 4\pi\lambda^{-1}\sin\theta$, by:

$$I(c,q) = I(0,q).S(c,q) \quad (4)$$

I(0,q), the Fourier transform of the spherically averaged auto-correlation function of the electron density contrast associated with the particle, is usually called the particle form factor. S(c,q), usually called the solution structure factor, is an interference term, which accounts for interactions between particles. From form factor analysis, we access to different particle structural parameters. Using the Guinier approximation Ln I(0,q) = ln I(0,0) $-(qR_g)^2/3$, while assuming that $q.R_g < 1$ at very small angles, the forward scattering intensity I(0,0) gives access to the particle absolute molar mass and the slope of the Guinier approximation to the radii of gyration R_g of the particle. The surfactant micelle molar mass was estimated from SAXS data by comparison of absolute forward scattering with that from the reference of a solution water [30]. The aggregation number N_{agg} is therefore determined by dividing the micelle molar mass by that of the surfactant monomer by the following expression (5):

$$N_{agg} = N_a \frac{I(0)_{mic}}{M_{mono}.(c - c_{cmc}).I(0)_{water}.[r_0.\bar{v}_p(\rho_{mic} - \rho^\circ)]^2}\left.\frac{d\Sigma}{d\Omega}\right|_{water}$$

With N_a the Avogadro number, r_0 the classical electron radius (r_0=0.28179 10^{-12} cm/e-), $\bar{v}_p$ the surfactant micelle specific volume (cm^3/g), ρ_{mic} and ρ^0, the scattering length density of surfactant micelle and water, respectively, and $\left.\frac{d\Sigma}{d\Omega}\right|_{water}$ the absolute scattering intensity of water equal to 0.01632 cm^{-1} at 293 K.

By inverse Fourier transformation using the program GNOM [31], the pair distribution function (PDF) and the maximum particle dimensions D_{max} can also be determined. It gives information about the geometrical shape of the particle in solution. Finally, the SAXS form factors can further be analyzed using least square models. Using SASfit software package [32], a triaxial core shell ellipsoid model has been used to account for our experimental data. Its functional form is:

$$I(q) = \int_0^1\int_0^1 dxdy\left[3.(\rho_{core} - \rho_{shell})\frac{\sin qR - qR.\cos qR}{(qR)^3} + \right.$$
$$\left. + 3.(\rho_{shell} - \rho_{solv})\frac{\sin qR_t - qR_t.\cos qR_t}{(qR_t)^3}\right]^2 \quad (6)$$

With

$$R = \sqrt{\left[a^2\cos^2(\pi x/2) + b^2\sin^2(\pi x/2)\right](1-y^2) + c^2y^2}$$

$$R_t = \sqrt{\left[(a+t)^2\cos^2(\pi x/2) + (b+t)^2\sin^2(\pi x/2)\right](1-y^2) + (c+t)^2y^2}$$

ρ_{core}, ρ_{shell} and ρ_{solv} the scattering length densities of the core, the shell and the solvent respectively, a, b and c three semi axes of the elliptical core, t the thickness of the shell. Volume of micelle core and total volume of micelle core along with shell can then be determined from these structural parameters:

$$V_{core} = 4\pi/3\ (a.b.c)$$
$$\text{and } V_{mic} = 4\pi/3\ (a+t).(b+t).(c+t) \qquad (7)$$

By assuming no hydration of hydrophobic chain, the core volume determination appears another to way to access the aggregation number by the expression $V_{core} = N_{agg}\ V_{chain}$. Finally hydration of polar head can be determined by the expression $V_{shell} = N_{agg}\ (V_{head} + n\ V_{H2O})$, with $V_{head} = V_{monomer} - V_{chain}$.

Second virial coefficient determination

In the case of non ideal solutions of macromolecules (i.e. concentrated solutions of macromolecules in interaction), the scattered intensity I(c,q) gives information about microscopic properties between particles in solution via the structure factor S(c,q). Forward structure factors, S(c,0), give access to the second virial coefficient A_2, which characterizes the resultant force of all individual interactions between particles in solution. These individual interactions are either repulsive or attractive. Mainly, these are the van der Waals forces, the excluded volume forces, the electrostatic forces, the hydration forces and sometimes additional forces such as depletion forces when polymers are added. The nature of net interaction forces, either attractive or repulsive, can be simply determined by the plot of the structure factor at the origin, S(c,0), as a function of the particle concentration, c, since it is related to the osmotic pressure Π by:

$$S(c,0) = \frac{RT}{M}\left(\frac{\partial \Pi}{\partial c}\right)^{-1} \qquad (8)$$

$$\text{with } \frac{\Pi}{cRT} = \frac{1}{M} + A_2c + A_3c^2 + \ldots \quad (9)$$

the concentration c being expressed in $g.cm^{-3}$.

Therefore, the second virial coefficient can be obtained by the expression (10):

$$S(c,0) = \frac{I(c,0)}{I(0,0)} = \frac{1}{1 + 2.M.A_2.c + \ldots} \approx 1 - 2.M.A_2.c$$

In the case where the term ($2MA_2c$) is small (<<1), the expansion in power of c of the structure factor at the origin S(c,0) can be limited to the second virial coefficient and linearized. If A_2 is positive (negative), S(c,0) is lower (larger) than 1, the overall interactions are repulsive (attractive).

RESULTS AND DISCUSSION

Surfactant structure and properties in water

Surfactants are amphiphilic molecules, which contains both a polar hydrophilic head and a hydrophobic tail. In aqueous solutions, they form self-assemblies such as micelles, vesicles, bilayers, whose size and shape depend on the surfactant structural parameters [33, 34], such as its head area, its aliphatic chain length, its anomeric form for glycosylated surfactants or its apolar chain hydrophobicity. DoDecylMaltoside presents two anomeric forms, whose β form is the most frequently used in biochemistry as detergent to solubilize lipidic membranes and extract and stabilize membrane proteins for structural studies. Propyl(bi)cyclohexyl maltoside presents also two anomeric forms, however the α form is the predominant stereoisomer obtained during its synthesis [27]. Shape and size of DDM micelles were already studied by small angle scattering [35, 36, 37]. The α-anomer forms spherical micelles, while the β-anomer forms large oblate ellipsoid micelles. We have performed SAXS experiments on both DDβM and PCCαM in H_2O at 20 °C on the same SAXS beamline over a large q-range, from 0.05 to 4 nm^{-1} (ID14-eh3, ESRF Grenoble-France), in order to compare the effect of hydrophobic chain structure and anomeric form on micellar assemblies and interactions for membrane protein crystallization, and in particular for RC-LH1-pufX crystallization. X-ray scattering intensities have been measured as a function of surfactant concentration between 2.5 and 40 $g.L^{-1}$ widely above critical micelle concentration (cmc = 0.087 g/L and 0.02 g/L for DDβM and PCCαM respectively) for both form factor characterization and second virial determination. Because of the very low signal of surfactant at concentration at and below cmc, similar to buffer signal, the subtracted background was the signal of water or of buffer. No change in the shape of scattering curves of surfactant micelles as a function of surfactant concentration is observed over the whole q-range for DDβM and for PCCαM (Figure 2), except slight changes in the zero-q range, corresponding to the interference term S(c,q) (eq 4). A slight decrease in the position of the second maximum is observed for PCCαM, which could be attributed to a slight increase in the micelle size [36]. Around the first maximum, i.e. q = 0, the decrease in Ln [I(0)/c] seen in Guinier plots as the surfactant concentration increases (Insert Figures 2) is characteristic of repulsive interactions arising mainly from excluded volume effects.

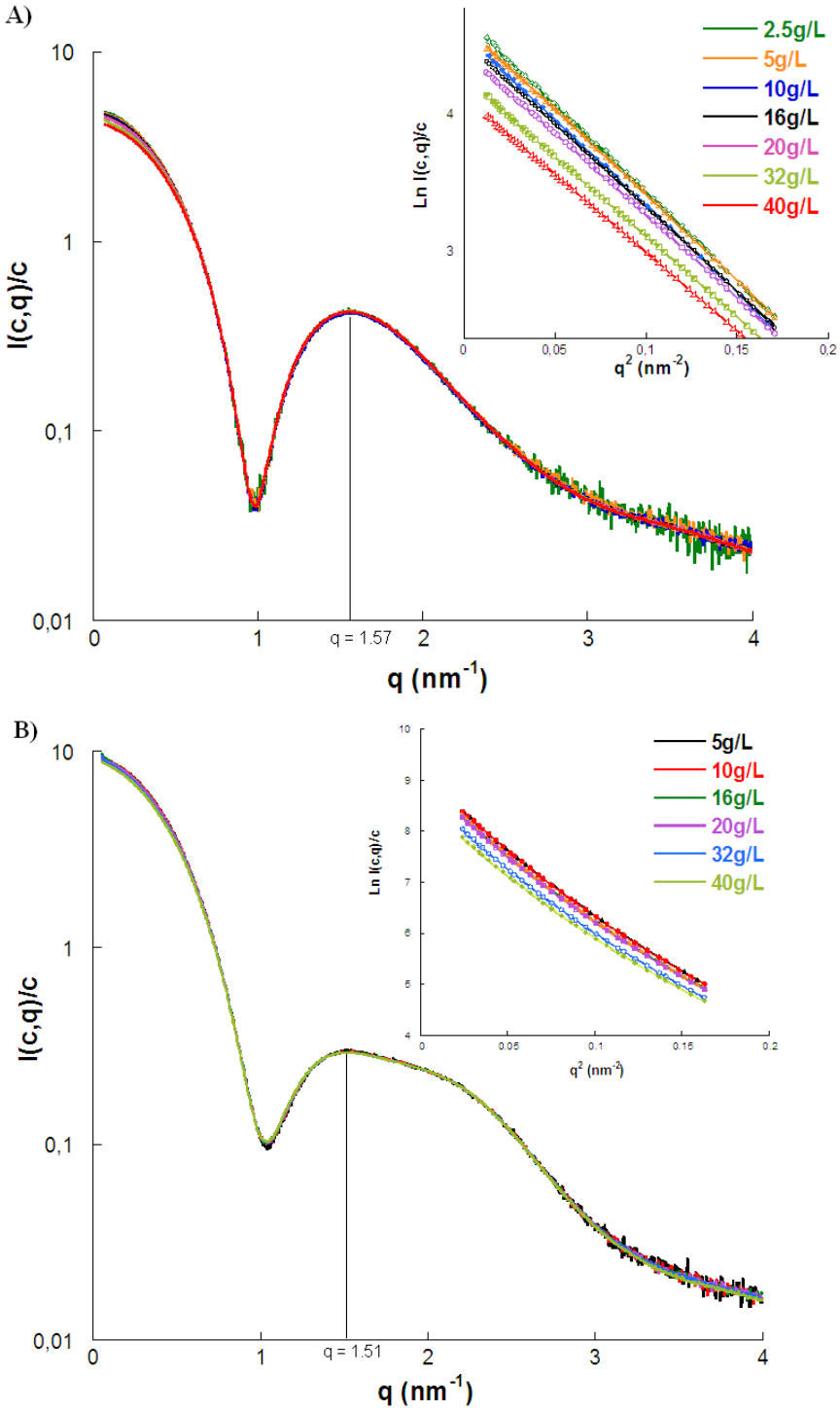


Figure 2 SAXS patterns of DDβM (A) and PCCαM (B) in H_2O as a function of concentration of each surfactant from 2.5 to 40 g/L

In order to overcome interparticle effects on the molar mass and radius of gyration determination, form factors are taken as the most diluted concentrated SAXS curves for the Guinier analysis [38]. By the Guinier approximation, the forward intensity gives access to the micelle molar mass and thus to the surfactant aggregation number N_{agg} (i.e. the number of surfactant monomers per micelle) (eq 5). Forward intensity I(0) and radius of gyration (R_G), listed in Table 1, are together higher for PCCαM than for DDβM. Molar mass and aggregation number for DDβM calculated from I(0) are found in agreement with values from literature [39, 40] between 110 and 140 for N_{agg}. For PCCαM, molar mass and aggregation number are found significantly higher than for

DDβM. Results for Mw and N_{agg} were confirmed by SEC-MALLS analysis.

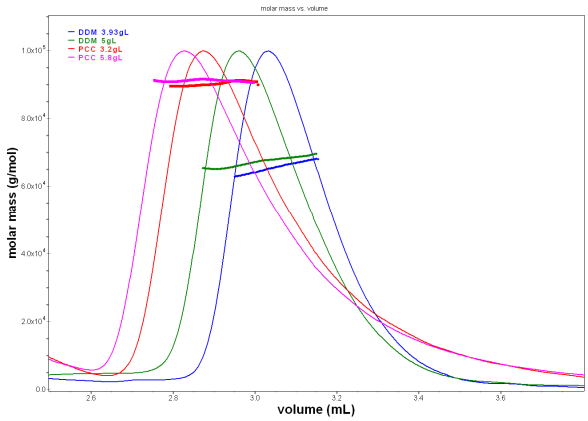


Figure 3 Gel permeation chromatogram coupled to triple detection UV-RI-MALLS from Wyatt technology

Figure 3 shows the elution profiles for two samples of each DDβM and PCCαM through a BioSep™-SEC-s2000 column equilibrated in water containing their respective surfactant at a concentration of twice cmc in order to maintain surfactants self-associated in micelle form during elution. Solutions of each surfactant at two excess concentrations, i.e. largely above cmc (between 3 and 6 g/L) were injected and their static light scattering signals analyzed. From measured refractive index increments, $\partial n/\partial c$, DDβM and PCCαM molar masses calculated from eq 3 and indicated on Figure 3 by the blue/green and red/magenta lines respectively, are found close to the values obtained from SAXS measurements (see Table 1) and higher for PCCαM than for DDβM. Micelles for both surfactants appear monodisperse in mass along the elution peak. The effect of concentration for both surfactants on elution peak is simply due to the saturation of column pores at high concentration of surfactant.

Other structural information is obtained from SAXS analysis. The pair distribution function (PDF), P(r), obtained by inverse Fourier Transformation of SAXS intensity gives information on the shape and geometry of the particle and its maximum dimension (D_{max}). It has the advantage to be a free-model method, only depending on scattering length density profile into the particle.

We thus observe (Figure 4) a slight increase in D_{max} for PCCαM micelles compared to DDβM micelles, in agreement with the slight shift of the second maximum of SAXS intensity towards lower q. In both cases, P(r) shows two peaks, but less marked for PCCαM than for DDβM. This behavior observed in the PDF is due to an inhomogeneous composition of particles. The scattering length densities of head and tail groups in micelles of DDβM and PCCαM (Table 1) are respectively higher and lower than that of the solvent for both surfactants. Thus the hydrophobic core has a negative length density contrast and the hydrophilic shell has a positive contrast, which induces oscillations in the P(r) [41].

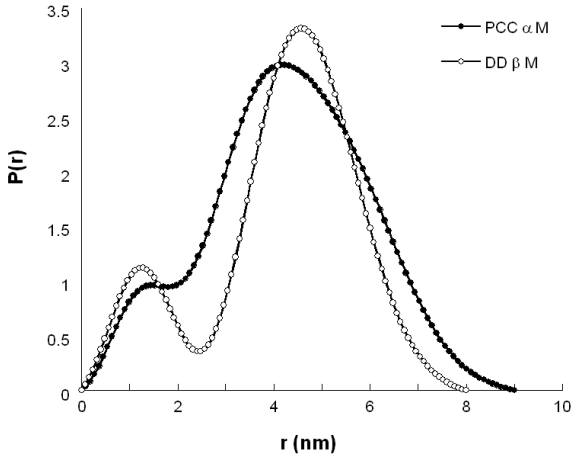


Figure 4 Pair distribution function of DDβM and PPCαM in water

Evaluated by SAXS, the P(r) function shows that a core-shell model could well describe these micelles. Fitting analysis of SAXS data were performed using ellipsoid core-shell model. Such simplistic model was already used to describe different detergent micelles [36] and appeared suitable to provide a comprehensive picture of micelle structure. In the SASfit procedure, assuming that the core contains no water molecules, the electron density for the core was kept fix to the calculated value obtained from the total number of electron in the chain divided by the volume of the chain. For the shell electron-density, the value was not fixed, allowing hydration of the head group. Experimental and fitted scattering curves are shown in Figure 5. Keeping in mind that final model parameters, although strongly depending on the choice of geometrical model, also depend on the experimental q-range and accuracy of collected data, we analyze data with two ellipsoidal models: i) an oblate ellipsoid with one semi-axis of length a, two semi-axes of length b and a thickness t for the head length as in Lipfert *et al* [36]; ii) a triaxial core-shell ellipsoid with semi-axes a < b, c and thickness t as in Bauer *et al* [42]. This latter model fits intensities better than the biaxial model, in the zero-q range which is larger than previous published experiments, mainly due to improvement in data acquisition detector, reflecting the forward intensities from Guinier analysis and therefore the micelle molar masses (Insert in Figure 5) and the aggregation number.

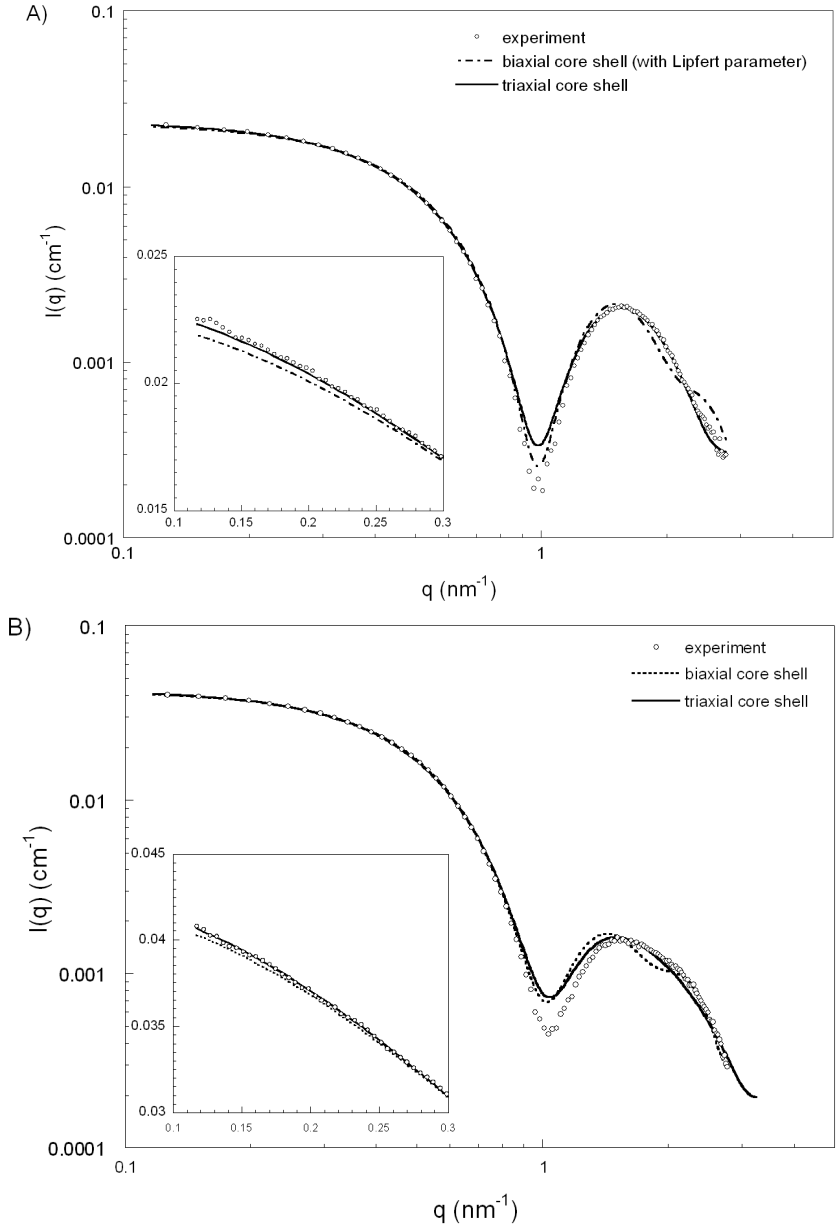


Figure 5 Experimental and fitted form factors of DDβM and PCCαM

Surfactant	Shape	ρ_{shell} (e-/A^3)	ρ_{core} (e-/A^3)	a (A)	b (A)	c (A)	t (A)	V_c (A^3)	V_t (A^3)
DDβM	Oblate	0.446	0.277	15.26	22.02	34.08	8.35	47968	127439
PCCαM	Oblate	0.438	0.305	13.98	25.93	37.55	8.27	57017	146049

Table 2 Best parameters from triaxial ellipsoid fits

Moreover the hydrophobic micelle core volume, $V_c = 4\pi abc/3$, obtained from the ellipsoid model also provides an independent value of the aggregation number. Assuming that micelle core does not contain water molecules [33], the micelle core volume can be written as $V_{core} = N_{agg}.V_{chain}$. The volume of the DDβM aliphatic chain, V_{chain}, was calculated from the Tanford method [33] using $V_{chain} = 27.4 + 26.9\ n_c$,

with n_c the number of carbon atom (n_c = 12 for DDβM). Thus, N_{agg} for DDβM is found equal to 137 in close agreement with the value obtained from our Guinier analysis (N_{agg} = 127 ± 4). For PCCαM, N_{agg} from core-shell model is found equal to 149 larger than DDβM, but quite smaller than N_{agg} from Guinier forward intensity (N_{agg} ≈ 165). This discrepancy is probably due to a SAXS fit of lower quality at large angles than for DDβM. From our fit, we could also evaluate the solvation of DDβM and PCCαM at around, respectively, 9 and 8 water molecules per maltoside head in agreement with literature [35]. Finally, our results clearly show that the PCCαM micelle, with size and hydration quite similar but aggregation number higher than DDβM, is denser than DDβM, which explains the shape of the two P(r) and should influence the intermicellar interactions.

Intermicellar surfactant interactions.

We have shown that DDβM and PCCαM exhibit quite similar micellar structures in aqueous solution. They can be described as oblate ellipsoids with equivalent dimensions (R_G, D_{max}), however with a larger aggregation number for PCCαM than for DDβM, which means that PCCαM is denser than DDβM. In H_2O, the scattering intensity at zero-q, for both DDβM and PCCαM, decreases as the micelle concentration of surfactant increases from 2.5 to 40 $g.L^{-1}$ (Insert Figure 2). The decrease in the case of DDβM is more pronounced than in the case of PCCαM. This decrease close to zero-q, without change in the large q-range up to 4 nm^{-1}, is characteristic of repulsive interaction between micelles. Structure factors at zero-q, S(c,0), have been plotted as a function of micelle concentrations for DDβM (Figure 6A) and PCC-αM (Figure 6B) in different solutions containing various percentages of Polyethylene Glycol 3,350 from 0 to 6 % (W/V).

According to eq 10, the second virial coefficient (A_2), which reflects the overall interactions between particles in solution, has been plotted as a function of addition of PEG (Figure 7). It shows that, in solutions without PEG, PCCαM micelles are less repulsive than DDβM micelles in the same physico-chemical conditions, i.e. $A_{2\ DD\beta M} > A_{2\ PCC\alpha M} > 0$. Since the two surfactants are non-ionic, repulsion between micelles is mainly due to micelle excluded volume effect. The discrepancy in A_2 between DDβM and PCCαM may be due to an increase in attractive interaction, probably to a modification in the van der Waals contribution in PCCαM micelles. We can expect that the anomeric form of PCCαM and its more rigid hydrophobic group favor the formation of denser and more packed micelles due an increase in van der Waals contacts in the bulk of the micelle compared to the case of DDβM micelles, where the hydrophobic chains are more labile and present less van der Waals contacts. When PEG 3,350 is added, up to 6 %, forward scattering intensity increases as a function of micelle concentrations in the range [2.5 – 40 $g.L^{-1}$] (data not shown), without changes in the form factor in the large q-range.

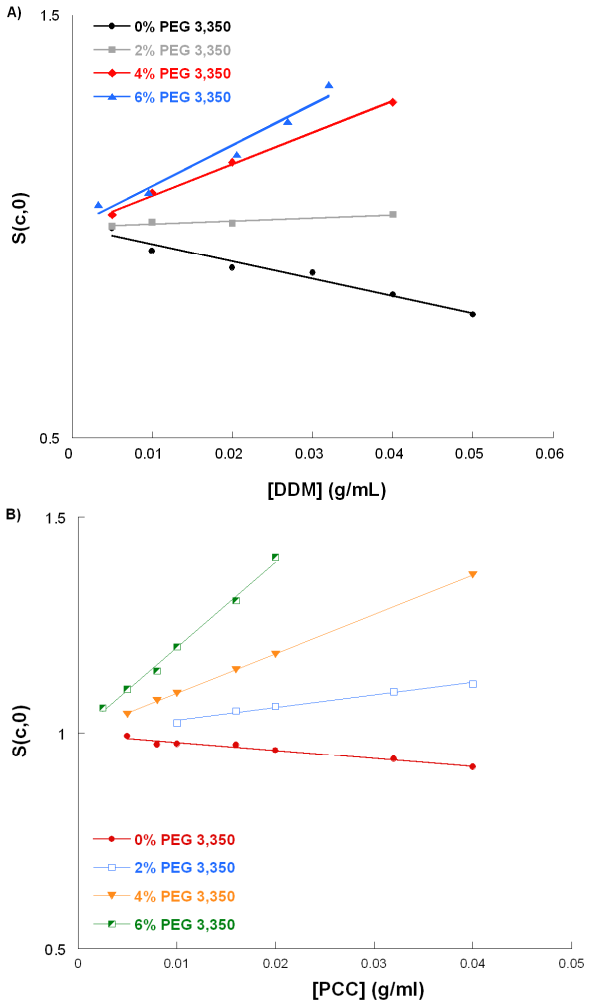


Figure 6 A) DDβM and B) PCCαM zero-q structure factor as a function of micelle concentration in different solutions Tris 20 mM pH 8 plus different percentage of PEG 3,350.

We have also observed that SAXS patterns of DDβM 40 $g.L^{-1}$ at 6% PEG 3,350 exhibited small diffraction peaks, whose signature let us think to the formation of a hexagonal phase. When data are reported in zero-q structure factor as a function of micelle concentration, it shows that attractive interactions are induced when PEG is added and that PCCαM micelles are more attractive than DDβM micelles. This attraction between surfactant micelles in both cases in presence of polymer is the well-known depletion attraction [43]. This depletion effect of Polyethylene Glycol is usual with proteins and was already observed with micelles of detergent [15, 44]. The variation in the depletion effect is quite similar for DDβM and PCCαM (Figure 7).

However with the supplementary attraction induced by PCCαM hydrophobic core, it may be possible that crystallization of integral membrane proteins purified in PCCαM should be favored at lower concentration of crystallizing agent [14, 17].

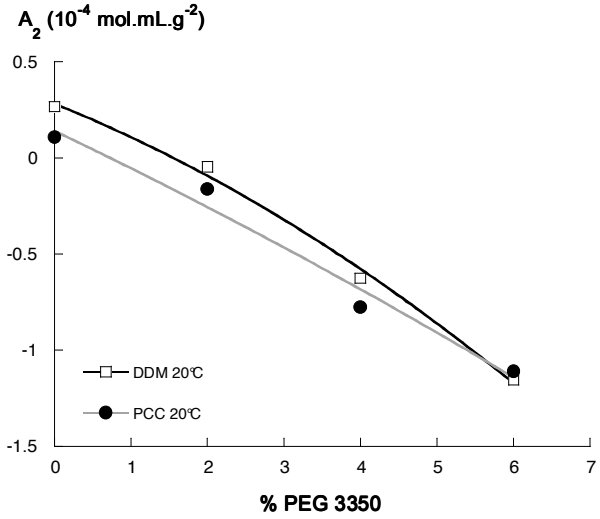


Figure 7 Second virial coefficients of DDβM and PCαM micelles as a function of PEG 3,350 percentage.

Surfactant phase map and RC-LH1-pufX crystallization.

Few articles in crystallography deal with the characterization of protein crystallization conditions via second virial coefficient determination. In the 2000's, Loll *et al.* first showed that, for integral membrane proteins, detergent (surfactant) moieties play an important role in modulating phase diagram of membrane protein detergent complexes (PDC) and that weak interaction forces between detergent micelles can be a predictive tool for the determination of PDC crystallization conditions. Conversely, could determination of attractive interactions, via negative second virial coefficients, be an interesting alternative to empirical trial-and-error crystallization method for unknown MPs? We have shown here that micelles of PCCαM are more attractive than micelles of DDβM in the same crystallizing conditions. It is therefore expected that surfactant phase diagram could be affected and that the cloud point boundary should be shifted towards lower polymer concentrations. This cloud point boundary, which corresponds to the condensation of micelles out of solution into a separate phase, has shown its interest in MP crystallization. Indeed, it has long been known that crystals of detergent-solubilized MPs tend to form near the cloud point of the detergent [45]. This empirical observation was used to construct crystallization screens and a recent publication demonstrated that such screens could generate crystalline leads for over a dozen different membrane proteins [46].

We have thus observed by optical microscopy and drawn cloud point phase transitions of DDβM and PCCαM (Figure 8) and found that the cloud point for PCCαM is observed at lower percentage of PEG 3,350 than in the case of DDβM.

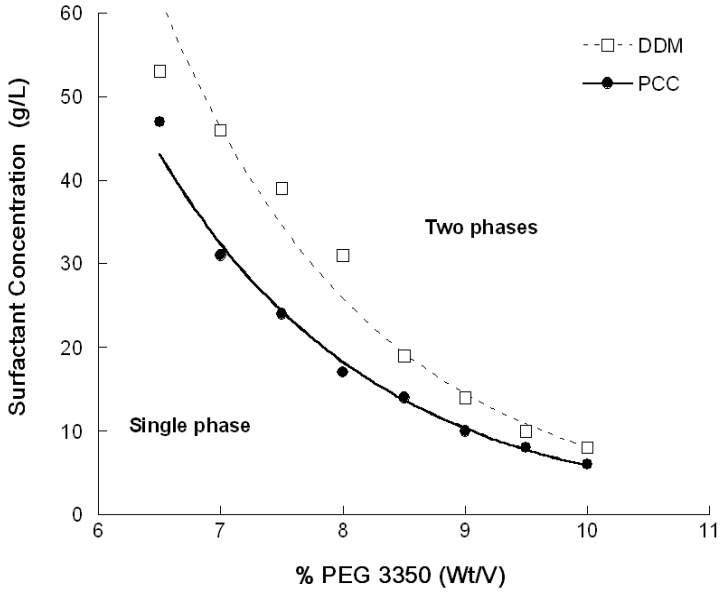


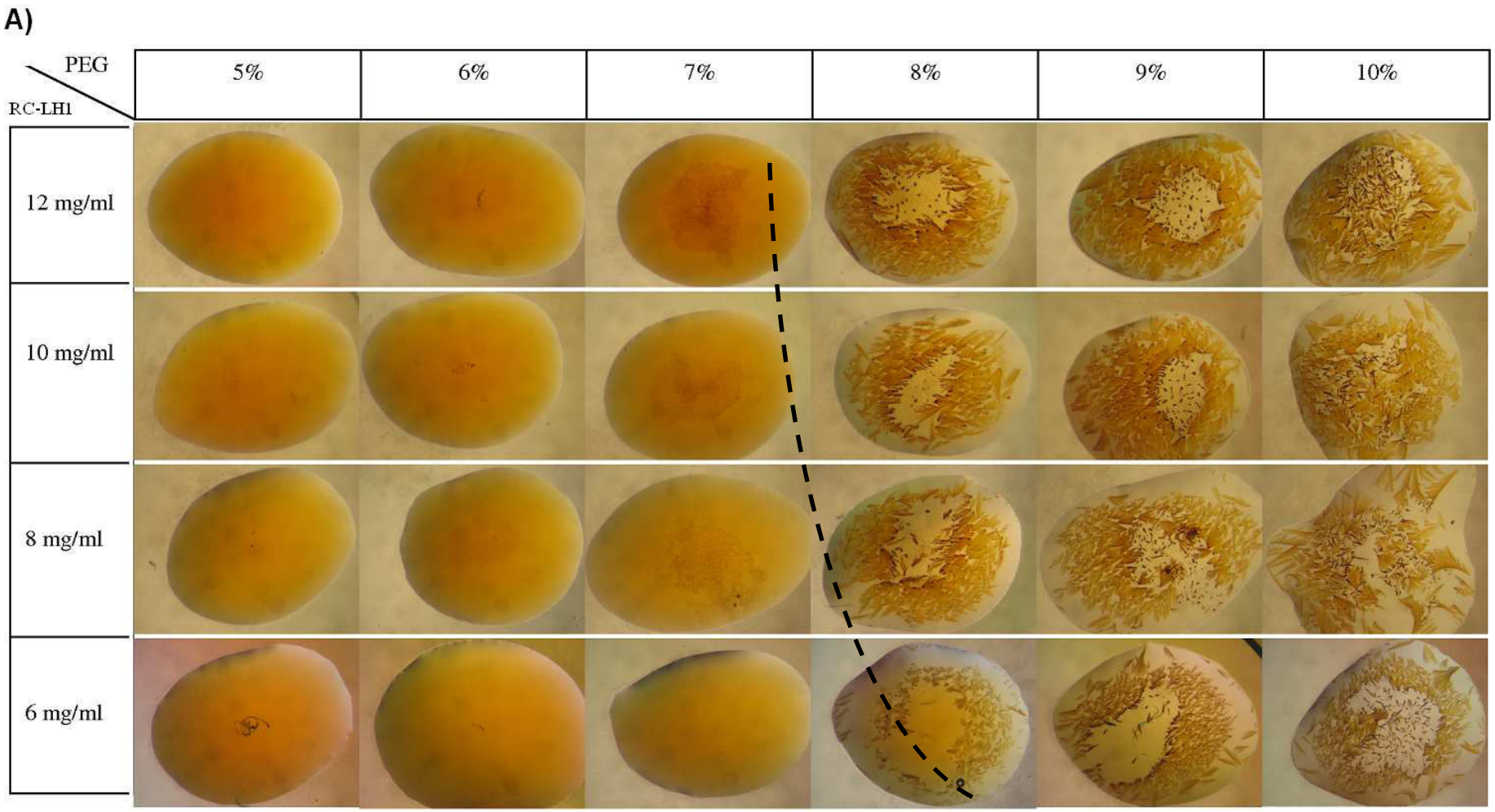
Figure 8 Phase transition map for DDβM and PCCαM micelles as a function of PEG 3,350 percentages.

This result suggests that crystallization of RC-LH1-pufX could occur at lower concentrations of crystallization agent when the membrane protein is purified in PCCαM compared to DDβM. Finally crystallization trials, using the vapor diffusion method, have been performed with the RC-LH1-pufX complex purified in DDβM (0.015%) and PCCαM (0.010%). As observed on the two morphodroms (Figures 9A and B), crystals of RC-LH1-pufX are observed in PCCαM at lower percentage of PEG 3,350 after 7 days at 20°C and lower concentration of the MP-surfactant complex, suggesting that its solubility curve is lower in PCCαM than in DDβM. This result is confirmed by optimization trials (Figure 10), which shows that for identical percentages of PEG, solutions of RC-LH1-pufX are supersaturated in presence of PCCαM than in DDβM. Crystals in PCCαM are more numerous and smaller than in DDβM.

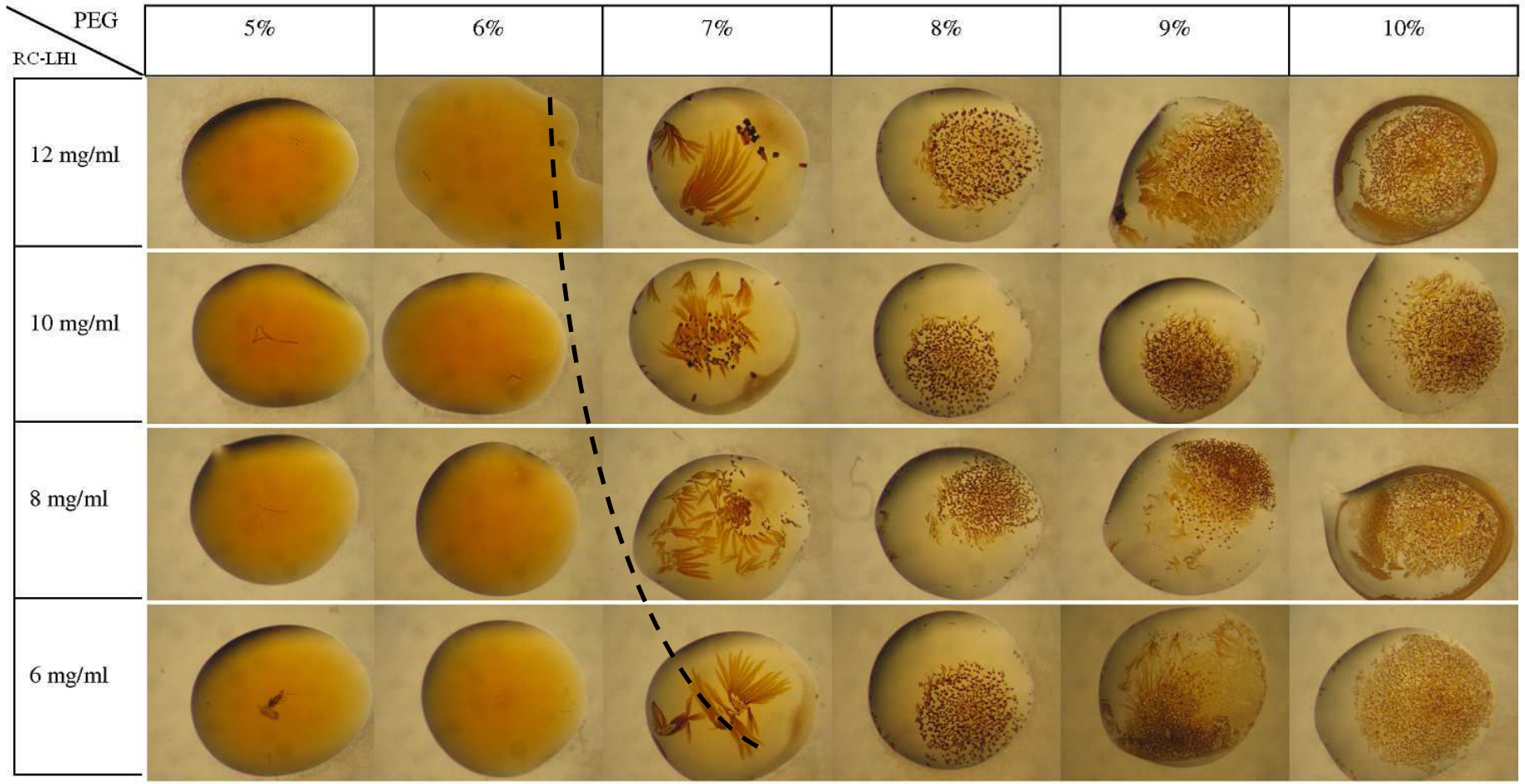
Surfactant (abbreviation)	***DDβM***	***PCCαM***
Formula	$C_{24}H_{46}O_{11}$	$C_{27}H_{48}O_{11}$
Total Number of electrons	278	298
Head Number of electrons	181	181
Chain Number of electrons	97	117
Formula Weight (Da)	510.60	548.66
cmc (mM / $g.L^{-1}$)	0.17 / 0.087	0.036 / 0.019
$\bar{v}_p$ ($cm^3.g^{-1}$) from density measurement	0.819	0.799
$\frac{\partial n}{\partial c}$ ($mL.g^{-1}$)	0.143	0.160
$V_{monomer}$ ($Å^3$) from density measurement	694.3	727.8
V_{head} ($Å^3$) from chemical formula	344.1	344.1
V_{chain} ($Å^3$) from chemical formula	350.2	383.7
ρ^{elect} ($e^-/ Å^3$) from density measurement	0.400	0.409
ρ^{elect} ($e^-/ Å^3$) for polar head group	0.526	0.526
ρ^{elect} ($e^-/ Å^3$) for hydrophobic chain	0.277	0.305
ρ^{elect} ($e^-/ Å^3$) for H_2O = 0.334		
I(0) (cm^{-1}) for 1% surfactant	0.247	0.426
Mw (kDa) SEC MALLS	65 ±3	90 ±1
Mw (kDa) SAXS	63 ±0.5	89 ±0.5
N_{agg}	124 -131	163-166
R_G (nm) SAXS	3.2	3.3
D_{max} (nm) SAXS	8.0	9.0

Table 1 Surfactant properties

Figure 9 Crystallization trials of RC-LH1-pufX at 6, 8, 10, 12 mg/mL with 5 to 10% Peg 3,350 in vapor diffusion (concentrations are initial concentration prior mixing): A) MP purified in DDβM, B) MP purified in PCCαM


A)
PEG
RC-LH1
5%
6%
7%
8%
9%
10%
12 mg/ml
10 mg/ml
8 mg/ml
6 mg/ml

B)



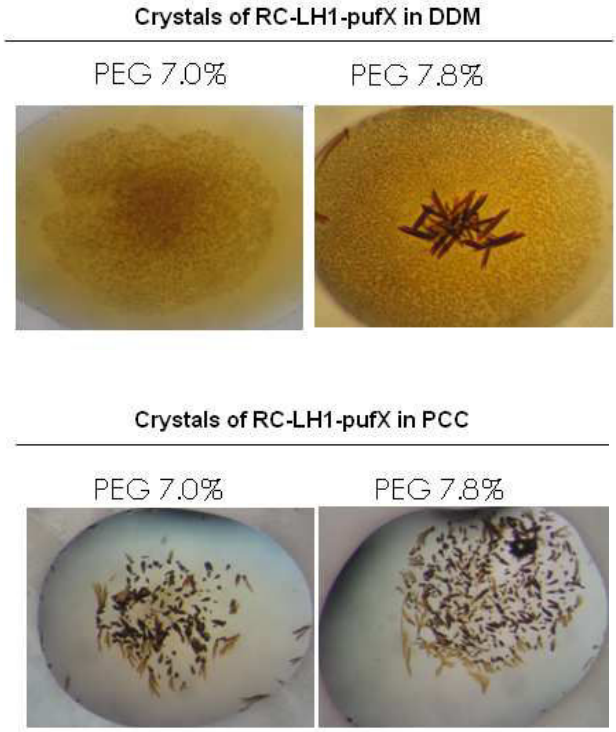


Figure10 Crystals of RC-LH1-pufX in DDβM and PPCαM

This result clearly demonstrates that there is a close correlation between intermicellar interactions and crystallization of RC-LH1-pufX in surfactants, since no other parameter - buffer, salt, precipitant, crystallization method - has been modified. The question that remains is whether these crystals in this new surfactant better diffract. First trials don't show improvement in the diffraction quality. As we mention in Introduction, detergent such as DDβM can destabilize membrane protein by intrusion of alkyl chains in the protein structure or by removing essential protein-bound lipids. It has recently been reported that adding phospholipids, which stabilizes MP structures, leads to MP crystals that diffract to better resolution. The nature and amount of phospholipids bound to RC-LH1-pufX have been characterized using a new high performance thin layer chromatography (HPTLC) assay [48]. It seems (Barret *et al*, personal communication) that when purified in PCCαM, RC-LH1-pufX associates 25 % more phospholipids than when purified in DDβM. This result has to be correlated with the non detergent effect of PCCαM and its higher hydrophobicity. Works are currently in progress to improve crystallization of RC-LH1-pufX in PCCαM and determine the amount and nature of phospholipids bound to the protein.

CONCLUSION

In this paper, we have compared micelle structure and intermicellar interactions of two mild surfactants, the classical dodecyl β maltoside and the derivative propyl(bi)cyclohexyl-α–maltoside in conditions used for membrane protein crystallization. We have first compared their structures in water by small angle X ray scattering complemented by gel permeation chromatography coupled to static light scattering. The surfactant micelle form factors are quite similar in shape but rather different in molar mass and aggregation number. We could fit SAXS experiments for both surfactants with a core-shell ellipsoid model. The PCC α maltoside appears a little larger but denser than DD-β-maltoside, which explains its more attractive behavior measured by second virial coefficients. A close correlation has been highlighted between higher attraction of micelles of PCCαM and lower cloud point boundary. Crystals of RC-LH1-pufX has finally been grown in PCCαM in conditions predicted by the surfactant phase diagrams. This work is pioneered in the crystallization field, by correlating modulation of surfactant structure hydrophobic moities, particle interactions and membrane protein crystallization. It opens ways for studies of new amphiphilic molecules such as stabilizing fluorinated surfactants [49] not yet used for membrane protein crystallization.

ACKNOWLEGMENT

This study was supported by a PhD grant from the region PACA (Provence Alpes Cote d'Azur-France) via FEDER funds. The SEC MALLS apparatus (from Wyatt Technology) was bought thank to financial supports from PACA, SANOFI-France and Avignon University. We are grateful to the European Synchrotron Radiation Facility for provision of synchrotron radiation facilities and to Petra Pernot and Adam Round for assistance in using beamline ID14-eh3. We would like to thank Dr. Marina Siponen for diffraction tests and Thomas Zemb for fruitful discussion.

REFERENCES

(1) George, A.; Wilson, W. W., Predicting protein crystallization from a dilute solution property. Acta Cryst. 1994, D50, 361-365.

(2) McMillan, W. G.; Mayer, J. E., The statistical thermodynamics of multicomponent systems. J. Chem. Phys. 1945, 13, 276–305.

(3) Zimm, B. H., Applications of the methods of molecular distribution to solutions of large molecules. J. Chem. Phys. 1946, 14, 164-179.

(4) Bonneté, F., Macromolecular crystallization controlled by colloidal interactions: the case of urate oxidase. In Crystallization / Book 1 [Online] Dr., M.; Andreeta, R. B., Eds. Intech: 2012; Chapter 13.

http://www.intechopen.com/books/crystallization-science-and-technology.

(5) Malfois, M.; Bonneté, F.; Belloni, L.; Tardieu, A., A model of attractive interactions to account for liquid-liquid phase separation of protein solutions. J. Chem. Phys. 1996, 105 (B), 3290-3300.

(6) Tardieu, A.; Le Verge, A.; Riès-Kautt, M.; Malfois, M.; Bonneté, F.; Finet, S.; Belloni, L., Proteins in solution : from X-ray scattering intensities to interaction potentials. J. Crystal Growth 1999, 196, 193-203.

(7) Vivares, D.; Belloni, L.; Tardieu, A.; Bonneté, F., Catching the PEG-induced attractive interaction between proteins. Eur. Phys. J. E. 2002, 9, 15-25.

(8) Guilloteau, J.-P.; Riès-Kautt, M. M.; Ducruix, A. F., Variation of lysozyme solubility as a function of temperature in the presence of organic and inorganic salts. J. Crystal Growth 1992, 122 (1-4), 223-230.

(9) Carbonnaux, C.; Riès-Kautt, M.; Ducruix, A., Relative effectiveness of various anions on the solubility of acidic Hypoderma lineatum collagenase at pH 7.2. Protein Sci. 1995, 4 (10), 2123-8.

(10) Bonneté, F.; Finet, S.; Tardieu, A., Second virial coefficient: variations with lysozyme crystallization conditions. J. Crystal Growth 1999, 196, 403-414.

(11) Vivarès, D.; Bonneté, F., X-ray scattering studies of Aspergillus flavus urate oxidase: towards a better understanding of PEG effects on the crystallization of large proteins. Acta Cryst. 2002, D58, 472-479.

(12) Giffard, M.; Delfosse, V.; Sciara, G.; Mayer, C.; Cambillau, C.; El Hajji, M.; Castro, B.; Bonneté, F., Surfactant Poloxamer 188 as a New Crystallizing Agent for Urate Oxidase. Cryst. Growth Des. 2009, 9, 4199-4206.

(13) Hitscherich, C. J.; Kaplan, J.; Allaman, M.; Wiencek, J.; Loll, P. J., Static light scattering studies of OmpF porin : implications for integral membrane protein crystallization. Protein Sci. 2000, 9, 1559-1566.

(14) Hitscherich, C.; Aseyev, V.; Wiencek, J.; Loll, P. J., Effects of PEG on detergent micelles: implications for the crystallization of integral membrane proteins. Acta Cryst 2001, D57, 1020-1029.

(15) Loll, P.; Hitscherich, C.; Aseyev, V.; Allaman, M.; Wiencek, J., Assessing micellar interaction and growth in detergent solutions used to crystallize integral membrane proteins. Crystal Growth & Design 2002, 2 (6), 533-539.

(16) Berger, B. W.; Gendron, C. M.; Rlobinson, C. R.; Kaler, E. W.; Lenhoff, A. M., The role of protein and surfactant interactions in membrane-protein crystallization. Acta Cryst 2005, D61, 724-730.

(17) Berger, B. W.; Gendron, C. M.; Lenhoff, A. M.; Kaler, E. W., Effects of additives on surfactant phase behavior relevant to bacteriorhodopsin crystallization. Protein Sci 2006, 15 (12), 2682-2696.

(18) Berger, B. W.; Blamey, C. J.; Naik, U. P.; Bahnson, B. J.; Lenhoff, A. M., Roles of additives and precipitants in crystallization of calcium- and integrin-binding protein. Crystal Growth & Design 2005, 5 (4), 1499-1507.

(19) Prive, G. G., Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. Methods: Structural Biology of Membrane Proteins 2007, 41 (4), 388-397.

(20) Wiener, M. C., A pedestrian guide to membrane protein crystallization. Methods 2004, 34 (3), 364-372.

(21) Zhang, H.; Kurisu, G.; Smith, J. L.; Cramer, W. A., A defined protein-detergent-lipid complex for crystallization of integral membrane proteins: The cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences 2003, 100 (9), 5160-5163.

(22) Park, K. H.; Berrier, C.; Lebaupain, F.; Pucci, B.; Popot, J. L.; Ghazi, A.; Zito, F., Fluorinated and hemifluorinated surfactants as alternatives to detergents for membrane protein cell-free synthesis. Biochemical Journal 2007, 403, 183-187.

(23) Nehmé, R.; Joubert, O.; Bidet, M.; Lacombe, B.; Polidori, A.; Pucci, B.; Mus-Veteau, I., Stability study of the human G-protein coupled receptor, Smoothened. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes 2010, 1798 (6), 1100-1110.

(24) Duval-Terrié, C.; Cosette, P.; Molle, G.; Muller, G.; Dé, E., Amphiphilic biopolymers (amphibiopols) as new surfactants for membrane protein solubilization. Protein Science 2003, 12 (4), 681-689.

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

(26) Tribet, C.; Audebert, R.; Popot, J. L., Amphipols: Polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1996, 93 (26), 15047-15050.

(27) Hovers, J.; Potschies, M.; Polidori, A.; Pucci, B.; Raynal, S.; Bonneté, F. o.; Serrano-Vega, M. J.; Tate, C. G.; Picot, D.; Pierre, Y.; Popot, J.-L.; Nehmé, R.; Bidet, M.; Mus-Veteau, I.; Bußkamp, H.; Jung, K.-H.; Marx, A.; Timmins, P. A.; Welte, W., A class of mild surfactants that keep integral membrane proteins water-soluble for functional studies and crystallization. Mol. Membr. Biol. 2011, 28 (3), 171-181.

(28) Comayras, R.; Jungas, C.; Lavergne, J., Functional consequences of the organization of the

photosynthetic apparatus in Rhodobacter sphaeroides - I. Quinone domains and excitation transfer in chromatophores and reaction center center dot antenna complexes. J. Biological Chemistry 2005, 280 (12), 11203-11213.

(29) Konarev, P. V.; Volkov, V. V.; Sokolova, A. V.; Koch, M. H. J.; Svergun, D. I., PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. J. Appl. Crystallogr. 2003, 36, 1277-1282.

(30) Orthaber, D.; Bergmann, A.; Glatter, O., SAXS experiments on absolute scale with Kratky systems using water as a secondary standard. J. Appl. Crystallogr. 2000, 33, 218-225.

(31) Svergun, D. I., Determination of the Regularization Parameter in Indirect-Transform Methods Using Perceptual Criteria. J. Appl. Crystallogr. 1992, 25, 495-503.

(32) Kohlbrecher, J. SASfit, ver. 0.93.3.

(33) Tanford, C., The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes. John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1980; Vol. 18, p 687.

(34) Israelachvili, J. N., Intermolecular and surface forces. Academic Press: Burlington, MA, 2011.

(35) Dupuy, C.; Auvray, X.; Petipas, C.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A., Anomeric Effects on the Structure of Micelles of Alkyl Maltosides in Water. Langmuir 1997, 13 (15), 3965-3967.

(36) Lipfert, J.; Columbus, L.; Chu, V. B.; Lesley, S. A.; Doniach, S., Size and shape of detergent micelles determined by small-angle x-ray scattering. Journal of Physical Chemistry B 2007, 111 (43), 12427-12438.

(37) He, Z.; Garamus, V. M.; Funari, S. S.; Malfois, M.; Willumeit, R.; Niemeyer, B., Comparison of Small Angle scattering Methods for the structural analysis of Octyl-b-maltopyranoside micelles. J. Phys. Chem. B 2002, 106, 7596.

(38) Guinier, A.; Fournet, G., Small angle scattering of X-rays. Wiley: New York, 1955.

(39) Le Maire, M.; Champeil, P.; Møller, J. V., Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. Biochim. Biophys. Acta 2000, 1508 (1-2), 86-111.

(40) Slotboom, D. J.; Duurkens, R. H.; Olieman, K.; Erkens, G. B., Static light scattering to characterize membrane proteins in detergent solution. Methods 2008, 46 (2), 73-82.

(41) Fritz, G.; Bergmann, A., Interpretation of small-angle scattering data of inhomogeneous ellipsoids. Journal of Applied Crystallography 2004, 37, 815-822.

(42) Bauer, C.; Bauduin, P.; Girard, L.; Diat, O.; Zemb, T., Hydration of sugar based surfactants under osmotic stress: A SAXS study. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects 2012, 413, 92-100.

(43) Asakura, S.; Oosawa, F., On the interaction between two bodies immersed in a solution of macromolecules. J. Chem. Phys. 1954, 22, 1255-1256.

(44) Tanaka, S.; Ataka, M.; Onuma, K.; Kubota, T., Rationalization of membrane protein crystallization with polyethylene glycol using a simple depletion model. Biophys. J. 2003, 84, 3299-3306.

(45) Wiener, M. C.; Snook, C. F., The development of membrane protein crystallization screens based upon detergent solution properties. Journal of Crystal Growth 2001, 232 (1-4), 426-431.

(46) Koszelak-Rosenblum, M.; Krol, A.; Mozumdar, N.; Wunsch, K.; Ferin, A.; Cook, E.; Veatch, C. K.; Nagel, R.; Luft, J. R.; DeTitta, G. T.; Malkowski, M. G., Determination and application of empirically derived detergent phase boundaries to effectively crystallize membrane proteins. Protein Science 2009, 18 (9), 1828-1839.

(47) Guan, L.; Smirnova, I. N.; Verner, G.; Nagamori, S.; Kaback, H. R., Manipulating phospholipids for crystallization of a membrane transport protein. PNAS 2006, 103 (6), 1723-1726.

(48) Barret, L.-A.; Polidori, A.; Bonneté, F.; Bernard-Savary, P.; Jungas, C., A new high-performance thin layer chromatography-based assay of detergents and surfactants commonly used in membrane protein studies. Journal of Chromatography A 2013, 1281 (0), 135-141.

(49) Breyton, C.; Gabel, F.; Abla, M.; Pierre, Y.; Lebaupain, F.; Durand, G.; Popot, J. L.; Ebel, C.; Pucci, B., Micellar and Biochemical Properties of (Hemi)Fluorinated Surfactants Are Controlled by the Size of the Polar Head. Biophysical Journal 2009, 97 (4), 1077-1086.

Journal of Chromatography A, 1281 (2013) 135–141

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

A new high-performance thin layer chromatography-based assay of detergents and surfactants commonly used in membrane protein studies

Laurie-Anne Barret[a,b,c,d,e], Ange Polidori[d,e], Françoise Bonneté[d,e], Pierre Bernard-Savary[f], Colette Jungas[a,b,c,*]

[a] CEA, IBEB, Lab Bioenerget Cellulaire, Saint-Paul-lez-Durance, F-13108, France
[b] CNRS, UMR 7265 Biol Veget & Microbiol Environ, Saint-Paul-lez-Durance, F-13108, France
[c] Aix-Marseille Univ, Saint-Paul-lez-Durance, F-13108, France
[d] Université d'Avignon et des pays du Vaucluse, Equipe Chimie Bioorganique et Systèmes Amphiphiles, 33 rue Louis Pasteur, F 84000 Avignon, France
[e] Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247, CNRS-Universités Montpellier 1&2, 15 avenue Charles Flahaut, F-34093 Montpellier Cedex 05, France
[f] Chromacim SAS, l'Ancienne église, F-38340 Pommiers la Placette, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 31 October 2012
Received in revised form 9 January 2013
Accepted 11 January 2013
Available online 24 January 2013

Keywords:
HPTLC method
Membrane protein detergent assay
n-Dodecyl-β-D-maltoside determination
Detergent exchange analysis

ABSTRACT

The hydrophobic nature of membrane proteins (MPs) necessitates the use of detergents for their extraction, solubilization and purification. Because the concentration of amphiphiles is crucial in the crystallization process, detergent quantification is essential to routine analysis. Here we describe a quantitative high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) method we developed for the detection of small quantities of detergent bound to solubilized MPs. After optimization of aqueous deposit conditions, we show that most detergents widely used in membrane protein crystallography display distinctive mobilities in a mixture of dichloromethane, methanol and acetic acid 32:7.6:0.4 (v/v/v). Migration and derivatization conditions were optimized with *n*-dodecyl-β-D-maltoside (DDM), the most popular detergent for membrane protein crystallization. A linear calibration curve very well fits our data from 0.1 to 1.6 μg of DDM in water with a limit of detection of 0.05 μg. This limit of detection is the best achieved to date for a routine detergent assay, being not modified by the addition of NaCl, commonly used in protein buffers. With these chromatographic conditions, no prior treatment is required to assess the quantities of detergent bound to purified MPs, thus enabling the quantification of close structure detergents via a single procedure. This HPTLC method, which is fast and requires low sample volume, is fully suitable for routine measurements.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Obtaining suitable conditions for the formation of stable protein–lipid–detergent complexes [1] for crystallization is a daunting task [2–5]. Following purification of membrane proteins (MPs), one of the major problems frequently encountered is an excess of concentrated detergent. During any concentration step in the purification of MPs, free detergent micelles typically concentrate along with proteins, even when a large weight cutoff (MWCO) is used. Additionally, excess detergent leads to detergent molecules being loosely bound to the hydrophobic parts of MPs. This in turn can interfere with or hinder the formation of protein–protein contacts in a growing crystal [6–8]. It is therefore essential to carefully control the quantity of detergent prior to crystallization in order to eliminate these negative effects. Moreover, crystal quality may also be improved by adding or exchanging detergents in the crystallization drop [9]. However it is difficult to make these adjustments because there are no simple, rapid methods available to routinely assess the quantities of detergent in crystallization solutions and to determine the extent of the detergent replacement required.

It is to meet this need that we developed a high performance thin-layer chromatography (HPTLC) method which provides a precise quantification of *n*-dodecyl-β-D-maltoside (DDM) in MP preparations, taking as a model the RC–LH1–pufX complex [10] from *Rhodobacter* (*Rb.*) *blasticus*. This bioenergetic complex is a transmembrane protein complex essential in the conversion of light energy to proton-driving force in photosynthetic purple bacteria.

Existing techniques to determine detergent concentration include radiolabeled detergent [11], Fourier transform infrared spectroscopy [12], a contact angle measuring device [13], a sugared detergent assay [14], a modified Bradford-based Bio-Rad dye assay [15], a gas chromatography method [16], and thin-layer

* Corresponding author at: CEA, IBEB, Lab Bioenerget Cellulaire, Saint-Paul-lez-Durance, F-13108, France. Tel.: +33 4 42 25 39 35; fax: +33 4 42 25 47 01.
E-mail address: colette.jungas@cea.fr (C. Jungas).

0021-9673/$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.061

chromatography (TLC) [17]. Not only do they entail a low detection limit, but also most of these techniques are unsuitable for routine analysis in the field of MPs because they require time-consuming pre-treatment of samples before analysis. Here, we report on the use of HPTLC to determine DDM and derive detergent concentrations present after MP purification. This led us to a systematic investigation of several HPTLC parameters for optimal detection and separation of two chemically close amphiphiles, DDM detergent and a newly synthesized hemifluorinated surfactant (FH). When the method was combined with the use of absorbing materials (e.g., Bio-Beads, Pierce) to remove excess DDM from MP solutions, rapid and accurate results were obtained. A TLC method is already successfully used for this purpose [17], being able to afford an indication of the extent of exchange between two detergents in the course of protein purification. Here, we show that our HPTLC method increases the limit of detection by several orders of magnitude without requiring any prior treatment, quickly and accurately assessing detergent concentrations.

Finally, the HPTLC method can be used to determine both the quantities and the specific types of lipids co-purified with MPs, thus enhancing the characterization of protein–detergent complexes.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

n-Dodecyl-β-D-maltopyranoside or *n*-dodecyl-β-D-maltoside (DDM) was provided by Biomol (Hamburg, Germany). Suppliers were Merck (Darmstadt, Germany) for octyl β-D-thioglucopyranoside (OTG), Fluka (Buchs, Switzerland) for N,N dimethyldodecylamine-N-oxide solution (2.3%) (LDAO), and Anatrace (Maumee, US) for decyl-β-D-maltopyranoside (DM), octyl-β-D-glucopyranoside (OG), and *n*-dodecyl-β-D-thiomaltopyranoside (DTM). Trans-4-(trans-4′-Propyl) bicyclohexyl-α-D-maltopyranoside (PCC) [18] and 6,6,7,7,8,8,9,9,9-nonafluorononyl-β-D-maltopyranoside (FH) were synthesized at research center UMR 5247 (Chimie Bioorganique et Systèmes Amphiphlies team) in Avignon. Bio-beads SM-2 absorbent (20–50 mesh) were manufactured by Pierce (Rockford, US).

For the mobile phase, 1-butanol, 2-propanol, diethyl ether, chloroform, cyclohexane and dichloromethane were supplied by Prolabo VWR (Fontenay-sous-Bois, France), methanol and ethyl-acetate were supplied by Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany), tetrahydrofuran and toluene by Merck and acetonitrile by Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). All solvents were of analytical grade. Acetic acid 99.8% was from Sigma–Aldrich and ammonium hydroxide solution 25% from Fluka. HPTLC silica gel 60 F_{254} plates (10 cm × 20 cm) were from Merck and thick paper pads were supplied by CAMAG (Muttenz, Switzerland). For derivatization, copper (II) sulfate pentahydrate was from Prolabo VWR, and o-phosphoric acid 85% and sulfuric acid 99.999% were from Sigma–Aldrich.

2.2. Purification of Rb. blasticus RC–LH1–pufX complex

Dimeric RC–LH1–pufX complex was isolated from *Rb. blasticus* photosynthetic membranes according to the procedure described in [19]. In the final purification step, the protein was eluted from Mono Q 5/50 GL column (GE Healthcare, Glattbrugg, Switzerland) in a buffer containing Tris–HCl 20 mM pH 8, DDM 0.01% (0.1 mg/mL) and NaCl 375 mM. The protein content of purified RC–LH1–pufX complex fractions was determined using the BCA Protein Assay Reagent Kit (Interchim, France).

2.3. Standard solutions

Stock solutions of detergents (10 mg/mL) were prepared in deionized water and stored at −18 °C. Working standard solutions at 0.1 mg/mL were prepared by volume dilution in water or in Tris–HCl 20 mM pH 8, NaCl 375 mM of individual stock solutions.

2.4. HPTLC set-up

All instruments are manufactured by CAMAG and were purchased from Chromacim (Pommier la Placette, France).

2.4.1. HPTLC aqueous deposit

In order to analyze samples directly eluted following purification with no prior treatment, it was necessary to create conditions suitable for aqueous deposits. For this purpose, a whole set of specific HPTLC application parameters were investigated. Solutions of DDM (0.1 mg/mL) were applied (from 0.5 to 18 μL) on the HPTLC plates as 6 mm bands with the Automatic TLC sampler 4 (ATS4) at least 8 mm from the bottom and 20 mm from the left side of the plate. Spaces between tracks were automatically adjusted according to the number of deposits and the plate size. To test the separation of DDM and FH, 1–5 μL mixtures composed of 0.1 mg/mL of each species were deposited and eluted.

2.4.2. Optimization of the mobile phase

The mobile phase composition was optimized via the CAMAG procedure based on Snyder's solvent selectivity triangle [20,21]. A mixture of DDM and FH (0.25 μg each) dissolved in water was applied with the ATS4 on HPTLC plates cut with the smartCUT Plate Cutter (3 cm × 5 cm). The HPTLC plate was developed manually in a small pre-saturated (15 min) flat bottom TLC cylindrical developing tank (outside dimension: 4.5 cm × 9 cm, Sigma–Aldrich) until the migration front was roughly 0.7 cm from the top of the plate. The plate was then dried for 5 min at room temperature and derivatization performed.

2.4.3. Optimization of the post-chromatographic derivatization

Two staining reagents based on sulfuric acid were tested before the plates were heated at 120 °C for 15 min, using sprayed-on sulfuric acid solution diluted in 50% water and immersion in sulfuric acid diluted in 90% ethanol. The modified copper sulfate reagent [22] used for lipid detection was also investigated. Chromatogram immersion device III was used to dip the plate in the staining reagent at 2.5 cm/s for 6 s. After a short heating at 120 °C (6 min) on the TLC Plate Heater III, brownish bands appeared on the white background of the plates.

2.4.4. Chromatography

Except for the initial experiments, chromatography was performed in the ADC2 automatic developing chamber. The migration chamber conditions were also investigated.

2.4.5. Quantification by densitometry

The absorbance of detergent bands was measured with TLC scanner 3 at its maximum wavelength of intensity, i.e. 366 nm, using a Hg lamp. Densitometric scanning was performed in relation to peak height and area. Slit dimensions were set at 4 mm × 0.1 mm, scanning speed at 20 mm/s and the data resolution at 100 μm/step. Data obtained were processed with winCATS software version 1.4.4.6337.

2.4.6. Precise evaluation

Evaluation was based on calculating both peak height and peak area. The precision of the method was evaluated by CAMAG WinCATS software with the calculation of the coefficient of variation

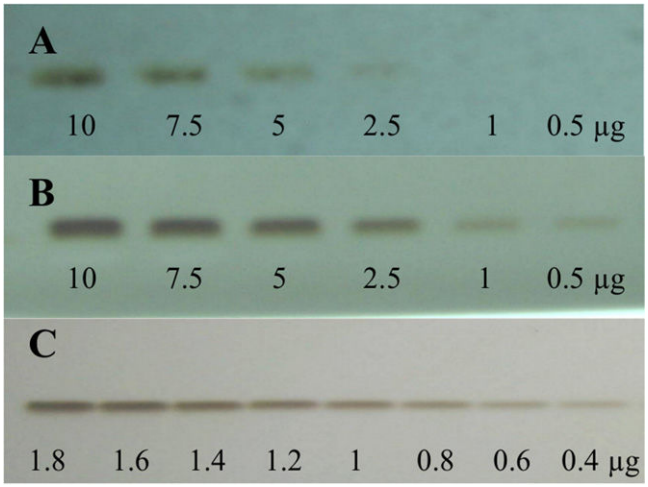


Fig. 1. Comparison of different methods for DDM detection. Plates were (A) sprayed with a 50% sulfuric acid solution and heated 10 min at 120 °C, (B) dipped in a solution of sulfuric acid 10% in ethanol before being heated 10 min at 120 °C and (C) dipped in a copper (II) sulfate reagent and heated 6 min at 120 °C. DDM quantities are in µg.

(CV) on analytical measurements. CV was evaluated three times from 6 and 12 deposits (2 µL) of DDM (0.1 mg/mL).

2.5. HPTLC application

2.5.1. Quantification of DDM in presence of RC–LH1–pufX complex

Elution buffer and protein elution fraction from anion exchange chromatography (0.5–5 µL) were directly applied in triplicate without any prior treatment. The experimental parameters were identical to those used for standard analysis.

2.5.2. Kinetics of DDM removal using Bio-beads

DDM capture was performed by incubation of the concentrated protein (10 mg/mL) at 20 or 22 °C with Bio-beads continuously stirred and previously washed with methanol and water. Samples (8–20 µL) were withdrawn at various time intervals for determination of the DDM concentration. For 10 mg/mL of protein, we used either 270 or 360 mg/mL of Bio-beads, as experimentally determined.

3. Results and discussion

3.1. Post-chromatographic derivatization

Post-chromatographic derivatization procedures were first optimized for detergent detection. Staining of DDM was performed with the sulfuric acid solution using a classic chloroform–methanol 20:18 (v/v) mixture as mobile phase. Fig. 1A shows thin-layer chromatograms of the DDM concentrations ranging from 0.5 to 10 µg after visualization by spraying dye. If the plate is dipped in sulfuric acid diluted in 10% ethanol, the sensitivity of the detection increases significantly by a factor of 5 (compare Fig. 1A and B). With the aim of improving detection quality of these two chemically close detergents, we also tested the staining method usually applied for lipid detection. As shown in Fig. 1C, the copper sulfate solution further improves the sensitivity of the staining in the range of 0.4–1.8 µg DDM, leading to the best-defined bands. The absorbance of the brownish bands is measured with the TLC Scanner 3 at its maximum of intensity, i.e. 366 nm using the Hg lamp.

3.2. Chromatographic method optimization

The multi-step approach based on the Snyder selectivity triangle separation [20] was used to optimize the mobile phase composition and to separate two structurally similar amphiphiles (same polar head, introduction of a fluorinated tip in the hydrophobic part). With a standard mixture of DDM/FH 1:1 (w/w), HPTLC runs were first performed using pure solvents from each Snyder group (Fig. 2, stage 1): diethyl ether (Group I), 1-butanol, 2-propanol, methanol and 2-butanol (Group II), tetrahydrofuran (Group III), dichloromethane (Group V), acetonitrile and ethyl acetate (Group VI), toluene (Group VII), chloroform (Group VIII). Other solvents such as 2-butanol, 2-propanol, 1-butanol (data not shown) and tetrahydrofuran, which display diffuse bands, were eliminated from further experiments.

In the next step, the solvent strength was adjusted in order to obtain a retention factor (R_f) ranging from 0.2 to 0.7. Addition of cyclohexane (30%) to methanol did not provide good results. For chloroform, dichloromethane, acetonitrile, ethyl acetate, toluene, and diethyl ether, new runs carried out in the presence of methanol (10–30%), which increased the solvent strength, were not conclusive. Only the mobile phases composed of dichloromethane/methanol 8:2 (v/v) and chloroform/methanol 8:2 (v/v) gave a good separation between the two detergents (Fig. 2, stage 2). To further improve this separation, the effect of pH modifiers on the separation was tested after addition of 1% acid or base. A mixture composed of dichloromethane/methanol/acetic acid 32:7.6:0.4 (v/v/v) was selected as the best mobile phase for the separation of DDM and FH in two well-defined bands (Fig. 2, stage 3). Snyder's method also selects the mobile phase used by Ericks et al. in TLC [17] although, in our experimental conditions, this mixture led to a lower resolution (Fig. 2. stage 3).

The migration chamber conditions were also investigated. Three options were tested in the automated developing chamber ADC 2: (i) a 15 min tank saturation (Fig. 3A), (ii) a 15 min tank saturation using a thick porous paper white pad (Fig. 3B) and (iii) a 10 min tank saturation and plate preconditioning (Fig. 3C). The most promising results were obtained after simple tank saturation (Fig. 3A), further improved by using a double migration procedure on a shorter distance (2 mm × 50 mm) instead of 70 mm (Fig. 3D). The final procedure was therefore adopted as follows: chromatographic conditions were set using two cycles of tank saturation with dichloromethane/methanol/acetic acid 32:7.6:0.4 (v/v/v), followed by plate elution (50 mm) and plate drying (5 min). As the mobile phase is the same for both cycles, the second tank saturation was shortened from 15 to 5 min. In these conditions, the relative migration distances are found to be 0.37 and 0.44 for FH and DDM respectively (Fig. 3D). Note that some variations can be observed depending on parameters such as silica humidity and temperature, measured by a captor located in the developing chamber, (1st migration: 23.5 °C, 54.8% of relative humidity; 2nd migration: 27.3 °C, 46.17% of relative humidity).

3.3. HPTLC aqueous deposit

First, using a mixture of methanol/water 1:1 (v/v) as rinsing solvent is essential, to avoid the risk of protein aggregation in the circuit of the automatic sample ATS4 (needle, syringe and tubing). Since detergents tend to foam under too vigorous manipulation conditions, the needle is placed at least 1 mm above the vial bottom and the syringe filling speed significantly decreased (3 µL/s). Vacuum filling time is set to 2 s, to eliminate micro air-bubbles that may appear in the syringe at the beginning of the sampling process. An initial syringe-full of the sample is used for rinsing purposes only, with the corresponding 30–40 µL of sample discarded. The

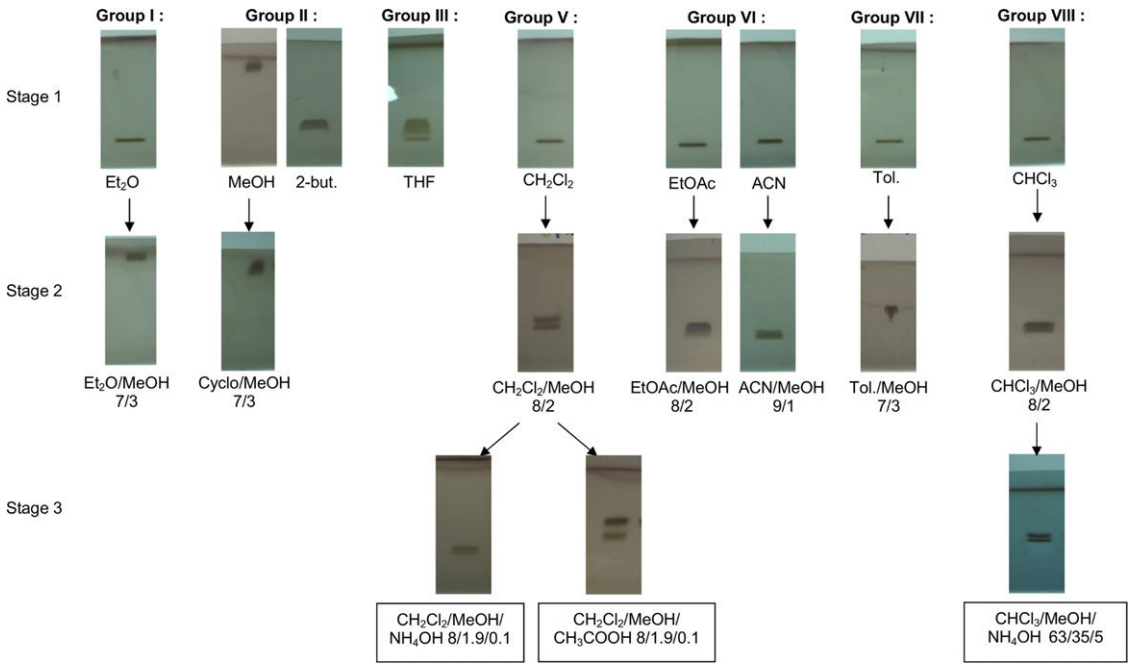


Fig. 2. Mobile phase optimization. A standard mixture of DDM/FH (0.5 μg each) in water is sprayed on HPTLC plates of 3 cm × 5 cm with ATS4. Stage (A) elution with pure solvents from different selectivity groups of the Snyder classification. Stage (B) adjustment of solvent strength (addition of cyclohexane for $R_f > 0.8$ or methanol for $R_f < 0.2$). Stage (C) addition of 1% of modifiers (acetic acid or ammonium hydroxide). Solvents: diethyl ether (Et_2O), methanol (MeOH), 2-butanol (2-but.), tetrahydrofuran (THF), dichloromethane (CH_2Cl_2), acetonitrile (ACN), ethyl acetate (EtOAC), toluene (Tol.), chloroform ($CHCl_3$), cyclohexane (Cyclo), acid acetic (CH_3COOH), ammonium hydroxide (NH_4 OH).

second sampling is applied to the plate. Therefore the minimum sample volume required for analysis inside the vial is 150 μL.

Due to their higher polarity and lower volatility compared to the usual organic solvents, aqueous samples are sprayed under nitrogen pressure at a lower application speed (50 nL/s), to dry the bands during application and avoid further diffusion.

3.4. Quantification of DDM in water

The standard calibration for DDM ranging from 0.05 μg to 1.8 μg is presented in Fig. 4A. Plotting either peak areas or peak heights as a function of quantity of DDM gives a linear calibration curve between 0.1 and 1.6 μg with an acceptable residual standard deviation of 2.2% and a limit of quantification (LOQ) of 0.1 μg. Precision evaluation gives a coefficient of variation of 4.5% for both 6 and 12 identical DDM deposits (0.2 μg).

3.5. Influence of ionic strength on analysis of DDM

First trials showed lower mobility for DDM in water than DDM present in protein sample solution, perhaps due to the difference in ionic strength between calibration standards and samples (data not shown). Therefore, as the protein is eluted in a buffer composed of Tris–HCl 20 mM pH 8, DDM 0.01% and NaCl 375 mM, we performed the calibration curve in the same buffer. This new preparation yields identical relative mobility for standards and samples and the CV on 12 identical calibration spots remains unchanged (4.3%) with 375 mM NaCl. With this new standard preparation, a Michaelis–Menten calibration fits our data from 0.1 to 1.4 μg, with

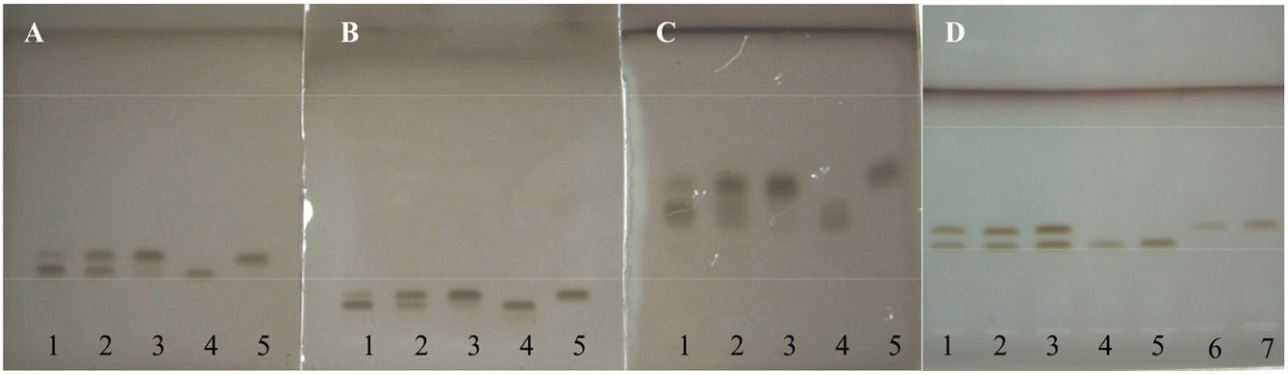


Fig. 3. Optimization of development conditions for DDM and FH. HPTLC plates developed in dichloromethane/methanol/acetic acid (32/7.6/0.4), with various migration conditions: (A) 15 min tank saturation, (B) 15 min tank saturation with pad, (C) 10 min plate preconditioning, (D) double migration preceded by a 15 min and a 5 min tank saturation. On plates A, B, C, (lanes 1–3), different combinations (μg) of the same detergent mixture FH/DDM respectively were tested (1:4), (2.5:2.5) and (4:1). 2.5 μg of each surfactant was added to the lanes 4 (DDM) and 5 (FH). Plate D (lanes 1–3) shows the same ratio detergent mixture FH/DDM applied at different concentrations (μg) 1:1, 1.5:1.5 and 2:2. 0.9 and 1.8 μg of FH were spotted in lanes 4 and 5 and 0.5 and 1.5 μg DDM in lanes 6–7.

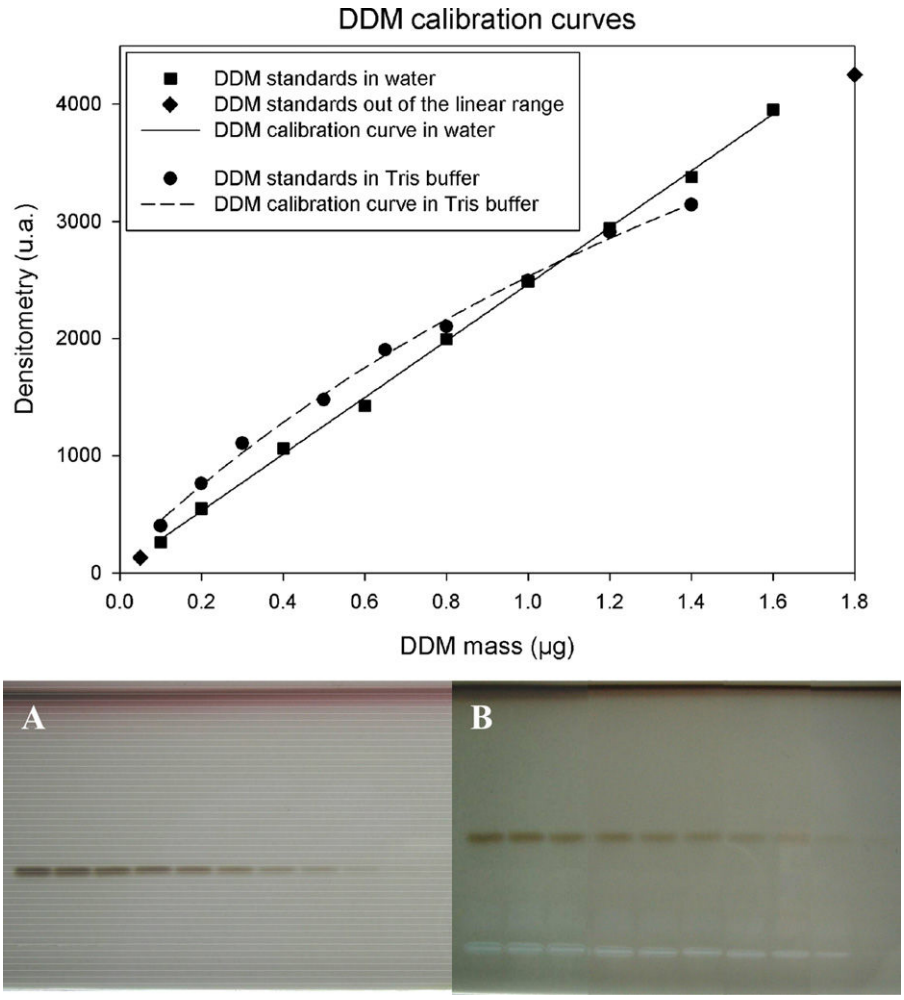


Fig. 4. Calibration curve for DDM in water solution. Between 0.5 µg and 18 µg of a 0.1 mg/mL DDM solution in water (A) or in Tris buffer (B) are deposited on HPTLC plates and chromatographed. The equations were $y = 43.27 + 2.42x$, $R^2 = 0.9995$, SD 4% for DDM in water and $y = 123.88 + (8506.9)/(2.537 + x)$, SD 4%. Note that white marks are seen at deposit positions in presence of NaCl.

a standard deviation of 3.97% (Fig. 4, plate B) which we judge to be fully satisfactory.

3.6. Applications

3.6.1. Quantification of DDM in presence of RC–LH1–pufX complex: determination of RC–LH1–pufX belt

Fig. 5 depicts a chromatogram of purified RC–LH1–pufX complex eluted from an anion-exchange column. As can be seen, the total DDM quantity present in the purified preparation of the RC–LH1–pufX complex migrates in a single band in the same position as standard samples. Our method contrasts with the TLC assay [17], where a significant portion of the detergent does not migrate and remains in the original position. This defect is probably due to the high protein concentration that needs to be deposited to analyze the associated detergent concentration. Furthermore, the DDM assay after the purification column gives a mean value of 0.096 mg/mL (for a triplicate measure) for a prepared buffer composition of 0.1 mg/mL, strongly indicating the efficacy of our HPTLC method.

Total DDM includes the contribution of both protein-free detergent micelles and protein-bound detergent molecules, the so-called belt. Following MP purification, the proportion of bound DDM is obtained by subtracting the free DDM micelle concentration (elution buffer) from total DDM. Mean values from five independent

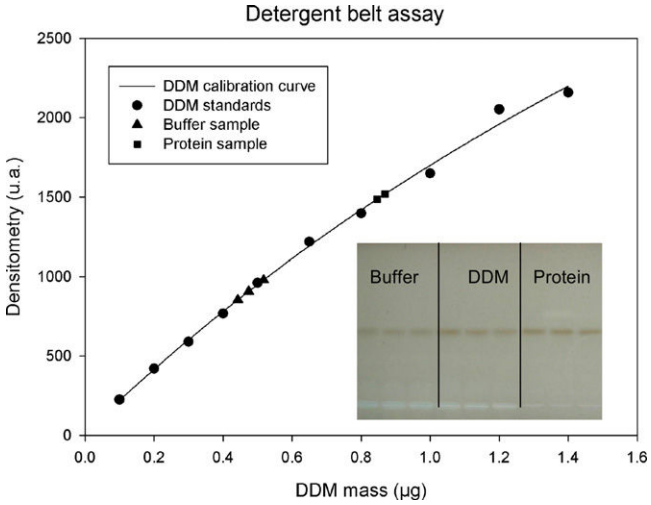


Fig. 5. Evaluation of the final detergent protein ratio following RC–LH1–pufX purification. DDM standards in Tris–NaCl (circles) ranging from 0.1 to 1.4 µg are fitted by a Michaelis–Menten calibration curve. 5 µL of elution buffer (triangles) and 1 µL of the purified PM (0.79 mg/ml) (square) were applied in triplicate.

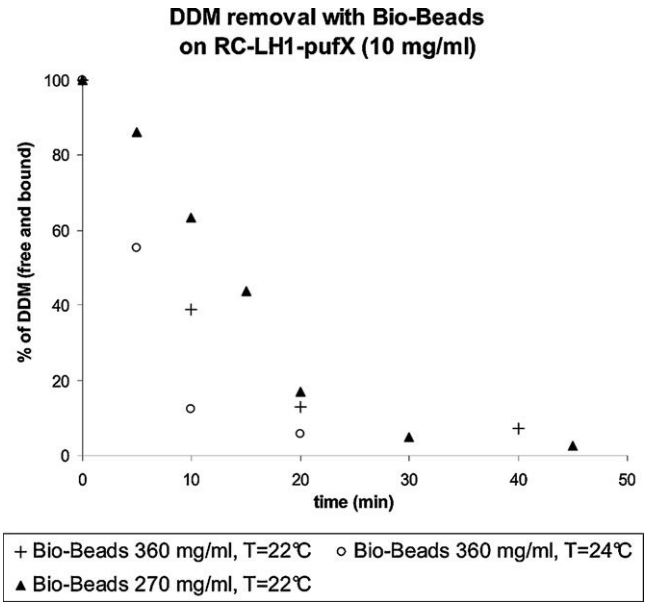


Fig. 6. Time course of DDM removal by Bio-beads use. Evolution of the residual DDM quantities in concentrated MP samples in the presence of different Bio-bead concentrations.

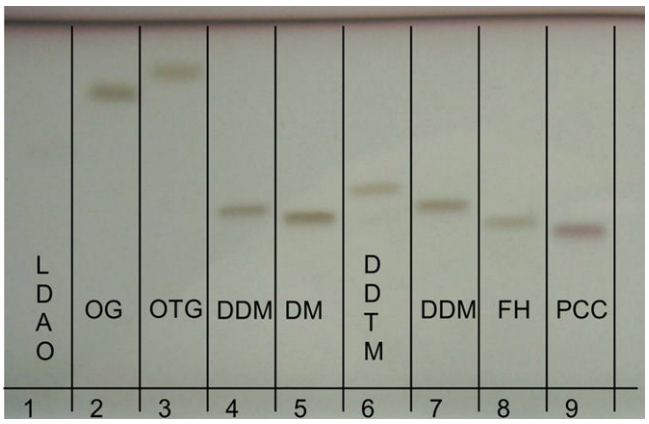


Fig. 7. Separation of surfactants frequently used in the field of MP via HPTLC. 1 μg of each surfactant in water is sprayed-on and developed with optimized migration conditions. Lanes (1) N,N-dimethyldodecylamine-N-oxide (LDAO); (2) octyl β-D-glucopyranoside (OG); (3) octyl-β-D-thioglycopyranosides (OTG); (4 and 7) dodecyl-β-maltoside (DDM); (5) *n*-decyl-β-D-maltopyranoside (DM); (6) *n*-dodecyl-β-D-thiomaltopyranoside (DDTM); (8) F4H5-β-maltoside (FH); (9) PCC-α-maltoside (PCC).

experiments show that 1070 (±160) DDM molecules are bound to the 500 kDa-complex, which corresponds to a ratio of 1.1 g of detergent per gram of protein, in agreement with published values [13,23]. Thanks to its high limit of detection, HPTLC requires only low detergent concentrations which migrate fully, as illustrated by the lack of a colored band at the starting position. Moreover, there appears to be no interference with other species potentially present in the membrane extract, since no peak differing from the DDM is visible.

3.6.2. Monitoring of detergent removal with Bio-beads

When MPs are concentrated using centrifugal filter units, the final detergent concentration can also increase. As previously mentioned, a high detergent concentration can either induce loss of the protein structure or affect crystal nucleation by impeding the protein–protein contacts. Excess detergent can be removed using Bio-beads from concentrated MP solutions: the HPTLC detergent assay method was applied to monitor detergent removal. DDM RC–LH1–pufX solutions (10 mg/mL) were incubated in the presence of Bio-beads (270 mg/mL or 360 mg/mL) at 22 °C or 24 °C. Fig. 6 shows that DDM final residual concentration plotted as a function of incubation time was successfully reached in 30 min with 270 mg/mL of Bio-beads. With 360 mg/mL of Bio-beads, this took only 20 min. Control of temperature is also crucial, since an increase of 2 °C enabled the removal of an additional 30% of DDM concentration (Fig. 7). These results demonstrate the efficiency of the HPTLC detergent assay method in Bio-bead experiments. Using Bio-beads in combination with the HPTLC method is a simple way of adjusting detergent concentrations optimally prior to crystallization assays.

3.6.3. Detergent exchange

The diffraction quality of MP crystals can be improved dramatically when a second surfactant is added to the crystallization sample or when the initial detergent is exchanged for another [9]. However, the success of this approach, which depends on the extent of detergent replacement, is difficult to assess with existing detergent assays. In order to test the HPTLC method, runs were performed with the most frequently used detergents for MP crystallization, (DDM, OG, LDAO, DM and OTG), as well as with recently synthesized surfactants (FH, PCC). Fig. 7 depicts chromatograms with optimized conditions developed for the separation of DDM and FH (see Section 3.2). As expected, the relative mobility values depend on the structure of the detergent polar head groups (glucoside or maltoside). OG and OTG are close together (Fig. 7, tracks 2–3), as well as DDM, DM, DDTM, FH and PCC (Fig. 7, tracks 4–5–6–8–9). However, all these surfactants present distinct mobilities and can be quantified either independently or in a binary mixture, the only requirement being to first establish a calibration curve for the detergent in question. LDAO detection using copper sulfate reagent is not satisfactory (Fig. 7, lane 1), probably because of the lack of sugar moiety. This post-chromatographic derivatization remains to be improved before quantification of LDAO with HPTLC can be achieved.

3.7. Comparison with existing detergent assay methods

Various methods have been developed to determine detergent concentrations in routine assays, including infrared spectroscopy

Table 1
Brief overview and comparison of the performance data from different detergent analysis techniques.

Methods	Colorimetric assay [15]	GC [16]	FTIR [12]	Drop shape[a] [13]	TLC [17]	HPTLC [Barret et al.]
Prior treatment	No	Yes	No	No	No	No
Minimum sample volume (μL)	50	–	10	20	–	150
Quantification range (μg)	4–20	0.01–2.5	18–584[b]	0.2–2	10–350	0.1–1.4
LOD (μg)[c]	2.45	0.01	3	–	–	0.05
Detergent exchange	No	No	No	No	Yes	Yes

[a] Non-marketed device.
[b] OG instead of DDM.
[c] Limit of detection.

[12], thin-layer chromatography [17], colorimetric assays [14] and contact angle measurements [13]. A very brief survey of existing instrumental methods applied in detergent quantification is shown in Table 1, comparing limits of detection, range of quantification and ease of use. Shortcomings include, in particular, low sensitivity; some do not cover detergent exchange or require too much time for routine implementation. Determining detergent exchange is crucial when using other detergents, in order to improve crystal resolution. With the HPTLC method, all surfactants can be detected without chemical labeling and no prior treatment for concentration or extraction is required. As the radio-labeled assay is not suitable for routine applications, TLC and HPTLC are the only simple methods of analyzing detergent exchange protocols. This new HPTLC method of measuring the extent of detergent replacement is 100 times more sensitive than TLC.

4. Conclusion

Crystallization of RC–LH1–pufX complex has already been obtained. Starting with DDM detergent, the complex (500 kDa) diffracted with 8 Å of resolution (Jungas, personal communication) without any control of the final DDM content prior to the crystallization step. Improving this successful result is currently one of the greatest challenges in the bacterial photosynthesis field. HPTLC is already used to assay phospholipids, the third component class associated with MPs. The various uses of HPTLC in the MP field show the strength of this analytical method with complex mixtures containing both proteins and surfactants. Our results demonstrate the precision of HPTLC in routine analysis without prior MP treatment. As used here, assay results can be obtained in approximately 3 h with only a few microliters of membrane protein solution. Our method should therefore lead to a better understanding of the crystallization conditions for optimization.

Acknowledgements

This study was supported by a PhD grant from the PACA (Provence Alpes Côte d'Azur-France) region via FEDER funds. The CAMAG HPTLC was bought with funds contributed by PACA and CEA-Cadarache. We are grateful to Stephan Cuiné and Dr Yonghua Li at the Laboratoire de Bioénergétique et Biotechnologie des Bactéries et Microalgues (LB3M-CEA Cadarache) for fruitful discussions and practical advice on the use of HPTLC devices. Our thanks to Marjorie Sweetko for English language revision.

References

[1] M. le Maire, P. Champeil, J.V. Moller, Biochim. Biophys. Acta 1508 (2000) 86.
[2] R.M. Garavito, D. Picot, P.J. Loll, J. Bioenerg. Biomembr. 28 (1996) 13.
[3] C. Ostermeier, H. Michel, Curr. Opin. Struct. Biol. 7 (1997) 697.
[4] H. Michel, M. Rossman, E. Arnold (Eds.), International Tables for Crystallography, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2001, p. 94.
[5] R.M. Bill, P.J. Henderson, S. Iwata, E.R. Kunji, H. Michel, R. Neutze, S. Newstead, B. Poolman, C.G. Tate, H. Vogel, Nat. Biotechnol. 29 (2011) 335.
[6] M.C. Wiener, Methods 34 (2004) 364.
[7] G.G. Privé, Methods 41 (2007) 388.
[8] L. Li, S. Nachtergaele, A.M. Seddon, V. Tereshko, N. Ponomarenko, R.F. Ismagilov, J. Am. Chem. Soc. 130 (2008) 14324.
[9] M.J. Lemieux, R.A. Reithmeier, D.N. Wang, J. Struct. Biol. 137 (2002) 322.
[10] C. Jungas, J.L. Ranck, J.L. Rigaud, P. Joliot, A. Vermeglio, EMBO J. 18 (1999) 534.
[11] M. Le Maire, S. Kwee, J.P. Andersen, J.V. Moller, Eur. J. Biochem. 129 (1983) 525.
[12] C.J. daCosta, J.E. Baenziger, Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr. 59 (2003) 77.
[13] T.C. Kaufmann, A. Engel, H.W. Rémigy, Biophys. J. 90 (2006) 310.
[14] A. Urbani, T. Warne, Anal. Biochem. 336 (2005) 117.
[15] M.A. Ostuni, S. Iatmanen, D. Teboul, J.C. Robert, J.J. Lacapere, Methods Mol. Biol. 654 (2010) 3.
[16] C. Shi, W. Shao, Y. Xiong, C. Tian, Anal. Biochem. 383 (2008) 326.
[17] L.R. Eriks, J.A. Mayor, R.S. Kaplan, Anal. Biochem. 323 (2003) 234.
[18] J. Hovers, M. Potschies, A. Polidori, B. Pucci, S. Raynal, M. Serrano-Vega, C. Tate, D. Picot, Y. Pierre, J.-L. Popot, R. Nehmé, M. Bidet, I. Mus-Veteau, H. Bußkamp, K.-H. Jung, A. Marx, P.A. Timmins, W. Welte, Mol. Membr. Biol. 28 (2011) 170.
[19] F. Comayras, C. Jungas, J. Lavergne, J. Biol. Chem. 280 (2005) 11203.
[20] L.R. Snyder, J. Chromatogr. Sci. 16 (1978) 223.
[21] A.R. Johnson, M.F. Vitha, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 556.
[22] D. Handloser, V. Widmer, E. Reich, J. Liquid Chromatogr. Related Technol. 31 (2008) 1857.
[23] A.G. Salvay, M. Santamaria, M. le Maire, C. Ebel, J. Biol. Phys. 33 (2007) 399.

NJC

Dynamic Article Links

Cite this: *New J. Chem.*, 2012, **36**, 1170–1179

www.rsc.org/njc

PAPER

Tripod facial surfactants with benzene as the central core: design, synthesis and self-assembly study†

Julien Dauvergne,[ab] Anissa Bendjeriou,[ab] Françoise Bonneté,[ab] Joachim Kohlbrecher,[c] Bernard Pucci,[ab] Laurie-Anne Barret[ab] and Ange Polidori*[ab]

Received (in Montpellier, France) 11th October 2011, Accepted 15th February 2012
DOI: 10.1039/c2nj20876h

The design, synthesis and self-assembled study of a new class of benzene-derived tripod facial amphiphiles are reported. The synthetic route chosen based on a central mesitylene as scaffold allows easy tuning of lipophilic and hydrophilic groups and thus control of the tensioactive properties of these new surfactants. This new class of surfactants exhibits three glucose moieties as the hydrophilic polar head and three hydrocarbon chains each having 3 to 7 carbons as the lipophilic part. These tripod facial amphiphiles exhibit well-defined tensioactive and aggregative properties. Their critical aggregation concentration, their particle size in water (less than 20 nm), and their aggregation behavior are closely linked to the nature of their lipophilic chains and can therefore be easily modulated.

Introduction

In the last few decades, synthetic amphiphiles with unusual architectures such as bolaamphiphiles or gemini surfactants have been obtained.[1] Amphiphilic surfactants too, sometimes called facial or contrafacial surfactants, have attracted increasing interest.[2] They are defined as molecules with a rigid framework (such as the steroid skeleton) with hydrophilic and lipophilic parts located on two opposite faces.[3,4] The controlled self-assembly of facial amphiphiles offers an attractive opportunity to construct defined aggregates and supramolecular architectures, specifically designed for particular applications. Currently, cholic acid is the most popular platform for the design of facial amphiphiles, leading researchers to derivatize its hydroxyl groups by grafting on sugars, carboxylates, amines/ammoniums and sulfonates, thus enhancing its facial amphiphilic character.[5–10a] Non-steroidal facial amphiphiles have also been synthesized with a block pattern derived from bridged annulene[10b] or [2 + 2] and [4 + 2] norbornadiene cycloaddition cores.[11] In recent years, other facial amphiphiles with original scaffolds have appeared in the literature. For example, clip-like glycoluril-based structures display an interesting counterion-dependent aggregation.[12] Amphiphilic calix[4]arene scaffolds possessing lipophilic side chains on the lower rim and either dendritic hydrophilic residues or carboxylic moieties on the upper rim have also been obtained.[13–15] Kellermann *et al.*[14] showed that these amphiphiles adopt a cone-shaped conformation involving small aggregates of high curvature, forming uniform aggregates consisting of seven units, non-deformable upon drying. Facially amphiphilic dendrimers have also been designed, forming well-controlled and stable self-assembled structures.[16–18] Facial amphiphiles offer particular promise in biology, where they can be used to overcome difficulties in handling membrane proteins in aqueous solution.[10]

Here, we describe how we designed the synthesis of a new class of benzene-based tripod facial amphiphiles and determined their tensioactive and aggregative properties in aqueous media. These new facial amphiphiles were prepared following a chemical pathway based on a central benzene group as scaffold (Fig. 1).

Simple chemical modifications of this aromatic core allow lipophilic and hydrophilic moieties to be tuned easily. Regarding the aromatic ring, persubstituted aromatic compounds having a D_{3d} symmetry structure have been shown to adopt an alternating up–down conformational network in which cooperative interactions direct the vicinal groups to point to opposite sides of the benzene ring, resulting in a 1,3,5/2,4,6 facial segregation.[19] In the present case, the lipophilic face of these amphiphiles is made up of three short hydrocarbon chains each having 3 to 7 carbons and the hydrophilic face consists of 3 glucosyl groups introduced *via* click-chemistry resources. The physico-chemical properties of these facial

[a] *Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Faculté des Sciences, Équipe Chimie Bioorganique et Systèmes Amphiphiles, 33, rue Louis Pasteur, 84000 Avignon, France. E-mail: ange.polidori@univ-avignon.fr*
[b] *Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247, CNRS—Universités Montpellier I et II 15, avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier cedex 05, France*
[c] *Laboratory for Neutron Scattering, Paul Scherrer Institut, 5232 Villigen PSI, Switzerland*

† Electronic supplementary information (ESI) available: TEM micrographs of a dispersion of **C7Glu3** in water after sonication, all ^{1}H and ^{13}C NMR spectra scanned of tripod compounds **CnGlu3** and some data concerning SAXS experiments. See DOI: 10.1039/c2nj20876h

 This journal is © The Royal Society of Chemistry and the Centre National de la Recherche Scientifique 2012

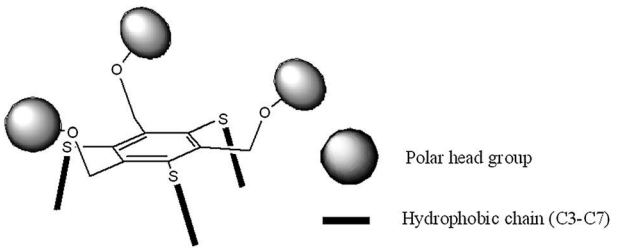


Fig. 1 General structure of tripod amphiphiles with 1,3,5/2,4,6 facial segregation.[19]

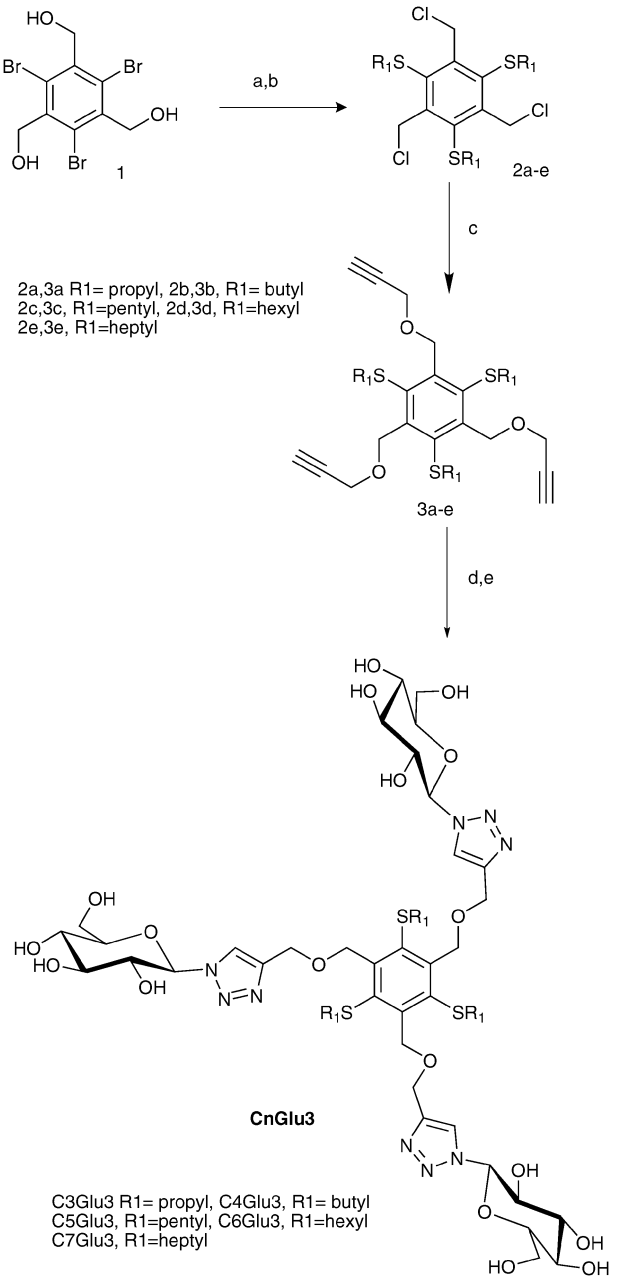
amphiphiles, notably tensioactive properties, shape and size of aggregates, are closely linked to the length of the lipophilic chains grafted onto the benzene ring.

Results and discussion

The key step in obtaining alternately substituted benzene was the sequential functionalization of 1,3,5-tribromo-2,4,6-trihydroxymethyl-benzene **1**, which can easily be achieved on a multiple-gram scale. Its synthesis from mesitylene as starting material, as described by Anthony *et al.*,[20] involves a four-step synthetic route giving a 59% overall yield. In the present case we obtained a 90 g batch without chromatography, which we used to synthesize tripod facial amphiphiles according to the chemical route depicted in Scheme 1.

The first decisive step involved a threefold nucleophilic aromatic substitution of **1** by thiolate anions derived from either propyl (a), butyl (b), pentyl (c), hexyl (d) or heptyl mercaptan (e). The reaction proceeded smoothly under mild conditions to give thioether compounds in excellent yield, due to the use of 1,3-dimethyl-2-imidazolidone (DMI) as solvent rather than DMF, which requires harsher conditions.[21] To efficiently introduce the three hydrophilic groups onto the aromatic core, copper(I)-catalyzed alkyne–azide cycloaddition was used. The hydroxyl groups were subjected to mesylation using a combination of methanesulfonyl chloride/TEA in cold CH_2Cl_2. Surprisingly, the reaction afforded the trichlorinated derivatives **2a–e** instead of the desired products. The mesylate groups produced in the reaction mixture appear to be substituted again by the existing chloride ions. Conversion requires a long reaction time but the product is formed in high yields with good purity.

The subsequent substitution of chlorine groups by propargyl alcoholate in DMF readily provided the trisubstituted derivatives **3a–e** in 60% yield. The addition of 1-azido-1-deoxy-β-D-glucopyranoside tetraacetate on trisubstituted derivatives **3a–e** in the presence of active CuI as catalyst afforded triglucosylated compounds in good yield after 24 h reaction time at room temperature. Finally, deprotection of acetyl groups by transesterification in the presence of sodium methoxide as catalyst provided tripod facial amphiphiles (**CnGlu3**). These alkynyl derivatives **3a–e** were used to efficiently attach sugar moieties by the usual Cu(I)-catalyzed azide-alkyne [1,3]-dipolar cycloaddition reaction, in high yield and with complete regioselectivity according to the optimized procedure for glycolipid analogues.[22,23] The treatment of derivatives **3a–e** and peracetylated glucosylazide in THF by direct use of active CuI(I) as catalyst



Scheme 1 Synthetic route leading to tripod facial amphiphiles **CnGlu3**, *reagents*, *temperature*, *time and yield*: (a) R_1SH, tBuOK, DMI, rt, 16 h, 97%; (b) Et_3N, MsCl, CH_2Cl_2, 5 °C → rt., 48 h, 83%; (c) propargyl alcohol, NaH 60%, THF/DMF (1 : 1), 0 °C → rt., 18 h, 65%; (d) 1-azido-1-deoxy-β-D-glucopyranoside tetraacetate, DIEA, CuI, THF, rt, 24 h, 71%; (e) MeONa cat., MeOH/THF (4 : 1), pH 9–10, rt, 24 h, 93%.

combined with DIEA, after a 24 h reaction time to ensure complete conversion, afforded stereoselective acetylated compounds **CnGlu3** in good yield. This was confirmed by ^1H NMR spectra, which revealed a characteristic peak at around 8 ppm assigned to the triazole protons and disappearance of the triplet at around 2.5 ppm assigned to the alkyne proton.

Deprotection of acetylated group sodium methoxide and purification by Sephadex LH-20 size exclusion chromatographies provided pure **CnGlu3** facial amphiphiles as white powder which

Table 1 Physico-chemical properties of tripods

Entry	CAC[a]/mM	γ_{CAC}[a]/mN m^{-1}	A_{min}/Å^2 [a]	P[e]	log K'_W[b]	D_h/nm[c]	%Vol	N_{Agg}[d]	R_g/nm[d]
C3Glu3	2.38 ± 0.03	39.2 ± 0.2	235 ± 58	0.260	6	3.3	99.9	3	1.4
C4Glu3	0.84 ± 0.05	36.3 ± 0.2	211 ± 26	0.292	5.9	5.2	99.8	5	1.8
C5Glu3	0.13 ± 0.01	35.8 ± 0.2	210 ± 8	0.295	7.4	8.1	99.9	13	3.6
C6Glu3	0.01 ± 0.001	33.2 ± 0.2	192 ± 24	0.324	8.5	11.5	99.8	n.d	n.d.
C7Glu3	$1.2 \times 10^{-3} \pm 0.1 \times 10^{-3}$	31.3 ± 0.2	211 ± 13	0.296	9.6	>200	52	n.d	n.d.

[a] Measured by tensiometry (Wilhelmy plate method). Each value is the mean of three different measurements ± SD. [b] Measured by reversed phase HPLC. [c] The hydrodynamic or Stokes diameter (D_h) of particles is measured at a concentration at least 15 times above the CAC. The values are the average of 10 runs. [d] Aggregation number (N_{Agg}) and radius of gyration (R_g) measured by SAXS at a concentration about 15 times the CAC [e] Packing parameter.

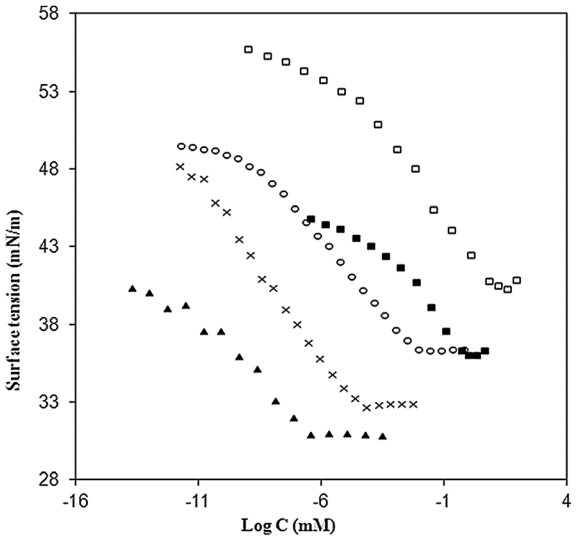


Fig. 2 Surface tension *vs.* log *C* for compounds **C3Glu3** (□), **C4Glu3** (■), **C5Glu3** (○), **C6Glu3** (×) and **C7Glu3** (▲).

were fully characterized by ^{1}H, ^{13}C and HR mass spectrometry. All these compounds have good water solubility except **C7Glu3**; this lower solubility was associated with the longer hydrocarbon tails of the lipophilic part.

Tensiometric measurements allowed us to determine the main tensioactive properties of these tripods (Table 1 and Fig. 2). For all compounds tested, the surface tension is observed to linearly decrease as tripod concentration increases, showing breaks corresponding to the critical aggregation concentration (CAC) depending on the hydrophobic chain length, as for a conventional surfactant.[24]

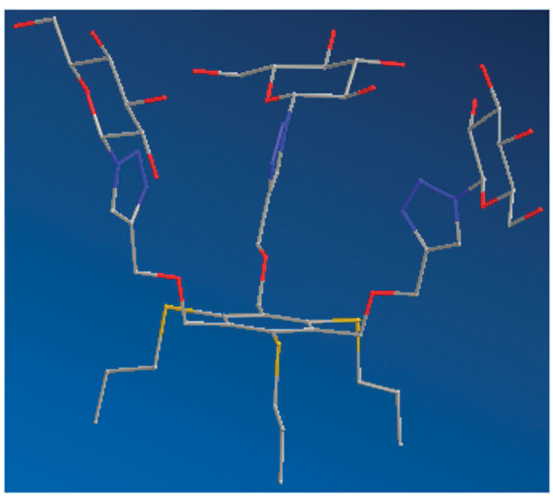
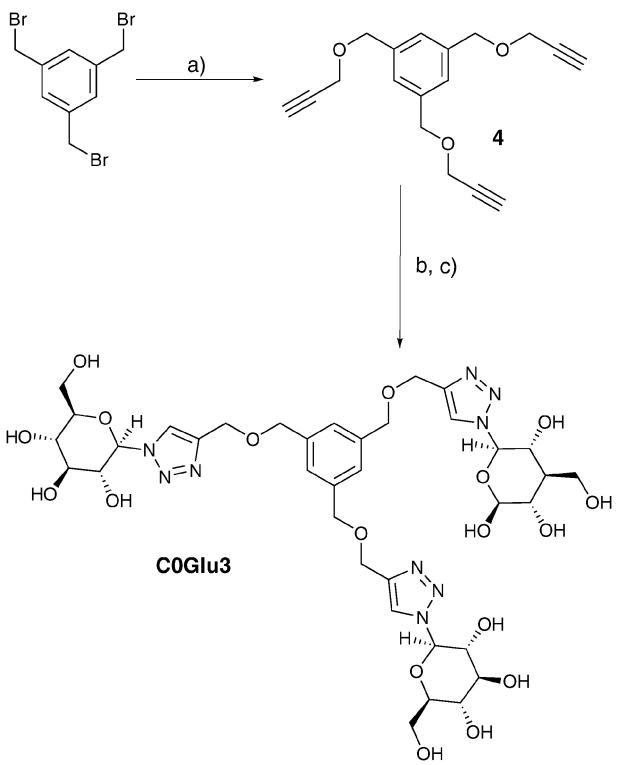


Fig. 3 Representation of a stick molecular model of the tripod **C3Glu3** (Chem3D Pro 11.0).

Such behavior clearly indicates a facial segregation of polar and apolar parts in water on both sides of the aromatic ring (Fig. 3). Furthermore, it should be noted that the triglucosylated compound without hydrocarbon chains (**C0Glu3**) prepared from 1,3,5-tris(bromomethyl)benzene following synthetic routes, summarized in Scheme 2, does not exhibit surfactant properties, indicating that the aromatic ring alone was not enough to endow the molecule with a sufficiently hydrophobic character.

For the tripod compounds (Fig. 4), log(CAC) linearly decreases when the number of methylenes of each hydrophobic chain increases: $\log(CAC) = -1.96nC + 7.26$ with $R^2 = 0.9804$. However it should be pointed out that within a homologous



Scheme 2 Synthetic route of **C0Glu3**, *reagents*, *temperature*, *time and yield*: (a) propargyl alcohol, NaH 60%, DMF, 0 °C, 48%; (b) 1-azido-1-deoxy-β-D-glucopyranoside tetraacetate, DIEA, CuI, THF, RT, 50%; (c) MeONa cat., MeOH/THF (4 : 1), pH 9–10, rt., 24 h, 87%.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry and the Centre National de la Recherche Scientifique 2012

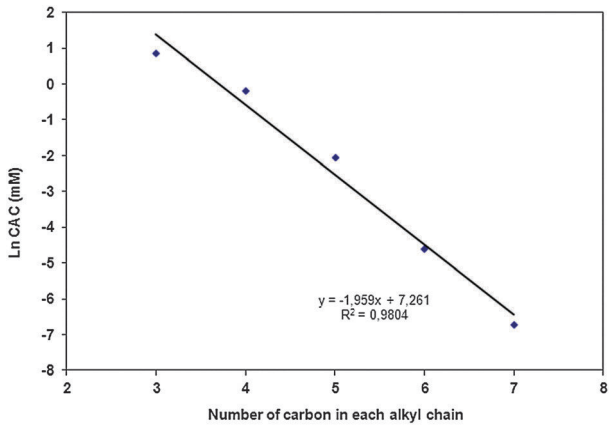


Fig. 4 logCAC plotted *vs.* number of carbons of the hydrophobic chains.

series of surfactants, the CAC usually decreases by a factor of about 10 every time two methylene groups are added to the hydrophobic tail.[24] In the present case, this factor increases from three to eight every time one methylene group is added to each tail. This weaker contribution to the hydrophobic effect is explained by the fact that the three methylenes are not added linearly to one chain, but to three different chains. Similar behavior can be observed with lipids. A second hydrocarbon chain added to an amphiphilic molecule makes a smaller contribution to the hydrophobic effect than the one already linked to that molecule.[24] By applying Gibbs equation $\Gamma = -(1/RT)[d\gamma/d\mathrm{Log}\,C]$, the relative excess of surfactant at the air–water interface Γ was determined, leading to the evaluation of the area per surfactant polar head from $A_{min} = 1/\Gamma N$. These tripod surfactants exhibit a wide polar head ($A_{min} = 210 \pm 60$ Å^2), whatever the nature of the hydrophobic tails (Table 1).

log($K'w$) is a parameter closely related to the molecule's water/octanol partition coefficient, which can be obtained from reverse-phase HPLC.[25] This parameter is usually considered to reflect the hydrophobic character of the surfactant. log($K'w$) shows a linear evolution from **C4Glu3 to C7Glu3** when the carbon number of hydrophobic chains increases (Fig. 5). It can be seen that the log($K'w$) of the **C3Glu3** compound is equal to that of the **C4Glu3** compound. Thus, we can assume that the hydrophobic contribution of the 3 additional methylenes remained marginal for very short chains. Above their CAC, all surfactants form monodispersed self-assembled systems with a Stokes (or hydrodynamic) diameter lower than 20 nm, except for **C7Glu3** (Table 1 and Fig. 6). The tripod hydrodynamic diameters increase with the length of the hydrophobic tail. Particle diameters obtained from DLS measurements suggest that **C3Glu3** and **C4Glu3** should form spherical micelles in water with a diameter of less than 6 nm, but the increase in the particle size observed with **C5Glu3** and **C6Glu3** indicates the formation of larger micelles.

Further information about the shape of the tripod assemblies was obtained by Small Angle X-ray Scattering experiments (SAXS). The last tripod **C7Glu3**, which has low water solubility, leads to unstable large particles larger than 0.2 μm as observed by TEM after negative staining (see ESI†, Fig. S1). Moreover, this compound precipitates quickly after dispersion by sonication. DLS measurements also reveal very large aggregates testifying to the rapid fusion of vesicles formed from the tripod **C7Glu3**.

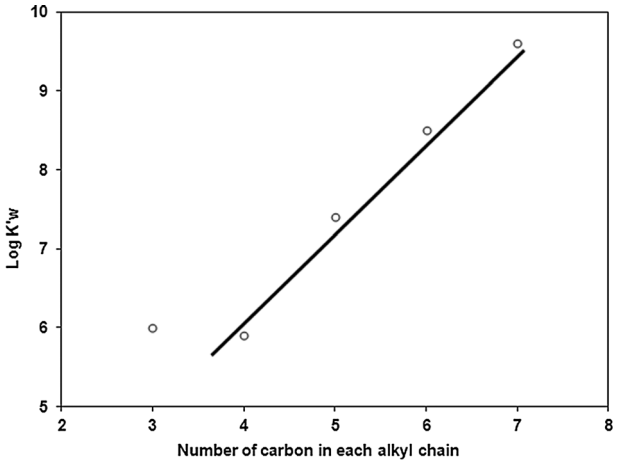


Fig. 5 Log($K'w$) of tripods **CnGlu3** plotted against number of carbon of the hydrophobic chains.

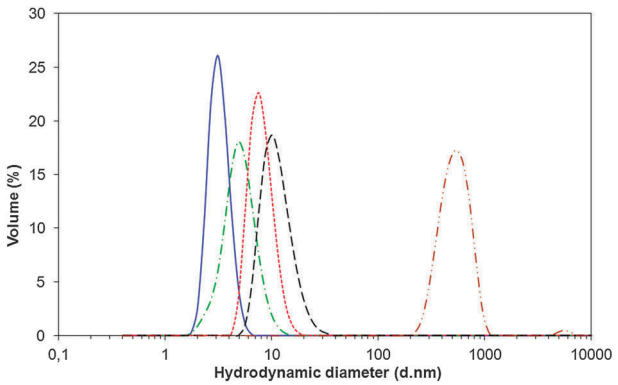


Fig. 6 Stokes (or hydrodynamic) diameter distribution from DLS measurements for amphiphile solutions as a function of length of linear alkyl chains: **C3Glu3** at 15 CMC (—, blue), **C4Glu3** at 15 CMC (–·–, green), **C5Glu3** at 120 CMC (···, red), **C6Glu3** at 15 CMC (– –, black), **C7Glu3** at 120 CMC (–···–, brown).

To better understand the whole process of evolution, the self-aggregated properties of **C3**- to **C5Glu3** tripods having good water solubility were studied by SAXS at different concentrations. Different behaviours were observed for **C3**- to **C5Glu3** tripods as the hydrophobic tail increased in length. Comparisons between **C3**, **C4** and **C5Glu3** at the same concentration (about 40 g L^{-1}) are shown in Fig. 7A. Evolution of scattering from factors of **C3Glu3** to **C5Glu3** as a function of concentration is shown in the ESI† (Fig. S2). As the concentration increases up to 42 g L^{-1} (15CMC), **C3Glu3** and **C4Glu3** form small aggregates (see ESI†, Table S2), probably trimers for **C3Glu3** and larger aggregates for **C4Glu3**. Radii of gyration and molecular masses have been determined *via* the Guinier approximation, the latter being determined by comparing the forward scattering intensity value $I(0)$ at the highest concentration with the $I(0)$ value below the CAC (taken to be monomeric). Analysis of the pair distribution function $P(r)$ for **C3Glu3** using the program GNOM[26] yielded a maximum particle dimension D_{max} of about 4 nm, consistent with DLS measurements. In the case of **C4Glu3**, although the evolution is essentially the same, it

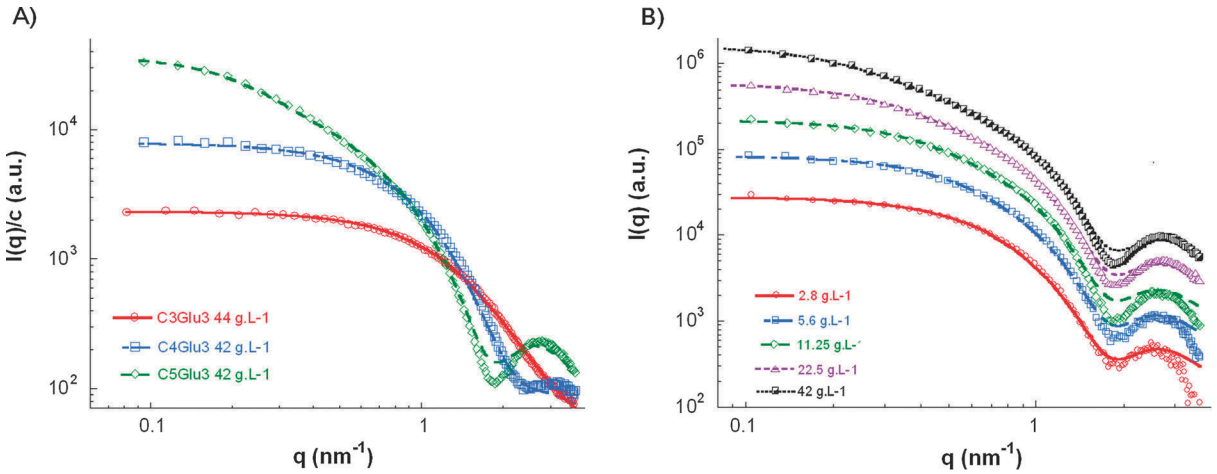


Fig. 7 (A) Experimental SAXS curves of **C3-** to **C5Glu3** at their highest concentrations. (B) Scattering intensities of **C5Glu3** at different concentrations. The curves are not normalized for sake of clarity. The symbols represent the experimental data and the lines the data fits.

was impossible to characterize the monomeric form below the CAC due to a poor SAXS signal below 0.9 g L^{-1}.

In the case of **C5Glu3**, the scattering curves clearly present a different behaviour. The **C5Glu3** pair distribution functions (see ESI†, Fig. S3) and the Guinier analysis suggest the formation of elongated objects, which lengthen as the tripod concentration increases. The increase in intensity at very low angles confirms the presence of larger objects, as compared to **C3Glu3** and **C4Glu3**. The SAXS curves were fitted using least-square models, for **C3-** to **C5Glu3** at the same high concentration (Fig. 7A) and for **C5Glu3** as a function of concentration (Fig. 7B). By using a model of a generalized Gaussian coil, **C3Glu3** looks like an oblate ellipsoid. For **C4Glu3** and **C5Glu3**, a model of rod-like copolymer micelles has been used, which shows that **C4Glu3** is thinner and shorter than **C5Glu3** at their highest concentration, but thicker than **C3Glu3**. Cross-sectional radius (1.52 ± 0.04 nm), radius of gyration and length were therefore determined for each **C5Glu3** concentration (see ESI†, Table S2). SAXS measurements (R_g and D_{max}) are in accordance with dynamic light scattering measurements in terms of evolution of particle dimensions as the hydrophobic tail increases in length. In the case of **C3-** and **C4Glu3**, DLS is not able to distinguish between the different species in solution (monomer and small aggregates), and gives only an average hydrodynamic diameter of tripods in solution. For **C5Glu3**, the DLS diameter is slightly lower than the length determined by SAXS, since for very long cylinders the diffusion and therefore the hydrodynamic radius are mainly determined by the diameter of the rod, and not by its length.[27] Differences in behaviour among **C3Glu3**, **C4Glu3** and **C5Glu3** have yet to be clearly explained. SAXS studies on **C6Glu3** and **C7Glu3** would probably have shed further light on tripod self-assembly, but their solubility was too low for SAXS experiments.

An interesting question is whether the results obtained by SAXS studies confirm the concept of *the molecular packing parameter* introduced by Tanford.[28]

According to this theory, a simple and common conceptual way of relating the geometric shape of an amphiphile and the preferred type of aggregation is through the surfactant packing parameter.

$$P = v/al \quad (1)$$

where v is the volume of the chain, l is the length of the chain and a, the cross-sectional area of the head group. Cross-sectional head group areas were determined from CMC measurements as described in the Experimental section. For single-chain hydrocarbon tails, both the length of the chain and its volume can be estimated according to Tanford:

$$v = 3(27.4 + 26.9n) \quad (2)$$

$$l = 1.5 + 1.265n \quad (3)$$

where l is the length of the fully extended chain in Å, v the volume of the 3 alkyl chains in $Å^3$, and n the number of hydrocarbon units in each chain.

Tanford *et al.* studied the factors determining the packing patterns of amphiphilic molecules and the shape of aggregates. Amphiphiles having $P < 1/3$ prefer to form spherical micelles while those having either $1/3 < P < \frac{1}{2}$ or $\frac{1}{2} < P < 1$, prefer to form either rod-like or cylindrical micelles, or lamellar phases, respectively. We can observe for all compounds (Table 1) that the calculated values for each compound show small changes in the critical packing parameter. The general trend predicted by the molecular packing parameter does not seem valid for our new tripod facial surfactants. Actually, this predictive theory is valid if the micelle core is packed with surfactant tails leaving no empty space.[29] The volume occupied by the hydrophobic part is certainly greater than that calculated with eqn (2) because there is an empty space between the 3 chains due to the presence of the rigid aromatic central core of this new family of tensioactives. Trappman *et al.* pointed out that the interaction of space-demanding dendritic amphiphiles dominates their self-assembly process.[30] Kratzat and Finkelmann have also reported that asymmetrically branched non-ionic surfactants do not follow the packing parameter model of Tanford.[31] Due to the very low aggregation number of compounds **C3Glu3**, **C4Glu3** and **C5Glu3** measured by SAXS, the aggregation properties of

 This journal is © The Royal Society of Chemistry and the Centre National de la Recherche Scientifique 2012

these compounds appear to be similar to those of bile salts.[32] In contrast to classical detergents, where the hydrophilic head group and the lipophilic flexible aliphatic chains are clearly separated, bile salt molecules have a lipophilic surface, which is the convex side of the rigid steroid ring system and a hydrophilic surface which is the polyhydroxylated concave side of the molecule. Bile salt micelles also have much smaller aggregation numbers than classical detergent micelles. Moreover, it is interesting to note that bile salts behave quite differently in water from classical detergents.[33] They form two types of aggregates, small aggregates and much larger ones. Small aggregates with an aggregation number of less than 10 lead to the formation of primary micelles of almost spherical shapes which transform with increasing tensioactive concentration into secondary micelles with rod-like structures. The results obtained by SAXS measurement with **C5Glu3** suggest an association behaviour of this amphiphilic tripods equivalent to that of bile salts with a face-to-face arrangement of the hydrophobic parts and the formation of rod-shaped micelles whose length increases as a function of the surfactant concentration (see ESI† in Table S2).

Conclusion

The synthetic route chosen for the synthesis of these new benzene-based facial amphiphiles allows the selective introduction in good yield of hydrophilic and hydrophobic parts of the molecule. Thus, both overall electrical charges and/or water solubility of the polar head and nature and length of hydrophobic parts can be tuned easily. We show that the increased number of small lipophilic chains and their segregation on one side of these amphiphilic compound tripods afford them tensioactive properties. Whatever the length of the hydrocarbon part, these amphiphilic compounds exhibit self-aggregation properties in water. They lead to particles whose size and shape are closely dependent on the length of the hydrophobic tail. Long hydrocarbon chains (**C7Glu3**) decrease tripod solubility in water, and thus their ability to form small aggregates. The attachment of other types of hydrophilic groups on the polar face of these tripods should easily offset hydrophobicity, modulate the hydrophilic lipophilic balance and solve problems of water solubility. We use SAXS experiments to characterize two different behaviours in the self-aggregation of **CnGlu3** tripods. The tripods form aggregates whose size and shape depend on the length of the hydrophobic tail. Interestingly, although the aggregation numbers, N_{agg}, of these facial amphiphiles are very low, this aggregation behaviour in water is close to that of natural facial surfactants such as bile salt derivatives. The aggregation process of **C5Glu3** seems to proceed stepwise over a broad concentration range, as with bile salt detergents. The design of these tripod facial surfactants and their ability to interact face-to-face with the hydrophobic part suggest that they are suitable for use in the solubilization of large hydrophobic nanoparticles. The study of their ability to handle and pinch-off specifically hydrophobic nanoparticles in aqueous solution is currently in progress.

General method

All starting materials were commercially available and were used without further purification. All solvents were of reagent grade and used as received unless stated. THF and MeOH were dried over Na and CH_2Cl_2 over CaH_2 under argon atmosphere. Commercially anhydrous DMF was stored over activated molecular sieves of 3 Å. The progress of the reactions was monitored by thin layer chromatography (TLC, Merck 254, silica plates) and the compounds were detected either by exposure to ultraviolet light (254 nm) or by spraying with a 0.05% permanganate aqueous solution or with an acidic solution of ceric molybdate following heating at 150 °C. Flash chromatography purifications were carried out on silica gel (40–63 μm granulometry). Size exclusion chromatography purifications were carried out on a Sephadex LH-20 resin. ^{1}H and ^{13}C spectra were recorded on a Brucker AC 250 spectrometer at 250 MHz for ^{1}H and 62.86 MHz for ^{13}C. Chemical shifts (δ values) were reported in ppm downfield from internal residual solvent as a heteronuclear reference. HRMS(ESI) was determined on a QStar Elite mass spectrometer.

Synthesis

1,3,5-Tris(chloromethyl)-2,4,6-tris(propylthio)benzene (2a). To a solution of potassium *tert*-butoxide (2.27 g, 20.23 mmol) in DMI (30 mL) was added under argon atmosphere propanethiol (3.8 mL, 21.76 mmol). The solution was stirred for 10 min then compound **1** (2.28 g, 5.63 mmol) was added and the thick mixture was stirred for 16 h at room temperature. The reaction mixture was poured into water (300 mL) and extracted with AcOEt (3 × 100 mL). The organic layer was washed first with H_2O (2 × 50 mL), then with brine (50 mL), dried with anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated. The crude compound was subjected to flash chromatography on a silica gel column with AcOEt/cyclohexane (2 : 8), giving the tris(hydroxymethyl) benzenic product as colorless oil (1.43 g, 97%). R_f 0.24 in AcOEt/cyclohexane (3 : 7). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 1.03 (t, ^3J = 7.34 Hz, 9H, 1.65 (six, ^3J = 7.39 Hz, 6H), 2.89 (t, ^3J = 7.55 Hz, 6H), 2.9 (br s, 3H), 5.31 (s, 6H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 13.5, 23.0, 40.7, 63.3, 137.2, 150.7.

Et_3N (1.25 mL, 9 mmol) was added slowly to a solution of the tris(hydroxymethyl)benzene derivative (1.2 g, 2 mmol) in dry CH_2Cl_2 (30 mL) cooled with an ice bath at 5 °C under argon atmosphere. Methane sulfonyl chloride (610 μL, 7.8 mM) was added dropwise at 5 °C and the reaction mixture was stirred for 48 h at room temperature. The reaction mixture was monitored by TLC with CH_2Cl_2/cyclohexane (1 : 9) as eluent until only one spot was obtained, and then concentrated to give a crude compound as an orange oil. Purification by flash chromatography on a silica gel column with CH_2Cl_2/cyclohexane (1 : 9) gave the expected product as a white powder (1.09 g, 83%), R_f 0.53 in CH_2Cl_2/cyclohexane (1 : 9), Mp 88.7–89.1 °C. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 1.07 (t, ^3J = 7.36 Hz, 9H), 1.72 (six, ^3J = 7.36 Hz, 6H), 3.02 (t, ^3J = 7.36 Hz, 6H), 5.51 (s, 6H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 13.6, 23.1, 40.9, 46.2, 139.9, 149.5. HRMS (ESI^+) calcd for $C_{18}H_{28}Cl_3S_3$ ($[M + H]^+$) 445.0436, found 445.0419.

Compounds **2b–2e** were obtained as described previously for **2a** from 5.63 mmol of compound **1** by using the appropriate thiol (butane-, pentane-, hexane- or heptanethiol) instead of propane thiol.

1,3,5-Tris(chloromethyl)-2,4,6-tris(butylthio)benzene (2b). Yield 865 mg (88%), colorless oil, R_f 0.5 in CH_2Cl_2/cyclohexane (1 : 9).

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0.96 (t, ^3J = 7.32 Hz, 9H), 1.49 (six, ^3J = 7.3 Hz, 6H), 1.69 (six, ^3J = 6.73 Hz, 6H), 3.04 (t, ^3J = 7.53 Hz, 6H), 5.51 (s, 6H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 13.7, 22.1, 31.6, 38.7, 46.2, 140.0, 149.5. HRMS (ESI^+) calcd for $C_{21}H_{34}Cl_3S_3$ ([M + H]$^+$) 487.0936, found 487.0888.

1,3,5-Tris(chloromethyl)-2,4,6-tris(pentylthio)benzene (2c). Yield 925 mg (87%), colorless oil, R_f 0.56 in CH_2Cl_2/cyclohexane (1 : 9). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0.93 (t, ^3J = 7.12 Hz, 9H), 1.32–1.46 (m, 12H), 1.71 (p, ^3J = 7.49 Hz, 6H), 3.03 (t, ^3J = 7.63 Hz, 6H), 5.51 (s, 6H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 14.0, 22.3, 29.3, 31.1, 39.0, 46.2, 140.0, 149.5. HRMS (ESI^+) calcd for $C_{24}H_{40}Cl_3S_3$ ([M + H]$^+$) 529.1328, found 529.1358.

1,3,5-Tris(chloromethyl)-2,4,6-tris(hexylthio)benzene (2d). Yield 1.03 g (91%), colorless oil, R_f 0.66 in CH_2Cl_2/cyclohexane (1 : 9). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0.91 (t, ^3J = 6.73 Hz, 9H), 1.29–1.47 (m, 18H), 1.7 (p, ^3J = 7.8 Hz, 6H), 3.02 (t, ^3J = 7.4 Hz, 6H), 5.51 (s, 6H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 14.1, 22.5, 28.6, 29.5, 31.4, 39.0, 46.2, 140.0, 149.5. HRMS (ESI^+) calcd for $C_{27}H_{46}Cl_3S_3$ ([M + H]$^+$) 571.1854, found 571.1827.

1,3,5-Tris(chloromethyl)-2,4,6-tris(heptylthio)benzene (2e). Yield 993 mg (81%), colorless oil, R_f 0.38 in CH_2Cl_2/cyclohexane (1 : 9). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0.91 (t, ^3J = 6.73 Hz, 9H, CH_3), 1.31–1.44 (m, 24H), 1.71 (p, ^3J = 7.65 Hz, 6H), 3.03 (t, ^3J = 7.63 Hz, 6H), 5.51 (s, 6H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 14.1, 22.7, 28.6, 28.9, 29.0, 29.3, 29.6, 31.8, 39.0, 46.2, 140.0, 149.5. HRMS (ESI^+) calcd for $C_{30}H_{52}Cl_3S_3$ ([M + H]$^+$) 613.2203, found 613.2234.

1,3,5-Tris(prop-2-ynyloxymethyl)-2,4,6-tris(propylthio) benzene (3a). To a solution of propargyl alcohol (210 µL, 3.6 mmol) in anhydrous DMF (5 mL) cooled to 0 °C was slowly added NaH (60% w/w, oil dispersion) (144 mg, 3.6 mM) under argon. The reaction mixture was stirred for 10 min and a solution of **2a** (656 mg, 1 mmol) in dry THF (5 mL) was slowly added at 0 °C. The resulting mixture was stirred for 18 h at room temperature. Then ice was added. The mixture was poured into water (50 mL) and extracted with AcOEt (3 × 50 mL). The organic layers were gathered, washed first with H_2O (2 × 30 mL), then with brine (30 mL), dried with anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated. Purification by flash chromatography on a silica gel column with CH_2Cl_2/cyclohexane (6 : 4) as eluent gave the expected product as yellow oil (329 mg, 65%). R_f 0.36 in CH_2Cl_2/cyclohexane (8 : 2). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 1.02 (t, ^3J = 7.34 Hz, 9H), 1.6 (p, ^3J = 7.34 Hz, 6H), 2.5 (t, ^4J = 2.38 Hz, 3H), 2.88 (t, ^3J = 7.24 Hz, 6H), 4.34 (d, ^4J = 2.35 Hz, 3H), 5.33 (s, 6H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 13.6, 23.0, 41.0, 58.1, 71.6, 74.4, 79.9, 141.4, 147.0.

Compounds **3b–3e** were obtained as described previously for **3a** by using the appropriate 1,3,5-tris(chloromethyl)-2,4,6-tris(alkylthio) benzene **2b–2e** (0.5 mmol) instead of **2a**.

1,3,5-Tris(prop-2-ynyloxymethyl)-2,4,6-tris(butylthio)benzene (3b). Yield 339 mg (62%), yellow oil, R_f 0.43 in CH_2Cl_2/cyclohexane (7 : 3). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0.92 (t, ^3J = 7.2 Hz, 9H), 1.44 (six, ^3J = 8.0 Hz, 6H), 1.57 (p, ^3J = 7.01 Hz, 3H), 2.49 (t, ^4J = 2.37 Hz, 3H), 2.9 (t, ^3J = 7.5 Hz, 6H), 4.33 (d, ^4J = 2.39 Hz, 6H), 5.3 (s, 6H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 14.1, 22.6, 29.6, 39.1, 58.1, 71.6, 74.4, 79.9, 141.4, 147.0.

1,3,5-Tris(prop-2-ynyloxymethyl)-2,4,6-tris(pentylthio) benzene (3c). Yield 492 mg (84%), yellow oil, R_f 0.45 in CH_2Cl_2/cyclohexane (6 : 4). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0.9 (t, ^3J = 7.06 Hz, 9H), 1.29–1.42 (m, 12H), 1.58 (m, 6H), 2.49 (t, ^4J = 2.32 Hz, 3H), 2.89 (t, ^3J = 7.49 Hz, 6H), 4.33 (d, ^4J = 2.36 Hz, 6H), 5.3 (s, 6H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 14.0, 22.3, 29.4, 31.2, 39.0, 58.1, 71.6, 74.4, 79.9, 141.4, 147.0.

1,3,5-Tris(prop-2-ynyloxymethyl)-2,4,6-tris(hexylthio)benzene (3d). Yield 488 mg (77%), yellow oil, R_f 0.45 in CH_2Cl_2/cyclohexane (6 : 4). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0.9 (t, ^3J = 6.81 Hz, 9H), 1.26–1.43 (m, 18H), 1.59 (p, ^3J = 8.88 Hz, 6H), 2.49 (t, ^4J = 2.37 Hz, 3H), 2.89 (t, ^3J = 7.5 Hz, 6H), 4.33 (d, ^4J = 2.39 Hz, 6H), 5.3 (s, 6H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 14.1, 22.6, 28.7, 29.6, 31.5, 39.1, 58.1, 71.6, 74.4, 79.9, 141.4, 147.0.

1,3,5-Tris(prop-2-ynyloxymethyl)-2,4,6-tris(heptylthio) benzene (3e). Yield 452 mg, (67%) yellow oil, R_f 0.45 in CH_2Cl_2/cyclohexane (6:4). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0.9 (t, ^3J = 6.88 Hz, 9H), 1.27–1.4 (m, 24H), 1.59 (p, ^3J = 8.88 Hz, 6H), 2.49 (t, ^4J = 2.37 Hz, 3H), 2.89 (t, ^3J = 7.5 Hz, 6H), 4.33 (d, ^4J = 2.39 Hz, 6H), 5.3 (s, 6H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 14.1, 22.6, 28.7, 29.6, 31.5, 39.1, 58.1, 71.6, 74.4, 79.9, 141.4, 147.0.

1,3,5-Tris[1-(β-D-glucopyranosyl)-1,2,3-triazole-4-yloxymethyl]-2,4,6-tris(propylthio) benzene (C3Glu3). To a solution of **3a** (358 mg, 0.5 mmol) in THF (15 mL) at room temperature was added 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl azide (740 mg, 1.8 mmol), DIEA (520 µL, 3 mmol) and CuI (29 mg, 0.15 mmol). The resulting green mixture was stirred for 24 h at room temperature. AcOEt (60 mL) was then added and the organic layer was washed first with saturated aqueous NH_4Cl (3 × 20 mL), then with brine (20 mL), dried with anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated. The crude solid was subjected to flash chromatography on a silica gel column with a gradient of AcOEt/CH_2Cl_2 (1 : 9 to 4:6), giving the acetylated product as a white powder (677 mg, 83%). R_f 0.26 in AcOEt/CH_2Cl_2 (4 : 6). Mp 190.1–192.9 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = −56.2 (*c* 1, CH_2Cl_2). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0.92 (t, ^3J = 7.41 Hz, 9H), 1.53 (six, ^3J = 7.4 Hz, 6H), 1.88 (s, 9H), 2.05–2.09 (3s, 27H), 2.79 (t, ^3J = 7.41 Hz, 6H), 4.02 (ddd, ^3J = 2.82 Hz, ^3J = 4.76 Hz, ^3J = 9.98 Hz, 3H), 4.14 (dd, ^3J = 2 Hz, ^2J = 12.53 Hz, 3H), 4.3 (dd, ^3J = 4.95 Hz, ^2J = 12.56 Hz, 3H), 4.82 (s, 6H), 5.21–5.33 (m, 9H), 5.4–5.53 (m, 6H), 5.9 (d, ^3J = 9.0 Hz, 3H), 7.83 (s, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 14.0, 20.2, 20.6, 20.7, 23.0, 40.8, 61.6, 64.2, 67.7, 70.2, 72.0, 72.8, 75.0, 85.7, 121.1, 141.1, 146.0, 147.1, 168.9, 169.4, 170.0, 170.6.

Deacetylated compound. An acetylated compound (550 mg, 0.3 mmol) was dissolved in 50 mL of a dry mixture of THF/MeOH (1 : 4). A sufficient catalytic quantity of sodium methoxide was added to reach a pH of 9–10 and the reaction mixture was stirred for 24 h at room temperature. The solution was neutralized with the resin acid IRC-50 (pH = 7), filtered and concentrated. The solid was purified by Sephadex LH-20 size exclusion chromatography with methanol, giving the expected product as a white powder (246 mg, 73%). R_f 0.18 in AcOEt/MeOH/H_2O (7 : 2 : 1). Mp 182.8–184.1 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = −8.0 (*c* 1, MeOH). HRMS (ESI^+) calcd for $C_{45}H_{71}N_9O_{18}S_3$ ([M + 2H]$^{2+}$): 560.7034, found 560.7033. ^{1}H NMR (DMSO) δ 0.90 (t, ^3J = 7.4 Hz, 9H), 1.45 (six, ^3J = 7.23 Hz, 6H),

 This journal is © The Royal Society of Chemistry and the Centre National de la Recherche Scientifique 2012

2.79 (t, ^3J = 7.28 Hz, 6H), 3.23 (m, 3H), 3.37–3.48 (m, 9H), 3.66–3.77 (m, 6H), 4.63 (t, ^3J = 7.5 Hz, 3H), 4.69 (s, 6H), 5.18 (d, ^3J = 5.36 Hz, 3H), 5.19 (s, 6H), 5.3 (d, ^3J = 4.81 Hz, 3H), 5.37 (d, ^3J = 6.06 Hz, 3H), 5.53 (d, ^3J = 9.23 Hz, 3H), 8.27 (s, 3H). ^{13}C NMR (DMSO) δ 13.8, 22.9, 39.0, 61.6, 64.2, 70.0, 71.8, 72.5, 77.4, 80.4, 87.9, 123.6, 140.4, 144.1, 147.3.

Compounds **CnGlu3** were obtained as previously described for the synthesis of **C3Glu3** by using the appropriate 1,3,5-tris(prop-2-ynyloxymethyl)-2,4,6-tris(alkylthio)benzene **3b–3e** (0.5 mmol) instead of **3a**, then 0.3 mmol of acetylated compound.

1,3,5-Tris[1-(β-D-glucopyranosyl)-1,2,3-triazole-4-yloxymethyl]-2,4,6-tris(butylthio) benzene (C4Glu3)

Acetylated compound. Yield 627 mg (75%), white powder, R_f 0.32 in AcOEt/CH_2Cl_2 (4 : 6). Mp 194.3–195.9 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = −54.9 (*c* 1, CH_2Cl_2). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0.86 (t, ^3J = 7.12 Hz, 6H), 1.34 (six, ^3J = 7.65 Hz, 6H), 1.45–1.68 (m, 6H), 1.9 (s, 9H), 2.04–2.09 (3s, 27H), 2.81 (t, ^3J = 7.41 Hz, 6H), 4.02 (m, 3H), 4.14 (dd, ^3J = 1.73 Hz, ^2J = 12.55 Hz, 3H), 4.3 (dd, ^3J = 4.85 Hz, ^2J = 12.62 Hz, 3H), 4.83 (s, 6H), 5.22–5.33 (m, 9H), 5.4–5.53 (m, 6H), 5.9 (d, ^3J = 8.75 Hz, 3H), 7.84 (s, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 13.7, 20.2, 20.6, 20.7, 22.1, 31.7, 38.6, 61.6, 64.2, 67.7, 70.3, 72.0, 72.8, 75.0, 85.7, 121.1, 141.1, 146.0, 147.1, 168.8, 169.4, 170.0, 170.5.

Deacetylated compound. Yield 289 mg (87%), white powder, R_f 0.4 in AcOEt/MeOH/H_2O (7 : 2 : 1). Mp 184.3–186.0 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = −8.4 (*c* 1, MeOH). HRMS (ESI^+) calcd for $C_{48}H_{77}N_9O_{18}S_3$ ($[M + 2H]^{2+}$): 581.7269, found 581.7275.^{1}H NMR (DMSO) δ 0.82 (t, ^3J = 7.03 Hz, 9H), 1.26–1.41 (m, 12H), 2.81 (t, ^3J = 6.91 Hz, 6H), 3.22 (m, 3H), 3.37–3.46 (m, 9H), 3.67–3.79 (m, 6H), 4.63 (t, ^3J = 5.09 Hz, 3H), 4.69 (s, 6H), 5.19 (s, 9H), 5.31 (d, ^3J = 4.49 Hz, 3H), 5.36 (d, ^3J = 5.96 Hz, 3H), 5.53 (d, ^3J = 9.2 Hz, 3H), 8.25 (s, 3H). ^{13}C NMR (DMSO) δ 14.1, 21.9, 31.7, 38.0, 61.2, 64.2, 70.0, 71.8, 72.6, 77.4, 80.4, 87.9, 123.5, 140.4, 144.1, 147.3.

1,3,5-Tris[1-(β-D-glucopyranosyl)-1,2,3-triazole-4-yloxymethyl]-2,4,6-tris(pentylthio) benzene (C5Glu3)

Acetylated compound. Yield 685 mg (79%), white powder, R_f 0.42 in AcOEt/CH_2Cl_2 (4 : 6). Mp 179.5–181.2 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = −55.9 (*c* 1, CH_2Cl_2). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0.86 (t, ^3J = 7.1 Hz, 9H), 1.25–1.31 (m, 12H), 1.5 (p, ^3J = 7.26 Hz, 6H), 1.88 (s, 9H), 2.05–2.08 (3s, 27H), 2.8 (t, ^3J = 7.41 Hz, 6H), 4.02 (m, 3H), 4.14 (dd, ^3J = 1.98 Hz, ^2J = 12.55 Hz, 3H), 4.3 (dd, ^3J = 4.83 Hz, ^2J = 12.52 Hz, 3H), 4.81 (s, 6H), 5.21–5.32 (m, 9H), 5.39–5.52 (m, 6H), 5.9 (d, ^3J = 8.93 Hz, 3H), 7.83 (s, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 14.0, 20.2, 20.6, 20.7, 22.3, 29.3, 31.1, 38.9, 61.6, 64.2, 67.7, 70.0, 71.9, 72.7, 75.0, 85.7, 121.1, 141.1, 146.0, 147.1, 168.8, 169.4, 170.0, 170.6.

Deacetylated compound. Yield 346 mg (95%), white powder, R_f 0.46 in AcOEt/MeOH/H_2O (7 : 2 : 1). Mp 187.8–189.3 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = 17.7 (*c* 1, MeOH). HRMS (ESI^+) calcd for $C_{51}H_{83}N_9O_{18}S_3$ ($[M + 2H]^{2+}$): 602.7504, found 602.7506. ^{1}H NMR (DMSO) δ 0.82 (t, ^3J = 6.96 Hz, 9H), 1.18–1.25 (m, 12H), 1.42 (m, 6H), 2.79 (t, ^3J = 7.24 Hz, 6H), 3.19–3.26 (m, 3H), 3.34–3.45 (m, 9H), 3.66–3.78 (m, 6H), 4.62 (t, ^3J = 5.56 Hz, 3H), 4.68 (s, 6H), 5.18 (2s, 9H), 5.31 (d, ^3J = 4.67 Hz, 3H), 5.36 (d, ^3J = 6.03 Hz, 3H), 5.53 (d, ^3J = 9.23 Hz, 3H), 8.23 (s, 3H). ^{13}C NMR (DMSO) δ14.3, 22.2, 29.2, 30.9, 38.2, 61.2, 64.2, 70.0, 71.8, 72.6, 77.4, 80.4, 87.9, 123.5, 140.4, 144.1, 147.3.

1,3,5-Tris[1-(β-D-glucopyranosyl)-1,2,3-triazole-4-yloxymethyl]-2,4,6-tris(hexylthio) benzene (C6Glu3)

Acetylated compound. Yield 643 mg (73%), white powder, R_f 0.47 in AcOEt/CH_2Cl_2 (4 : 6). Mp 123.7–125.4 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = −54.8 (*c* 1, CH_2Cl_2). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0.87 (t, ^3J = 7.0 Hz, 9H), 1.25–1.35 (m, 18H), (p, ^3J = 7.38 Hz, 6H), 1.89 (s, 9H), 2.05–2.11 (3s, 27H), 2.79 (t, ^3J = 7.28 Hz, 6H), 4.02 (m, 3H), 4.14 (dd, ^3J = 1.75 Hz, ^2J = 12.53 Hz, 3H), 4.3 (dd, ^3J = 4.96 Hz, ^2J = 12.71 Hz, 3H), 4.81 (s, 6H), 5.22–5.28 (m, 9H), 5.39–5.53 (m, 6H), 5.9 (d, ^3J = 8.85 Hz, 3H), 7.83 (s, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 14.1, 20.2, 20.5, 20.6, 20.7, 22.5, 28.6, 29.6, 31.4, 38.9, 61.6, 64.2, 67.7, 70.2, 71.9, 72.8, 75.0, 85.7, 121.1, 141.1, 146.0, 147.0, 168.8, 169.4, 170.0, 170.5.

Deacetylated compound. Yield 347 mg (88%), white powder, R_f 0.46 in AcOEt/MeOH/H_2O (7 : 2 : 1). Mp 186.8–188.1 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = −8.2 (*c* 1, MeOH). HRMS (ESI^+) calcd for $C_{54}H_{89}N_9O_{18}S_3$ ($[M + 2H]^{2+}$): 623.7738, found 623.7739. ^{1}H NMR (DMSO) δ 0.82 (t, ^3J = 6.96 Hz, 9H), 1.18–1.25 (m, 12H), 1.42 (m, 6H), 2.79 (t, ^3J = 7.24 Hz, 6H), 3.19–3.26 (m, 3H), 3.34–3.45 (m, 9H), 3.66–3.78 (m, 6H), 4.62 (t, ^3J = 5.56 Hz, 3H), 4.68 (s, 6H), 5.18 (2s, 9H), 5.31 (d, ^3J = 4.67 Hz, 3H), 5.36 (d, ^3J = 6.03 Hz, 3H), 5.53 (d, ^3J = 9.23 Hz, 3H), 8.23 (s, 3H). ^{13}C NMR (DMSO) δ 14.3, 22.2, 29.2, 30.9, 38.2, 61.2, 64.2, 70.0, 71.8, 72.6, 77.4, 80.4, 87.9, 123.5, 140.4, 144.1, 147.3.

1,3,5-Tris[1-(β-D-glucopyranosyl)-1,2,3-triazole-4-yloxymethyl]-2,4,6-tris(heptylthio) benzene (C7Glu3)

Acetylated compound. Yield 645 mg (72%), white powder, R_f 0.54 in AcOEt/CH_2Cl_2 (4 : 6). Mp 134.2–136.7 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = −50.8 (*c* 1, CH_2Cl_2). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0.88 (t, ^3J = 6.9 Hz, 9H), 1.25 (m, 24H), 1.47 (p, ^3J = 7.54 Hz, 3H), 1.89 (s, 9H), 2.05–2.11 (3s, 27H), 2.79 (t, ^3J = 7.3 Hz, 6H), 4.02 (ddd, ^3J = 1.99 Hz, ^3J = 5.27 Hz, ^3J = 10.17 Hz, 3H), 4.14 (dd, ^3J = 1.95 Hz, ^2J = 12.54 Hz, 3H), 4.3 (dd, ^3J = 4.97 Hz, ^2J = 12.63 Hz, 3H), 4.81 (s, 6H), 5.22–5.28 (m, 9H), 5.4–5.53 (m, 6H), 5.9 (d, ^3J = 8.98 Hz, 3H), 7.83 (s, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 14.1, 20.2, 20.5, 20.6, 20.7, 22.6, 28.9, 29.7, 31.7, 38.9, 61.6, 64.2, 67.7, 70.2, 71.9, 72.8, 75.0, 85.7, 121.2, 141.1, 146.0, 147.0, 168.8, 169.4, 170.0, 170.5.

Deacetylated compound. Yield 341 mg (87%), white powder, R_f 0.53 in AcOEt/MeOH/H_2O (7 : 2 : 1). Mp 183.0–184.7 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = −7.4 (*c* 1, MeOH). HRMS (ESI^+) calcd for $C_{57}H_{95}N_9O_{18}S_3$ ($[M + 2H]^{2+}$): 644.7973, found 644.7978. ^{1}H NMR (DMSO) δ 0.85 (t, ^3J = 6.95 Hz, 9H), 1.22–1.41 (m, 30H), 2.79 (t, ^3J = 6.77 Hz, 6H), 3.17–3.27 (m, 3H), 3.36–3.45 (m, 9H), 3.67–3.76 (m, 6H), 4.62 (t, ^3J = 5.54 Hz, 3H), 4.68 (s, 6H), 5.17 (2s, 9H), 5.3 (d, ^3J = 4.73 Hz), 5.35 (d, ^3J = 6.06 Hz, 3H), 5.53 (d, ^3J = 9.21 Hz, 3H), 8.24 (s, 3H). ^{13}C NMR (DMSO) δ 14.4, 22.5, 28.7, 28.8, 29.6, 31.6, 38.3, 61.3, 64.2 70.0, 71.7, 72.6, 77.4, 80.4, 87.9, 123.5, 140.3, 144.0, 147.2.

1,3,5-Tris(prop-2-ynyloxymethyl) benzene (4). To a solution of propargyl alcohol (311 mg, 5.5 mmol) in anhydrous DMF (8 mL) cooled to 0 °C, was added, little by little, under argon atmosphere a 60% NaH (131 mg, 5.5 mmol) oil dispersion. The reaction mixture was stirred for 10 min and a solution of tris(bromomethyl)benzene (505 mg, 1.4 mmol) in dry DMF (1 mL) was slowly added at 0 °C. The resulting mixture was stirred for 18 h at room temperature and ice was added to neutralize the basic solution. The mixture was poured into water (50 mL) and extracted with AcOEt (3 × 50 mL). The organic layers were gathered, washed first with H_2O (2 × 30 mL), then with brine (30 mL), dried with anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated. Purification by flash chromatography on a silica gel column with CH_2Cl_2/cyclohexane (85 : 15) gave the expected product as yellow oil (511 mg, 48%). R_f 0.51 in CH_2Cl_2/cyclohexane (9 : 1). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 2.5 (t, ^4J = 2.38 Hz, 3H), 4.22 (d, ^4J = 2.38 Hz, 6H), 4.64 (s, 6H), 7.33 (s, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 57.33, 71.30, 74.77, 79.55, 127.12, 137.93.

1,3,5-Tris[1-(β-D-glucopyranosyl)-1,2,3-triazole-4-yloxymethyl] benzene (C0Glu3). Compound **C0Glu3** was obtained as described for the synthesis of **C3Glu3** by using the appropriate 1,3,5-tris(prop-2-ynyloxymethyl)-benzene instead of **3a**.

Acetylated compound. Yield 481 mg (50%), white powder, R_f 0.48 in AcOEt/CH_2Cl_2 (8 : 2). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 2.00–2.06 (3s, 26H), 4.04–4.32 (m, 9H), 4.55 (s, 6H) 4.62 (s, 6H), 5.27–5.88 (m, 9H), 6 (d, ^3J = 9.04 Hz, 3H), 7.32 (s, 3H), 8.04 (s, 3H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 20.1, 20.5, 20.6, 20.7, 61.5, 62.7, 67.7, 70.3, 71.6, 72.7, 74.9, 85.6, 121.7, 127.3 138.2, 145.6 168.9, 169.5, 170.0, 170.5.

Deacetylated compound. Yield 308 mg (87%), white powder, R_f 0.51 in AcOEt/MeOH/H_2O (5 : 4 : 3). Mp 175.0–176 °C. $[\alpha]_D^{25}$ = −7.4 (*c* 1, MeOH). ^{1}H NMR (DMSO) δ 2.51–3.47 (m, 24H), 3.68–3.82 (m, 6H), 4.15 (m, 3H), 4.57 (s, 6H), 4.60 (s, 6H), 4.68 (m, 3H), 5.24 (m, 3H), 5.39–5.46 (m, 9H), 5.54 (d, ^3J = 9.2 Hz, 3H), 7.27 (s, 3H), 8.38 (s, 3H). ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ 49.06, 61.20, 63.35, 69.99, 71.67, 72.51, 77.39, 80.40, 87.96, 123.82, 126.43, 138.77, 144.17.

Surface tension measurements

The surface activity of facial amphiphiles in solution at the air/water interface was determined by the Wilhelmy plate technique using a Krüss K100 tensiometer controlled by Labdesk software (Krüss, Germany). All solutions were prepared at least 12 hours before the measurements with water purified using a Milli-Q system (Millipore; resistivity = 18.2 MΩ cm; surface tension = 72.8 mN m^{-1}). A 20 mL initial volume of the facial amphiphile solution was taken in a glass trough, and surface tensions were determined by a dilution technique. The platinum plate was cleaned by flaming before experiments. All measurements were carried out at 25 °C and repeated 3 times unless otherwise noted. The surface excess Γ at the air–water interface was calculated by the Gibbs adsorption isotherm equation $\Gamma = -(1/RT)(d\gamma/d\log C)$, where γ is the surface tension (N m^{-1}) at the surfactant concentration C (mol L^{-1}). The occupied area (A_{min}) per surfactant molecule was calculated from $A_{min} = 1/N_A\Gamma$, where N_A is Avogadro's number.

Dynamic light scattering measurements

Hydrodynamic diffusion coefficients and polydispersity index of **CnGlu3** solutions at different concentrations were measured at 25 °C using a Zetasizer Nano-S model 1600 (Malvern Instruments Ltd., UK) equipped with a He–Ne laser (λ = 633 nm, 4.0 mW). The solutions were prepared and stored at room temperature overnight before measurements. The samples were filtered through a 0.45 μm filter and placed in a 45 μL-cuvette. The experimental run time was 10 s and experimental data are reported as an average of 10 values from 10 scans. Scattered light intensity was measured at a scattering angle of 173° relative to the laser source (backscattering detection). The time-dependent correlation function was analyzed using an exponential decay model. When there was a low polydispersity index (PDI < 20%), a Stokes radius (R_S) of particles was estimated from the diffusion coefficient (D) using the Stokes–Einstein equation $D = k_BT/6\pi\eta R_S$, where k_B is the Boltzmann constant, T the absolute temperature and η the viscosity of the solvent. This enabled intensity size distribution to be converted into volume size distribution *via* the manufacturer's software, according to the Mie theory which gives a good estimation of the mean size of particles in solution.

Determination of log *K′w* values

We used reversed-phase high-performance liquid chromatography, a common and rapid technique for indirect determination of the octanol/water partition coefficient as a measure of the lipophilicity of organic compounds. The facial amphiphiles were dissolved in MeOH at a concentration of 1 g L^{-1} and injected into a reverse-phase column (C18, 5 μm granulometry, 250 × 4.6 mm) at room temperature.[25] Compounds were eluted with various MeOH/H_2O mixtures (from 95 : 5 to 65 : 35). The measurements were performed at a flow rate of 0.8 mL min^{-1} and detected at 220 nm. The value of $\log k'w$ was calculated as $\log k'w = \log[(t-t_0)/t_0]$, where t is the retention time of the compound and t_0 is the elution time of MeOH, which is not retained on the column. $\log k'w$ values were obtained by extrapolation of the linear regression to 0% MeOH.

Small angle X-ray scattering (SAXS)

The structure of particles in solution (radius of gyration, dimensions of self-assembled structures, molecular mass) was characterized by SAXS using Synchrotron radiation on the ID14-eh3 beamline at European Synchrotron Research Facility (Grenoble, France). Scattering patterns were measured at several solute concentrations ranging from 2 to 40 g L^{-1} in H_2O. For a sample–detector distance of 1.83 m and an X-ray wavelength λ = 0.0931 nm, a 0.01 < q < 3.5 nm^{-1} range of momentum transfer was covered. To avoid radiation damage during the scattering experiments, the sample was kept circulating in the cell while the data were collected in 10 successive 30 s frames. Individual frames were averaged after normalization to the intensity of the incident beam and corrected for detector response, and the scattering of the buffer was subtracted. The difference curves were scaled for the solute concentration. All data manipulations were performed *via* the program package PRIMUS.[34]

 This journal is © The Royal Society of Chemistry and the Centre National de la Recherche Scientifique 2012

The forward scattering values $I(q = 0)$ and the radii of gyration R_g were evaluated using the Guinier approximation assuming that, at very small angles ($qR_g < 1$), the intensity is represented as $I(q) = I(0)\exp(-(qR_g)^2/3)$. For rod-like particles, scattering curves were analyzed by plotting $qI(q) \approx \exp(-(qR_g)^2/2)$. The scattering data were separated into two parts: a low-angle range where the length of the rod $L = \sqrt{12}\,R_g$ can be determined and a higher-angle region where the diameter can be obtained from data at angles where $2\pi/L < q < 1/R_c$ (R_c is the cross-sectional radius of gyration). The molecular weight (MW) of the solutes was estimated by comparing their forward scattering intensity with that of a reference solution[35] of bovine serum albumin ($MW_{BSA} = 66$ kDa), corrected for electron density and partial specific volume of solutes. Partial specific volumes were estimated from the chemical compositions of the molecules. N_{agg} is calculated by dividing the aggregate molecular weight obtained from the forward intensity by the molecular weight of the monomer. The SAXS data in Fig. 7 were further analyzed using the SASfit software package.[36] For **C4Glu3** and **C5Glu3**, a model from Jan Skov Pedersen of rod-like copolymer micelles was used. This model worked reasonably well except for sample **C3Glu3**, which needed to be treated with a model of a generalized Gaussian coil.

Acknowledgements

We are grateful to the European Synchrotron Radiation Facility for provision of synchrotron radiation facilities and to Petra Pernot for assistance in using beamline ID14-eh3. We would like to thank Professor Marc Gingras for his helpful discussion concerning the synthesis of tripods, and Marjorie Sweetko for English language revision.

References

1 (*a*) J. H. Fuhrhop and T. Wang, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 2901–2938; (*b*) F. M. Menger and J. S. Keiper, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2000, **39**, 1906–1920; (*c*) M. Wathier, A. Polidori, K. Ruiz, A.-S. Fabiano and B. Pucci, *New J. Chem.*, 2001, **25**, 1588–1599.
2 Y. Zhao, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2007, **12**, 92–97.
3 Y. Cheng, D. M. Ho, C. R. Gottlieb, D. Kahne and M. A. Bruck, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 7319–7320.
4 P. Venkatesan, Y. Cheng and J. D. Kahne, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 6955–6956.
5 Y. R. Vandenburg, B. D. Smith, M. N. Pérez-Payán and A. P. Davis, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 3252–3253.
6 U. Taotafa, D. B. McMullin, S. C. Lee, L. D. Hansen and P. B. Savage, *Org. Lett.*, 2000, **2**, 4117–4120.
7 P. B. Savage, *Eur. J. Org. Chem.*, 2002, 759–768.
8 H. M. Willemem, A. T. M. Marcelis and E. J. R. Sudhölter, *Langmuir*, 2003, **19**, 2588–2591.
9 Z. Zhang, J. Yan and Y. Zhao, *Langmuir*, 2005, **21**, 6235–6239.
10 (*a*) P. S. Chae, K. Gotfryd, J. Pacyna, L. J. W. Miercke, S. G. F. Rasmussen, R. A. Robbins, R. R. Rana, C. J. Loland, B. Kobilka, R. Stroud, B. Byrne, U. Gether and S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 16750–16752; (*b*) D. T. McQuade, D. G. Barett, J. M. Desper, R. K. Hayashi and S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 4862–4869.
11 F. M. Menger and J. L. Sorrels, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 4960–4961.
12 J. A. A. W. Hlemans, R. R. J. Slangen, A. E. Rowan and R. J. M. Nolte, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 9040–9049.
13 R. Roy and J. M. Kim, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1999, **38**, 369–372.
14 M. Kellermann, W. Bauer, A. Hirsch, B. Schade, K. Ludwig and C. Böttcher, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, **43**, 2959–2962.
15 (*a*) S. Jebors, F. Fache, S. Balme, F. Devoge, M. Monachino, S. Cecillon and A. W. Coleman, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 319–329; (*b*) K. Suwinska, O. Shkurenko, C. Mbemba, A. Leydier, S. Jebors, A. W. Coleman, R. Matar and P. Falson, *New J. Chem.*, 2008, **32**, 1988–1998.
16 A. P. H. J. Schenning, C. Elissen-Romàn, J.-W. Weener, M. W. P. L. Baars, S. J. van der Gaasdt and E. W. Meijer, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 8199–8208.
17 K. Ariga, T. Urakawa, A. Michiue, Y. Sasaki and J.-I. Kikuchi, *Langmuir*, 2000, **16**, 9147–9150.
18 Y. Chen, A. V. Ambade, D. R. Vutukuri and S. Thayumanavan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 14760–14761.
19 K. V. Kilway and J. S. Siegel, *Tetrahedron*, 2001, **57**, 3615–3627.
20 J. E. Anthony, S. I. Khan and Y. Rubin, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 3499–3627.
21 M. Gingras, J.-M. Raimundo and Y. M. Chabre, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, **45**, 1686–1712.
22 (*a*) H. C. Kolb, M. G. Finn and K. B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2001, **40**, 2004–2021; (*b*) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin and K. B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, **41**, 2596–2599.
23 F. Fazio, M. C. Bryan, O. Blixt, J. C. Paulson and C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 14397–14402.
24 C. Tanford, in *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*, Krieger publishing company, Malabar Florida, 2nd edn, 1991.
25 T. Braumann, *J. Chromatogr., A*, 2008, **373**, 191–225.
26 D. Svergun, *J. Appl. Crystallogr.*, 1992, **25**, 495–503.
27 R. Pecora, Basic Concepts Scattering and Time Correlation Functions, in *Soft Matter Characterization*, ed. Borsali and Percora, Springer, 2007, vol. 1, pp. 1–38.
28 (*a*) C. Tanford, *J. Phys. Chem.*, 1972, **76**, 3020–3024; (*b*) Israelachvili, D. J. Mitchell and B. W. Ninham, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, 1976, **72**, 1525–1568; (*c*) K. Kratzat and H. Finkelmann, *Langmuir*, 1996, **12**, 1765–1770.
29 R. Ngarajan, *Langmuir*, 2002, **18**, 31–38.
30 B. Trappmann, K. Ludwig, M. R. Radowski, A. Shukla, A. Mohr, H. Rehage, C. Böttcher and R. Haag, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 11119–11124.
31 K. Kratzat and H. Finkelmann, *J. Colloid Interface Sci.*, 1996, **181**, 542–550.
32 P. Garidel, A. Hildebrand, R. Neubert and A. Blume, *Langmuir*, 2000, **16**, 5267–5275.
33 A. Hidebrand, P. Garidel, R. Neubert and A. Blume, *Langmuir*, 2004, **20**, 320–328.
34 P. V. V. Konarev, V. Vladimir, A. V. Sokolova, M. H. J. Koch and D. Svergun, *J. Appl. Crystallogr.*, 2003, **36**, 1277–1282.
35 E. Mylonas and D. I. Svergun, *J. Appl. Crystallogr.*, 2007, **40**, s245–s249.
36 J. Kohlbrecher, SASfit ver. 0.93.3; available at http://kur.web.psi.ch/sans1/SANSSoft/sasfit.html.

Biochimica et Biophysica Acta 1818 (2012) 798–805

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamem

Production of UCP1 a membrane protein from the inner mitochondrial membrane using the cell free expression system in the presence of a fluorinated surfactant

Iulia Blesneac [a,b,c,1], Stéphanie Ravaud [a,b,c], Céline Juillan-Binard [a,b,c], Laure-Anne Barret [d,e], Manuela Zoonens [f,g], Ange Polidori [d,e], Bruno Miroux [f,g], Bernard Pucci [d,e], Eva Pebay-Peyroula [a,b,c,*]

[a] Université Grenoble 1, Institut de Biologie Structurale, 41 Rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France
[b] CEA, Institut de Biologie Structurale, 38027 Grenoble, France
[c] CNRS, Institut de Biologie Structurale, 38027 Grenoble, France
[d] Université d'Avignon, Faculté des Sciences, Equipe Chimie Bioorganique et Systèmes Amphiphiles, 33, rue Louis Pasteur, 84000 Avignon, France
[e] Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247, Universités Montpellier I & II, 15 avenue Charles Flahault, 34093, Montpellier Cedex 05, France
[f] Université Paris-Diderot, UMR 7099, Paris, France
[g] CNRS UMR 7099, LBPC-PM, Institut de Biologie Physico Chimique, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 21 July 2011
Received in revised form 7 December 2011
Accepted 19 December 2011
Available online 27 December 2011

Keywords:
Membrane protein expression
Mitochondrial carriers
Uncoupling protein
Cell-free expression
Fluorinated surfactants
Circular dichroism

ABSTRACT

Structural studies of membrane protein are still challenging due to several severe bottlenecks, the first being the overproduction of well-folded proteins. Several expression systems are often explored in parallel to fulfil this task, or alternately prokaryotic analogues are considered. Although, mitochondrial carriers play key roles in several metabolic pathways, only the structure of the ADP/ATP carrier purified from bovine heart mitochondria was determined so far. More generally, characterisations at the molecular level are restricted to ADP/ATP carrier or the uncoupling protein UCP1, another member of the mitochondrial carrier family, which is abundant in brown adipose tissues. Indeed, mitochondrial carriers have no prokaryotic homologues and very few efficient expression systems were described so far for these proteins. We succeeded in producing UCP1 using a cell free expression system based on *E. coli* extracts, in quantities that are compatible with structural approaches. The protein was synthesised in the presence of a fluorinated surfactant, which maintains the protein in a soluble form. Further biochemical and biophysical analysis such as size exclusion chromatography, circular dichroism and thermal stability, of the purified protein showed that the protein is non-aggregated, monodisperse and well-folded.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

UCP1 (uncoupling protein 1) belongs to the mitochondrial carrier family (MCF), which comprises more than 40 integral membrane proteins transporting metabolites across the inner mitochondrial membrane [1]. This transport is linked to major metabolic pathways occurring in mitochondria, which are essential to eukaryotic metabolism. Because of their functional importance, impairment of such carriers leads to severe diseases (for review see [2]). MCF members share several characteristics: (a) they are encoded by nuclear genes, (b) they have a molecular mass of 30–35 kDa, (c) six transmembrane helices are predicted from their sequence, (d) their sequence displays three repeated regions of about 100 amino acids each, and (e) strongly conserved amino acids forming a characteristic signature for these carriers, the MCF motif, are found in each repeated region. Despite of these common features each of them is highly specific to the transport of one metabolite [3]. The ADP/ATP carrier (AAC) is the most studied MCF carrier and is the first for which a high-resolution structure was solved [4]. From the location of MCF motifs in the structure, it is predicted that all MCF members have a similar folding. However, the specific recognition mode of the substrates as well as the conformation changes occurring during the transport, still are elusive. UCP1 is the second most studied MCF member (for review see [5]). By inducing a proton leak across the inner mitochondrial membrane, it is responsible for the dissipation of the proton gradient [6,7], and the uncoupling of oxidative phosphorylation from ATP synthesis. UCP1 is expressed in the brown adipose tissue (BAT) and because of the respiration uncoupling, fat stored into brown adipocytes converts into heat. UCP1 is a key component of non-shivering thermogenesis and several reports suggest its role in the protection against diet-induced obesity [8–10].

All the efforts to characterise biochemically and structurally MCF carriers are hindered by the difficulty in producing sufficient amounts of high-quality samples, known to be a major bottleneck for

Abbreviations: UCP1, uncoupling protein 1; MCF, mitochondrial carrier family; AAC, ADP/ATP carrier; BAT, brown adipose tissues; cmc, critical micellar concentration; CD, circular dichroism; RTS, Rapid Translation System

* Corresponding author at: Institut de Biologie Structurale, 41 Rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France. Tel.: +33 4 38 78 34 82/95 83; fax: +33 4 38 78 94 84.
E-mail address: eva.pebay-peyroula@ibs.fr (E. Pebay-Peyroula).
[1] Present address: Institut de Génomique Fonctionnelle, CNRS UMR5203, INSERM U661, Universités de Montpellier, 34094 Montpellier, France, France.

0005-2736/$ – see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bbamem.2011.12.016

membrane proteins. As predicted from the known AAC structure, MCF carriers consist in 6 transmembrane helices partially interacting with the lipid bilayer and partially accessible to the solvent, explaining their high lability. This topology was confirmed with the recent UCP2 structure [11]. Most of the published studies on purified MCF carriers have been made with protein purified from native tissues, which explains the more extensive studies on AAC extracted from heart or liver mitochondria (see *i.e.* [12–14] and for review [15]), and on UCP1 found in BAT (see *i.e.* [16–19], and for review [20]). Although AAC and UCP1 are quite abundant in heart or liver mitochondria and BAT, respectively, the purification of native proteins remains difficult to control and the production of mutants necessary for the study of structure–function relationships impossible. One of the major biochemical difficulties is that native MCF do not bind to chromatographic column and instead are generally isolated from the flow through of hydroxylapatite column when solubilised with Triton X-100 or LAPAO. A bacterial expression protocol including a large number of steps was recently published for UCP2 and led to the first structural insights of UCP2 by NMR [11]. Establishing efficient and robust protocols for the heterologous production and purification of functional mitochondrial carriers still remains an essential but challenging task for the study of the MCFs.

Two heterologous production systems of UCP1 have been described so far: (a) the production in *E. coli* as inclusion bodies [21–23] and (b) the expression in yeast [24–27]. Although, the oxoglutarate/malate carrier has been produced in large amounts from inclusion bodies [28], UCP1 could not be produced with similar yields. The final amounts of pure protein obtained from inclusion bodies or yeast are low and rather inadequate for structural studies. We present herein the production of UCP1 using the cell free system, which couples transcription and translation reactions into the same reaction medium [29]. This technique developed since a decade mainly for soluble proteins, emerged recently for membrane proteins. A considerable variety of prokaryotic or eukaryotic membrane proteins, belonging to different family, having up to twelve membrane helices and for some with molecular masses exceeding 100 kDa, have already been successfully expressed (for review see [30]). Among other advantages, cell free expression overcomes general limitations known for cellular expression such as targeting, translocation and insertion into the cell membrane, a limited volume of membranes into which proteins can be inserted, and toxic or inhibitory effects induced by the proteins on the host cell. In addition, the set-up of the cell free system offers a multitude of options to adapt the reaction conditions and to directly supply any compound favouring the expression or stability of proteins of interest. In order to produce UCP1 in the soluble fraction of the reaction medium, we added surfactants above their critical micellar concentrations (cmc) and explored various types of compounds from classical detergents to non commercial surfactants. Fluorinated surfactants [31] are of particular interest for stabilising membrane proteins [32] and were already shown to be compatible with the cell free machinery [33]. We were able to produce UCP1 in quantities that are compatible with structural studies in the presence of fluorinated surfactants. As shown from size exclusion chromatography and circular dichroism, including thermal stability, the protein is monodisperse, well-folded and sufficiently stable for structural studies.

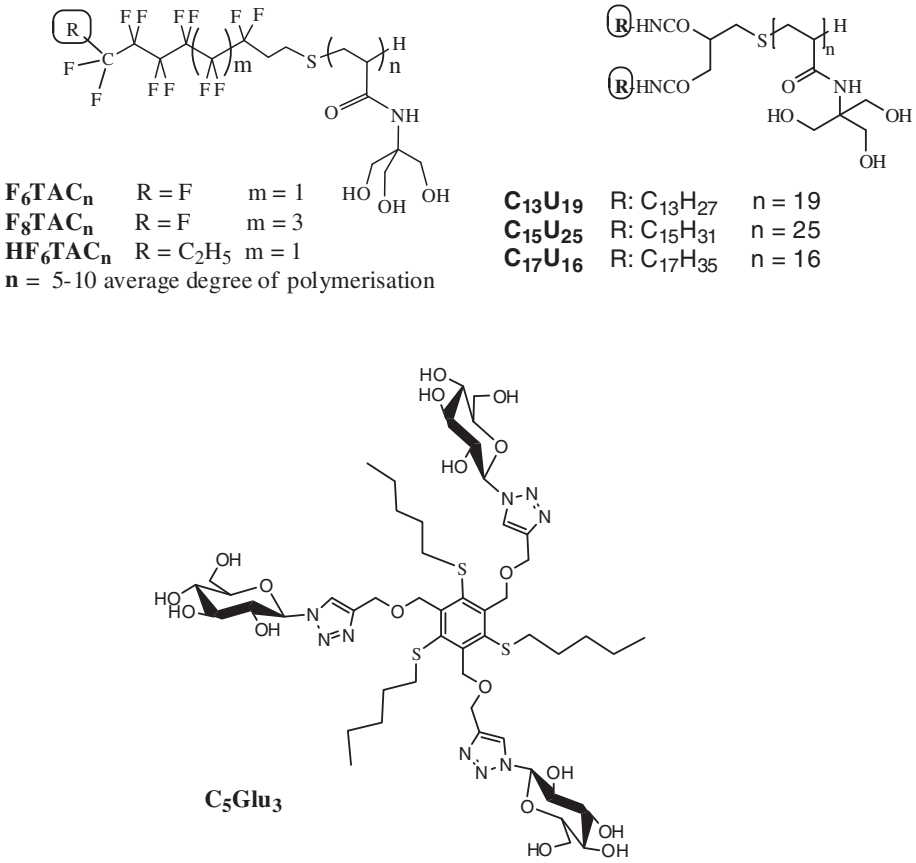


Fig. 1. Chemical structures of FTACs, C_nU_m and Tripod surfactants. FTACs are short oligomers of Tris (hydroxymethyl) acrylamidomethane (THAM) prepared in the presence of fluorinated mercaptans as transfer reagents, to introduce (hemi) fluorinated chain at the end of polymeric backbone [31]. C_nU_m are prepared from mercapto glycerol as starting material which is first endowed with two hydrophobic tails bearing C_n carbon atoms, then involved in telomerization reaction of THAM monomer to multiply the number of Tris moieties (m) as polar heads [34]. Three hydrocarbon chains and three glucosyl groups are grafted onto the central mesitylene forming the hydrophobic and hydrophilic faces of C_5Glu_3, respectively [35].

2. Material and methods

2.1. Surfactants and lipids

Detergents were purchased from Anatrace (except Triton X-100 from Sigma), and lipids from Avanti Polar Lipids. Hemifluorinated (HFTACs) or fluorinated surfactants (FTACs), phospholipid-like surfactants (C_nU_m) and facial amphiphiles C_5Glu_3 (Fig. 1), were synthesised by one coauthoring team (B. Pucci, A. Polidori and L.A. Barret). F_nTAC_m contain fluorinated hydrophobic tails consisting of n carbons (6 or 8 in this study), and m is the average degree of polymerization of the polar head [31]. Their physical–chemical properties (including cmc) are independent of the average degree of polymerization of the polar head. Three different FTACs were initially screened (Table 1). Only F_8TAC_5 was considered in additive screens and upscale experiments. In the corresponding sections, unless specified, FTAC refers to F_8TAC_5. Phospholipid-like surfactants C_nU_m have two hydrophobic tails bearing C_n carbon atoms, and m Tris moieties as polar heads [34]. The hydrophobic face of the facial amphiphile C_5Glu_3 consists of three short hydrocarbon chains (3 to 7 carbons each). Three glucosyl groups grafted onto a central mesitylene constitute the hydrophilic face [35]. The peptergents were a gift from S. Zhang (MIT, USA).

2.2. Cloning

The rUCP1 cDNA was amplified by PCR using the primers UCP1-NOTI-FW (TATGAGCGGCCGCATGGTGAGTTCGACAACTTCCG) and UCP1-CFR9I-24A-REV (CGGATCCCGGGCTATGTGGTGCAGTCCACTGTCTGC) for insertion into the plasmid pIVEX 2.4a (Roche) or UCP1-CFR9I-MCS-REV (CGGATCCCGGGTGTGGTGCAGTCCACTGTCTGCC) for insertion into the plasmid pIVEX 2.3MCS (Roche). The PCR product was inserted between the NotI and Cfr9I restrictions sites of the vectors pIVEX 2.4a or pIVEX 2.3 MCS encoding for an N-terminal or C-terminal poly (His) 6 tag respectively. These vectors are optimised for expression in the Rapid Translation System (RTS) cell-free system used in this study. Constructs were checked by sequencing.

2.3. Cell free expression

Cell free expression experiments were performed using the Roche *E. coli* RTS system according to the manufacturer's instructions. For small scale (batch) production, 0.5 μg of plasmid DNA was incubated for 24 h, at temperatures ranging from 15 °C to 28 °C in the RTS 100 HY kit reaction mixture (final volume of 25 μL). The synthesis was followed by a centrifugation step at 18,000 g for 15 min (4 °C). The supernatant and the pellet resuspended in 50 mM Tris buffer, pH 7.5 were subsequently analysed by SDS-PAGE, Western blotting and immunodetection of the (His) 6-tag. The production of soluble protein was achieved by supplying into the reaction mixture different surfactants and additives listed in Tables 1 and 2.

For preparative experiments, 10 μg of plasmid DNA was incubated in the RTS 500 ProteoMaster HY lysate supplemented with 4 mM FTAC and 0.28 mM cardiolipin in a final volume of 1 mL. After 24 h incubation at 28 °C the reaction mixture was centrifuged 15 min at 18,000 g (4 °C) and the supernatant was used for the purification of the protein.

Table 2
Effect of additives on rUCP1 solubility. Solubility of the protein synthesised in the presence of (A) 4 mM FTAC and different additives or (B) different surfactants in the presence of 0.28 mM cardiolipin. The solubility was evaluated on the same scale as for Table 1. The surfactant and additives concentration used are given in the brackets. Some additives inhibited the synthesis. When scaled up to a 1 mL reaction mixture, in the presence of F_8TAC_5 and cardiolipins the quantity of protein is estimated to about 1 mg with 90% in the supernatant and 10% in the pellet.

A.

Additives	Solubility
No additive	6
E. coli lipids (0.4 g/L)	6
Cardiolipin (0.28 mM = 0.4 g/L)	9
Facial amphiphile C_5Glu_3 (0.25 mM)	6
Peptergent KA_6 (0.1 mM)	6
Lauric acid (0.1 mM)	No synthesis
GDP (0.1 mM)	No synthesis

B.

Surfactant	UCP1 solubility	
	No additive	Cardiolipin
F_8TAC_5 (4 mM)	6	9
$C_{13}U_{19}$ (0.8 mM)	6	4
DDM (1.7 mM)	3	1
Brij35 (3.3 mM)	5	9
Brij58 (0.9 mM)	5	0
Digitonin (32.2 mM)	5	5

Table 1
Effect of surfactants on rUCP1 solubility. For each surfactant the table indicates its charge, cmc, the concentration used (mM) and the result obtained. The solubility was evaluated on a scale from 0 to 10, 5 corresponding to half of the protein in the supernatant and 10 corresponding to the detection of the protein exclusively in the supernatant. N: non ionic, A: anionic, Z: zwitterionic.

Surfactant type	Surfactant	Charge	cmc (mM)	Concentration (mM)	UCP1 solubility
Glucosides	DDM	N	0.17	0.85	3
	Cymal 5	N	2.4	24	2
Polyethylene glycols	Triton X-100	N	0.23	2.3	0
Polyoxyethylenes	$C_{10}E_5$	N	0.81	8.1	0
	Brij35	N	0.091	3.3	5
	Brij58	N	0.004	0.9	5
Steroids	Digitonin	N	0.5	6.5	5
Amine oxides	LDAO	Z	1.00	10	No synthesis
	LAPAO	Z	1.56	15.6	No synthesis
Lipid like detergents	FC_{12}	Z	1.5	15	No synthesis
	FC_{14}	Z	0.12	1.2	No synthesis
	FC_{16}	Z	0.013	0.13	3
Phospholipid like surfactants	$C_{13}U_{19}$	N	0.008	0.08	6
	$C_{15}U_{25}$	N	0.0055	0.055	6
	$C_{17}U_{16}$	N	0.005	0.05	6
Fluorinated compounds	HFTAC	N	0.45	9	6
	F_6TAC_{10}	N	0.3	7.5	6
	F_6TAC_5	N	0.3	7.5	6
	F_8TAC_5	N	0.03	0.75	6
Facial amphiphiles	C_5Glu_3	N	0.12	1.23	0

2.4. Protein purification

rUCP1 was purified by affinity chromatography using a Ni-NTA resin. The supernatant recovered from the large scale synthesis was diluted ten times in 50 mM Hepes, pH 7.5, 200 mM NaCl containing 10 mM imidazole and incubated with 250 µL of preequilibrated resin (Ni-NTA Superflow, Qiagen). After 1 h incubation at 4 °C, under shaking, the suspension was poured into a column and extensively washed with buffer A (50 mM Hepes, pH 7, 200 mM NaCl, 0.014 mM cardiolipin, 0.15 mM FTAC) and increasing concentrations of imidazole (10, 20 and 40 mM). The protein was eluted at 200 mM imidazole.

2.5. Size-exclusion chromatography

The apparent molecular mass and the Stokes radius of the rUCP1-surfactant complex (Rs) were analysed by size-exclusion chromatography using a Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare). Standard proteins (ferritin, aldolase, ovalbumin, and ribonuclease; Bio-Rad) were used to calibrate the column with the same buffer. Prior to the size-exclusion analysis, imidazole was removed by dialysis and during concentration in Amicon Ultracel-30k concentrator (Millipore).

2.6. UCP1 purified from BAT

The purification procedure was described by Lin and Klingenberg [36]. Briefly, brown adipose tissue (BAT) mitochondria were isolated from one week cold-adapted mice. Mitochondria were cleaned up with 3.2% lubrol in buffer 20 mM MOPS pH 6.8, 20 mM Na_2SO_4, 1 mM EDTA. The proteins were then solubilised 30 min in 2% $C_{10}E_5$. UCP1 was purified on hydroxyapatite column previously washed with buffer containing 0.05% $C_{10}E_5$. The buffer was then exchanged for 10 mM KPi pH 6.5 by desalting on a HiTrap 5 mL column.

2.7. Circular dichroism spectroscopy

Prior to the circular dichroism experiments on cell-free expressed rUCP1, the buffer composition of the protein solution was changed to 25 mM KPi pH 7, 0.014 mM cardiolipin, 200 mM NaF (supplemented with 0.15 mM FTAC) by dialysis and during concentration in Amicon Ultracel-30k concentrator (Millipore). The measurements were performed using a Peltier temperature controlled spectropolarimeter (JASCO model J-810) equipped with a 0.1 cm path length cell. The CD spectrum of native UCP1, was recorded on a Jasco Model J-815 using a 0.1 cm path length cell. For both proteins, ten scans were collected at 20 °C from 260 to 200 nm at 0.5 nm intervals, then averaged and baseline-corrected by subtraction of blank buffer. After subtracting the blank signal, the CD signal (in millidegrees) was converted to mean molar residue ellipticity (in $deg.cm^2.dmol^{-1}$). Thermal denaturation of cell-free expressed rUCP1 was followed by continuously monitoring ellipticity changes at a fixed wavelength (220 nm) while the sample was heated up at a constant rate from 20 °C to 90 °C. Spectra were analysed with the Spectra Manager II software (Jasco) including the protein secondary structure determination.

3. Results

3.1. Small-scale cell free production of rUCP1

First, the expression of the two rUCP1 constructs (His-rUCP1 and rUCP1-His) was determined in detergent free batch reactions using RTS 100 kits. Interestingly, only His-rUCP1 was synthesised in detectable amounts. The influence of the position of the tag on the amount of proteins produced with the cell free system was already reported in a study of *Pseudomonas aeruginosa* proteins [37]. Although there is no general rule for the position of tag, the location of the His-tag in its N-terminus is important for an optimal synthesis of rUCP1.

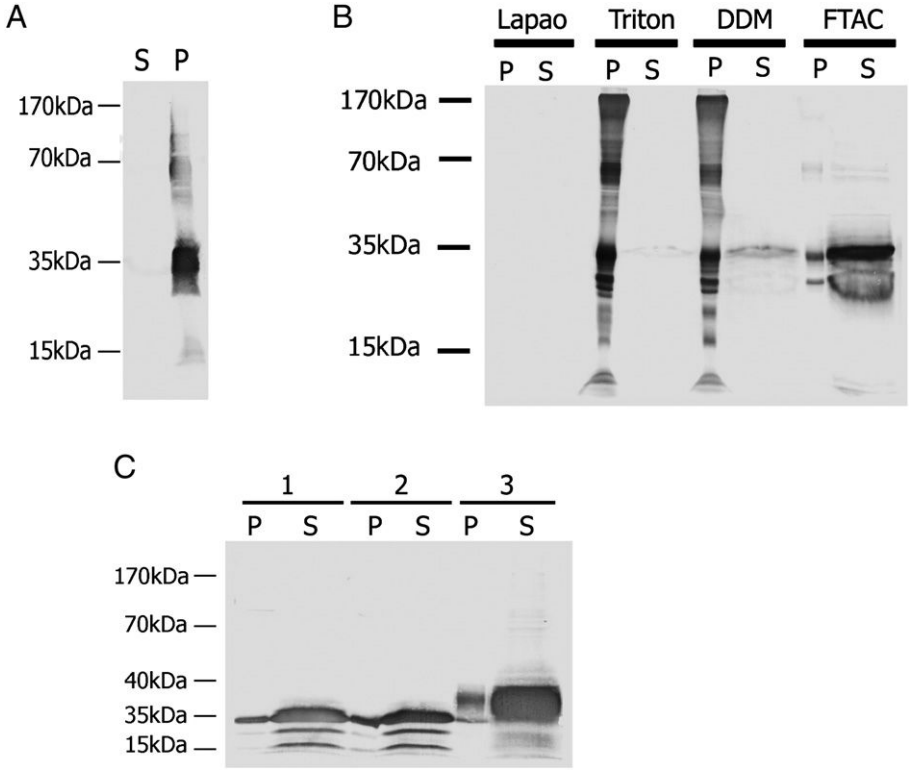


Fig. 2. Cell free production of rUCP1. (A) In the absence of surfactants. (B) In the presence of different surfactants. (C) In the presence of 4 mM FTAC and different additives: 1 — without any additives, 2 — with 1 mM A_6K-NH_2 (peptergent), and 3 — with 0.28 mM cardiolipin. The protein was synthesised as described in Material and methods section. The surfactants were used at the concentration described in Table 1. The notations used are as follows: Triton, Triton X-100; P, pellet; S, supernatant.

Therefore only the His-rUCP1 construct was used for further experiments. After the synthesis reaction of His-rUCP1, the supernatant and the pellet were separated by centrifugation and analysed by Western blots. As expected for a membrane protein, rUCP1 was detected exclusively in the pellet (Fig. 2A).

Three different strategies, commonly used for the cell free production of membrane proteins (for review see [30]) were then initially explored: (a) the production of the protein as a precipitate and the subsequent solubilisation of the pellet by detergents, (b) the synthesis of the protein in the presence of liposomes and (c) the synthesis of the protein in the presence of surfactants. While preliminary experiments following the first two strategies failed to produce soluble rUCP1, the cell free production of the protein in presence of surfactants proved to be efficient and was further explored.

3.2. rUCP1 cell free production in the presence of surfactants

To identify the ideal surfactant that results in the production of completely solubilised proteins while maintaining high expression levels, a panel of different types of surfactants was tested (see Table 1 and Fig. 2B). The panel not only contained classical detergents but also other amphiphilic molecules, which are able to surround membrane proteins and to maintain them in solution (Fig. 1). Some of them were already shown to be compatible with the cell free production of other membrane proteins, like DDM [38–40], Triton X-100 [39,41], Brij35 or Brij58 [39], digitonin [39,42] and fluorinated compounds [43]. LAPAO and $C_{10}E_5$ were never used in cell free protein production but are known to be efficient for the solubilisation of mitochondrial carriers [12,44,45]. The use of facial amphiphiles and phospholipid-like surfactants (C_nU_m) in a cell free expression system was also never reported.

In order to provide the appropriate environment necessary to maintain a membrane protein in solution, all the surfactants were tested at concentrations above their cmc, as specified in Table 1. In each case, the solubility of the protein was ranked according to the proportion of the protein present in the supernatant *versus* pellet, on a scale from 0 (all the protein in the pellet) to 10 (all the protein in the supernatant). Three categories of surfactants could be defined: (a) inhibitors for the synthesis reaction, (b) not capable to produce soluble rUCP1 and (c) capable to produce at least partially soluble rUCP1.

Most of the zwitterionic surfactants (LDAO, LAPAO, FC_{12}, FC_{14}) were inhibitory for the synthesis reaction at the used concentrations, except FC_{16}, which even increased the level of soluble protein. All the fos-cholines were used at ten times their cmc. Given the low cmc of FC_{16}, the concentration used for FC_{16} was significantly lower than for FC_{12} and FC_{14}, which probably explain its lack of toxicity. Indeed, increasing ten times the FC_{16} concentration proved to be also inhibitory for the cell free reaction (data not shown). The capacity of fos-cholines to inhibit the cell free synthesis of protein when used at high concentration was already described by Kaiser et al. [42].

Triton X-100, a non ionic surfactant widely used for the purification of MCFs from native tissues, was compatible with the *in vitro* synthesis but surprisingly not efficient for the production of soluble protein (Fig. 2B). Same result was obtained with the facial amphiphile C_5Glu_3. Maltosides (DDM and Cymal5) only partially maintained the protein in solution. Among polyoxyethylenes, $C_{10}E_5$ was not able to produce soluble proteins, but about 50% of the proteins was obtained in the soluble fraction in the presence of dodecyl or hexadecyl polyoxyethylenes analogues like Brij35 and Brij58. Even surfactants with similar chemical nature displayed different effects and similar deviations were already reported for the cell free synthesis of GPCRs [46]. From all these data, it is not obvious whether a longer hydrophobic tail or polydispersity of the surfactant favours the production of soluble protein. Good results were also obtained with the steroidian detergent, digitonin (about half of the protein was soluble). The best yields for the production of soluble rUCP1 were obtained with less commonly used surfactants like phospholipid-like surfactants (C_nU_m) [34] and fluorinated surfactants (FTACs). About 60% of the protein was detected in the supernatant in the presence of the six fluorinated surfactants and the three C_nU_m tested independently of the length of the fluorinated or hydrocarbon chains.

However, among all the surfactants tested, none of them was able to produce 100% of the protein in the soluble fraction. Increasing the DDM, C_nU_m and FTAC concentrations did not enhance the fraction of soluble protein and even reduced it for DDM (results not shown). Varying the temperature of the synthesis reaction to 15 °C, 20 °C or 28 °C did not improve the proportion of soluble protein and even significantly reduced the total amount of protein at 15 °C (results not shown). We therefore investigated the effect of additives.

3.3. Effect of additives on rUCP1 solubility

A wide range of additives was systematically tested to enhance the solubility of protein produced in presence of FTAC (Table 2A and Fig. 2C). They were chosen based on their stabilising effect reported on other membrane proteins (peptergents [47] or lipids) or on their functional effect on UCP1 (lauric acid or GDP known to activate or inhibit UCP1, respectively [48,49]). Peptergents or *E. coli* lipids did not increase the soluble fraction of the protein. Activators, like lauric acid, or inhibitors, like GDP, could favour a single conformation and thus prevent flexibility due to conformational disorder. However, adding lauric acid or GDP inhibited the synthesis reaction. Most interestingly, in the presence of cardiolipins almost all the protein was detected in the supernatant. Cardiolipins were then added in combination with surfactants other than FTAC like $C_{13}U_{19}$, Brij35, Brij58, digitonin and DDM (Table 2B). Surprisingly, the cardiolipin effect was very different depending on the surfactant. The soluble fraction of the protein was improved in the presence of Brij35 while no effect was observed with digitonin. The solubility of the protein was even decreased when cardiolipin was added to Brij58, DDM or $C_{13}U_{19}$.

3.4. Preparative scale expression of rUCP1 and purification

The production was scaled up using the RTS 500 system and the best conditions determined with the batch experiments were first tested. The synthesis was carried out (a) in the presence of 4 mM FTAC and 0.28 mM cardiolipin or (b) in the presence of 3.3 mM Brij35 and 0.28 mM cardiolipin. Then, the reaction mixture was centrifuged and rUCP1 was mainly detected in the supernatant for both of these conditions. The protein was purified in a one step affinity purification on Ni-NTA resin. Preliminary tests revealed that the yield could be easily improved when working with FTAC. Therefore, further

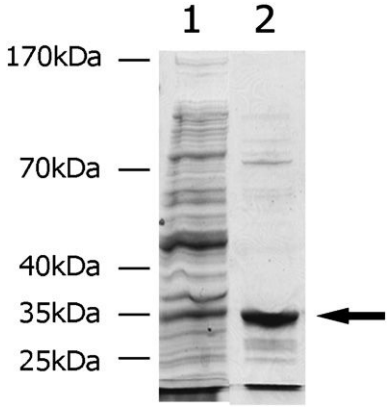


Fig. 3. Purification of rUCP1 as analysed by SDS-PAGE. rUCP1 was purified as described in the Material and methods section; Lane 1, supernatant of the reaction mixture before purification; Lane 2, protein eluted from the Ni-NTA resin. Protein standards in kDa are indicated on the left side.

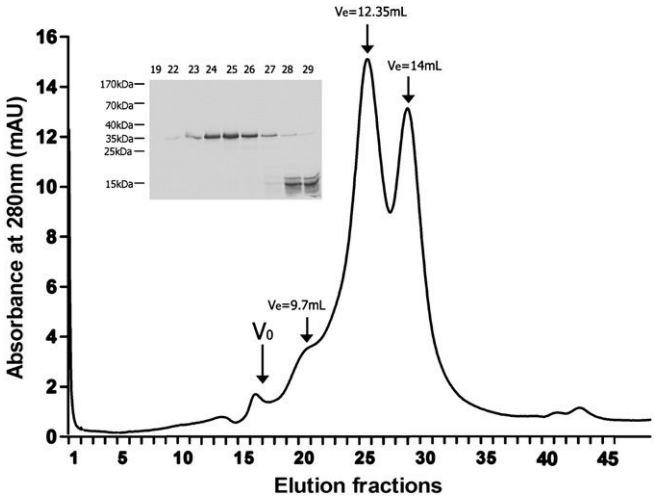


Fig. 4. Size exclusion chromatography analysis of purified rUCP1. Purified rUCP1 in the presence of FTAC was applied to a Superdex 200 HR 10/30 column. The column was equilibrated with 25 mM Hepes, pH 7, 200 mM NaCl supplemented with 0.15 mM FTAC and 0.014 mM cardiolipin. Fractions of 0.5 mL were collected starting from 0 mL. Western blots with anti His-tag immunodetection of the protein present in various elution fractions are shown in the insets. V_0 is the void volume.

optimisations were mainly restricted to the protein produced in FTAC and cardiolipin. Most impurities were washed off with sequential washing steps at 10, 20 and 40 mM imidazole and the bound protein eluted with 200 mM imidazole. The purity of the eluted protein was analysed on a Coomassie blue stained SDS-PAGE gel (Fig. 3). Except the band corresponding to the expected mass of rUCP1, one band at about 75 kDa and several bands at lower molecular masses could be noticed. Lower molecular mass bands could correspond to not fully synthesised proteins, a common problem encountered in cell free expression. Indeed, all the fragments that contain the N-terminal His-tag are recovered after Ni-NTA purification. The yield of purified protein ranged from 0.6 to 0.8 mg per mL of reaction mixture. This amount is quite high and compatible with structural studies. Furthermore, the method from expression to purification is very simple and fast as compared to the production from inclusion bodies.

3.5. Size exclusion chromatography

The protein was subjected to size exclusion chromatography in order to investigate the dispersity and homogeneity of the sample. We analysed the Stokes' radii and the apparent molecular mass of the rUCP1-surfactant-lipid complex in the presence of FTAC (Fig. 4). The size-exclusion elution profile of rUCP1 contained two main peaks with an elution volume of 12.35 mL and 14 mL, respectively (Fig. 4). A small shoulder at higher molecular mass (elution volume 9.7 mL) was also observed. The Western blot analysis showed that the first peak was essentially composed of full-length rUCP1 while the second contained only fragments of not fully synthesised protein. Of note, fragments of rUCP1 were efficiently separated from the full-length protein by this additional SEC purification step, therefore useful to improve the purity of the sample. After removal of the second peak, rUCP1 was monodisperse and eluted with an apparent molecular mass of 179 kDa. Using a calibration curve, a Stokes radius of 4.6 nm was determined for the protein-surfactant-lipid complex. No significant peak corresponding to the void volume was evidenced in the size exclusion profile, showing that the protein did not aggregate.

3.6. Circular dichroism

To further investigate the *in vitro* synthesised protein after purification, its secondary structure was analysed by CD spectroscopy. As shown in Fig. 5A, the far-UV CD spectra of rUCP1 purified in FTAC in the presence of cardiolipin exhibited two negative maxima near 222 nm and 208 nm indicating a significant α-helix content in the secondary structure. Comparison of the spectra obtained in the absence or in the presence of 100 μM GTP did not indicate any significant differences at the level of the secondary-structure (data not shown). Thermal denaturation of rUCP1 was also investigated by CD by continuous recording of ellipticity at 220 nm while heating up the sample from 20 °C to 90 °C (Fig. 5C). The Tm value measured for the protein purified in FTAC was 64 °C.

4. Discussion

The cell free system has become over the last few years an interesting alternative for the production of membrane proteins (for review, see [30]). Cell free synthesised human VDAC could even be crystallised, thus demonstrating the structural homogeneity of the protein [40]. Fluorinated surfactants were successfully used to stabilise membrane proteins (see *i.e.* [50]) and proved to be efficient for the cell free synthesis of bacterial proteins [33]. As mitochondrial carriers are particularly labile eukaryotic proteins, cell free synthesis in the presence of fluorinated compounds or other amphiphiles was therefore explored herein. The best results for producing a large soluble fraction of rUCP1 were obtained with phospholipid-like surfactants (C_nU_m)

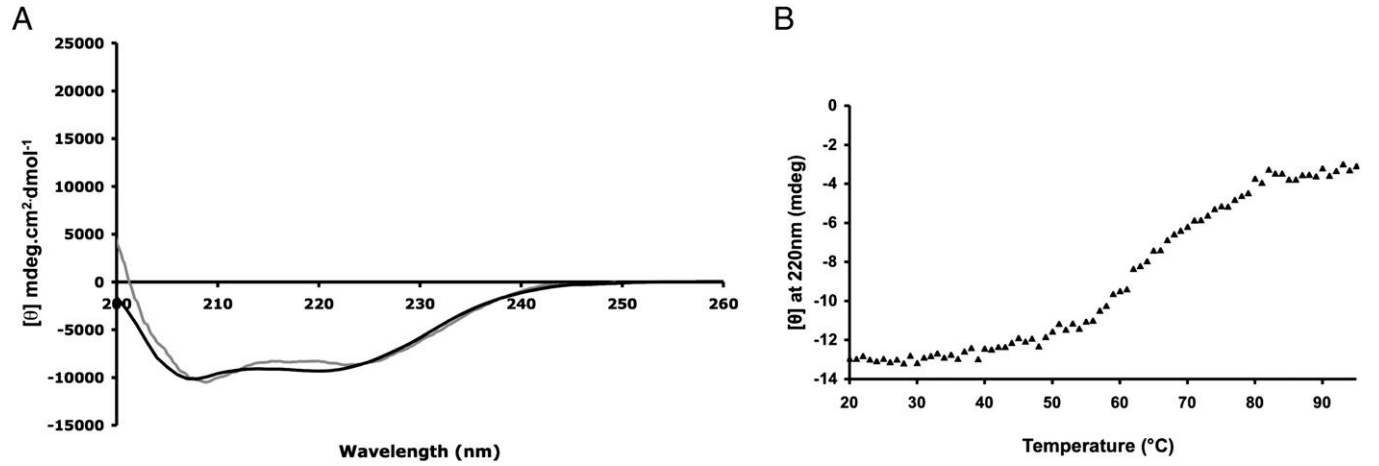


Fig. 5. Circular dichroism spectroscopy of purified UCP1. (A) CD spectra of the cell-free expressed rUCP1 purified in the presence of FTAC (black line) and of native UCP1 (grey line). The data were recorded at 20 °C in a 0.1 cm path length cell. Ten scans were collected at 0.5 nm intervals from 260 to 200 nm, then averaged and baseline-corrected by subtraction of blank buffer. (B) Melting curve of cell-free produced rUCP1 purified in the presence of FTAC.

[34] and fluorinated surfactants (FTACs). Combined with cardiolipins as additives, the solubility of rUCP1 synthesised in FTACs and also Brij35 was highly enhanced. The use of Brij35 in a cell free system was already described [30], while the use of C_nU_m is novel. C_nU_m are water-soluble non-ionic surfactants. They display interesting low denaturing properties and have stabilising capacities. Endowed with two hydrophobic tails, they mimic natural phospholipids and are suggested to associate with membrane proteins and maintain them soluble in aqueous solution without prohibitive unfolding [34]. The use of FTACs was earlier explored for the stabilisation of membrane proteins. Bacteriorhodopsin and cytochrome b_6f have been shown to be more stable once transferred to FTACs than in the presence of detergents [32]. A similar effect was shown on Smoothened, a human G-protein coupled receptor [51]. Fluorinated surfactants are highly hydrophobic but also lipophobic. Using dye-labelled FTACs, it could be demonstrated by fluorescence correlation spectroscopy that these molecules do not interact with lipids [52]. In contrast to detergents, FTACs do not compete with protein–lipid, but most probably also with protein–protein or intra-protein interactions. In combination to the relative stiffness of their chains compared to detergents, these properties are favourable to the maintenance of membrane protein integrity and function. For example, specific ATPase activity of the yeast F1–F0 ATP-synthase was reported to be higher in FTAC than in DDM, and in addition, the sensitivity towards inhibitors remained strong even after 6 weeks [50]. Fluorinated surfactants were also described as possible chemical chaperones as inferred from their efficiency in forming the membrane-competent form of diphtheria toxin T-domain by acidification [52]. When synthesising rUCP1 in the cell free system, this chaperone property could explain the higher yield of soluble protein observed in the presence of FTAC. FTACs were already used with success for the cell free production of a bacterial mechanosensitive ion channel MscL [43]. Here, we demonstrate that FTAC is also a valuable surfactant for expressing a labile mammalian membrane protein.

Cardiolipin is highly abundant in the inner mitochondrial membrane. Being a dimer of phosphatidylglycerol, it contains two polar heads and four aliphatic chains instead of two as for most of the phospholipids. Several studies showed that cardiolipins play an important role for the structural integrity of mitochondrial carriers [53,54]. The high resolution structures of AAC revealed three cardiolipins that surround the carrier and that are tightly bound through several interactions [53,4]. The phosphate groups of the three lipid molecules mainly interact with main chain nitrogens of AAC, while their acyl chains stack to aromatic residues located in MCF motifs. The first type of interaction is related to the overall fold of MCF carriers, and the second to residues conserved in MCF motifs. Therefore both types of interactions are not specific to AAC and possibly exist in other MCF carriers. In particular in UCPs, the increase in the solubility of the cell free produced rUCP1 could be explained by a stabilising effect by cardiolipins. Because FTACS are poorly miscible with lipids, they do not perturb putative interactions between rUCP1 and cardiolipins in contrast to detergents as for example DDM. A similar effect was observed for the yeast F1–F0 ATP-synthase. Relipidation of this complex in DDM did not rescue its specific ATPase activity nor its sensitivity to inhibitors. In contrast, in FTAC both properties were maintained for more than 40 days after extraction [50].

Although no functional assays have been developed so far on rUCP1 produced in the cell free system, the protein was characterised by several means. The Stock radius of 4.6 nm and the apparent molecular mass of 179 kDa measured from size exclusion chromatography, were consistent with data reported for the ADP/ATP carrier, predicted to have a similar overall shape as UCP1. Indeed, in the presence of various detergents having hydrophobic chains of similar length to FTAC (such as $C_{12}M$, $C_{13}M$ or LAPAO), Rs values for AAC-detergent complex were determined in the range of 4 to 4.5 nm by two groups [55,56]. In both studies, AAC was shown to be monomeric. The Rs value of 4.6 nm would be therefore consistent with a monomeric rUCP1 in FTAC. Our CD spectra are comparable with those previously reported for UCP1 purified from inclusion bodies [23] and from yeast [57] but also with the CD spectrum recorded for native UCP1 purified from BAT (Fig. 5A), suggesting that the secondary structures are similar. Indeed, similarly to [57], the shape between 200 and 240 nm is characterised by two negative peaks located at 208 and 222 nm. In addition, the addition of GDP does not modify significantly the secondary structure of the protein as reported in [57]. Overall, CD analyses showed that rUCP1 produced in the cell free system in the presence of FTAC is folded mainly as α-helices as expected. We estimate that 60% of cell-free expressed UCP1 is α-helical. From their CD data, Douette et al. evaluated the α-helical structure to 68% while Jelokhani-Niaraki et al. reported 40 to 50%. In addition, the known structures of members of the same MCF family, bAAC1 [4] and mUCP2 [11] highlight 67% (55% in the TM helices and 12% within the structured part of the matrix loops) for both bAAC1 and mUCP2. Our data are consistent with all these values, considering structural variability of matrix loops (they vary depending on the conformational state of the carriers) and also lack of accuracy of the value calculated herein due to the missing part below 200 nm. Finally, thermal denaturation over 60 °C is a good indication of a well-defined tertiary structure below Tm. In comparison with other membrane proteins that were successfully purified in the presence of FTAC and functional, we anticipate that rUCP1 produced in the cell free system in the presence of FTAC is adequate for structure–function studies.

5. Conclusion

We demonstrate herein that rUCP1 can be produced in a cell free system in the presence of a fluorinated surfactant FTAC. This is the first example of the use of fluorinated surfactants for producing large quantities of eukaryotic membrane proteins in the cell free system. This method is fast and simple compared to the production from inclusion bodies. It is also flexible and constitutes a valuable alternative to the expression of MCF carriers. The protein forms monodisperse protein-surfactant complexes whose size is compatible with a monomeric state. The protein is mainly structured in α-helices and the amounts obtained after purification are compatible with structural studies.

Acknowledgements

We thank the PSB platforms for access and support in particular Marc Jamin for the CD, Michel Vivaudou and Dominique Madern for helpful discussions and Ilias Iliopoulos and Ulysse Naessens for access and support to CD spectroscopy.

The work was supported by the Institut Universitaire de France (EPP), by ANR project Trans-MIT (EPP, IB, SR, CJB) and JCJC-UCP2 (BM), by E.U. Specific Targeted Research Project IMPS nr 513770 (EPP, IB, CJB) and E.U. Integrated project EDICT nr 211800 (EPP, SR, CJB).

References

[1] J.E. Walker, M.J. Runswick, The mitochondrial transport protein superfamily, J. Bioenerg. Biomembr. 25 (1993) 435–446.
[2] F. Palmieri, Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: a review, Biochim. Biophys. Acta 1777 (2008) 564–578.
[3] A.J. Robinson, C. Overy, E.R. Kunji, The mechanism of transport by mitochondrial carriers based on analysis of symmetry, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105 (2008) 17766–17771.
[4] E. Pebay-Peyroula, C. Dahout-Gonzalez, R. Kahn, V. Trézéguet, G.J. Lauquin, G. Brandolin, Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside, Nature 426 (2003) 39–44.
[5] D. Ricquier, F. Bouillaud, The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP, Biochem. J. 345 (Pt 2) (2000) 161–179.
[6] D.G. Nicholls, R.M. Locke, Thermogenic mechanisms in brown fat, Physiol. Rev. 64 (1984) 1–64.
[7] R.K. Porter, Uncoupling protein 1: a short-circuit in the chemiosmotic process, J. Bioenerg. Biomembr. 40 (2008) 457–461.

[8] M.E. Harper, J. Patrick, J. Himms-Hagen, Altered brown adipose tissue and Na,K pump activities during diet-induced obesity and weight loss in rats, Obes. Res. 1 (1993) 106–117.
[9] J. Kopecky, M. Rossmeisl, Z. Hodny, I. Syrovy, M. Horakova, P. Kolarova, Reduction of dietary obesity in aP2-Ucp transgenic mice: mechanism and adipose tissue morphology, Am. J. Physiol. 270 (1996) E776–E786.
[10] H.M. Feldmann, V. Golozoubova, B. Cannon, J. Nedergaard, UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality, Cell Metab. 9 (2009) 203–209.
[11] M.J. Berardi, W.M. Shih, S.C. Harrison, J.J. Chou, Mitochondrial uncoupling protein 2 structure determined by NMR molecular fragment searching, Nature 476 (2011) 109–113.
[12] R. Krämer, H. Aquila, M. Klingenberg, Isolation of the unliganded adenosine 5′-diphosphate, adenosine 5′-triphosphate carrier-linked binding protein and incorporation into the membranes of liposomes, Biochemistry 16 (1977) 4949–4953.
[13] M.R. Block, G. Zaccai, G.J. Lauquin, P.V. Vignais, Small angle neutron scattering of the mitochondrial ADP/ATP carrier protein in detergent, Biochem. Biophys. Res. Commun. 109 (1982) 471–477.
[14] H. Hackenberg, M. Klingenberg, Molecular weight and hydrodynamic parameters of the adenosine 5′-diphosphate–adenosine 5′-triphosphate carrier in Triton X-100, Biochemistry 19 (1980) 548–555.
[15] M. Klingenberg, The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier, Biochim. Biophys. Acta 1778 (2008) 1978–2021.
[16] C.S. Lin, H. Hackenberg, E.M. Klingenberg, The uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria is a dimer. A hydrodynamic study, FEBS Lett. 113 (1980) 304–306.
[17] P. Jezek, D.E. Orosz, K.D. Garlid, Reconstitution of the uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria. Demonstration of GDP-sensitive halide anion uniport, J. Biol. Chem. 265 (1990) 19296–19302.
[18] E. Rial, A. Muga, J.M. Valpuesta, J.L. Arrondo, F.M. Goni, Infrared spectroscopic studies of detergent-solubilized uncoupling protein from brown-adipose-tissue mitochondria, Eur. J. Biochem. 188 (1990) 83–89.
[19] B. Miroux, V. Frossard, S. Raimbault, D. Ricquier, F. Bouillaud, The topology of the brown adipose tissue mitochondrial uncoupling protein determined with antibodies against its antigenic sites revealed by a library of fusion proteins, EMBO J. 12 (1993) 3739–3745.
[20] D.G. Nicholls, The physiological regulation of uncoupling proteins, Biochim. Biophys. Acta 1757 (2006) 459–466.
[21] M. Jaburek, K.D. Garlid, Reconstitution of recombinant uncoupling proteins: UCP1, -2, and -3 have similar affinities for ATP and are unaffected by coenzyme Q10, J. Biol. Chem. 278 (2003) 25825–25831.
[22] E.P. Breen, S.G. Gouin, A.F. Murphy, L.R. Haines, A.M. Jackson, T.W. Pearson, P.V. Murphy, R.K. Porter, On the mechanism of mitochondrial uncoupling protein 1 function, J. Biol. Chem. 281 (2006) 2114–2119.
[23] M. Jelokhani-Niaraki, M.V. Ivanova, B.L. McIntyre, C.L. Newman, F.R. McSorley, E.K. Young, M.D. Smith, A CD study of uncoupling protein-1 and its transmembrane and matrix-loop domains, Biochem. J. 411 (2008) 593–603.
[24] M. Modriansky, D.L. Murdza-Inglis, H.V. Patel, K.B. Freeman, K.D. Garlid, Identification by site-directed mutagenesis of three arginines in uncoupling protein that are essential for nucleotide binding and inhibition, J. Biol. Chem. 272 (1997) 24759–24762.
[25] M. Bienengraeber, K.S. Echtay, M. Klingenberg, H+ transport by uncoupling protein (UCP-1) is dependent on a histidine pair, absent in UCP-2 and UCP-3, Biochemistry 37 (1998) 3–8.
[26] E. Urbankova, P. Hanak, E. Skobisova, M. Ruzicka, P. Jezek, Substitutional mutations in the uncoupling protein-specific sequences of mitochondrial uncoupling protein UCP1 lead to the reduction of fatty acid-induced H+ uniport, Int. J. Biochem. Cell Biol. 35 (2003) 212–220.
[27] F. Bouillaud, I. Arechaga, P.X. Petit, S. Raimbault, C. Levi-Meyrueis, L. Casteilla, M. Laurent, E. Rial, D. Ricquier, A sequence related to a DNA recognition element is essential for the inhibition by nucleotides of proton transport through the mitochondrial uncoupling protein, EMBO J. 13 (1994) 1990–1997.
[28] V.R. Smith, J.E. Walker, Purification and folding of recombinant bovine oxoglutarate/malate carrier by immobilized metal-ion affinity chromatography, Protein Expr. Purif. 29 (2003) 209–216.
[29] A.S. Spirin, V.I. Baranov, L.A. Ryabova, S.Y. Ovodov, Y.B. Alakhov, A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield, Science (New York, N.Y.) 242 (1988) 1162–1164.
[30] F. Junge, S. Haberstock, C. Roos, S. Stefer, D. Proverbio, V. Dotsch, F. Bernhard, Advances in cell-free protein synthesis for the functional and structural analysis of membrane proteins, N. Biotechnol. 28 (2011) 262–271.
[31] A.A. Pavia, B. Pucci, J.G. Riess, L. Zarif, New perfluoroalkyl telomeric nonionic surfactants — synthesis, physicochemical and biological properties, Makromol. Chem. 193 (1992) 2505–2517.
[32] C. Breyton, E. Chabaud, Y. Chaudier, B. Pucci, J.L. Popot, Hemifluorinated surfactants: a non-dissociating environment for handling membrane proteins in aqueous solutions? FEBS Lett. 564 (2004) 312–318.
[33] K.H. Park, E. Billon-Denis, T. Dahmane, F. Lebaupain, B. Pucci, C. Breyton, F. Zito, In the cauldron of cell-free synthesis of membrane proteins: playing with new surfactants, N. Biotechnol. 28 (2011) 255–261.
[34] M. Damian, S. Perino, A. Polidori, A. Martin, L. Serre, B. Pucci, J.L. Banères, New tensio-active molecules stabilize a human G protein-coupled receptor in solution, FEBS Lett. 581 (2007) 1944–1950.
[35] J. Dauvergne, A. Bendjeriou, F. Bonneté J. Kohlbrecher, B. Pucci, L.-A. Barret, A. Polidori, Tripod facial surfactants with benzene as central core: design, synthesis and self-assembly study, New J. Chem. (in press).
[36] C.S. Lin, M. Klingenberg, Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria, FEBS Lett. 113 (1980) 299–303.
[37] T.V. Murthy, W. Wu, Q.Q. Qiu, Z. Shi, J. LaBaer, L. Brizuela, Bacterial cell-free system for high-throughput protein expression and a comparative analysis of *Escherichia coli* cell-free and whole cell expression systems, Protein Expr. Purif. 36 (2004) 217–225.
[38] Y. Elbaz, S. Steiner-Mordoch, T. Danieli, S. Schuldiner, *In vitro* synthesis of fully functional EmrE, a multidrug transporter, and study of its oligomeric state, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101 (2004) 1519–1524.
[39] C. Klammt, D. Schwarz, K. Fendler, W. Haase, V. Dötsch, F. Bernhard, Evaluation of detergents for the soluble expression of alpha-helical and beta-barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system, FEBS J. 272 (2005) 6024–6038.
[40] A. Deniaud, L. Liguori, I. Blesneac, J.L. Lenormand, E. Pebay-Peyroula, Crystallization of the membrane protein hVDAC1 produced in cell-free system, Biochim. Biophys. Acta 1798 (2010) 1540–1546.
[41] C. Berrier, K.H. Park, S. Abes, A. Bibonne, J.M. Betton, A. Ghazi, Cell-free synthesis of a functional ion channel in the absence of a membrane and in the presence of detergent, Biochemistry 43 (2004) 12585–12591.
[42] L. Kaiser, J. Graveland-Bikker, D. Steuerwald, M. Vanberghem, K. Herlihy, S. Zhang, Efficient cell-free production of olfactory receptors: detergent optimization, structure, and ligand binding analyses, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105 (2008) 15726–15731.
[43] K.H. Park, C. Berrier, F. Lebaupain, B. Pucci, J.L. Popot, A. Ghazi, F. Zito, Fluorinated and hemifluorinated surfactants as alternatives to detergents for membrane protein cell-free synthesis, Biochem. J. 403 (2007) 183–187.
[44] C. Dahout-Gonzalez, G. Brandolin, E. Pebay-Peyroula, Crystallization of the bovine ADP/ATP carrier is critically dependent upon the detergent-to-protein ratio, Acta Crystallogr. 59 (2003) 2353–2355.
[45] E. Winkler, M. Klingenberg, An improved procedure for reconstitution of the uncoupling protein and in-depth analysis of H^+/OH^- transport, Eur. J. Biochem. 207 (1992) 135–145.
[46] G. Ishihara, M. Goto, M. Saeki, K. Ito, T. Hori, T. Kigawa, M. Shirouzu, S. Yokoyama, Expression of G protein coupled receptors in a cell-free translational system using detergents and thioredoxin-fusion vectors, Protein Expr. Purif. 41 (2005) 27–37.
[47] J.I. Yeh, S. Du, A. Tortajada, J. Paulo, S. Zhang, Peptergents: peptide detergents that improve stability and functionality of a membrane protein, glycerol-3-phosphate dehydrogenase, Biochemistry 44 (2005) 16912–16919.
[48] E. Rial, A. Poustie, D.G. Nicholls, Brown-adipose-tissue mitochondria: the regulation of the 32000-Mr uncoupling protein by fatty acids and purine nucleotides, Eur. J. Biochem. 137 (1983) 197–203.
[49] C.S. Lin, M. Klingenberg, Characteristics of the isolated purine nucleotide binding protein from brown fat mitochondria, Biochemistry 21 (1982) 2950–2956.
[50] J.C. Talbot, A. Dautant, A. Polidori, B. Pucci, T. Cohen-Bouhacina, A. Maali, B. Salin, D. Brèthes, J. Velours, M.F. Giraud, Hydrogenated and fluorinated surfactants derived from Tris (hydroxymethyl)-acrylamidomethane allow the purification of a highly active yeast F1–F0 ATP-synthase with an enhanced stability, J. Bioenerg. Biomembr. 41 (2009) 349–360.
[51] R. Nehme, O. Joubert, M. Bidet, B. Lacombe, A. Polidori, B. Pucci, I. Mus-Veteau, Stability study of the human G-protein coupled receptor, Smoothened, Biochim. Biophys. Acta 1798 (2010) 1100–1110.
[52] M.V. Rodnin, Y.O. Posokhov, C. Contino-Pepin, J. Brettmann, A. Kyrychenko, S.S. Palchevskyy, B. Pucci, A.S. Ladokhin, Interactions of fluorinated surfactants with diphtheria toxin T-domain: testing new media for studies of membrane proteins, Biophys. J. 94 (2008) 4348–4357.
[53] H. Nury, C. Dahout-Gonzalez, V. Trézéguet, G. Lauquin, G. Brandolin, E. Pebay-Peyroula, Structural basis for lipid-mediated interactions between mitochondrial ADP/ATP carrier monomers, FEBS Lett. 579 (2005) 6031–6036.
[54] M. Klingenberg, Cardiolipin and mitochondrial carriers, Biochim. Biophys. Acta 1788 (2009) 2048–2058.
[55] L. Bamber, M. Harding, P.J. Butler, E.R. Kunji, Yeast mitochondrial ADP/ATP carriers are monomeric in detergents, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103 (2006) 16224–16229.
[56] H. Nury, F. Manon, B. Arnou, M. le Maire, E. Pebay-Peyroula, C. Ebel, Mitochondrial bovine ADP/ATP carrier in detergent is predominantly monomeric but also forms multimeric species, Biochemistry 47 (2008) 12319–12331.
[57] P. Douette, R. Navet, F. Bouillenne, A. Brans, C. Sluse-Goffart, A. Matagne, F.E. Sluse, Secondary-structure characterization by far-UV CD of highly purified uncoupling protein 1 expressed in yeast, Biochem. J. 380 (2004) 139–145.

Résumé

Ce projet vise à étudier, par une approche pluridisciplinaire, l'influence des tensioactifs dans la cristallisation des protéines membranaires (PM) en prenant pour protéine modèle le complexe photosynthétique RC-LH1-pufX de *Rhodobacter blasticus*. Des cristaux de ce complexe avaient été obtenus en présence de dodécyl-α-maltoside (DDM) et avaient diffractés à 8 Å de résolution. L'objectif final est de pouvoir améliorer, de façon rationnelle, la qualité des cristaux du complexe RC-LH1-pufX grâce à une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu.

Dans un premier temps, trois tensioactifs dérivés du DDM ont été conçus et synthétisés. L'intérêt est d'augmenter la rigidité et le caractère lipophobe des parties hydrophobes des tensioactifs par rapport au DDM, pour les rendre moins déstabilisants envers la protéine : soit par l'incorporation d'un groupement bicyclohexyle (PCC-maltoside), soit par l'ajout d'un segment fluoré de longueur modulable (F_4H_5- et F_2H_9-maltoside). Nous avons inclus également le F_8TAC, tensioactif fluoré utilisé depuis une vingtaine d'années pour le maintien en solution des PM, et les "tripodes", amphiphiles faciaux dont la géométrie particulière n'avaient jamais été testée.

Nous avons ensuite réalisé la caractérisation physico-chimique, en solution, de ces tensioactifs et du DDM en terme de CMC (concentration micellaire critique), nombre d'agrégation, taille (par diffusion de la lumière dynamique, DLS), facteur de forme (par diffusion des rayons X aux petits angles, SAXS) et facteur de structure (par mesure du second coefficient du viriel, indicateur du potentiel des tensioactifs à initier la cristallisation) afin de déterminer les caractéristiques importantes au maintien en solution et à la cristallisation des PM. Le PCC-malt présentant le même comportement que le DDM, nous l'avons sélectionné pour réaliser une étude en présence de la protéine.

Après avoir mis au point une méthode de dosage des tensioactifs par HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography) et identifier les lipides présents dans les membranes constitutives de *Rhodobacter blasticus*, nous avons pu quantifier les quantités de lipides et de tensioactifs associés à la protéine en présence de DDM et de PCC-malt.

Enfin, dans une dernière partie, nous avons réalisé des essais de cristallisation du complexe RC-LH1-pufX en présence des tensioactifs sélectionnés pour faire le lien entre les conditions de cristallisation et l'étude physico-chimique des micelles en solution.

Mots clés : : détergents/tensioactifs, protéines membranaires, cristallisation, complexe RC-LH1-pufX, HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography), SAXS (diffusion des rayons X aux petits angles), second coefficient du viriel.