



**HAL**  
open science

# Les nanodisques comme outil pour l'étude de protéines membranaires intégrales

Yann Huon de Kermadec

► **To cite this version:**

Yann Huon de Kermadec. Les nanodisques comme outil pour l'étude de protéines membranaires intégrales. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAV025 . tel-01316897

**HAL Id: tel-01316897**

**<https://theses.hal.science/tel-01316897>**

Submitted on 17 May 2016

**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.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### **DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Biologie Structurale et Nanobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Yann HUON DE KERMADEC**

Thèse dirigée par **Eva PEBAY-PEYROULA** et **Dieter WILLBOLD**  
Co-encadrée par **Stéphanie RAVAUD**

préparée au sein de l'Institut de Biologie Structurale  
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

### **Les nanodisques comme outil pour l'étude de protéines membranaires intégrales**

Thèse soutenue publiquement le **27 novembre 2015**,  
devant le jury composé de :

<b>Andrea DESSEN</b> Directrice de recherche, Institut de Biologie Structurale, Grenoble	<b>Présidente</b>
<b>Mohamed CHAMI</b> Chargé de recherche, Université de Bâle, Bâle	<b>Rapporteur</b>
<b>Maité PATERNOSTRE</b> Directrice de recherche, CEA, Saclay	<b>Rapporteur</b>
<b>Jean-Michel JAULT</b> Directeur de recherche, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Lyon	<b>Membre</b>
<b>Dieter WILLBOLD</b> Professeur Université de Düsseldorf, Forschungszentrum Jülich, Jülich	<b>Membre</b>
<b>Stéphanie RAVAUD</b> Maître de conférences Université Grenoble Alpes, Institut de Biologie Structurale, Grenoble	<b>Membre</b>
<b>Eva PEBAY-PEYROULA</b> Professeur Université Grenoble Alpes, Institut de Biologie Structurale, Grenoble	<b>Invitée</b>





## Remerciement

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux membres du jury qui ont pris le temps de lire et de discuter de mes travaux de thèse, Jean Michel Jault, Andrea Dessen et plus particulièrement les rapporteurs, Maité Paternostre et Mohamed Chami, qui ont accepté de corriger ma thèse.

Je voudrai remercier chaleureusement mes encadrants, Eva Pebay Peyroula, Stéphanie Ravaud et Dieter Willbold, qui m'ont donné l'opportunité de réaliser ma thèse au sein de leur équipe. Votre patience exemplaire et votre soutien ont été déterminant pour la réussite de ma thèse. Merci de m'avoir offert l'opportunité de découvrir le monde complexe et merveilleux des protéines membranaires.

Je souhaite remercier tous les membres du groupe LPM. En particulier mon équipe Membrane et mes coéquipiers de paillasse. Merci à Hubert Mayerhoffer pour son amitié et ses conseils biochimiques, j'espère que la prochaine dégustation de bières se fera chez toi en Autriche ; a Laurène Marchand, et Antoine Liccino. Je souhaite remercier chaleureusement Delphine Blot et Céline Julian Binart pour leur patience et leur compréhension face à mes prouesses au laboratoire. Je souhaite remercier Hugues Nury pour sa vision et ses fidèles alcoolytes Orso (le véritable roi des lipides), Sonja et Lucie. Je remercie l'équipe de Valentine, notamment Georgy, Vitaly et Florine. Grâce à vous tous, l'ambiance au labo était géniale. J'espère que je vous manquerai autant que vous allez me manquer. Je souhaite aussi remercier les stagiaires du labo ; Maria et Ambre qui ont permis faire avancer mes projets. Enfin, merci à Michel, pour son ingéniosité et sa disponibilité.

Je souhaite remercier toutes les personnes présentes à l'IBS qui m'ont permis de mener à bien mes projets et sans qui aucune science ne serait possible. Merci aux secrétaires pour avoir gérer- souvent en urgence- mes missions et remboursements. Merci au service informatique et à Alain, merci à Sylvie.

L'IBS c'est aussi de nombreux amis réparti sur les 4 étages avec qui j'ai eu, pour certains, la joie de travailler. Merci à Charlotte, Charles, Sylvain, Jules, Maria P, Corrine, Ioulia, Jonathan pour les discussions scientifiques passionnantes et les pauses café. Et avec ceux qui bien que ne travaillant pas sur des protéines membranaires, sont quand même des gens très bien : Alex, Mylène et Ziad, mon concitoyen préféré. Un remerciement particulier à Xavier, Maria et Jaka pour leurs amitiés et les discussions chez eux en attendant la fin des lessives.

Je remercie mes fidèles amis, qui malgré l'éloignement de Paris et ma proportion à ne pas donner de nouvelles, sont restés à mes côtés. Merci à Jé qui en me détournant de ma première année de médecine m'a permis de découvrir ma passion pour la science et la biochimie. De plus, il m'a permis de rencontrer la grande équipe des moulins et de participer à la Chouille. Merci aux amis de Versailles, Tib, Stéf, Dave, Mallou et Raph, mes amis de toujours. Merci aux amis étudiants biologistes, Newan, Olive et Guillaume pour leur soutien.

Evidemment, je me dois de parler de ma seconde équipe à l'IBS, surement la plus importante, la team Porquerolles, qui a permis d'avoir une ambiance d'entraide et de fraternité entre les doctorants, au sein de l'IBS (et aussi au CEA grâce à Hicham). Merci donc à Hicham, le

meilleur colocataire de la planète, à Pierre, mon partenaire de stade, à Mauris, à Yann F, le VRAi yann, à Coraline, à Didier, pour l'animation des discussions le mercredi, à Widade, la deuxième meilleur colocataire, à Gianluca, à Vanessa, pour son apprentissage du Mawasha-Guero, Jules, le puerco, Mathieu, pour sa voix cristalline.

Merci à Louise, que j'ai hébergé, et qui a été un soutien crucial dans les moments difficiles. Notre rencontre a été la plus grande réussite de ma thèse, même les nanodisques, aussi charmants et mignons soient-ils, n'ont pu rivaliser.

Je souhaite remercier ma famille qui m'a épaulé bien avant que je commence ma thèse. Merci de votre confiance lors de ces très longues études. Merci à Laure, Antoine et Mathilde. Merci à ma mère Yolaine et mon père Alain pour leur amour et leur soutien. Cette thèse n'aurait pas eu lieu sans eux.

Je vous aime tous. Peace.

## Table des matières

Liste des tables .....	9
Abbréviation.....	10
I. Introduction.....	12
I.1. L'étude des protéines membranaires .....	12
I.1.1. Importance des protéines membranaires .....	12
I.1.2. Etudes structurales des protéines membranaires .....	14
I.1.3. Méthodes d'étude des protéines membranaires.....	16
I.2. Reconstitution de protéines membranaires dans des nanodisques .....	26
I.2.1. La protéine Apolipoprotéine A1 .....	26
I.2.2. La composante lipidique des nanodisques.....	35
I.2.3. Méthodes alternatives utilisées pour former des nanodisques.....	36
I.3. Utilisation des nanodisques pour l'étude de protéines membranaires.....	41
I.3.1. Méthodes de reconstitution .....	41
I.3.2. Etudes fonctionnelles .....	43
I.3.3. Etudes structurales.....	48
I.4. Incorporation de protéine membranaires .....	54
II. Matériel et méthodes.....	57
II.1. Formation des nanodisques.....	57
II.1.1. Expression des protéines d'assemblages MSP1 et MSP1E3D1 chez <i>E.coli</i> ..	57
II.1.2. Purification par chromatographie d'affinité.....	57
II.1.3. Assemblage de nanodisques vides .....	58
II.1.4. Caractérisation de la protéine MSP1 .....	59
II.1.5. Assemblage de nanodisques à partir de membrane.....	59
II.2. Etude de BmrA .....	60
II.2.1. Production de BmrA.....	60
II.2.2. Assemblage des nanodisques avec BmrA .....	61
II.2.3. Test d'activité.....	62

II.2.4.	Microscopie électronique.....	63
II.3.	Etude de YedZ.....	63
II.3.1.	Purification de YedZ.....	63
II.3.2.	Assemblage des nanodisques contenant YedZ .....	64
III.	Méthodologie des nanodisques .....	68
III.1.	Introduction.....	68
III.2.	Etude de la protéine MSP1: optimisation de l'assemblage des nanodisques..	69
III.2.1.	Purification de la protéine MSP1 et caractérisation de son état oligomérique.....	69
III.2.2.	Interaction des protéines d'assemblage avec les métaux .....	70
III.2.3.	Effet de la présence de métaux sur la stabilité de MSP1 .....	76
III.2.4.	Rôle des ions avec les nanodisques .....	80
III.2.5.	Essais de cristallisation des nanodisques.....	85
III.3.	Assemblage de nanodisques à partir d'une membrane native .....	87
III.4.	Discussion.....	90
IV.	Etudes fonctionnelles des protéines hémiques YedZ et SpNox.....	92
IV.1.	Introduction.....	92
IV.2.	Etude de la protéine YedZ .....	94
IV.2.1.	Incorporation dans des nanodisques.....	94
IV.2.2.	La problématique liée à l'Hème.....	100
IV.2.3.	Etude de l'interaction entre YedZ, Fre et YedY.....	103
IV.3.	Etude de la protéine SpNox .....	112
IV.3.1.	Incorporation dans des nanodisques.....	112
IV.3.2.	Test d'activité .....	115
IV.3.3.	Cristallogénèse par diffusion de vapeur .....	117
IV.4.	Discussion.....	120
V.	Etude structurale de transporteurs ABC: BmrA et BceB-RS.....	121
V.1.	Introduction .....	121
V.2.	Etude de la protéine BmrA .....	125

V.2.1.	Incorporation dans des nanodisques .....	125
V.2.2.	Caractérisation fonctionnelle .....	126
V.2.3.	Etude structurale à l'aide de la Cryo-microscopie électronique.....	129
V.2.4.	Essais de cristallisation en phase cubique.....	135
V.3.	Etude de la protéine BceAB dans les nanodisques .....	135
V.3.1.	Insertion de la protéine BceAB en nanodisques .....	136
V.3.2.	Activité du transporteur BceAB.....	138
V.4.	Discussion .....	140
VI.	Conclusion générale .....	141



## Liste des Figures

Figure I-1 : Représentation d'une membrane et des différentes fonctions de protéines membranaires .....	13
Figure I-2 : Statistiques de résolutions de structures uniques de protéines membranaires depuis 1985 .....	15
Figure I-3 : Structure des différentes familles de détergents.....	17
Figure I-4 : Structures des différentes familles d'amphipols .....	21
Figure I-5 : Mécanisme de lipopeptides détergents.....	23
Figure I-6 : Structure de lipopeptides détergents.....	24
Figure I-7 : Voie d'assemblage des particules HDL .....	27
Figure I-8 : Organisation de la protéine Apolipoprotéine A-1 .....	28
Figure I-9 : Structure d'apolipoprotéine A1 sans lipides .....	29
Figure I-10 : Mécanisme proposé pour le recrutement de lipides par la protéine apolipoprotéine A1 .....	30
Figure I-11 : Différentes conformations possibles de la protéine Apolipoprotéine A-1...	31
Figure I-12 : Représentation du modèle en double super hélice .....	32
Figure I-13 : Représentation des ponts salins pour deux protéines apolipoprotéine A1 en conformation nanodisques .....	33
Figure I-14 : Différents tailles de nanodisques formés avec les protéines apoE422K .....	34
Figure I-15 : Représentation des différentes conformations de la protéine Apolipoprotéine A1 en présence de lipides .....	35
Figure I-16 : Représentation hélicoïdal d'une hélice alpha amphipathic .....	37
Figure I-17 : Représentation de la molécule SMA.....	40
Figure I-18 : Comparaison de spectres entre la protéine VDAC-2 en LDAO et en nanodisques .....	51
Figure I-19 : Reconstitution du complexe SecYE avec des images de Cryo-microscopie électronique.....	53
Figure III-1 : Purification de la protéine MSP1 .....	69
Figure III-2 : Effet des cations divalents sur l'oligomérisation de MSP1 .....	71
Figure III-3 : Interaction et effet du magnésium et du calcium sur la protéine MSP1 .....	72
Figure III-4 : Effet du calcium sur MSP1E3D1 .....	75
Figure III-5 : Observation de particules de 40nm en l'absence d'EDTA.....	77
Figure III-6 : Etude de la stabilité de la protéine MSP1 .....	78
Figure III-7 : Dépliement de la protéine MSP1 à l'urée,.....	80
Figure III-8 : Assemblage de nanodisques avec différents métaux.....	81
Figure III-9 : Comparaison des nanodisques dans un tampon traité ou non avec la résine Chelex.....	83
Figure III-10 : Mesure de la turbidité de la solution à 500nm à l'aide d'un fluorimètre ( $\lambda_{exc}$ 500nm, $\lambda_{em}$ 500nm) des nanodisques POPC dans des tampons traités ou non avec la résine Chelex.....	84
Figure III-11 : Essais de cristallisation de nanodisques vides .....	86
Figure III-12 : Assemblage de nanodisques à partir de membranes.....	88
Figure III-13 : Représentation de la formation des particules HDL .....	90
Figure IV-1 : Différents domaines la famille des NADPH oxydase et leur activité .....	92
Figure IV-2 : Purification des nanodisques avec YedZ incorporée; .....	95
Figure IV-3 : Optimisation de l'assemblage des nanodisques YedZ.....	97
Figure IV-4 : Mesure par spectrométrie de masse de nanodisques YedZ .....	98

Figure IV-5 : Comparaison entre la réduction de l'hème avec la protéine YedZ solubilisée en détergent, Cymal5 et incorporée en nanodisques avec les lipides POPC .....	99
Figure IV-6 : Topologie prédite de la protéine YedZ.....	100
Figure IV-7 : Titration de l'hème avec YedZ.....	101
Figure IV-8 ; Elimination des hèmes grâce à la protéine HasA,.....	102
Figure IV-9 : Expériences de pontage chimique entre les nanodisques YedZ et Fre et YedY .....	105
Figure IV-10 : Représentation de la technique de résonance plasmonique de surface..	107
Figure IV-11 : Réponse mesurée d'expériences de résonance plasmonique de surface, .....	108
Figure IV-12 ; Caractérisation des protéines Fre et YedY.....	110
Figure IV-13 : Essai de caractérisation du complexe YedZ/Fre/YedY .....	111
Figure IV-14 : Purification des nanodisques SpNox.....	113
Figure IV-15 : Activité de la protéine SpNox.....	115
Figure IV-16 : Cristaux de nanodisques YedZ, dans la condition 2-méthylpentanediol (MPD), 100 mM imidazole reproduits et clichés de diffractions .....	118
Figure V-1 : Mécanisme de fonctionnement proposé pour les transporteurs ABC .....	122
Figure V-2 : Mécanisme d'action des transporteurs ABC,.....	123
Figure V-3 : Purification des nanodisques avec BmrA.....	125
Figure V-4 : Mesure de l'activité de la protéine BmrA .....	126
Figure V-5 : Digestion à la trypsine des nanodisques BmrA.....	128
Figure V-6 : Fraction utilisée pour la microscopie électronique.....	129
Figure V-7 : Observation des nanodisques BmrA à l'aide de la microscopie électronique .....	130
Figure V-8 : Images de Cryo-microscopie électronique des nanodisques avec BmrA E504Q.....	132
Figure V-9 : Digestion des nanodisques BmrA E504Q incubés avec du magnésium et de l'ATP avec la trypsine .....	134
Figure V-10 : Mécanisme du complexe BceAB-RS (image provenant de Jaroslav Vorac) .....	136
Figure V-11 : Purification des nanodisques BceAB .....	137
Figure V-12 : Mesure de l'activité ATPasique de BceAB. ....	139

## Liste des tables

Tableau I-1 : Différentes classe d'hélices amphipatiques.....	38
Tableau I-2 : Différentes utilisations des nanodisques pour des études fonctionnelles et d'interaction des protéines membranaires .....	47
Tableau I-3 : Différentes utilisations des nanodisques pour des études fonctionnelles et d'interaction des protéines membranaires .....	50
Tableau I-4 Récapitulatif de toutes les protéines étudiées avec les nanodisques. ....	55
Tableau II-1 : Réaction de la transformation du PEP en pyruvate couplée avec la réaction de la transformation du pyruvate en lactate .....	62
Tableau II-2 : Listes de techniques utilisées en collaboration ou avec des plateformes ..	66
Tableau II-3 : Liste des tampons utilisés .....	67
Tableau IV-1 : Comparaison de l'activité de SpNox en environnement lipidique et en détergents.....	116

## Abbréviation

AAC : Transporteur ADP/ATP

Au : Unité arbitraire

AFM : Microscopie à force atomique

ATP : adénosine-5'-triphosphate

BCA : Bicinchoninic acid assay

DDM : n-Dodecyl  $\beta$ -D-maltoside

DDT : Dithiotréitol

EDC : 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride)

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

FAD : Flavine adénine dinucleotide

FRET : Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes

FTIR : Spectroscopie infrarouge

GFP : Protéine fluorescente verte

HDL : Lipoprotéine de haute densité

IPTG : Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

ITC : Titration calorimétrique isotherme

LB : Lysogeny Growth ou bouillon lysogène

LDAO : N,N-Dimethyldodecylamine N-oxide

MSP : Membrane scaffold protein ou protéine d'échaffaudage

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

NBD : Domaine de liaison aux nucléotides

NHS : N-hydroxysuccinimide

Ni-NTA : Acide nitrilotriacétique

POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RU : Unité de réponse

SANS : Diffusion des rayons X aux petits angles

SST : Sodium silicotungstate

TB : Terrific growth

TEV : Tobacco etch virus

TMD : Domaine transmembranaire

# **I. Introduction**

## **I.1. L'étude des protéines membranaires**

### **I.1.1. Importance des protéines membranaires**

Les cellules ainsi que toutes les organelles et vésicules présentes dans la cellule sont délimitées par une membrane. Ces membranes isolent les différents compartiments de la cellule, qui ont des fonctions spécifiques et des conditions physico-chimiques différentes. Entre ces compartiments, il y a des gradients de concentration de différents ions ou molécules essentielles aux fonctions biologiques. Par exemple, le gradient de protons au niveau de la membrane interne mitochondriale permet la synthèse de l'ATP.

Les membranes sont composées de lipides, molécules amphiphiles insolubles dans l'eau, formées par une tête polaire et des chaînes hydrophobes. Les chaînes aliphatiques sont majoritairement au nombre de deux, mais il peut y avoir quatre chaînes ou une seule chaîne. Dans une membrane, les lipides ont leurs queues hydrophobes qui se font face, avec les têtes polaires qui sont orientées vers le solvant.

Les membranes sont aussi constituées de deux autres éléments principaux, les protéines intrinsèques ou périphériques, et enfin les sucres qui sont à l'extérieur de la membrane plasmique (Figure I-1).

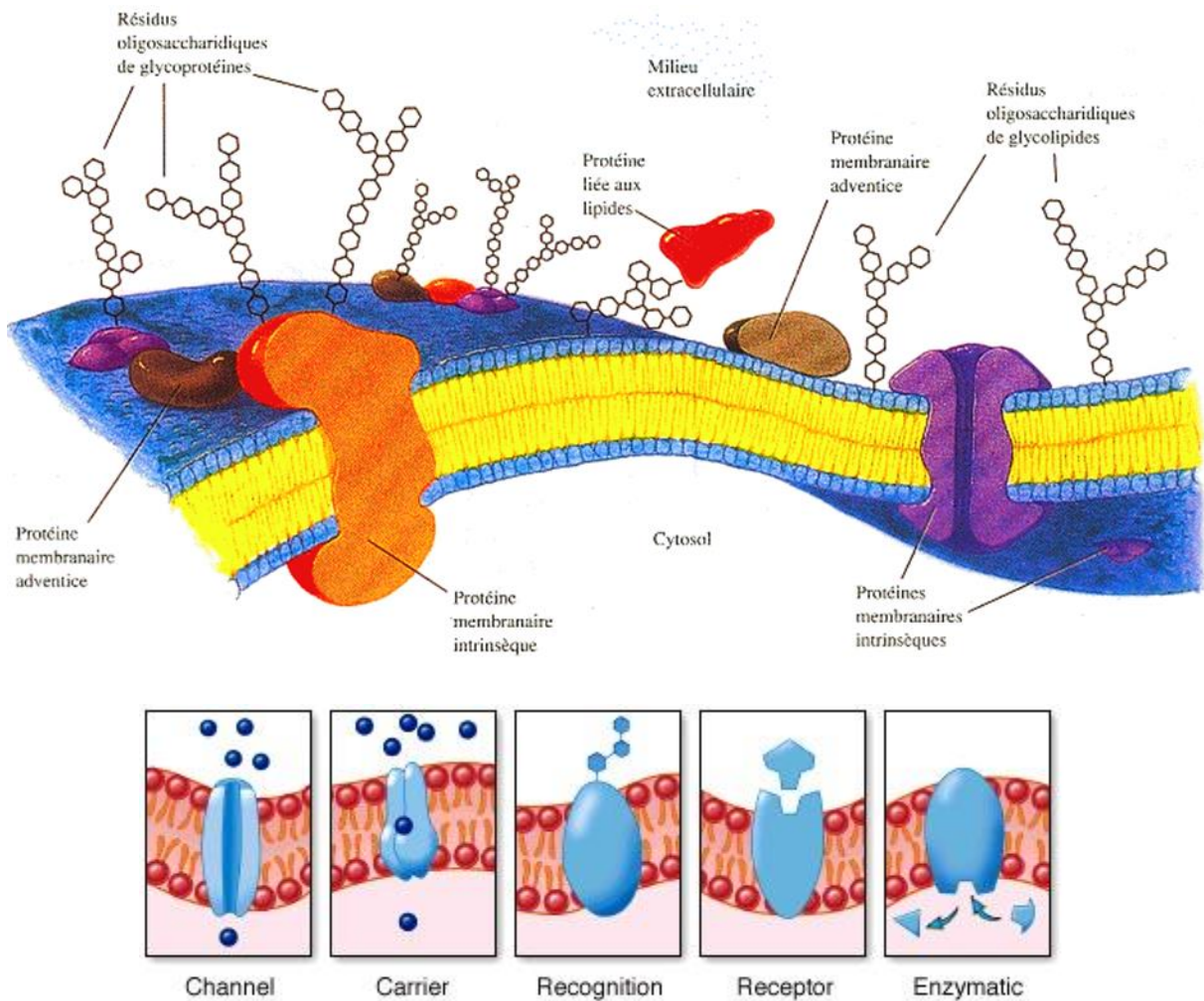


Figure I-1 : Représentation d'une membrane (haut) et des différentes fonctions de protéines membranaires (bas)<sup>1</sup>

Les protéines trans-membranaires sont impliquées dans de nombreux phénomènes biologiques. Elles jouent un rôle dans la communication intercellulaire via des signaux chimiques. D'autres protéines ont comme fonction de transporter des molécules à travers la membrane, de l'extérieur vers l'intérieur, ou l'inverse (Figure I-1).

Dans le cadre de ma thèse, plusieurs types de protéines membranaires ont été étudiés, mais principalement des transporteurs.

Un des objectifs majeurs pour chaque protéine étudiée était d'obtenir des informations structurales. Obtenir des informations structurales permet de comprendre au niveau moléculaire le fonctionnement de ces protéines, et de développer des inhibiteurs pour les protéines qui ont une importance médicale.

## **I.1.2. Etudes structurales des protéines membranaires**

### **1.2.a Méthodes d'études structurales**

La structure tridimensionnelle à haute résolutions des protéines peut être obtenue par trois techniques principales : la cristallographie aux rayons X, la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la microscopie électronique.

Pour la cristallographie aux rayons X, il est tout d'abord nécessaire d'obtenir des cristaux de protéines, dans lesquels les protéines forment un empilement régulier. Une fois les cristaux obtenus, ils sont exposés à un faisceau de rayon X qui va diffracter en fonction de la nature et de la position de chaque atome présent dans le cristal. A partir des clichés de diffraction, on peut déterminer la structure de la protéine. L'obtention de cristaux nécessite la purification d'un échantillon protéique pur, homogène et concentré (environ 10mg/mL).

La résonance magnétique nucléaire (RMN) utilise les moments magnétiques des atomes. Un champ magnétique oriente le spin des atomes. La relaxation du spin des atomes est mesurée lorsque le champ magnétique est modifié. Comme la relaxation du spin d'un atome est dépendant de son environnement, le signal correspondant à un atome est influencé par les caractéristiques électroniques des atomes voisins. Cela permet d'avoir des informations de distance entre ces atomes. Il est possible de déterminer la structure d'une molécule en tenant compte de cet effet. Pour les protéines, il est nécessaire d'avoir un échantillon concentré, et enrichi en  $^{15}\text{N}$  et en  $^{13}\text{C}$ . La technique s'applique à des protéines en dessous d'une certaine taille (typiquement 100 kDa).

La microscopie électronique de particules uniques consiste à observer la transmission d'un faisceau d'électrons par les échantillons déposés sur une grille. Les objets ne doivent donc pas être trop denses aux électrons, afin de pouvoir mesurer le faisceau transmis sur le détecteur. A partir des clichés de microscopie électronique, la structure des particules peut être obtenue en classifiant les différentes orientations de la particule observée et en reconstruisant la structure en moyennant la particule sélectionnée. Cette technique a en général une résolution plus faible que la cristallographie aux rayons X ou la RMN, et est plus adaptée aux objets de grande taille. Cependant, les récents progrès sur les détecteurs permettent maintenant d'obtenir des résolutions inférieures au

nanomètre, comme pour la structure du canal ionique TRPV1 obtenue à une résolution de 3,4 Å<sup>2</sup>, ou le transporteur ABC hétérodimérique couplé à un fragment d'anticorps TmrAB-BA6 obtenu à une résolution de 9,4 Å<sup>3</sup>.

### 1.2.b Le cas des protéines membranaires

La production, la purification, et l'obtention de structures de protéines transmembranaires demeurent une entreprise fastidieuse et délicate, conséquemment à la qualité hydrophobe intrinsèque des domaines enfouies dans la membrane. Il y a donc beaucoup moins de structures de protéines membranaires résolues comparées aux protéines solubles, et la vitesse de résolution de nouvelles structures dans le temps est plus faible que celle des protéines solubles<sup>4</sup> (Figure I-2). Moins de 2% des structures présentes dans la PDB sont des structures de protéines membranaires, alors que celles-ci représentent 20 à 30% des génomes de chaque organisme.

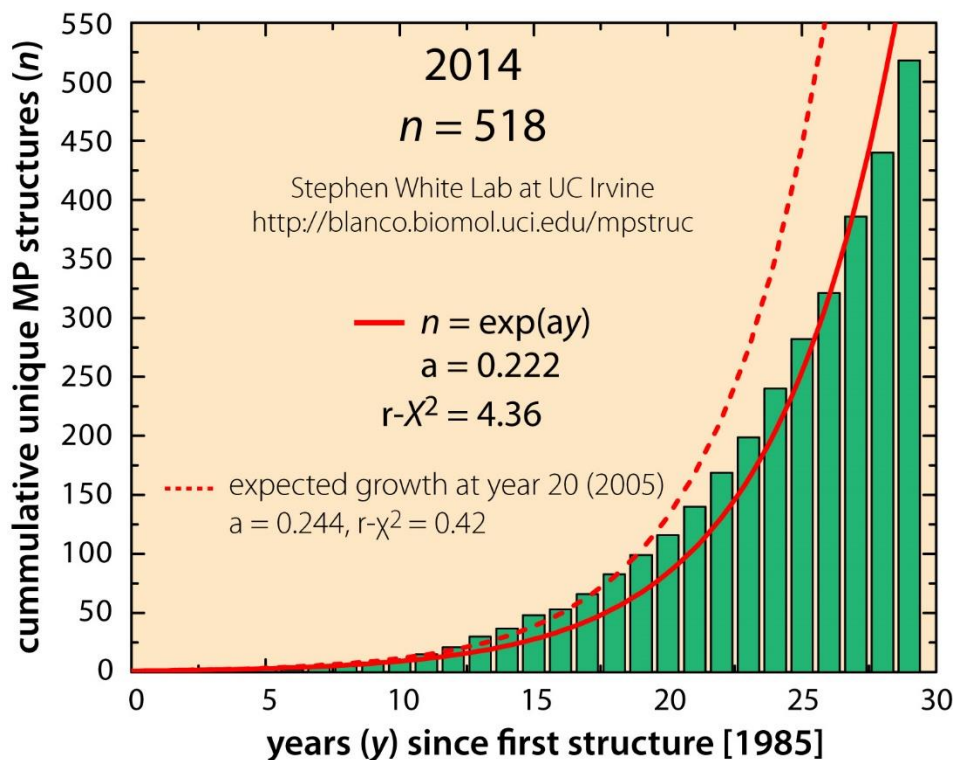


Figure I-2 : Statistiques de résolutions de structures uniques de protéines membranaires depuis 1985<sup>4</sup>



La surexpression des protéines membranaires est la première difficulté rencontrée pour leur étude avec les principales techniques physico-chimiques. Il est en effet nécessaire de les extraire de la membrane qui les contient pour les purifier, en évitant l'agrégation induite par l'interaction hydrophobe des parties initialement insérées dans la membrane lipidique et surtout par la dénaturation des protéines en dehors de leur milieu naturel. Les procédés utilisés pour solubiliser les protéines membranaires ont souvent un effet délétère sur leur repliement et il est très difficile de mimer l'environnement lipidique *in vitro*. De plus, il faut aussi préserver leur repliement natif et déterminer un environnement qui mime les interactions avec les lipides au niveau moléculaire et avec la membrane dans son ensemble.

Dans ce cadre, les techniques utilisées reposent soit sur l'utilisation de surfactants, qui maintiennent les protéines membranaires en solution (détergents, amphipols, agents fluorés, peptergent), soit sur l'utilisation de membranes reconstituées (liposomes, bicelles, nanodisques).

Nous commencerons par présenter l'utilisation des détergents qui est la technique la plus utilisée de nos jours autant pour la cristallisation<sup>5</sup> que pour la caractérisation de nombreuses protéines membranaires.

### **I.1.3. Méthodes d'étude des protéines membranaires**

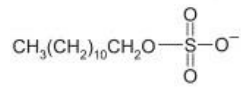
#### **1.3.a Les détergents**

##### **I.1.3.a.i Présentation des détergents**

Les détergents sont des molécules amphiphiles solubles dans l'eau et sont composés d'une tête polaire et d'une queue hydrophobe, dont le rôle est d'extraire des protéines membranaires hors de la membrane et de les maintenir solubles. Il existe quatre grandes familles de détergents : les détergents ioniques, les dérivés d'acides biliaires, les détergents non ioniques et les détergents zwitterioniques (Figure I-3).

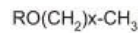
**a.**  
**Ionic detergents**

Sodium dodecyl sulfate (SDS)

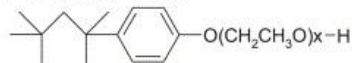


**c.**  
**Non-Ionic Detergents**

R = glucose, x = 7, n-octyl-β-D-glucopyranoside  
R = maltose, x = 9, decyl-β-D-maltoside  
x = 11, dodecyl-β-D-maltoside

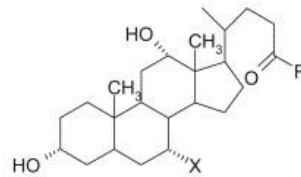


x = 9, Triton® X-100  
x = 7-8, Triton® X-114



**b.**  
**Bile Acid Salts**

X=H, R = O-Na<sup>+</sup>, sodium deoxycholate  
X=OH, R = O-Na<sup>+</sup>, sodium cholate



**d.**  
**Zwitterionic Detergents**

x = H, CHAPS  
x = OH, CHAPSO

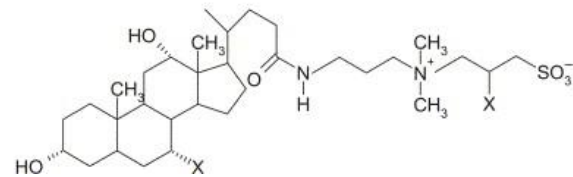


Figure I-3 : Structure des différentes familles de détergents<sup>151</sup>

Les détergents ioniques possèdent une tête polaire chargée, positive ou négative. Le sodium dodecyl sulfate (SDS) est un exemple de cette famille. Ces détergents sont très puissants et sont capable de déstabiliser les interactions protéine-lipides, mais aussi les interactions protéine-protéine entraînant souvent la dénaturation des protéines. Ces détergents sont donc en général trop agressifs pour les protéines membranaires et ne sont pas adaptés dans le cadre d'une caractérisation biophysique.

Les détergents dérivés des acides biliaries sont aussi chargé. Ils ont comme acide gras des groupements stérol, que l'on retrouve dans le cholestérol.

Les détergents non ioniques sont plus doux que les détergents ioniques. Ils ne dénaturent généralement pas la protéine étudiée, mais peuvent déstabiliser les interactions protéine-lipides, et parfois les interactions protéine-protéine. Il existe deux familles de détergents non ioniques :

- les détergents avec une base glycoside, comme le dodécylmaltoside (DDM). Ce détergent est le détergent le plus utilisé pour l'approche cristallographique
- les détergents éther de Poly(oxyéthylène) ont une queue hydrophobe composée de polymère d'oxyéthylène (Brij et TWEEN) ou d'éthylèneglycoéther (Triton)

Les détergents zwitterioniques sont aussi utilisés pour l'étude de protéines membranaires. Ils ont des caractéristiques à la fois des détergents ioniques et non ioniques. Ils dénaturent moins les protéines membranaires que les détergents ioniques et sont plus efficaces que les détergents non ioniques pour déstabiliser les interactions protéine-protéine.

En conclusion, le choix du détergent est primordial pour avoir une efficacité optimale. Pour les expériences de repliement des protéines, les détergents ioniques sont privilégiés afin de solubiliser les corps d'inclusion. Pour extraire des protéines membranaires, les détergents non ioniques sont privilégiés.

#### **I.1.3.a.ii Fonctionnement des détergents**

En solution, les détergents s'assemblent en micelles au-dessus d'une concentration critique, appelée cmc (concentration micellaire critique). Il existe un équilibre entre les détergents en monomère et en micelle, mais plus la concentration en détergent augmente et plus la quantité de micelle augmente, alors que la quantité de monomère reste stable. La taille des micelles dépend de la structure du détergent, mais aussi de l'environnement (force ionique, pH, température).

La cmc d'un détergent est un critère essentiel pour la manipulation de protéines membranaires. Lors de l'extraction des protéines membranaires, les détergents doivent être utilisés à une concentration au-dessus de la cmc pour pouvoir solubiliser les membranes et maintenir en solution les protéines membranaires. Les membranes sont fragmentées et solubilisées dans les micelles et les protéines membranaires forment alors des complexes incorporant les détergents qui protègent leurs surfaces hydrophobes du solvant.

Une méthode alternative d'extraction de protéines membranaires consiste à utiliser la température pour jouer sur les phases des détergents. En effet, à partir d'une certaine température (cloud point), une séparation de phase s'effectue entre la phase aqueuse et la phase contenant le détergent. Cette valeur dépend de la concentration en détergent et de la force ionique du tampon.<sup>6</sup> Cette méthode a été utilisée avec succès pour

l'extraction d'une protéine chimérique appelé EGIcore-HFBI constituée du cœur catalytique de la cellulase endoglucanase 1 et de la petite protéine hydrophobine 17.

Il est difficile de prédire l'effet d'un détergent sur une protéine. Il est donc nécessaire de tester un ensemble de détergents afin de déterminer celui qui permettra d'extraire la protéine de la membrane sans endommager son repliement. Le détergent utilisé peut être différent selon l'étape de purification (extraction, solubilisation). De plus, le choix du détergent est aussi important dans le processus de cristallisation. Ce facteur supplémentaire dans la cristallisation de protéines membranaires par rapport aux protéines solubles est en partie responsable de la difficulté à obtenir des cristaux et résoudre des structures de protéines membranaires.

Les protéines membranaires solubilisées par des détergents peuvent être étudiées par les techniques physico-chimiques utilisées pour les protéines solubles. Cependant, la présence de détergent lié et de détergent libre en solution génère des inhomogénéités et donc des difficultés dans la mise en œuvre et l'interprétation des expériences biophysiques. De plus, le manteau de détergent peut empêcher des interactions protéine-protéine ou protéine-lipides.

La majorité des structures de protéines membranaires a été déterminée avec des protéines membranaires maintenues en solution grâce à des détergents. Dans les années 80, un travail important (en particulier dans l'équipe de J. Rosenbusch à l'Université de Bâle) a permis de comprendre les propriétés des détergents et de concevoir de nouveaux détergents permettant la cristallisation des protéines membranaires. Néanmoins, beaucoup de protéines ne cristallisaient pas ou avec un pouvoir diffractant très faible. Les tests d'activité sur des protéines en solution (tests de liaison ou réaction enzymatique) montrent que les valeurs d'activité varient selon l'environnement de la protéine (membrane ou détergents)<sup>8</sup>. Plus récemment, la pertinence de certaines structures cristallographiques a été discutée mettant en lumière que les détergents induisent des conformations non présentes en solution<sup>9,10</sup>. En effet, des détergents trop puissants peuvent forcer les protéines à adopter des conformations non existantes en solution (ou non physiologiques).

Les problématiques liées à l'utilisation des détergents ont conduit au développement d'autres molécules tensio-actives capable de maintenir en solution les protéines

membranaires dans des conditions plus proches des conditions natives. Ces molécules dérivent de détergents préexistants, comme les maltose-neopentyl glycol (MNG)<sup>11</sup> ou ont des structures moins conventionnelles, comme les amphipols<sup>12</sup> ou les tensio-actifs fluorés.

### **1.3.b Les amphipols**

Les amphipols ont été développés dans les années 90 par Jean-Luc Popot et Christophe Tribet et leur équipe<sup>13</sup>. L'objectif de ces molécules est d'augmenter l'affinité entre le surfactant et les surfaces hydrophobes des parties transmembranaires des protéines membranaires, de telle sorte qu'il n'y ait plus de molécules libres en solution et qu'une quantité très faible d'amphipol soit suffisante pour maintenir la protéine soluble.

Les amphipols ont permis de maintenir en solution de nombreuses protéines membranaires<sup>13,14</sup>. Certains travaux font état d'une plus grande stabilité des protéines membranaires solubilisés par cette technique par rapport aux détergents<sup>15-17</sup>.

L'utilisation des principales méthodes biophysiques d'études des protéines est compatible avec l'utilisation des amphipols. Cependant, ces molécules présentent certains inconvénients, comme la difficulté de transférer les protéines solubilisées avec des amphipols dans des membranes, ou de remplacer les amphipols par des détergents. Aucune structure n'a encore été résolue avec des protéines en amphipols cristallisés. Récemment de nouveaux amphipols non ioniques, plus propices à la cristallisation, ont été développés en utilisant la fonction hydroxyle de groupement Tris pour augmenter la solubilité de la molécule<sup>18</sup>. Ces amphipols restent toutefois délicats à utiliser tant leur solubilité est faible. Plus récemment, d'autres amphipols ont été développés en ajoutant des groupements glycosyls<sup>19,20</sup>.

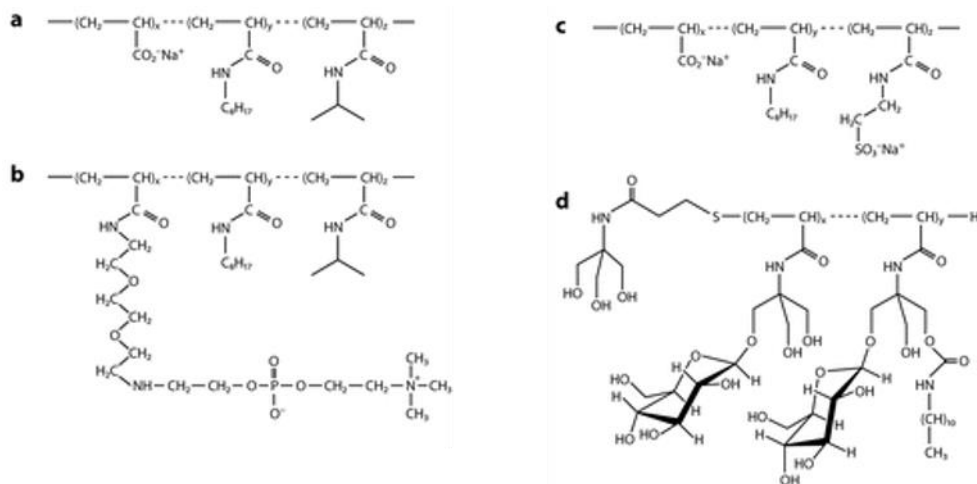


Figure 1-4 : Structures des différentes familles d'amphipols<sup>12</sup> a. A8-35, amphipol basé sur des fonctions polyacrylate b. C22-43, amphipol basé sur des fonctions phosphorylcholine c. Amphipol sulfonaté d. Amphipol glucosylé, non ionique (NAPol).

D'autres approches structurales ont bénéficié avec succès de l'utilisation des amphipols : la microscopie électronique en transmission<sup>21</sup>, la RMN en solution<sup>22-24</sup>, et la cristallisation en phase cubique de lipides<sup>25</sup>.

Toutefois, malgré la possibilité d'avoir des protéines membranaires en solution étudiées plus facilement par des méthodes biophysiques, les protéines membranaires ne sont pas dans un environnement proche de leur environnement physiologique, et on ne peut exclure que les protéines associées aux amphipols ont des conformations non physiologiques. En particulier, la stabilisation des protéines membranaires par ces molécules provoque une diminution de leurs propriétés dynamiques ce qui peut affecter leur activité<sup>26</sup>

### I 2.3 Les surfactants fluorés

Les surfactants fluorés (FS) ont la même structure que les détergents, sauf que la chaîne aliphatique contient des atomes de fluor. Le principe est que les alcanes fluorés ne se mélangent pas avec les micelles de détergents. Par conséquent, les lipides et autres molécules hydrophobes ne devraient pas être présents dans les micelles composées de FS. Ceci permet de limiter la délipidation des protéines. Comme les chaînes alkyl des FS sont plus rigides et plus imposantes que celles des détergents, les FS ont une affinité

faible pour les segments transmembranaires des protéines membranaires. Ils sont moins à même de casser les interactions entre les protéines membranaires que les détergents.

Toutefois, les FS ne sont pas capables de solubiliser les membranes, ils sont donc utilisés dans un deuxième temps après solubilisation par un détergent classique.

Le cytochrome b6f, la bacteriorhodopsine, l'ATP synthase mitochondriale ont été étudiés en présence de FS qui ont amélioré leur stabilité<sup>12,27-29</sup>.

## **I 2.4 Les lipopeptides détergents**

Les lipopeptides détergent sont des petits peptides qui ont été pensés pour permettre de solubiliser et/ou de garder en solution des protéines membranaires<sup>30-32</sup>. Il existe deux types de lipopeptides détergents.

Le premier type de lipopeptides détergents sont des peptides qui ont une taille de 25 acides aminés et sont structurés en hélices  $\alpha$  amphiphiles, un côté de l'hélice est hydrophile et l'autre côté ainsi que les extrémités N- et C-terminales sont hydrophobes. La face hydrophobe du lipopeptide détergent est composée d'alanine et aux positions 2 et 24 des chaînes alkyles sont attachés covalamment. Le côté hydrophobe interagit avec les domaines transmembranaires des protéines membranaires alors que les parties hydrophiles font face au solvant et par conséquent aident à la solubilisation de la protéine membranaire<sup>30</sup>.

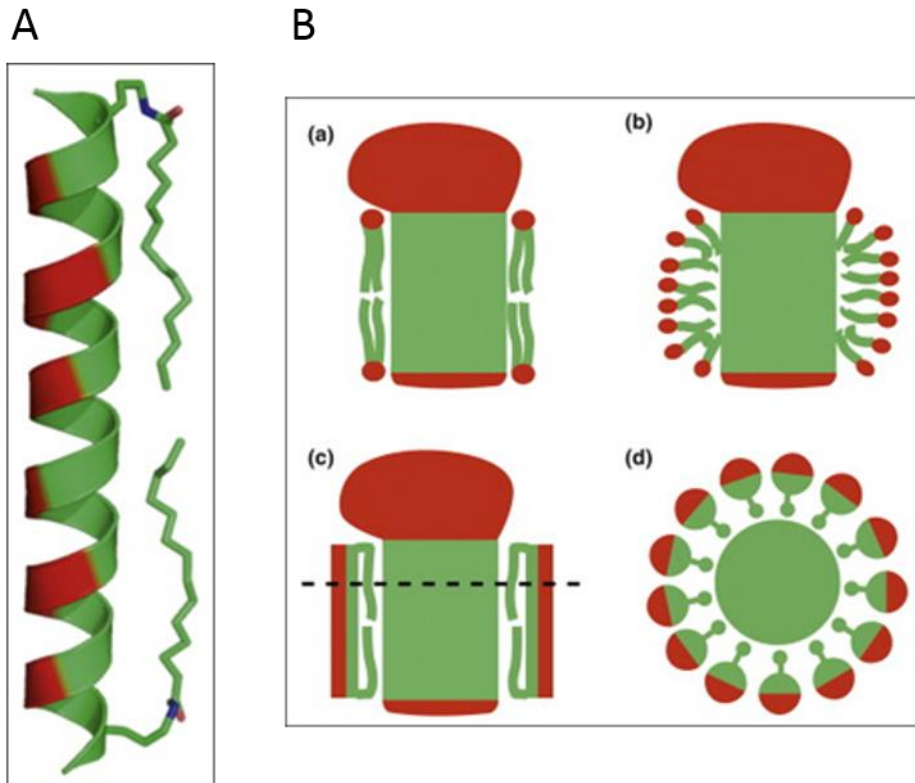


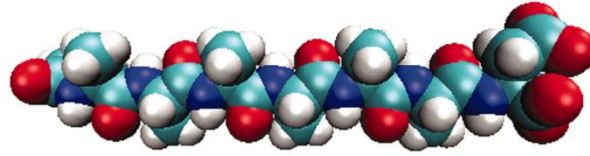
Figure I-5 : Mécanisme de lipopeptides détergents A. Structure d'un lipopeptide détergent B. Schémas comparatifs des différentes interactions entre une protéine membranaire et des lipides (a), des détergents (b) et des lipopeptides détergents (c) et (d)<sup>31</sup>

Ces lipopeptides étant difficile à produire et coûteux, ils sont utilisés après solubilisation préalable avec des détergents. Pour substituer les détergents par des lipopeptides, ils sont ajoutés pendant l'étape d'ultrafiltration. Du fait de leur structure proche des détergents, ils possèdent des propriétés similaires et sont caractérisés par des paramètres similaires, comme la cmc ou le nombre d'agrégation.

L'autre type de lipopeptide détergent est une construction peptidique qui permet de maintenir en solution une protéine membranaire et consiste à imiter la structure d'un détergent. Le peptergent est constitué d'environ 6 à 10 acides aminés, soit une taille de 2 à 3nm. Il est composé d'une queue hydrophobe, fait d'une succession d'acides aminés hydrophobes, généralement des valines ou alanines, et d'une tête polaire, composée de l'acide aminé arginine, asparagine, ou glycine (Figure I-6).



A Ac-AAAAAAD-COOH



B Ac-AAAAAAK-CONH<sub>2</sub>



Figure I-6 : Structure de lipopeptides détergents<sup>32</sup>

Ces lipopeptides détergents ont pour le moment été décrit comme système pour solubiliser et maintenir en solution des protéines membranaires (bactériorhodopsine, GPCR, complexe photo système 1<sup>30,32</sup>), mais il y a peu d'études d'interaction, de fonctionnalité, ou de structures avec ces petits peptides. L'absence de tels travaux peut être dû au fait que l'accès à ces molécules est plus compliqué que pour d'autres systèmes, et aussi que cette méthode est récente. Il n'y a pas encore de commercialisation de ces peptides.

### 1.3.c Reconstitution des protéines membranaires dans une membrane

#### 1.1.3.c.i Rôle de la membrane

La solubilisation de protéines membranaires à l'aide de détergents peut entraîner une déformation de la protéine et altérer ses fonctions. En effet, les protéines membranaires ont généralement une activité supérieure ou égale une fois reconstituées dans des membranes lipidiques comparativement à un environnement de détergent<sup>8</sup>.

Les détergents peuvent par exemple s'intercaler entre des hélices et, même si la protéine est maintenue en solution, la structure obtenue peut souffrir d'artefacts liés à la présence de ces détergents<sup>9,10</sup>.

De plus, la présence de lipide particulier peut être indispensable au bon repliement ou à l'activité de la protéine. Par exemple, la structure du transporteur mitochondrial ADP/ATP bovin révèle la présence de trois molécules de cardiolipide en interaction avec les hélices transmembranaires suggérant un rôle capital de ce lipide dans la stabilité et peut-être la fonction de la protéine<sup>33</sup>. Le canal potassium a par exemple besoin du lipide PIP2 pour pouvoir s'ouvrir<sup>34</sup>. S'inspirant de cette observation, les lipides sont souvent testés de manière systématique comme additif pour améliorer la cristallogénèse d'une protéine<sup>35</sup>.

#### **1.1.3.c.ii Méthodes de reconstitution de protéines membranaires dans des membranes**

##### **(a) Les liposomes**

Il existe différents systèmes qui permettent de faire une membrane lipidique.

Le système le plus commun est le liposome. Il consiste en une vésicule formée par une bicouche lipidique, avec en son sein un compartiment aqueux. Les liposomes peuvent avoir différentes tailles, qui varient en fonction des lipides utilisés ou des conditions physico-chimiques, comme le pH ou la température, ou mécaniques (par exemple sonication ou extrusion). Les liposomes forment un compartiment fermé, ce qui les rends utile pour les études fonctionnelles de protéines ayant une activité de transport<sup>36,37</sup>.

L'inconvénient de cette méthode est que la coalescence des vésicules est importante surtout à température ambiante. Par conséquent, les liposomes augmentent en taille et en hétérogénéité, compliquant les études structurales. Des études structurales ont en revanche pu être menées par RMN du solide, où la taille des objets étudiés et leur homogénéité sont moins essentielles<sup>38-41</sup>.

## **(b) Les bicelles**

Les bicelles sont de petits fragments de membranes qui sont maintenus en solution par un lipide (comme le 1,2-diheptanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DHPC)). Elles ont l'avantage d'être beaucoup plus stables que les liposomes, les fusions entre bicelles étant moins nombreuses. Les bicelles étant petites et stables, elles ont beaucoup été utilisées en RMN du solide<sup>42,43</sup>. Des structures de protéines en bicelles ont aussi été obtenues par cristallographie des rayons X<sup>44,45</sup>.

La partie suivante présente la technique que j'ai étudiée et utilisée durant ma thèse : la reconstitution de protéines membranaires dans une membrane lipidique de type nanodisques.

### **I.2. Reconstitution de protéines membranaires dans des nanodisques**

Les nanodisques consistent en une bicouche lipidique piégée par une protéine amphiphile. La protéine la plus couramment utilisée pour l'assemblage de nanodisques est la protéine MSP1 (Membrane Scaffold Protein), une protéine chimérique dérivée de l'apolipoprotéine A1. Cette procédure a été initialement développée par Steven Sligar de l'Université de l'Illinois.

#### **I.2.1. La protéine Apolipoprotéine A1**

Plusieurs apolipoprotéines permettent de former ces structures discoïdales (voir partie II4), nous allons nous concentrer ici sur l'apolipoprotéine A1 <sup>46</sup>.

##### **2.1.a Contexte biologique de la protéine**

La protéine apolipoprotéine A1 est le constituant principal des particules HDL (High Density Lipoprotein) présentes dans les vaisseaux sanguins et impliquées dans la voie de biosynthèse du cholestérol. De nombreuses études ont été réalisées sur la formation des particules HDL et leur importance pour la santé. Elles sont impliquées dans plusieurs maladies comme l'athérosclérose, la thrombose, et des fragments de l'apolipoprotéine A1 sont retrouvés dans certaines maladies amyloïdes.

Les particules HDL sont impliquées dans le transport inverse du cholestérol. La protéine ApoA1 est synthétisée dans l'intestin et le foie puis recrute des lipides afin de former une particule discoïdale, appelée particules pre- $\beta$  HDL. Ces particules sont composées de cholestérol et de glycérophospholipides. Ensuite, les particules pre-B HDL circulent dans sang et récupèrent les excès de cholestérol présent dans les cellules endothéliales (dont les cellules spumeuses) et les transportent jusqu'au foie pour être intégrés à la bile ( Figure I-7)<sup>47</sup>.

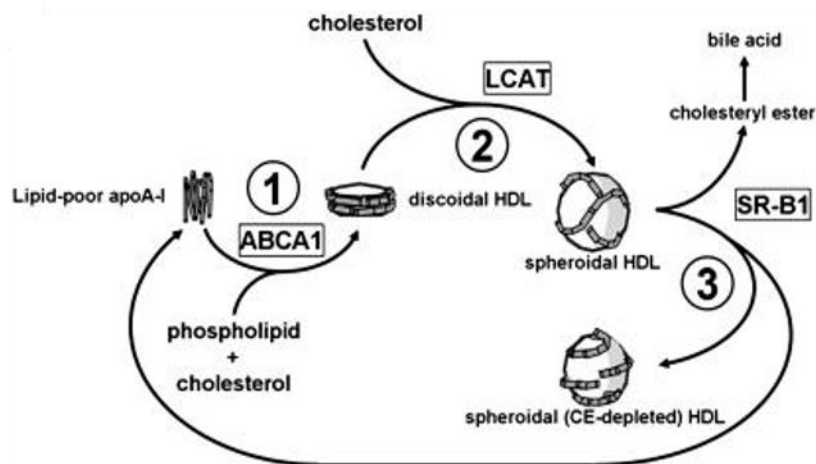


Figure I-7 : Voie d'assemblage des particules HDL<sup>152</sup>

Le cholestérol est incorporé dans les particules HDL de manière sélective. Le mécanisme qui permet cette incorporation n'est pas encore complètement résolu. Il a été montré que la protéine ABCA1 est nécessaire pour la formation des particules pre-B HDL <sup>48-50</sup>, mais le mode de fonctionnement est encore discuté. Cette protéine a aussi un rôle dans le transport des lipides entre l'appareil de Golgi et membrane plasmique. La protéine ABCA1 est exprimé de façon ubiquitaire chez l'homme, mais est sur-exprimé dans le foie, l'intestin et les tissus adipeux. <sup>51</sup> Des expériences de pontage chimique semblent montrer une interaction directe entre la protéine ApoA1 et ABCA1. <sup>48</sup>. Cependant, une publication récente rejette cette hypothèse ; l'absence d'interaction est démontrée par une expérience de co-précipitation<sup>50</sup>. Un des modèles actuels est qu'ABCA1 serait impliquée dans la formation de la courbure de la membrane, favorisant l'interaction entre la partie C-terminale de l'ApoA1 et la membrane.

### 2.1.b Formation de la particule $\beta$ -HDL

La protéine Apolipoprotéine A-1 est composée d'hélices amphipatiques répétées de 11 à 22 résidus qui sont séparées les unes des autres par des résidus proline (Figure I-8).

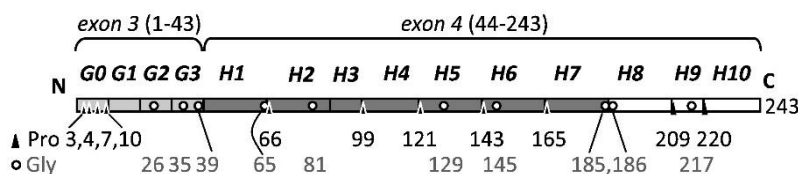
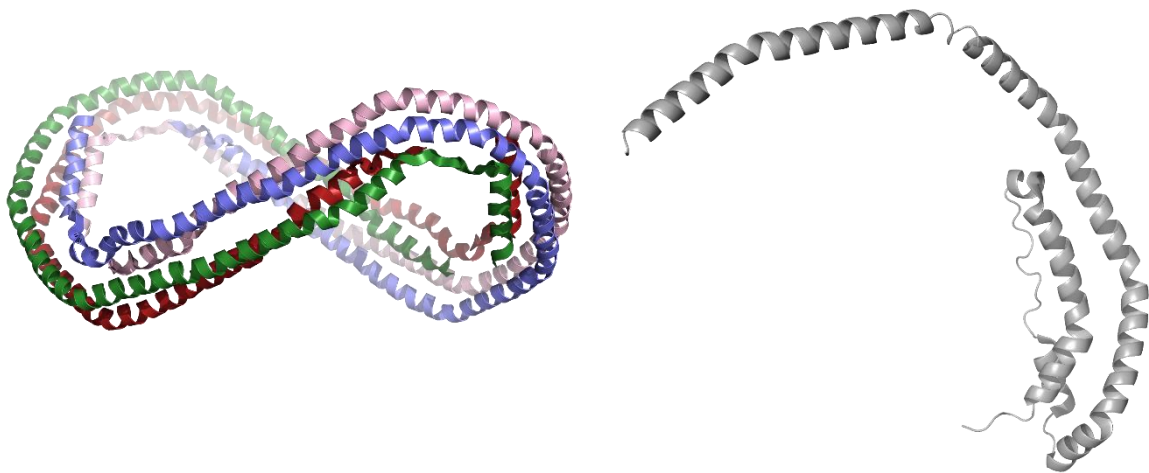


Figure I-8 : Organisation de la protéine Apolipoprotéine A-1. Les positions des prolines (triangles) et glycines (cercles) sont marquées par les nombres.<sup>70</sup>

En absence de lipides ou de détergents, la protéine adopte un repliement en faisceau d'hélices<sup>52</sup>. Trois structures hautes résolutions de la protéine ApoA1 sans lipides ont été déterminées, deux de la protéine humaine déterminées par cristallographie aux rayons X, et une autre résolue par RMN, avec une protéine de souris (65% d'identité). La première structure de la protéine, tronquée du résidu 1 à 43, a été résolue en 1997, à une résolution d'environ 4 Å.<sup>53</sup> La protéine a une structure de fer à cheval. L'unité asymétrique comprend deux dimères de protéine. La deuxième structure obtenue par cristallographie concerne une version tronquée de la protéine, des résidus 185 à 243 <sup>54</sup>. Ces deux structures montrent l'apolipoprotéine A1 dans une conformation dépliée. La structure obtenue par RMN a été déposée dans la PDB (PDB code : 2LEM) en 2011 mais n'a pas fait l'objet d'un article à ce jour. Cette structure montre que 4 hélices se font face, avec les résidus hydrophobes à l'intérieur, alors que les résidus hydrophiles sont face au solvant.



*Figure I-9 : Structure d'apolipoprotéine A1 sans lipides. A gauche, la structure de l'apolipoprotéine A1 tronquée des résidus 1 à 43. (pdb code : 1AV1), a droite, la structure de l'apolipoprotéine A1 tronquée des résidus 145 à 243 (pdb code : 3R2P)*

Les apolipoprotéines s'associent aux lipides et au cholestérol pour former un disque comprenant une bicouche lipidique (Beta-nascent HDL particle), la protéine ceinturant la bicouche. Il a été montré que ce processus est thermodynamiquement favorable<sup>55</sup>. La formation des Beta-nascent HDL s'effectue en trois étapes principales : la fixation de la

protéine à la membrane, l'enrichissement en lipides, et le décrochage de la membrane (Figure I-10).

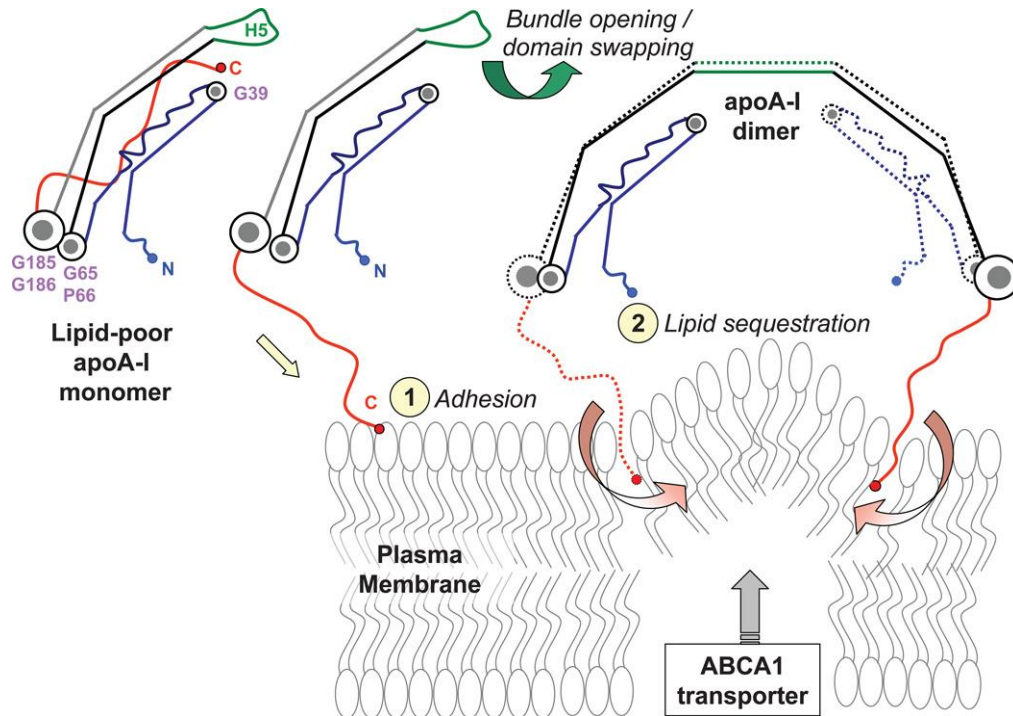


Figure I-10 : Mécanisme proposé pour le recrutement de lipides par la protéine apolipoprotéine A1 <sup>70</sup>

La partie C-terminale de l'apolipoprotéine A1 est non structurée en solution mais forme une hélice amphipatique au contact de la membrane. Après l'interaction de la protéine avec la membrane, la protéine pourrait se dimériser autour de l'hélice 5. Cette hélice amphipatique interagit avec la membrane parallèlement à celle-ci, les têtes polaires chargées vont interagir avec les résidus chargés de l'hélice tandis que la partie hydrophobe va s'enfoncer dans la membrane. La protéine ABCA1 pourrait favoriser l'insertion des hélices amphipatiques en perturbant la membrane.

Plusieurs études ont été faites pour étudier l'interaction entre la partie C-terminale de la protéine et les membranes<sup>56</sup>.

### 2.1.c Conformation de l'apolipoprotéine formant les nanodisques

#### - Picket Fence vs Double belt

De nombreuses études ont été menées afin de déterminer si ApoA1 adopte une conformation dite « Picket fence » (palissade), correspondant aux hélices alpha de la protéine parallèles à l'axe de la bicouche lipidique, ou une conformation « double belt » (double ceinture), où les hélices alpha sont perpendiculaires à l'axe de la bicouche, avec deux protéines pour couvrir la largeur de la bicouche lipidique (Figure I-11). Une autre conformation possible est appelée « hairpin » (épingle à cheveux). Dans cette disposition formant une double ceinture, les deux protéines se partagent chacune un côté de la particule discoïdale.

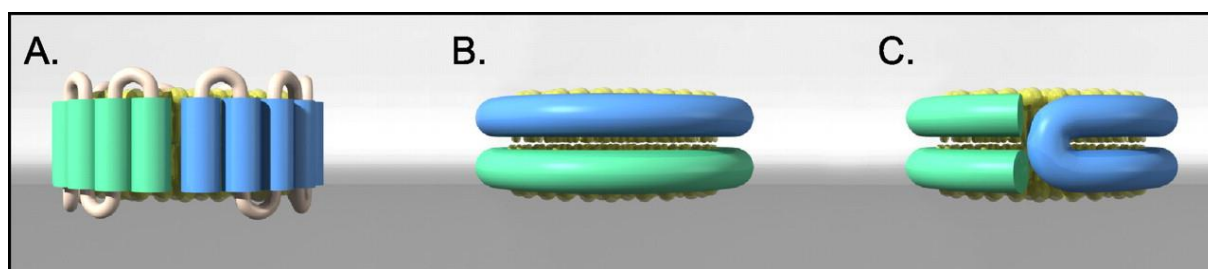


Figure I-11 : Différentes conformations possibles de la protéine Apolipoprotéine A-1. A. « Picket Fence », B. « Double Belt », C. « hairpin » <sup>57</sup>

Plusieurs expériences comme la digestion enzymatique, microscopie à effet tunnel ou spectroscopie infrarouge<sup>58,59,60</sup> sont en faveur de la conformation du modèle en palissade. Dans ce modèle, les prolines, nombreuses dans les hélices de la protéine apolipoprotéine, induiraient un coude qui permettrait l'alignement des hélices. Le dimère de la protéine permettrait de stabiliser une particule HDL discoïdale avec 12 hélices alpha. Structural analysis of nanoscale self-assembled discoidal lipid bilayers by solid-state NMR spectroscopy.

D'un autre côté, une expérience de résonance paramagnétique électronique décrite par Davidson<sup>61</sup> indique que l'hélice 4 est perpendiculaire aux chaînes acyl, ce qui est en faveur du modèle en double ceinture. Par ailleurs, la modélisation moléculaire faite par



Gu<sup>62</sup> vient confirmer ce modèle. Enfin, une autre étude comprenant des expériences de FRET est aussi en faveur de ce même modèle<sup>57</sup>. Dans cette étude, le transfert de fluorescence est réalisé entre un tryptophane et un fluorophore, l'AEDANS. Les trois tryptophanes de la protéine ont été mutés pour qu'il n'y ait pas plusieurs possibilités de transfert. La localisation des fluorophores permet aussi de faire la différence entre le modèle en double ceinture ou le modèle en épingle à cheveux. Les résultats de cette étude sont en faveur d'un modèle en double ceinture.

Une structure de la protéine, tronquée du résidu 1 à 43, a été résolue en 1997, à une résolution d'environ 4 Å. La protéine a une structure de fer à cheval. L'unité asymétrique comprend deux dimères de protéine. Cette structure est fortement en faveur du modèle en double ceinture, même si la structure a été obtenue en absence de lipides. Ce modèle est celui qui bénéficie actuellement d'un consensus.

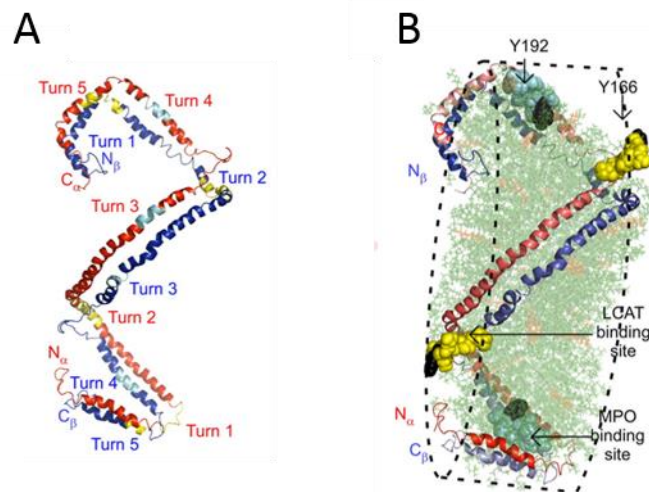


Figure I-12 : Représentation du modèle en double super hélice <sup>68</sup> A. Modèle de la protéine Apolipoprotéine A-1, avec des données d'expériences SANS (small angle neutron scattering) et de HD-MS/MS B. Modèle représenté avec des lipides POPC (en vert) et cholestérol (en orange)

Dans un dernier modèle appelé double super hélice (Figure I-12), la protéine apolipoprotéine A1 est encore associée par deux, ceinturant la bicouche lipidique, mais n'est pas perpendiculaire aux chaînes acyl. La protéine forme une sorte de double hélice qui ceinture la particule HDL, aussi de manière transversale. Des expériences de dynamique moléculaire, de microscopie électronique, de cryo-microscopie électronique,

de SANS, et enfin de FRET sont en faveur de cette hypothèse<sup>63</sup>. Dans les expériences de SANS, les différents modèles sont comparés avec les données expérimentales.

#### 2.1.d Stabilité des nanodisques

Un modèle de l'apolipoprotéine dans une conformation en « double belt » met en évidence une quantité importante de ponts salins, entre les hélices des deux protéines qui entourent la membrane lipidique (Figure I-13). Ces ponts salins jouent un rôle primordial dans la stabilité des nanodisques. Des expériences de modélisation moléculaire ont aussi abondé dans le sens de l'existence de ces ponts salins<sup>64,65</sup>.

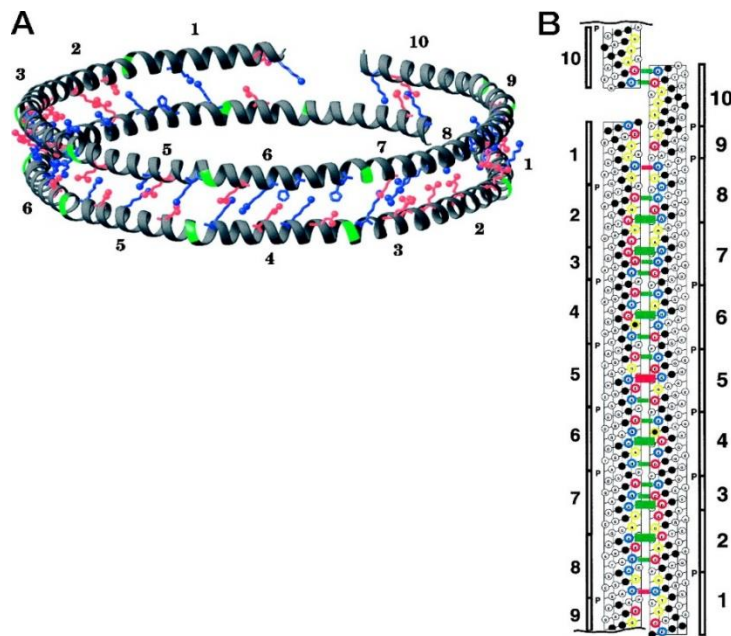


Figure I-13 : Représentation des ponts salins pour deux protéines apolipoprotéine A1 en conformation nanodisques A. Modèle de nanodisques où les hélices 5 se font face<sup>64</sup>, les résidus basiques sont représentés en bleus, les résidus acides sont représentés en rouge B. Diagramme représentant les hélices alpha des protéines MSP1 qui se font face.

#### 2.1.e Hétérogénéité des particules HDL discoïdales (nanodisques)

L'hétérogénéité des particules HDL discoïdales et nanodisques a été largement documentée. Elle peut avoir deux origines principales : (1) une association de plus de

deux protéines par nanodisques, ce qui va augmenter la taille des nanodisques (Figure I-14), (2) des variations de conformations lorsque la protéine est associée avec les lipides (un des modèles proposés correspond à la formation d'une épingle par une hélice flexible, appelée solar flare).

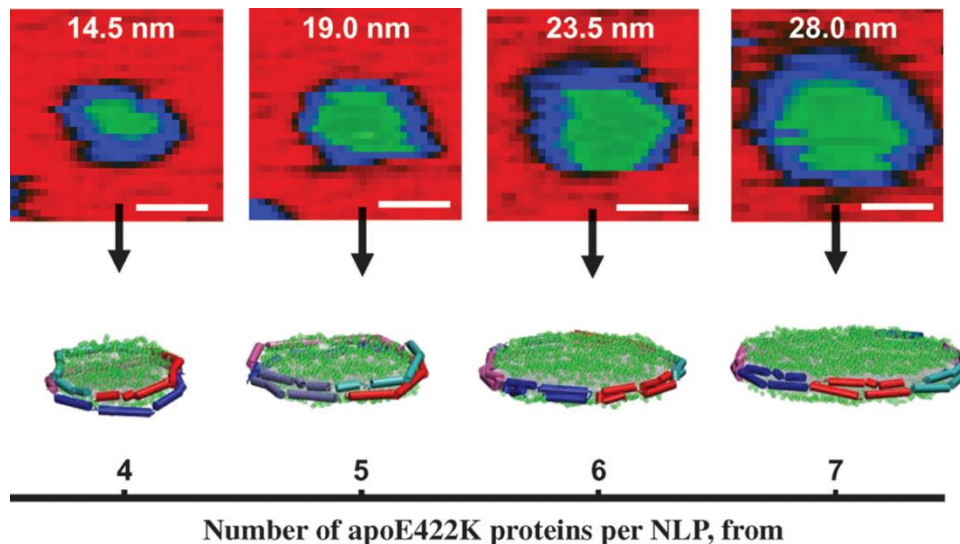


Figure I-14 : Différents tailles de nanodisques formés avec les protéines apoE422K<sup>153</sup>  
En haut, des images obtenus par la technique de microscopie à force atomique

La protéine ApoA1 pourrait former des épingles à cheveux sur certaines hélices quand elle est dans la conformation nanodisques. L'étude faite par Chetty par l'échange d'hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse<sup>66</sup>, souligne la présence d'hélice flexible dans la conformation en nanodisques. L'étude de fluorescence citée en partie II1c <sup>67</sup> est aussi en faveur de l'existence d'une partie flexible au niveau de l'hélice 5 de l'apolipoprotéine. Il est aussi à noter que le modèle de double super hélice n'est pas incompatible avec l'existence de cette zone flexible, la zone qui correspond à la boucle n'étant pas structurée dans le modèle<sup>68</sup>.

Toutefois des simulations de dynamique moléculaire ont conclu à la faible probabilité de leur existence ; les épingles à cheveux s'effondrent dans les simulations<sup>69</sup>.

### 2.1.f Conformation de la protéine apolipoprotéine dans les particules HDL

L'augmentation de la concentration en lipides induit un changement de la conformation de la protéine ApoA1, qui permet de former une sphère. Les mécanismes exacts de la formation de la sphère ne sont pas encore connus, ni les résidus importants pour ce changement de conformation<sup>70</sup>.

Un modèle propose que la protéine ait la même conformation en double ceinture qu'en nanodisques, sauf que les domaines N- et C-terminaux sont structurés en hélices et ne font pas partie de la double ceinture. Ce modèle a été obtenu par dynamique moléculaire, où 160 lipides POPC sont entourés par deux apolipoprotéines A1. Après ajout de 60 molécules cholestérol ester, les protéines apolipoprotéine A1 garde la même conformation en double ceinture.<sup>71</sup>

Lorsque plus d'apolipoprotéines A1 sont recrutées dans les particules HDL, les apolipoprotéines A1 gardent une conformation en double ceinture et forment une structure en trèfle<sup>70</sup>(Figure I-15).

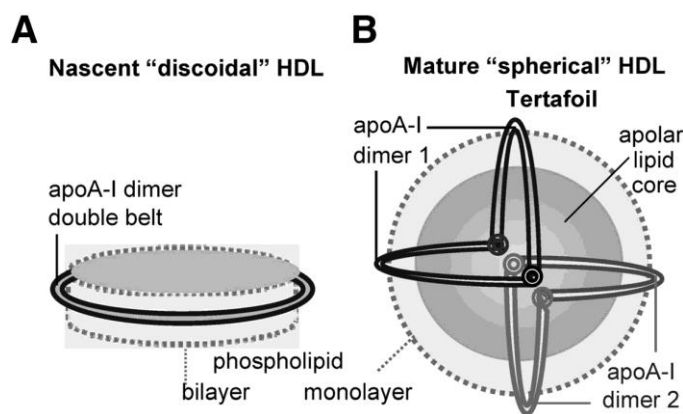


Figure I-15 : Représentation des différentes conformations de la protéine Apolipoprotéine A1 en présence de lipides A. Représentation des particules HDL discoïdales, B. Représentation d'une particule sphérique HDL.

La plus grande partie des nanodisques, que ce soit en molarité ou en masse, est composée de lipide. Par exemple, pour les nanodisques formés avec des lipides POPC et la protéine MSP1, la quantité de lipides présent est de 120 molécules de POPC pour 2

molécules de protéine MSP1. Les lipides représentent donc environ 2/3 de la masse et 98% de la molarité sont dus aux lipides. Il est possible de choisir la composition lipidique des nanodisques. Cette grande variété de composition permet de choisir les lipides nécessaires à la bonne stabilité d'une protéine membranaire <sup>72</sup>.

D'autres travaux mentionnent que les lipides présents dans les nanodisques ont une organisation différente de ceux présents dans les liposomes, les lipides étant plus resserrés dans les nanodisques. Des modélisations moléculaires et des expériences de RPE sur les têtes polaires des lipides ont permis de confirmer l'arrangement plus compact à l'intérieur des nanodisques comparé aux liposomes <sup>73, 74</sup>.

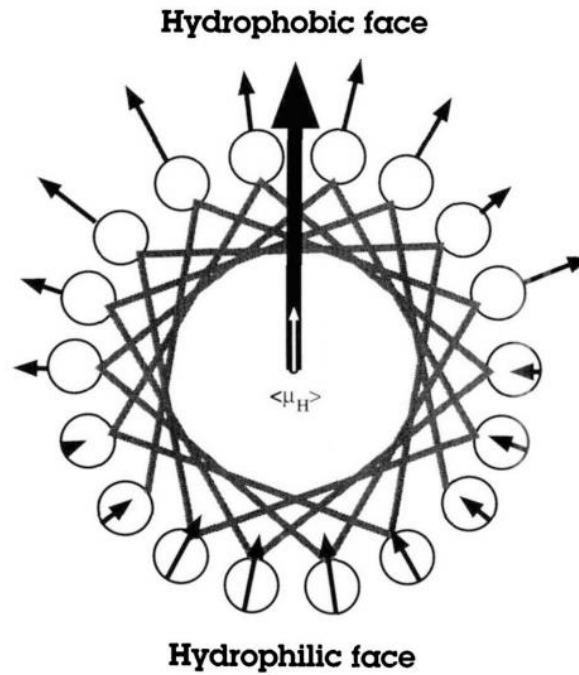
### **1.2.3. Méthodes alternatives utilisées pour former des nanodisques**

De manière plus générale, de nombreuses études ont été publiées montrant la formation de nanodisques à partir d'autres types de molécules : des protéines appartenant à la même famille que l'apolipoprotéine A1, des protéines qui possèdent des hélices amphipatiques, ou des molécules amphiphiles.

#### **2.3.a Les hélices amphipatiques (Importance des interactions lipides-protéines)**

Le rôle des hélices amphipatiques dans les interactions entre les protéines et les lipides a été mis en avant pour la première fois par Segrest<sup>75</sup>.

Afin de déterminer quelles sont les hélices alpha amphipathiques, une méthode biophysique a été utilisée. Le critère utilisé est le moment hydrophobe. C'est la somme des vecteurs pour chaque résidu dont l'amplitude correspond à l'hydrophobicité du résidu, et la direction est perpendiculaire à l'axe de l'hélice. (Figure I-16)



*Figure I-16 : Représentation hélicoïdale d'une hélice alpha amphipathic, les cercles représentent les résidus des acides aminés, et les flèches noires qui partent des cercles représentent les moments hydrophobes des résidus. La flèche partant du centre de l'hélice correspond à la moyenne des moments hydrophobe de l'hélice.*

Les caractéristiques de ces hélices ont été comparées et classé dans 7 classes, qui correspondent à différentes familles de protéines. La classe A est la classe des apolipoprotéines, la classe H correspond aux hormones polypeptidiques, la classe L correspond aux polypeptides lytique, la classe G correspond aux hélices alpha amphipatiques présente dans les protéines globulaire, la classe K aux protéines kinases régulé par la calmoduline, la classe C aux protéines associés en coiled-coil et enfin la classe M correspond aux domaines transmembranaires de protéines membranaires.

**TABLE I. Average Properties of Seven Different Classes of Amphipathic Helices\***

Property	Classes						
	A (Apolipo- proteins)	H (Poly- peptide hormones)	L ("Lytic" poly- peptides)	G (Globular proteins)	K (Calmodulin- regulated protein kinases)	C (Coiled- coil proteins)	M (Transmem- brane proteins)
Mean hydrophobic moment per residue	0.42	0.54	0.37	0.13	0.38	0.22	0.12
Mean hydrophobicity per residue of nonpolar face	0.73	0.57	0.74	0.64	0.55	0.80	0.74
Mean charged residue density per 11mer of helix							
Positive	1.9	2.4	1.6	1.3	3.0	2.1	0.09
Lys/Arg ratio	2.0	0.8	30	5.7	0.8	1.3	0.6
Negative	2.0	0.5	0.4	1.3	0.2	2.5	0.25
Total	3.9	2.9	2.0	2.6	3.2	4.6	0.3
Mean $\pm$ charge ratio	0.9	4.8	4.0	1.1	15	0.8	0.4
Mean localization of charged residues by quadrant							
Nonpolar face							
Positive							
Polar face							
Nonpolar face							
Negative							
Polar face							
Mean angle subtended by polar face	$\geq 180$	$\leq 100$	$\leq 100$	$\geq 180$	$\geq 180$	$\geq 320$	$\leq 60$

*Tableau I-1 : Différentes classe d'hélices amphipatiques<sup>154</sup> Class A. 28 séquence d'hélice amphipathique ont été analysé, Class H. 12 séquence d'hélice amphipathique ont été analysé, Class L. 13 séquences d'hélice amphipathique ont été analysé Class G. 21 séquences d'hélices amphipathique ont été analysé. Class K. 6 séquence d'hélices amphipathique ont été analyses Class C. 9 séquences d'hélices amphipathique ont été analyses Class M. 59 séquences d'hélices amphipathique ont été analysés*

Sur ces hélices, le moment hydrophobe par résidu, qui est le moment hydrophobe totale de l'hélice divisé par le nombre total de résidu, et la moyenne des moments hydrophobe par résidu présent dans le coté non polaire des hélices amphipatiques ont été comparé. Les hélices de la classe A possèdent des caractéristiques structural spécifiques comparé aux hélices amphipatiques d'autres classes. Le coté hydrophiles des hélices de la face A présentent une organisation particulière, avec des résidus chargés positivement au centre et des résidus chargés négativement à l'interface entre le coté hydrophobe et le coté hydrophile.

Un peptide a été créé par l'équipe de Segrest, pour mimer une hélice amphipatique interagissant avec les lipides, possédant les caractéristiques de la classe A<sup>76</sup>. Ce peptide a permis de comparer les forces des interactions d'hélices  $\alpha$  avec différents types de liposomes, les petits liposomes unilamellaires, les gros liposomes unilamellaires, les liposomes unilamellaires géants. Le peptide 18A interagit très fortement avec toutes les tailles de liposomes, alors que le peptide qui correspond à l'hélice 10 de l'apolipoprotéine A1 n'interagit qu'avec les SUV<sup>77</sup>; des expériences de diffraction aux rayons X démontrent que le peptide se positionne de manière parallèle à la surface de la membrane <sup>78</sup>.

### **2.3.b Protéines utilisées pour la formation des nanodisques**

La protéine la plus utilisée pour faire des nanodisques est une construction dérivée de la protéine apolipoprotéine A1. Comme la partie N-terminale de l'apolipoprotéine A1 est impliquée dans la formation de fibre amyloïde et n'est pas nécessaire pour la formation de particules HDL discoïdales, les 43 premiers résidus ont été retirés. Cette construction a été renommée MSP1, pour Membrane Scaffold Protein. Pour avoir des nanodisques de taille plus importante, des constructions avec des répétitions des hélices 4,5 et 6 ont été développées et appelées MSP1E1 (répétition hélice 4), MSP1E2 (répétition hélice 4 et 5), et MSP1E3 (répétition hélice 4,5 et 6). Dans le cadre de ma thèse, j'ai utilisé les protéines MSP1 et MSP1E3.

Deux autres protéines peuvent être utilisées pour former des nanodisques, l'apolipoporphine 3, une protéine d'insecte venant des organismes *M. mori* et *B. sextat*<sup>79</sup>; et l'apolipoprotéine E humaine<sup>80</sup>. Ces protéines possèdent aussi des hélices amphipatiques qui leur permettent de s'associer aux lipides.

La protéine humaine apoE422K a servi avec succès pour étudier des protéines interagissant avec des nanodisques, ou pour incorporer des protéines membranaires<sup>81</sup>.

L'hélice amphipatique appelé 18A (cf partie II3a), a aussi été utilisée pour former des nanodisques <sup>82</sup>. Les disques formés par ces hélices amphipatiques ont une distribution de taille plus importante que les nanodisques formés à l'aide des apolipoprotéines.



### 2.3.c Nanodisques natifs formés directement à partir de membranes

Récemment, l'assemblage de nanodisques directement à partir de membranes a été décrit. Le Styrene-maleic acid (SMA) possède la propriété de pouvoir s'insérer dans une membrane et de la solubiliser en formant des disques d'une taille de 10nm, comprenant lipides et protéine membranaire, de manière relativement homogène<sup>83</sup>.

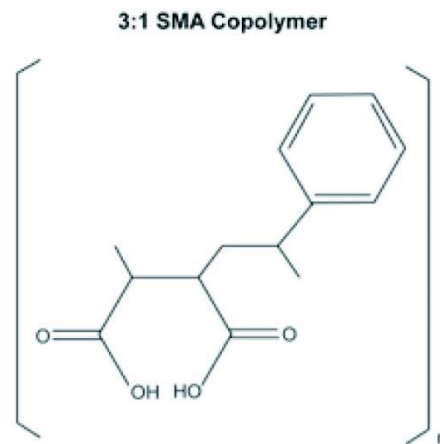


Figure I-17 : Représentation de la molécule SMA<sup>83</sup>

La possibilité de former des nanodisques à partir d'une membrane native est très intéressante pour pouvoir extraire des protéines membranaires qui sont sensibles à la présence de certains lipides pour leur stabilité. En effet, l'utilisation de détergent puissants peut provoquer la dissociation de lipides, induisant la dénaturation de la protéine. En utilisant cette méthode, un canal potassique a été extrait de membranes de *E.coli* et l'activité du canal a été observée<sup>83</sup>. Très récemment, un récepteur couplé aux protéines G a été extrait de membranes de levure (*Pichia pastoris*), purifié grâce à une étiquette histidine, et des caractérisations biophysiques (ultracentrifugation analytique, dichroïsme circulaire et test de stabilité grâce à la fixation d'un ligand) ont été réalisées sur la protéine purifiée<sup>84</sup>. Cet article met en exergue un avantage que possèdent les nanodisques natifs sur les nanodisques formés avec les protéines d'assemblages ; la stabilisation des nanodisques natifs est assurée par une molécule et non par une protéine. La protéine membranaire incorporée est la seule composante protéique, ce qui

permet la quantification de la protéine grâce aux méthodes de quantification traditionnelle (Absorbance à 280nm, dosage BCA).

Il n'y a pour l'instant que peu d'étude biophysiques réalisées à l'aide des nanodisques natifs, ce qui est probablement dû au fait que c'est une technique récente.

### **I.3. Utilisation des nanodisques pour l'étude de protéines membranaires**

#### **I.3.1. Méthodes de reconstitution**

Il existe plusieurs méthodes de reconstitution des protéines membranaires dans des nanodisques.

##### **3.1.a Assemblage direct**

La première méthode qui a été mise au point pour incorporer des protéines dans les nanodisques est appelée méthode d'assemblage directe. Cette méthode consiste à mélanger des protéines membranaires maintenues en solution avec des détergents avec des lipides préalablement solubilisés avec des détergents, et avec une protéine d'assemblage. Les détergents sont ensuite enlevés et conséquemment les lipides et les protéines d'assemblages vont former les nanodisques, incorporant au passage des protéines membranaires.

Le ratio entre les lipides, les protéines d'assemblage et les protéines membranaires doit être optimisé pour avoir la meilleure incorporation possible. Pour estimer le ratio optimal pour des nanodisques vides, la taille des différents nanodisques déterminée par SAXS et par DLS <sup>85</sup>, et le volume pris par un lipides sont des paramètres nécessaires pour calculer le nombre de lipides par nanodisques.

Il y a plusieurs façons d'enlever les détergents :

- par dialyse, les détergents se dialysent généralement difficilement, quand la concentration en détergents est supérieur à la concentration micellaire critique, la taille des micelles est trop importante pour passer à travers les membranes et par conséquent seulement les monomères passent à travers les membranes. Cependant certain détergents forment des micelles de petites tailles, ce qui les rends facilement dialysable. Par exemple, le cholate de sodium forme des micelles de 900 à 1200Da est peuvent donc être enlevés grâce à cette méthode.
- Avec l'aide de biobeads, qui sont des billes en polystyrène comportant des cavités hydrophobes qui interagissent avec la queue hydrophobe des détergents. En retirant les biobeads, les détergents sont enlevés de la solution. Les biobeads peuvent être utilisé avec le Triton-X 100, le cholate, le C12E8, l'octylglucoside et le DDM.
- Avec des cyclodextrines, qui sont des oligosaccharides cyclique en forme de cage qui piègent les détergents<sup>86</sup>. Il y a trois différentes cyclodextrines, la cyclodextrine  $\alpha$ , la cyclodextrine  $\beta$  et la cyclodextrine  $\gamma$  qui sont formés de 6, 7 ou 8 sous-unités de glucopyranose respectivement. Les cyclodextrines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  ont des affinités différentes pour les détergents<sup>87</sup>.

### 3.1.b Assemblage en synthèse *in vitro*

La surexpression de protéines membranaires, leur extraction des membranes et leur solubilisation ne sont parfois pas possibles dans les systèmes d'expression *in vivo* couramment utilisés. Dans ce cas, elles peuvent parfois être surexprimées dans des systèmes d'expression *in vitro*.

L'incorporation de protéines membranaires en nanodisques peut aussi se faire dans ce système d'expression, en ajoutant des nanodisques préformés dans le mélange réactionnel<sup>88,89,90,91</sup>.

### I.3.2. Etudes fonctionnelles

La capacité des nanodisques de maintenir en solution des protéines membranaires en fait un objet très pertinent pour étudier avec des méthodes biophysiques les protéines membranaires. Depuis la première incorporation d'une protéine membranaire dans les nanodisques en 1998 <sup>92</sup>, cette méthode a été utilisée pour répondre à de nombreuses questions biologiques (cf exemples répertoriés dans le Tableau 2).

Un des avantages majeurs des nanodisques est l'accès aux deux faces de la membrane, ce qui n'est pas toujours possible dans le cas d'une reconstitution en liposomes. A l'inverse, dans le cas de protéine membranaire transporteurs, l'absence d'une vésicule est problématique pour étudier l'activité de la protéine.

Un autre avantage est la possibilité de pouvoir contrôler le degré d'oligomérisation des protéines membranaires. En jouant sur les ratios protéine d'intérêt, lipides, et protéines d'assemblage, il est possible de former des nanodisques contenant différents états d'oligomérisation de la protéine d'intérêt. Cela a été fait par exemple avec un récepteur au glutamate, qui a besoin d'être dimérique pour fonctionner<sup>93</sup>. En augmentant la quantité de lipides et de protéines d'assemblage par rapport à la protéine d'intérêt, on favorise statistiquement l'incorporation d'une protéine par nanodisques. Il est ainsi possible de déterminer l'état d'oligomérisation de la conformation active de la protéine.

La majorité des études réalisées sur des protéines membranaires maintenues en solution par des nanodisques concerne des études fonctionnelles. Par exemple, l'activité ATPasique des ABC transporteurs est facilement mesurable avec la protéine incorporée dans des nanodisques. Les activités mesurables de protéines possédant un chromophore dont les caractéristiques spectrales varient en fonction du cycle catalytique sont aussi des modèles de choix pour l'étude de leur activité dans une membrane lipidiques. A l'inverse, l'étude de l'activité de protéine membranaire qui nécessite une cavité est impossible, à moins de pouvoir recréer une cavité en associant les nanodisques à un liposome, comme cela a été fait avec les protéines v-snare et t-snare. <sup>94</sup>

Différentes méthodes sont compatibles avec les nanodisques afin de réaliser des études d'interactions. La plus simple est l'utilisation de la chromatographie d'exclusion de taille avec la protéine incorporé et son partenaire. Cela a été utilisé pour montrer l'interaction

entre la protéine secY et Syd. La résonance plasmonique de surface est utilisable avec les nanodisques immobilisé sur une surface<sup>95,96</sup> ou avec les nanodisques comme partenaires<sup>97</sup>

Protéine	Assemblages	Types d'études	Année	Références
<b>GPCR</b>				
NK1R, ADRB2, DRD1	Expression in vitro Co expression MSP et protéines membranaires	Interaction avec ligands Spectroscopie par résonance paramagnétique électronique	2012	<sup>98</sup>
Green proteorhodopsin	Assemblage direct	Photodissociation Spectre	2011	<sup>99</sup>
u -opioid receptor	Assemblage direct	Test d'activité	2009	<sup>100</sup>
Rhodopsin	Assemblage direct	Interaction avec transducine	2007	<sup>101</sup>
Bacteriorhodopsin	Assemblage direct	Incorporation	2006	<sup>102</sup>
	Assemblage direct	Expérience de dépliage (Microscopie à Force Atomique)		<sup>103</sup>
<b>Transporteur ABC</b>				
ABCB1	Assemblage direct	Test d'activité Résonance plasmonique de surface	2011	<sup>95</sup>
	Assemblage direct	Test d'activité Importance de la composition lipidique Résonance plasmonique de surface	2011	<sup>8</sup>

MalFGK2	Assemblage direct	Test d'activité : ATPase Comparaison liposome/nanodisque Résonance paramagnétique électronique	2010	104
<b>Cytochrome</b>				
CYP5A1	Assemblage direct	Test d'interaction Expériences Redox	2014	105
Cytochrome c oxydase	Assemblage direct	Expériences Redox	2011	106
CYP3A4	Assemblage direct	Résonance plasmonique de surface	2009	107
cytochrome P450	Assemblage direct	Expériences Redox	2007	108
	-	Microscopie à force atomique	2002	109
<b>Autres protéines</b>				
Light-Harvesting complex II	Assemblage direct avec Beta cyclodextrine	Spectroscopie de fluorescence résolue en temps	2011	86
SecY		Interaction : chromatographie d'exclusion de taille, Gel natif	2008	110
Proteomique		Résonance plasmonique de surface Co-immunoprecipitation	2011	111
Proteomique	Assemblage direct		2013	112
Snare protein	Assemblage direct	Test d'activité	2012	94

ZipA-FtsZ	Assemblage direct	Interaction avec microscopie électronique	2012	<sup>113</sup>
Gamma-glutamyl carboxylase	Assemblage direct	Echange hydrogène/deutérium associé à la spectrométrie de masse	2010	<sup>114</sup>
glycolipid receptor GM1	Assemblage direct	Résonance plasmonique de surface	2008	<sup>115</sup>
Partial CD4	Assemblage direct	Résonance plasmonique de surface	2011	<sup>97</sup>
Pas de protéine	Assemblage direct	Etude d'interaction, résonance plasmonique de surface, microfluidique	2008	<sup>116</sup>
glycoprotein Ib-IX complex	Assemblage direct	Liaison aux ligands	2011	<sup>117</sup>

*Tableau I-2 : Différentes utilisations des nanodisques pour des études fonctionnelles et d'interaction des protéines membranaires*



### **I.3.3. Etudes structurales**

Des essais d'utilisation des nanodisques en biologie structurale ont été réalisés avec les trois méthodes principales à haute résolution que sont la résonance magnétique nucléaire, la cristallographie aux rayons X et la microscopie électronique.

Protéines	Techniques	Assemblage	Résolution	Année	Références
Microscopie électronique					
ZipA	Negative staining	Assemblage direct		2012	113
Anthrax toxin pore	Negative staining	Assemblage direct	22A	2010	118
anthrax toxin translocon	Cryo microscopie électronique	Assemblage direct	16A	2013	119
KcsA	Coloration négative	Assemblage direct		2014	120
Integrin $\alpha$ IIb $\beta$ 3	Coloration négative	Assemblage direct	20A	2013	121
Bax	Cryo EM	Assemblage direct	25-30A	2013	122
Nanodisques vides	Cryo-EM	Assemblage directe		2016	123
Résonance magnétique nucléaire					
VDAC-2	RMN en solution	Assemblage direct	Comparaison spectres	2012	124
Nanodisques vide	RMN en solution	Assemblage direct		2013	125
Nanodisques vides	RMN en solution	Assemblage direct		2010	126
Fragment de la protéine CD4	RMN en solution	Assemblage direct		2009	127
VDAC-1	RMN en solution	Assemblage direct		2009	128

BCL-XL	RMN en solution	Assemblage direct		2015	129
Nanodisques seuls	RMN du solide	Assemblage direct		2006	82
Cristallographie					
Nanodisques vide	Cristallogénèse	Assemblage direct	Cristaux		79
Spectroscopie de force atomique					
Bacteriorhodopsin		Assemblage direct		2012	103
SANS/SAXS					
Nanodisques vide	SANS/SAXS	Assemblage direct		2014	130
Bacteriorhodopsin	SANS/SAXS	Assemblage direct		2014	131
Nanodisque vide	SAXS	Assemblage direct		2015	132

*Tableau I-3 : Différentes utilisations des nanodisques pour des études fonctionnelles et d'interaction des protéines membranaires*

### 3.3.a Etudes à l'aide de la résonance magnétique nucléaire

Dans une étude de l'équipe de Hiller, les spectres RMN de la protéine membranaire VDAC-2 en détergent LDAO et en nanodisques sont parfaitement superposables (Figure I-18). Cela démontre la faisabilité d'étude de protéines membranaires en nanodisques par cette approche<sup>124</sup>.

Un des problèmes pour la résolution de structures par RMN est la taille des nanodisques qui vont entraîner un temps de relaxation important. Par conséquent, l'interprétation des spectres est difficile, à cause du chevauchement des tâches de corrélation.

Pour remédier à cela, différentes troncations de la protéine MSP1 ont été réalisées par deux équipes de manière simultanée, afin de réduire la taille des nanodisques<sup>133,125</sup>.

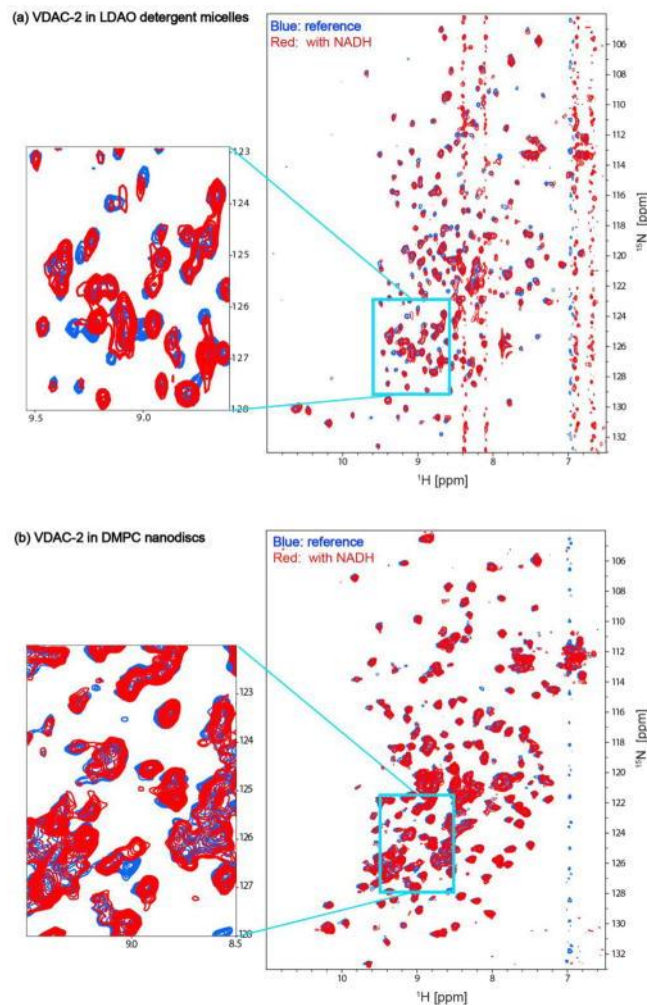


Figure I-18 : Comparaison de spectres entre la protéine VDAC-2 en LDAO et en nanodisques <sup>124</sup>

La stabilité des nanodisques formés avec les protéines d'assemblages tronquées est variable contribuant au fait que ces améliorations n'ont pas encore permis de résoudre une structure de protéine membranaire en nanodisques.

La RMN du solide pour le moment permet d'avoir des spectres de nanodisques vides mais aucune structure n'a été publiée<sup>82</sup>.

### **3.3.b Etudes structurales à l'aide de la cristallographie**

Obtenir une structure cristallographique d'une protéine membranaire incorporée dans des nanodisques représente un challenge audacieux.

Pour atteindre cet objectif avec la cristallisation en diffusion de vapeur, il faut résoudre de nombreux problèmes. Le premier est l'hétérogénéité des nanodisques. Les variations faibles de tailles des nanodisques sont un obstacle à la cristallisation. D'autre part, les rendements souvent faibles de la reconstitution en nanodisques sont aussi limitant. Enfin, la présence de la membrane lipidique peut entraîner aussi une dynamique de la protéine dans la membrane impropre à la cristallisation.

Les seuls cristaux de nanodisques sans protéine membranaire incorporée décrits dans la littérature<sup>79</sup> sont l'œuvre de l'équipe de Craig D Blanchette, qui après avoir montré l'existence de plusieurs tailles de nanodisques dans le pic d'une chromatographie d'exclusion de taille, a réussi à améliorer des cristaux après avoir fait une deuxième chromatographie. Cette équipe a montré une corrélation entre l'homogénéité des nanodisques et la qualité des cristaux obtenus.

Pour la méthode de cristallisation de protéines membranaires avec la phase cubique de lipides, l'équipe de V. Gordeliy (IBS, communication personnelle) a réussi à cristalliser la bactériorhodopsine à partir de protéine incorporée en nanodisques. Les nanodisques ayant incorporé la bactériorhodopsine sont mélangés avec les lipides en phase cubique, en utilisant le même protocole que pour les protéines en détergents. On peut supposer que les nanodisques permettent de sélectionner les protéines membranaires qui

peuvent correctement s'insérer dans la membrane lipidique et donc être correctement repliées. De ce fait, moins de protéines incorrectement repliées peuvent perturber le réseau cristallin.

### 3.3.c Etudes structurales à l'aide de la microscopie électronique

Cette méthode demeure celle ayant connu le plus de succès lors de la résolution de structures de protéines membranaires incorporées dans les nanodisques. Des structures de grands complexes incorporés dans des nanodisques ont été résolues grâce à cette méthode. La première structure résolue est celle de la porine de l'anthrax, avec des images prises en coloration négative<sup>118</sup>. Deux conformations du pore de l'anthrax ont pu être déterminées à une résolution de 22 Å. Une autre structure résolue, est le complexe Sec-YEG, avec des clichés pris en cryo-microscopie électronique (Figure I-19)<sup>134</sup>. La résolution obtenue est de 7,1 Å.

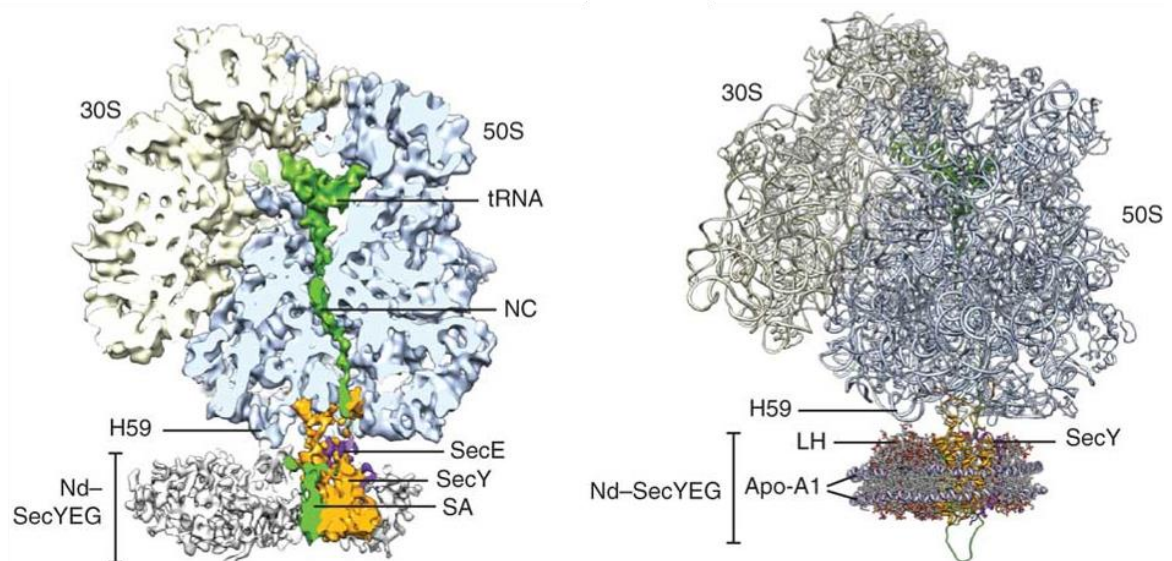


Figure I-19 : Reconstitution du complexe SecYE avec des images de Cryo-microscopie électronique.<sup>134</sup>

Grâce à la résolution de la structure en nanodisques, des interactions entre la membrane et le complexe SecYE ont été mis en évidence. Il est aussi intéressant de noter que les images de microscopie n'ont pas permis d'avoir une bonne résolution de la partie nanodisques à cause de leur hétérogénéité.

Le translocon est la seule structure obtenue de protéine membranaire incorporée dans des nanodisques à une résolution en dessous du nanomètre. Pour résoudre cette structure les particules ont été alignées grâce aux ribosomes, ce qui permet de s'affranchir du problème lié à l'hétérogénéité des nanodisques. A l'inverse, dans le cas de protéine membranaires qui ont un domaine transmembranaire de petite taille, il n'y a pas eu de structure résolu grâce aux nanodisques. Pour la protéine ZipA, des clichés de microscopie électronique ont été réalisés et une reconstruction a été réalisée. Une densité correspondant à la protéine ZipA est observable mais la structure n'est pas observable. De la même façon, la reconstruction de la protéine Bax permet de mettre en évidence la présence de la protéine dans les nanodisques mais ne permet pas de déterminer la structure de la protéine.

#### **I.4. Incorporation de protéine membranaires**

Pendant ma thèse, j'ai mis au point l'incorporation en nanodisques de nombreuses protéines membranaires avec des stratégies différentes et exploré leur utilisation pour des tests fonctionnels, des études d'interactions et des études structurales. Il s'agissait également de mieux appréhender la compréhension de l'incorporation en nanodisques de protéines ayant des caractéristiques différentes (masse molaire, taille des parties extramembranaires, structure secondaire des parties membranaires en hélices transmembranaires ou feuilletts beta,...) et l'utilisation de ces objets. Le tableau 3 résume l'ensemble des protéines étudiées. Par souci de clarté, seules certaines ont été détaillées dans les chapitres suivants.

<b>Protéines testées</b>	<b>Famille</b>	<b>Méthode d'incorporation</b>	<b>Lipides</b>	<b>Succès</b>	<b>Techniques</b>
<b>BmrA</b>	transporteur ABC	Assemblage direct	Extrait d' <i>E.coli</i>	Oui	HS-AFM, EM, Cryo-EM, Activité
<b>BmrCD</b>	transporteur ABC	Assemblage direct	Extrait d' <i>E.coli</i>	Oui	Incorporation
<b>BceAB</b>	transporteur ABC	Assemblage direct	Extrait d' <i>E.coli</i>	Oui	Activité
<b>CCR5</b>	GPCR	Assemblage direct	Extrait d' <i>E.Coli</i>	Non	
<b>hAAC1</b>	Transporteur mitochondriaux	In vitro, assemblage direct (avec mistic)	POPC, Extrait d' <i>E.coli</i> , mélange POPC, CL	Non	
<b>YedZ</b>	Homologue de NADPH oxydase	Assemblage direct	POPC	Oui	Titration hème, spectrométrie de masse Native, pontage chimique, SPR
<b>SpNox</b>	NADPH oxydase	Assemblage direct	POPC, Extrait d' <i>E.coli</i>	Oui	Activité, cristallographie
<b>PscC</b>	Système de sécretion bactérien type 3	In vitro	POPC	Oui	Microscopie électronique
<b>PopD/popB</b>	Système de sécretion bactérien type 3	In vitro	POPC	Oui	Microscopie électronique
<b>Kir</b>	Canal potassium	In vitro	POPC avec PIP2	Non	
<b>RodA</b>	Flipase	Assemblage direct	POPC	Oui	Incorporation
<b>5HT3A</b>	Récepteur cys-loop	Assemblage direct	Extraits d' <i>E.coli</i>	Oui	Microscopie électronique
<b>Fhua</b>	TonB récepteur	Assemblage direct	POPC	Oui	Incorporation

Tableau I-4 Récapitulatif de toutes les protéines étudiées avec les nanodisques. L'utilisation des protéines BmrCD et BceAB ont été faite en collaboration avec l'équipe de Jean-Michel Jault (IBCP) ; CCR5 et SpNox, respectivement Corinne Vivès et Jérôme Dupuy de l'équipe de Franck Fieschi (IBS) ; PscC, PopD/popB et RodA avec l'équipe d'Andréa Dessen (IBS), Kir6.2 avec l'équipe de Michel Vivaudou (IBS)



L'incorporation a été un succès pour la plupart des protéines testées. L'origine des protéines incorporées est variées, bactériens avec les protéines BmrA, BmrCD, BceAB, eucaryotes, et plus précisément humaine, avec les protéines AAC1, 5HT3A, et de plantes, avec la protéine NTT2. Les protéines ont un nombre d'hélices transmembranaires et des oligomérisations variables, par exemple 6 hélices transmembranaires prédites pour la protéine YedZ et la protéine 5HT3A possède 4 hélices transmembranaires et forme un pentamère, soit 20 hélices transmembranaires au total. La grande diversité de protéines incorporées, que ce soit pour leur taille ou leurs origines, démontre la versatilité de cette méthode nanodisque.

Les incorporations avaient un but soit de caractérisation de l'activité (SpNox, Kir), soit structural pour déterminer l'existence d'un complexe (YedZ) ou la structure d'une protéine (BmrA, SpNox, RodA).

## **II. Matériel et méthodes**

### **II.1. Formation des nanodisques**

#### **II.1.1. Expression des protéines d'assemblages MSP1 et MSP1E3D1 chez *E.coli***

Deux différentes protéines d'assemblage ont été utilisées, MSP1 et MSP1E3D1. La seconde diffère de la première par la présence de 3 hélices répétées. Les deux protéines ont été clonées avec une étiquette Histidine en N-terminal comportant un site de clivage de la protéase TEV.

Les séquences codantes pour les protéines MSP ont été clonées dans le vecteur pET28a. Le plasmide est transformé dans les bactéries BL21 (DE3) qui va permettre la sur-expression de la protéine.

Une pré-culture dans du milieu LB (Lysogeny Broth, Sigma) est utilisée pour inoculer un milieu de culture TB (Terrific Broth, Sigma) enrichi avec 50 µg/mL de kanamycine. Les milieux de culture sont incubés à 37 °C sous agitation jusqu'à atteindre une densité d'environ 1,2 puis l'expression protéique est induite avec une concentration finale de 1 mM d'IPTG pendant 4 h à 37 °C, sous agitation à 180 rpm (Incubateur Infors HT multitron pro).

Les cultures sont ensuite centrifugées à 16000 g pendant 20 minutes. Puis les culots bactériens sont lavés avec du tampon PBS (Phosphate buffered saline) et centrifugés de nouveau à 4000 g pendant 20 minutes. Les culots sont alors congelés et gardés à -20 °C.

#### **II.1.2. Purification par chromatographie d'affinité**

Les culots sont resuspendu dans un tampon de lyse (20 mM NaPi, pH 7,4, CLAPA 1X, 1 % (w/v) Triton X-100, lysozyme 0,2 mg/mL, DNaseI 0,2 mg/mL), puis les cellules sont lysées mécaniquement grâce à un microfluidizer (3 passage à 13000 psi, microfluidic M-110P) ou soumis aux ultrasons (2 secondes à 90% de puissance, 10 secondes de repos, 12 minutes au total, Branson digital sanifier). La solution est ensuite centrifugée à

257000 g pendant une heure à 4 °C pour récupérer uniquement le cytosol. Le surnageant est déposé sur une résine de nickel (His-trap, 5mL Quiagen), préalablement équilibrée avec le tampon A (40 mM TrisHCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 1% (w/v) Triton X-100). La résine est lavée successivement par le tampon précédent, puis par le tampon B (40 mM TrisHCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 50 mM NaCholate, 20mM imidazole), et C (40 mM TrisHCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 50mM imidazole) à raison de 25 mL de chaque tampon. Le cholate permet de d'enlever tous les lipides qui pourrait être associé aux apolipoprotéines. La protéine est éluée avec le tampon D (40 mM TrisHCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 300 mM imidazole)

Lorsqu'il est nécessaire de cliver l'étiquette Histidine de la protéine MSP, la protéase TEV est ajoutée à la fraction éluée de la colonne d'affinité, dans un ratio massique de 1TEV :10 MSP1. Le mélange est incubé toute la nuit dans le tampon TEV (50 mM TrisHCl, pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT), à température ambiante puis dialysé pendant 2 h dans 4 L de tampon A' (20 mM TrisHCl, pH 8.0, 150 mM NaCl). La protéine clivée est de nouveau chargée sur la résine NiNTA, et la résine est lavée avec 20 mL de tampon A'. Les fractions non retenues et celles issues des lavages, qui contiennent la protéine clivée, sont dialysées dans du tampon d'assemblage (20 mM TrisHCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA) pendant toute la nuit à température ambiante. La protéine est concentrée jusqu'à environ 1,5 à 2 mg/mL, par ultrafiltration (Vivaspin, 10kDa) Le dosage de la protéine est fait en mesurant l'absorbance à 280 nm. ( $M_w$  23329,3 Da ;  $\epsilon$  23950 L·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> ; NanoDrop 2000c Thermo scientific)

### **II.1.3. Assemblage de nanodisques vides**

La première étape consiste à préparer les lipides nécessaires à l'élaboration des nanodisques. Les lipides (Avanti Polar lipids) sont stockés dans du chloroforme et séchés sous flux d'azote. Les traces de chloroformes sont éliminées grâce à une incubation toute la nuit dans un dessiccateur sous vide. Les lipides sont ensuite solubilisés dans une solution TrisHCl pH 7,4, 100 mM NaCholate, puis agités et incubés 10 min à 37 °C sous agitation.

La protéine MSP1 est incubée en présence de lipides (1 MSP1 :30 POPC) pendant 1 h sur la glace, soit à une température proche de la température de transition de phase des lipides. Le détergent présent dans le tampon de solubilisation des lipides est enlevé en ajoutant des biobeads (Sigma), sous agitation pendant 2 h. Les biobeads sont des billes de polystyrène qui piègent les chaînes aliphatiques des détergents. Ils sont ajoutés en excès par rapport à la quantité de détergents<sup>135</sup>(650 mg/mL). La bonne formation des nanodisques est vérifiée par chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne Superdex 200 10/300 (GE Healthcare, avec Aktä purifier ou NGC chromatography system Biorad) dans le tampon SEC (10 mM Hepes pH 7,4; 150 mM NaCl).

#### **II.1.4. Caractérisation de la protéine MSP1**

Des expériences de calorimétrie différentielle à balayage ont été faites sur la protéine MSP1 seule et sur les nanodisques, avec et sans Mg et Ca (NanoDSC TA instrument). Les mesures ont été faites sur une gamme de température allant de 30 °C à 110 °C. La vitesse d'augmentation de la température est de 1°C par minute. Pour les expériences de diffusion de lumière, les échantillons sont chauffés à la vitesse de 2°C par minute, avec une gamme de température de 20°C à 100°C.

Pour déterminer l'état d'oligomérisation de la protéine, elle est diluée à une concentration d'environ 1 mg/mL et 300 µL sont injectés sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille superdex 10/300.

La fluorescence des tryptophanes lors de la dénaturation à l'urée a été suivie à 295 nm de longueur d'onde d'excitation et 340 nm de longueur d'onde d'émission, avec une variation croissante d'urée (Agilent technologies 1260 infinity).

#### **II.1.5. Assemblage de nanodisques à partir de membrane**

Des membranes internes de mitochondrie, qui ont été purifiées à partir de cœur de chamois par Vera Moiseeva (étudiante en thèse, équipe Pebay-Peyroula, IBS), sont mélangé avec la protéine MSP1, en absence de détergents. La protéine MSP1 est mise en excès par rapport à la quantité de lipides, ce qui favorise la formation de petits nanodisques et évite la formation d'agrégats. Après incubation pendant 3-4 h, les

nanodisques formés sont purifiés à l'aide d'un 1 mL de résine de Nickel. Les résines sont équilibrées avec 5 mL de tampon SEC. Les nanodisques sont passés sur la résine, et elle est lavée avec 5 mL de tampon SEC, 5 mL de tampon SEC avec 20mM imidazole. Les nanodisques sont élués avec 3 mL de tampon SEC avec 200 mM imidazole, puis sont injectés sur une colonne d'exclusion de taille de type Superdex 200.

## **II.2. Etude de BmrA**

### **II.2.1. Production de BmrA**

La protéine BmrA native et les deux mutants BmrA E504Q et T123C E428C sont exprimés et purifiés de la même manière.

Le plasmide comprenant la séquence codante de BmrA est transformé dans des cellules compétentes C43 (DE3). Les bactéries transformées sont étalées sur boîte de Pétri avec de l'ampicilline (100µg/mL) et incubées à 37 °C en incubateur à sec.

Une colonie fraîche est ensuite utilisée pour inoculer du milieu de culture 2TY (LB base 20 g/L, tryptone 6 g/L yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L) auquel est ajouté de l'ampicilline (100µg/mL). La culture est incubée pendant environ 20h à 25°C sous agitation (180 rpm). Lorsque la densité optique (600 nm) atteint 1-1,2, l'expression de la protéine est induite par l'ajout de 0,75 mM IPTG pendant 4 h à 25 °C sous agitation.

Les milieux de cultures sont centrifugés à 6200 g pendant 20 min. Les culots sont lavés dans du tampon PBS puis les solutions sont centrifugées une nouvelle fois et les culots conservés à -20 °C.

Pour préparer les membranes, les culots bactériens sont resuspendus dans du tampon RC (50 mM TrisHCl pH 8, 20 mL par culot correspondant à 1 L de culture), et sont lysés en utilisant un microfluidizer (2 passages à 1800 psi). Les bactéries non lysées et les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 15000 g pendant 30 min à 4 °C. Pour récupérer les fractions membranaires, le surnageant est centrifugé à 100000 g pendant 1 h à 4 °C. Les membranes sont resuspendues dans du tampon RM (20 mM TrisHCl pH 8, 300 mM sucrose), congelées avec de l'azote liquide et conservées à -80 °C.

La quantité totale de protéines membranaires est déterminée en utilisant le dosage par méthode BCA (BiCinchoninic acid Assay). Les liaisons peptidiques permettent la réduction du cuivre  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^{1+}$ . L'acide bicinchoninique réagit avec le  $\text{Cu}^{1+}$  et va former un complexe visible à 562nm. Cette méthode a été utilisée notamment parce qu'elle est compatible avec la présence de détergent dans la solution protéique.

Les membranes sont solubilisées en rajoutant du tampon S (50 mM TrisHCl pH 8, 100 mM NaCl, 10 mM imidazole, Clapa 1X, 1% (w/v) DDM (Anatrace Anagrade Grade). Après une incubation de 1 h à 4 °C sur une roue mécanique, une ultracentrifugation à 290000 g de 1 h à 4 °C est réalisée pour ne conserver que la protéine solubilisée.

Le surnageant est ensuite ajouté à 2 mL de résine de nickel qui a été équilibrée avec du tampon Eq (50 mM TrisHCl pH8, 100 mM NaCl, 10 mM imidazole, DDM 0,04%). La résine est placée à 4 °C sous agitation avec le surnageant pendant une heure puis le surnageant est enlevé. La résine est alors lavée avec 20 mL de tampon L (50 mM TrisHCl, 100 mM NaCl, 20 mM imidazole, DDM 0,04%, CLAPA 1X). La protéine est éluée avec le tampon EL (50 mM TrisHCl pH8, 100 mM NaCl, 100 mM imidazole, DDM 0,03%). Les fractions d'élutions sont concentrées par ultrafiltration (Amicon, 50000 Mw) puis dialysées dans 1 L de tampon F (50 mM TrisHCl pH8, 50 mM NaCl, DDM 0,02%) toute la nuit. La quantité de protéine BmrA est estimée avec un test BCA, et la protéine est congelée avec de l'azote liquide et conservée à -80 °C.

### **II.2.2. Assemblage des nanodisques avec BmrA**

La préparation des lipides (mélange de lipides extrait de *E.coli*) pour les nanodisques avec BmrA est identique à la description faite en II.1.3. Le mélange de protéine d'assemblage (MSP1E3D1), de lipides et de protéine BmrA est incubé à température ambiante pendant une heure. Les biobeads préalablement lavés à l'éthanol, puis à l'eau, sont ajoutées en excès (650 mg/mL). Après une incubation de 2 heures, les biobeads sont retirées.

Les nanodisques comprenant la protéine BmrA sont purifiés par une chromatographie d'affinité grâce à l'étiquette histidine de BmrA. Les nanodisques vides et ceux comprenant BmrA sont passés sur 3mL de résine NiNTA équilibrée avec le tampon SEC (20 mM Hepes pH7,4, 100 mM NaCl ). La résine est ensuite lavée avec 20 mL de tampon

SEC, puis 20 mL de tampon SEC contenant 50 mM d'imidazole. Les nanodisques sont ensuite élués avec 8 mL de tampon SEC contenant 300 mM d'imidazole et sont dialysés dans 4 L de tampon SEC pendant toute la nuit. Après concentration par ultrafiltration (vivaspin, 30000 Mw), une chromatographie d'exclusion (colonne Superdex 200 10/300) est réalisée pour éliminer les agrégats et vérifier l'intégrité des nanodisques.

L'incorporation en nanodisques des protéines BmrA mutantes, T123C/E428C et E504Q, est réalisée exactement de la même manière.

### II.2.3. Test d'activité

L'activité ATPasique de la protéine BmrA est mesurée en utilisant une réaction couplée. L'ADP est utilisé par la pyruvate kinase (PK) pour transformer le phosphoénolpyruvate (PEP) en pyruvate. Le pyruvate est ensuite transformé en lactate par l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH). L'activité enzymatique de l'enzyme LDH est suivie en mesurant l'absorbance à 340 nm correspondant à la déprotonation du cofacteur NADH. Le NADH a un maximum d'absorbance à 340 nm, et le NAD<sup>+</sup> a un maximum d'absorbance à 260 nm. Pour suivre l'activité ATPasique de la protéine BmrA, on suit la décroissance de l'absorbance du NADH à 340 nm.

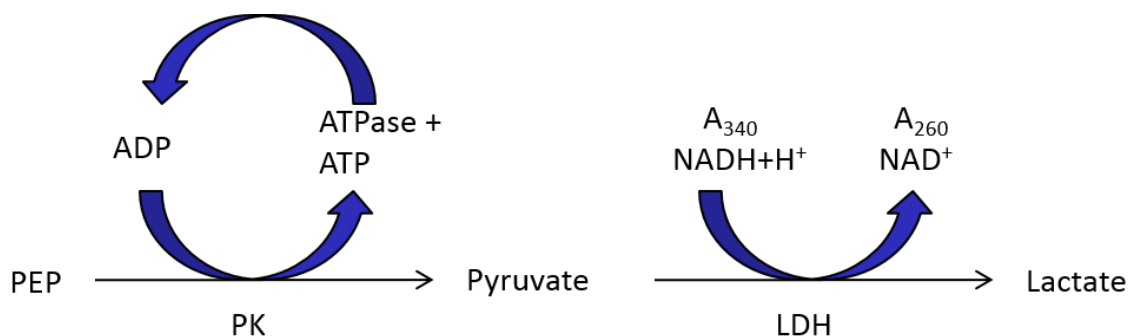


Tableau II-1 : Réaction de la transformation du PEP en pyruvate couplée avec la réaction de la transformation du pyruvate en lactate

Pour la protéine solubilisée en DDM, le mélange réactionnel comprend : 50 mM Tris HCl pH 8, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycérol, 5 mM Beta mercaptoethanol, 32 µg/mL LDH, 60 µg/mL PK, 4 mM PEP, 0,4 mM NADH, 4 mM ATP, 0,02% DDM. Pour l'activité de

BmrA incorporé dans les nanodisques, le mélange réactionnel est le même mais ne comprend pas de DDM. Il s'ensuit une incubation de 5 min à 37 °C.

Dans la cuve d'absorbance de 1 mL, 500 µL du mélange réactionnel précédent est mélangé avec environ de 10 à 20 µg de protéine dans 100 µL. L'absorbance à 340 nm est mesurée pendant 10 min.

La vitesse initiale la réaction correspondant à la disparition du NADH permet de déterminer l'activité ATPasique de la protéine BmrA.

#### **II.2.4. Microscopie électronique**

La microscopie électronique a été faite en collaboration avec Wai Li Ling et Guy Schoehn à l'IBS. L'homogénéité des échantillons est vérifiée en coloration négative, avec le colorant sodium silicotungstate (SST). Les grilles sont observées sur le microscope Tecnai12 avec la caméra Orius 1000 GATAN. Les images en cryo-microscopie sont prises avec le microscope FEI Tecnai Polara.

### **II.3. Etude de YedZ**

#### **II.3.1. Purification de YedZ**

La purification de la protéine est réalisée à partir de préparation de membranes issues de cultures de BL21 sur-exprimant YedZ, protéine fusionnée à une étiquette Histidine en C-terminal. Les membranes sont préparées par Céline Jullian-Binard, technicienne de l'équipe.

La quantité de protéines totales contenue dans les membranes est dosée en utilisant la technique BCA (bicinchoninic acid assay). Les membranes sont alors diluées à 2 mg/mL avec du tampon A1 (TrisHCl 50mM pH8), incubées à 4 °C durant 30 min, puis solubilisées en ajoutant du Cymal-5 (Anatrace), pour atteindre une concentration de 22,4 mM (20 mM au-dessus de la cmc).



Les membranes solubilisées sont centrifugées à 257000g, à 4 °C pendant 30 min. Le surnageant est récupéré et concentré par ultrafiltration (Amicon MWCO 30 kDa) jusqu'à un volume de 5 mL. De l'imidazole et des sels sont alors ajoutés (5 mL de tampon TrisHCl 50 mM, 15 mM imidazole, 150mM NaCl) dans la solution pour éviter les interactions non spécifiques avec la résine.

L'échantillon protéique est passé sur 2 mL de résine NiNTA qui a été équilibrée avec du tampon 50 mM TrisHCl, 15mM imidazole, 150mM NaCl. La résine est lavée avec 20mL de tampon 1 (50mM TrisHCl pH8, 150mM NaCl, 15mM imidazole, 4mM Cymal 5), puis avec 20mL de tampon 2 (50mM TrisHCl pH 8, 300mM NaCl, 15mM imidazole, 4mM Cymal 5), avec 20mL de tampon 3 (50mM TrisHCl pH 8, 150mM NaCl, 40mM imidazole, 4mM Cymal 5). La protéine est élué avec 10mL de tampon 4 (50mM TrisHCl pH 8, 150mM NaCl, 300mM imidazole, 4mM Cymal 5). L'élution est passée sur chromatographie d'exclusion (Superdex 200 10/300 GL) avec le tampon (50mM TrisHCl pH 8, 150mM NaCl, 4mM Cymal 5) à 4 °C et le pic correspondant à la protéine est récupéré et concentré par ultrafiltration (Amicon Ultra 50 Mw).

Une autre construction a été utilisée, avec YedZ possédant une étiquette histidine en C-terminale, fusionné avec la GFP (Green Fluorescent Protein). Une séquence de clivage avec la TEV protéase est présente entre l'étiquette histidine et la GFP. Cette protéine a été purifiée par Céline Jullian Binard.

### **II.3.2. Assemblage des nanodisques contenant YedZ**

#### **3.2.a Reconstitution de la protéine YedZ en Nanodisques**

La reconstitution de la protéine YedZ est faite dans des nanodisques composés de lipides POPC (Avanti polar lipids). La reconstitution est réalisée comme décrit au paragraphe II.1.3., le ratio molaire de protéine YedZ, MSP1 et POPC est de 0,18/1/35. Après que le détergent ait été adsorbé par les biobeads, on obtient une solution avec des nanodisques vides et des nanodisques ayant incorporés la protéine YedZ.

La purification des nanodisques est faite avec 4 mL de résine NiNTA. La résine est équilibrée avec 2 volumes de colonne de tampon SEC (20 mM Hepes pH7,4, 100 mM

NaCl). La solution comprenant les nanodisques est passée trois fois par gravité sur la résine. La résine est ensuite lavée avec 5 volume de colonne respectivement avec du tampon SEC, et du tampon SEC avec 50 mM imidazole. Ces étapes permettent de se débarrasser des nanodisques vides. Les nanodisques qui ont incorporé la protéine YedZ sont élués avec un tampon SEC avec 150 mM imidazole, avec un volume correspondant à trois fois le volume de la résine. L'intégrité des nanodisques est vérifiée à l'aide d'une étape de chromatographie par exclusion de taille, soit Superdex 200 10/300, soit Superdex 200 16/60.

### 3.2.b Vérification de l'incorporation de la protéine YedZ

La bonne incorporation de la protéine YedZ est vérifiée grâce aux volumes d'élution obtenus par chromatographie d'exclusion de taille et par gels SDS PAGE, colorés avec du bleu de Coomassie. Pour les fractions correspondant à la taille des nanodisques par chromatographie d'exclusion de taille, la présence conjointe d'une bande ayant la masse apparente de la protéine MSP1 et d'une bande ayant la masse apparente de la protéine YedZ est une bonne indication de son incorporation. Un autre moyen a été l'utilisation de la spectrométrie de masse, en collaboration avec Luca Signor (plateforme IBS). La spectrométrie de couche ultramince (ultra thin layer spectrometry) a été la méthode employée<sup>136</sup>.

#### Résumé des techniques utilisées en collaborations

Technique	Facilités
Spectrometrie de masse	Plateforme IBS, Luca Signor
Microscopie électronique	Plateforme IBS, Daphna Fenel, Wai-Li Ling
Cryo-Microscopie électronique	Wai-Li Ling, équipe Guy Schoehn, IBS
Spectrometrie de masse native	Elisabetta Boeri Erba, IBS
Résonance Plasmonique de surface	Accès à la platerforme IBS, Nicole Thielens

Cristallogénèse à diffusion de vapeur	Plateforme HTX-Lab, EMBL
Cristallogénèse à phase cubique	Vitaly Polivenkin, équipe Valentin Gordely, IBS
Microscopie à force atomique	Pierre-Emmanuelle Millhet, CBS, montpellier

Tableau II-2 : Listes de techniques utilisées en collaboration ou avec des plateformes

Tampon	Composition
PBS	137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,76mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Tampon SEC	20mM Hepes pH 7,4, 100mM NaCl
Purification de protéines d'assemblages	
Tampon de lyse	20 mM NaPi, pH 7,4, CLAPA 1X, 1 % (w/v) Triton X-100, lysozyme 0,2 mg/mL, DNaseI 0,2 mg/mL
Tampon A	40 mM TrisHCl, pH 8, 300 mM NaCl, 1% (w/v) Triton X-100
Tampon B	40 mM TrisHCl, pH 8, 300 mM NaCl, 50 mM NaCholate, 20mM imidazole
Tampon C	40 mM TrisHCl, pH 8, 300 mM NaCl, 50mM imidazole
Tampon D	40 mM TrisHCl, pH 8, 300 mM NaCl, 300 mM imidazole
Tampon A'	20 mM TrisHCl, pH 8, 150 mM NaCl
Tampon B'	
Tampon TEV	50 mM TrisHCl, pH 8, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT
Tampon d'assemblage	20 mM TrisHCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA
Purification de la protéine YedZ	
Tampon A1	TrisHCl 50mM pH8
Tampon 1	50mM TrisHCl pH8, 150mM NaCl, 15mM imidazole, 4mM Cymal 5
Tampon 2	50mM TrisHCl pH8, 300mM NaCl, 15mM imidazole, 4mM Cymal 5
Tampon 3	50mM TrisHCl pH8, 150mM NaCl, 40mM imidazole, 4mM Cymal 5
Tampon 4	50mM TrisHCl pH 8, 150mM NaCl, 300mM imidazole, 4mM Cymal 5
Tampon GF	50mM TrisHCl pH 8, 150mM NaCl, 4mM Cymal 5

---

Purification de la protéine BmrA	
Tampon RC	50 mM TrisHCl pH 8
Tampon RM	20 mM TrisHCl pH 8, 300 mM sucrose
Tampon S	50 mM TrisHCl pH 8, 100 mM NaCl, 10 mM imidazole, Clapa 1X, 1% (w/v) DDM
Tampon Eq	50 mM TrisHCl pH8, 100 mM NaCl, 10 mM imidazole, DDM 0,04%
Tampon L	50 mM TrisHCl pH8, 100 mM NaCl, 20 mM imidazole, DDM 0,04%, CLAPA 1X
Tampon EL	50 mM TrisHCl pH8, 100 mM NaCl, 100 mM imidazole, DDM 0,03%
Tampon F	50 mM TrisHCl pH8, 50 mM NaCl, DDM 0,02%

---

*Tableau II-3 : Liste des tampons utilisés*

# RESULTATS

## III. Méthodologie des nanodisques

### III.1. Introduction

Les nanodisques ont été mis au point par l'équipe de Sligar pour permettre de garder les protéines membranaires en solution mais dans un environnement lipidique. L'idée de base était d'entourer la protéine d'un anneau de lipides, et de ceinturer cet ensemble par une protéine. La protéine la plus utilisée qui permet de faire ces nanodisques est une protéine dérivée de l'apolipoprotéine A1 qui naturellement forme des nanodisques pour le transport de cholestérol, appelés particules HDL. Comme la partie N-terminale de la protéine est impliquée dans la formation de fibre amyloïde et qu'elle est non structurée, les 43 premiers résidus ont été supprimés, et la protéine renommée MSP1 (Membrane Scaffold Protein).

Le mécanisme même de formation de ces particules discoïdales, et des particules HDL reste toutefois inconnu, et peu d'études ont été faites sur la stabilité de la protéine d'assemblage seule et des nanodisques. Or la compréhension des mécanismes de formation des nanodisques serait importante pour, par exemple, améliorer les rendements de formation et la stabilité de ces assemblages.

Au cours de mon travail, j'ai utilisé deux protéines d'assemblage, les protéines MSP1 et MSP1E3D1 (voir introduction II3b).

## III.2. Etude de la protéine MSP1: optimisation de l'assemblage des nanodisques

### III.2.1. Purification de la protéine MSP1 et caractérisation de son état oligomérique

La purification de la protéine a été réalisée comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes. À partir de 1 L de culture, 15 mg de protéine (MSP1 ou MSP1E3D1) purifiée peuvent être obtenus.

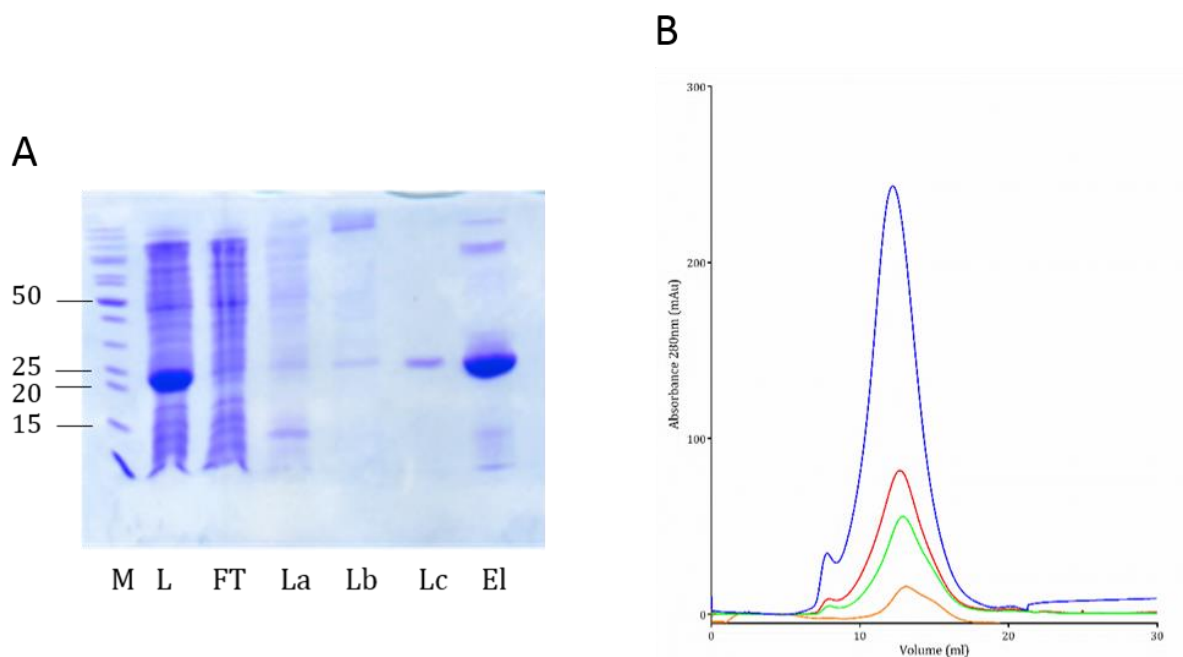


Figure III-1 : Purification de la protéine MSP1 A. Gel SDS PAGE coloré en bleu de Coomassie de la purification de la protéine His-MSP1. Les masses moléculaires sont en kDa. De gauche à droite, M correspond au marqueur de masse moléculaire, L correspond au lysat après sonication, FT correspond à la fraction non retenue par la résine NiNTA, La correspond au lavage de la résine avec le tampon A, Lb avec le tampon B et Lc avec le tampon C. El est la fraction d'élution. 20 $\mu$ l de chaque échantillon ont été déposés. B. Chromatographie d'exclusion de taille de la protéine MSP1 après purification avec la résine NiNTA à différentes concentrations, en orange 1mg/mL, en vert, 2mg/mL, en rouge 3mg/mL et en bleu 6,9mg/mL.

Le gel SDS PAGE présenté en Figure III-1, permet de suivre la purification sur colonne Ni-NTA. La protéine d'intérêt correspond à la bande entre 20 et 25 kDa. Ce gel montre que les lavages (Figure III-1, puits La, Lb, Lc) permettent d'éliminer des contaminants. L'imidazole contenu dans les tampons B et C enlève les protéines qui sont fixées de façon non spécifique. La protéine est éluée avec 300mM d'imidazole (Figure III-1, puit El).

Après clivage de l'étiquette histidine avec la protéase TEV, une autre étape avec la résine NiNTA est effectuée. La fraction non retenue et le lavage de la résine sont mélangés et la protéine obtenue est pure.

Le profil d'élution de la protéine sur chromatographie d'exclusion de taille de la protéine MSP1 à une concentration de 6,9 mg (Figure III-1 B, courbe bleue) comporte un pic principal à 12,2 mL. Lorsque la protéine est moins concentrée, le volume d'élution augmente, et à partir de 3 mg/mL, un épaulement est visible à un volume d'élution de 15 mL (Figure III-1 B, courbe rouge). Cette diminution du volume d'élution de la protéine MSP1 indique un changement de l'état d'oligomérisation de la protéine en fonction de sa concentration, comme cela a été décrit dans des travaux précédents pour la protéine apolipoprotéine A1 précédente.

### **III.2.2. Interaction des protéines d'assemblage avec les métaux**

Une interaction des protéines d'assemblage avec des cations divalents a été suspectée. Lors des expériences de formation de nanodisques à partir des membranes de mitochondries (voir partie III3), un contrôle consistait à repasser la protéine MSP1 à travers une résine NiNTA et ensuite effectuer une chromatographie d'exclusion de taille à la protéine élué. De manière surprenante, le volume d'élution de la protéine MSP1 repurifié était différent de celui de la protéine initiale. Afin de comprendre d'où venait la modification de la taille apparente de la protéine d'assemblage, la protéine a été incubée en utilisant les conditions du tampon final, sans qu'il y ait de changement sur le profil de chromatographie.

Une des hypothèses était que la protéine pendant son passage sur la résine NiNTA interagissait avec le nickel libre. Pour vérifier cette hypothèse, une expérience de chromatographie d'exclusion de taille avec la protéine incubée avec différents métaux a été réalisée.

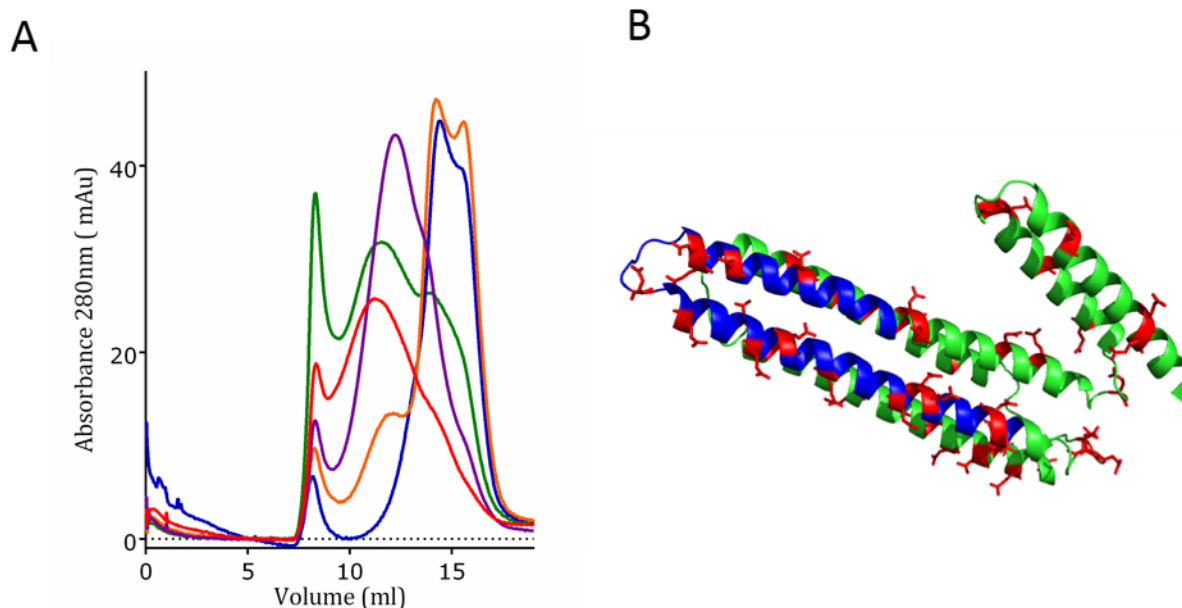


Figure III-2 : Effet des cations divalents sur l'oligomérisation de MSP1 A Chromatographie d'exclusion de taille de la protéine d'assemblage MSP1 incubée avec différents cations divalents, en bleu la protéine seule, en orange avec 2mM MgCl<sub>2</sub>, en violet avec 2mM CaCl<sub>2</sub>, en rouge avec 2mM NiCl<sub>2</sub>, en vert avec 2mM CuCl<sub>2</sub> B. Structure par RMN de la protéine Apolipoprotéine A1 de la souris (code PDB : 2LEM) En rouge, les résidus chargés négativement, en bleu les hélices 4,5 et 6 de la protéine (cf partie I.2.1.b.)

L'incubation de la protéine MSP1 avec des métaux induit un changement dans le profil d'élution de MSP1, des formes oligomériques de plus hauts poids moléculaires apparaissent pour tous les métaux testés (Figure III-2 A).

Des expériences de chromatographie d'exclusion de taille avec la protéine MSP1 incubée avec du calcium et du magnésium ont été reproduites. Afin de contrôler la composition des tampons en métaux, la résine Chelex a été utilisée. Cette résine permet d'éliminer toutes traces de métaux en formant des complexes avec les métaux. L'augmentation de la concentration de la protéine favorisant l'oligomérisation de la protéine, j'ai travaillé avec de faibles concentrations en protéines (autour de 1 mg/mL) afin de voir principalement l'effet des métaux.



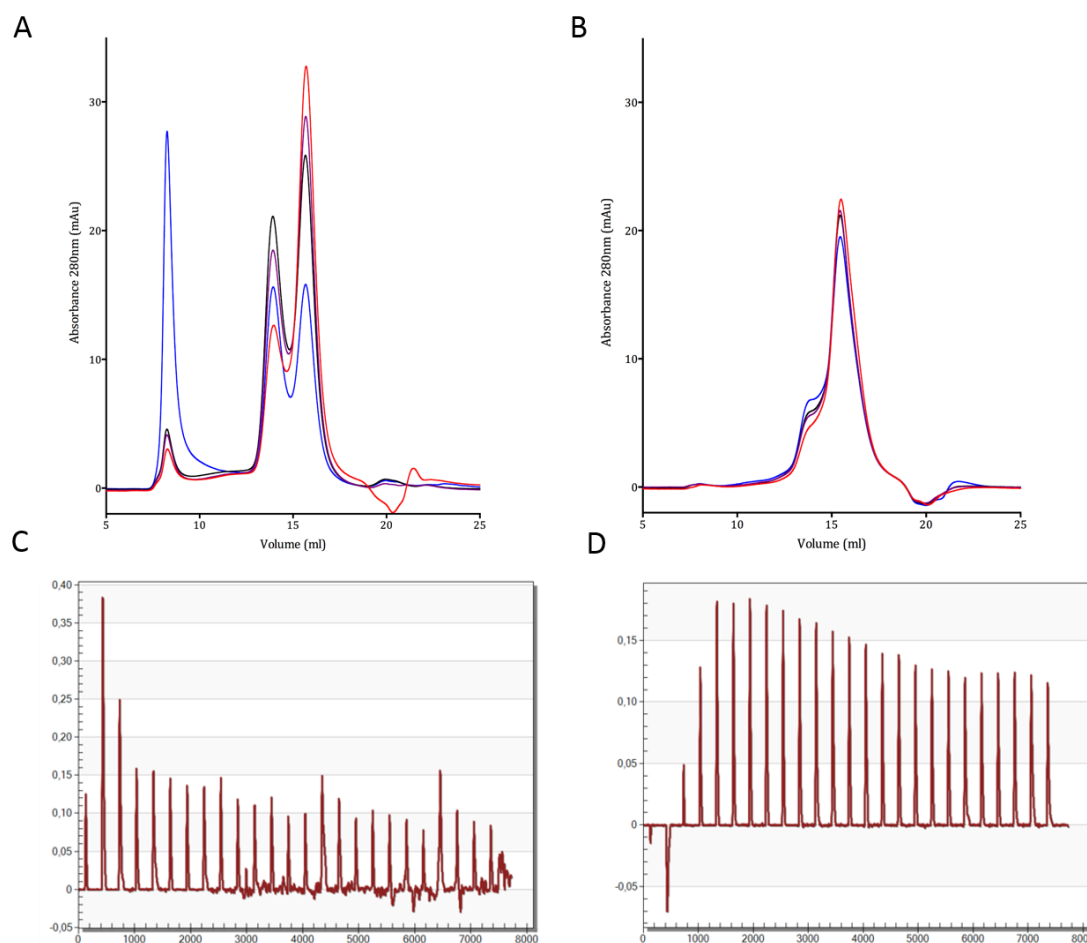


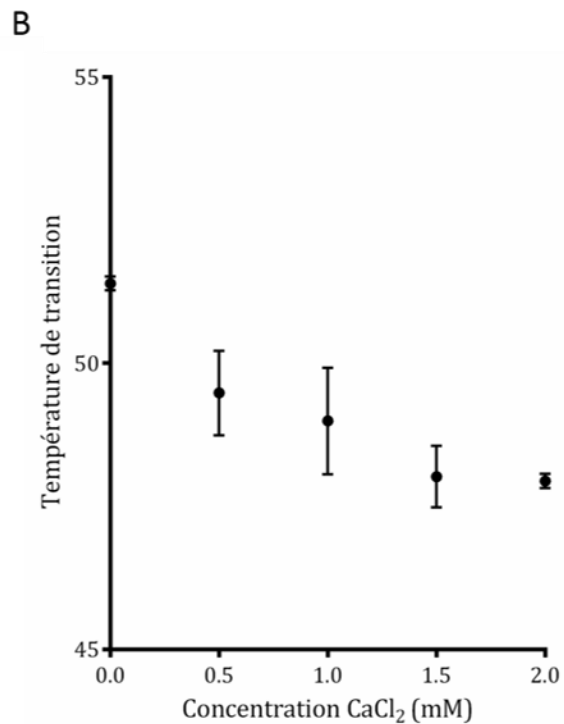
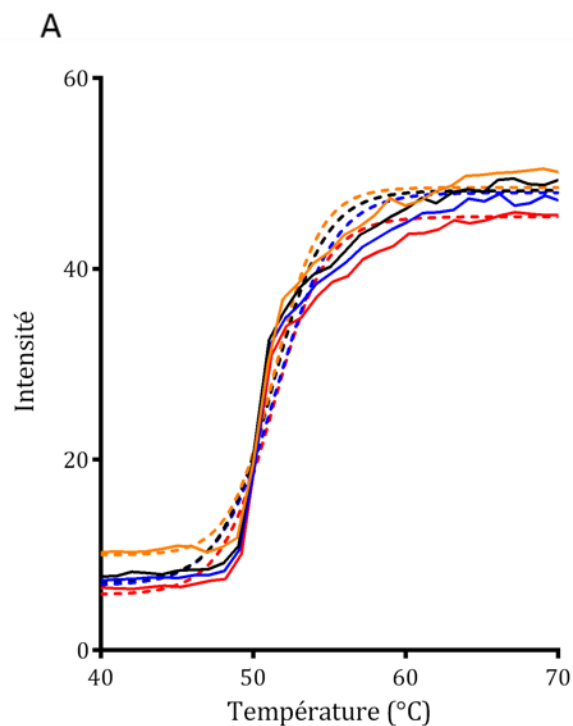
Figure III-3 : Interaction et effet du magnésium et du calcium sur la protéine MSP1 A Chromatographie d'exclusion de taille Superdex 200 10/300 de la protéine MSP1 (1mg/mL), en rouge la protéine MSP1 seule, en violet avec 100 $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, en noir avec 1mM CaCl<sub>2</sub>, en bleu avec 10mM CaCl<sub>2</sub>. B Chromatographie d'exclusion de taille Superdex 200 10/300 de la protéine MSP1 (0.8 mg/mL), en rouge la protéine MSP1 seule, en violet avec 100 $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>, en noir avec 1mM MgCl<sub>2</sub>, en bleu avec 10mM MgCl<sub>2</sub> C Calorimétrie de titration isotherme MSP1 (30 $\mu$ M) avec ajout de 300 $\mu$ M chlorure de calcium, D Calorimétrie de titration isotherme MSP1 (30 $\mu$ M) ajout de 300 $\mu$ M chlorure de magnésium

Deux espèces sont observées en chromatographie d'exclusion de taille (Figure III 3 A). Une forme dimérique qui est éluée à 15,7 mL (soit une masse molaire d'environ 42 kDa) et une forme oligomérique qui est éluée à 14 mL (soit une masse molaire d'environ 98 kDa, ce qui correspondrait à un dimère de dimère). Dans le cas du calcium, avec une concentration croissante de calcium, une diminution de l'espèce éluée à 15,7mL et une augmentation de l'espèce à 14mL est observée. À 100  $\mu$ M de concentration en ions, un effet est visible pour le calcium alors qu'il n'y a pas de changement avec le magnésium. Un effet est observé pour le calcium et pas pour le magnésium. A concentration élevée de calcium, le pic correspondant aux agrégats devient majoritaire.

Dans un deuxième temps, des expériences de titration calorimétrique isotherme ont été utilisées pour caractériser les interactions (Figure III-3 C et D). Dans le cas du calcium,

un dégagement de chaleur est observé après injection, qui décroît très rapidement. L'absence de stabilisation de la chaleur mesurée peut être due à une précipitation de la protéine. Pour le magnésium, une absorption de chaleur est observée. Les résultats confirment qu'il y a une interaction entre la protéine et les ions divalents. À ce stade, il n'est pas certain que le magnésium ou le calcium se fixe directement sur la protéine. Il est possible qu'il y ait une compétition entre un autre ion qui se fixe avec la protéine et le calcium ou le magnésium. Cependant, les chromatographies d'exclusion de taille mettent en évidence un effet des ions sur l'oligomérisation de MSP1, et principalement un effet du calcium (Figure III-3 A et B). De plus, afin d'identifier les sites de fixation potentiels des cations divalents, les acides aminés chargés négativement, aspartates et glutamates, ont été représentés en rouge sur la structure de la protéine Apolipoprotéine A1 (Figure III-2 B). La présence de nombreux pseudo-site de fixation du calcium est en faveur d'une interaction de ce métal.

Une autre expérience a été de mesurer la diffusion de la lumière à 500 nm par les solutions de MSP1 et MSP1E3D1, avec ou sans magnésium ou calcium, en fonction de la température. L'objectif de cette expérience était de suivre l'apparition de particules qui correspondraient à des agrégats ou à une forme oligomérique de plus haut poids moléculaire. Le principe de l'expérience est d'observer la turbidité de la solution éclairée avec une source à 500nm en suivant la lumière diffusée, dans un fluorimètre. L'observation à 90° de l'onde incidente va permettre de s'affranchir du signal correspondant à l'onde transmise. L'intensité observée découle directement de la diffusion par les particules en solution<sup>137</sup>.



Concentration Calcium (en mM)	en	Valeurs du point d'inflexion (en °C)	R <sup>2</sup> de la courbe d'ajustement
0		51,4	0,9941
		51,3	0,910
		51,6	0,9870
		51,3	0,9912
0,5		48,6	0,9872
		50,0	0,9909
		49,8	0,9916
1		48,6	0,9904
		48,3	0,9901
		50,1	0,9822
1,5		47,7	0,9859
		48,5	0,9860
		47,4	0,9921
		48,4	0,9871
2		47,9	0,9852
		48,0	0,9878

*Figure III-4 : Effet du calcium sur MSP1E3D1 A Mesure de la turbidité de la solution à 500nm à l'aide d'un fluorimètre ( $\lambda_{ex}$  500nm,  $\lambda_{em}$  500nm) de la protéine MSP1E3D1 à 1,55mg/mL. Les échantillons sont chauffés à la vitesse de 2°C par minutes. Les courbes sont ajustées avec une fonction sigmoïdale. Les températures de transition sont calculées à partir des points d'inflexions des courbes d'ajustement B Représentation de la température de transition de la protéine MSP1E3D1 (tampon non traité avec la résine Chelex) en fonction de la concentration en CaCl<sub>2</sub>. C. Tableau de valeurs expérimentales obtenues aux différentes concentrations de calcium*

Les résultats présentés sur la Figure III-4 A montrent qu'une transition entre deux états est clairement visible en fonction de la température. La valeur de la température au point d'inflexion sera appelée température de transition. Les valeurs des températures de transitions ne sont utilisées que si le coefficient de régression  $R^2$  des courbes d'ajustement est supérieur à 0,98. Les températures de transition sont ensuite reportées en fonction de la concentration en calcium.

De manière notable, la température de transition décroît en fonction de la concentration en calcium jusqu'à perdre 4 °C à 2 mM CaCl<sub>2</sub>, passant de 51 °C à 47 °C. Pour la protéine MSP1, la différence est encore plus importante avec une perte d'environ 10 °C (Donnée non montré). Un effet dose dépendant du calcium sur l'oligomérisation de la protéine est donc observé pour les deux protéines.

Il est à noter qu'en l'absence de calcium, la température de transition de MSP1E3D1 est plus basse que celle de MSP1. L'effet du calcium est également plus important pour la protéine MSP1 que pour la protéine MSP1E3D1. Cette différence de température de transition entre les deux protéines peut être due aux hélices supplémentaires de MSP1E3D1, les hélices 4, 5 et 6 qui sont répétées trois fois (cf introduction). Le mécanisme d'oligomérisation de la protéine pourrait être favorisé par la répétition de ces hélices. On pourrait imaginer qu'un site de fixation de calcium serait situé sur ces hélices, et la répétition multiplierait par trois l'affinité de l'interaction, favorisant le changement de conformation. Une autre hypothèse serait que la protéine est déstabilisée par ces hélices supplémentaires et cela favoriserait la transition de la protéine.

Un autre point marquant est que la température de transition pour les protéines MSP, que cela soit pour la protéine MSP1 ou MSP1E3D1, est plus importante dans le tampon sans ion divalent que dans celui utilisé pour conserver la protéine. La protéine est donc

moins à même d'oligomériser dans un tampon sans ion. Le tampon de conservation comprenant 0,5mM D'EDTA, il est difficile de titrer précisément le calcium, et la comparaison entre la réponse au calcium de la protéine dans les deux tampons ne peut être faite.

Cette expérience montre que le calcium permet de déstabiliser la forme dimérique et entraîne l'oligomérisation de la protéine. La protéine restera plus sûrement dans une forme monomérique si elle est dans un tampon sans ion divalent.

L'effet observé du calcium sur la protéine pourrait être dû à une perte de stabilité de la protéine. Les expériences d'ITC ne sont pas adaptées pour étudier cette hypothèse. Des expériences de dénaturation à l'urée ont donc été conduites pour pouvoir comparer la stabilité de la protéine avec ou sans métaux.

### **III.2.3.Effet de la présence de métaux sur la stabilité de MSP1**

La protéine MSP1 est conservée dans un tampon contenant du TrisHCl pour maintenir le pH à 7,4, du sel et de l'EDTA. Il a été observé que lorsque la protéine est placée dans un tampon sans EDTA, la protéine forme une suspension blanchâtre qui ne sédimente pas au fond du tube.

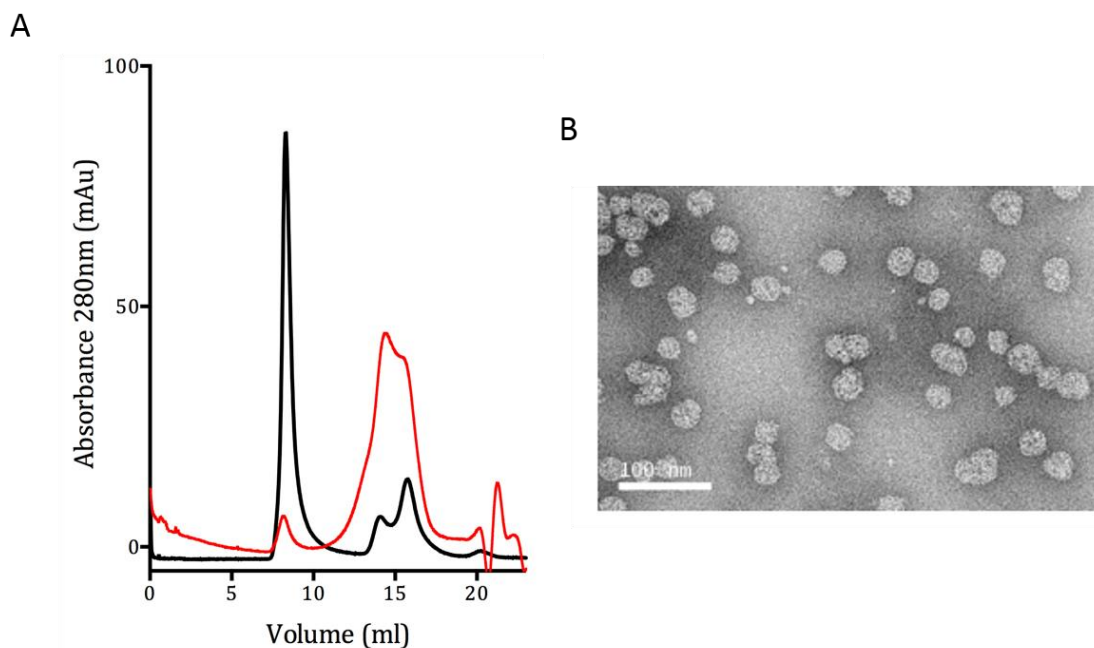


Figure III-5 : Observation de particules de 40nm en l'absence d'EDTA A. Chromatographie d'exclusion de taille de la protéine MSP1 après incubation toute la nuit dans un tampon sans EDTA, en rouge la protéine MSP1 contrôle, en noir la protéine MSP1 incubée durant la nuit dans un tampon sans EDTA. B. Image de microscopie électronique en coloration négative (SST) du pic d'agrégat de la chromatographie en A, tracé noir

Après une incubation toute la nuit dans le tampon sans EDTA, la protéine est principalement dans le volume mort de la chromatographie d'exclusion de taille (Figure III-5A, courbe noire). À titre de comparaison, il n'y a pas de pic dans le volume mort sur le profil d'élution de la protéine MSP1 dans un tampon avec EDTA. (Figure III-5A, courbe rouge) La microscopie électronique montre que la protéine forme une structure sphérique d'environ 40nm (Figure III-5B).

Deux techniques ont ensuite été mises en œuvre afin d'évaluer la stabilité de la protéine MSP1 purifiée, et les effets des métaux sur celle-ci. Des expériences de calorimétrie différentielle à balayage (DSC : Differential Scanning Calorimetry) et de fluorescence des tryptophanes en fonction de la température ont été réalisées. Ces deux méthodes ont l'avantage de ne pas nécessiter de marquage spécifique de la protéine. Les expériences de DSC sont réalisées en comparant la chaleur dégagée dans la cellule contenant la protéine avec la chaleur dégagée par le tampon seul lors de la variation de température. En se dépliant, ou lorsque un complexe se dissocie, un dégagement de chaleur a lieu. En déterminant la température qui correspond au maximum de la chaleur dégagée, on obtient la température de fusion de la protéine.

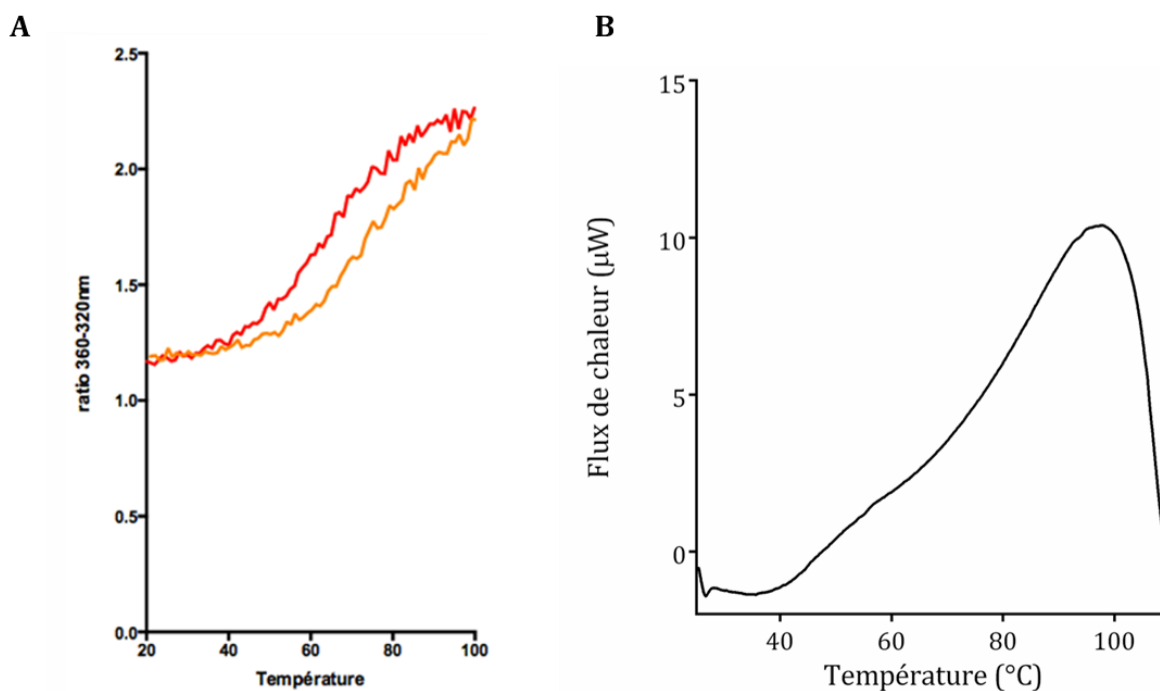


Figure III-6 : Etude de la stabilité de la protéine MSP1 A. Fluorescence des tryptophanes ( $\lambda_{ex}$  295nm), le graphique représente le ratio entre la fluorescence à 360nm et la fluorescence à 320nm en fonction de la température (°C). En orange, variation de la température croissante, en rouge, variation de la température décroissante. B. Calorimétrie différentielle à balayage faite avec la protéine MSP1 à une concentration de 1mg/mL, en abscisse la température (°C), en ordonnée la chaleur émise, la courbe noir correspond à la mesure avec le tampon seul, la courbe rouge correspond à la mesure de la protéine MSP1.

Un dégagement de chaleur est mesuré à partir de 40°C pour atteindre un maximum à 97°C (

Figure III-6B). Le profil obtenu avec cette protéine MSP1 est très différentes de celui obtenu avec la protéine apolipoprotéine A1<sup>138</sup> (température de transition est de 52-53°C). La protéine MSP1 semble beaucoup plus stable que l'apolipoprotéine A1. Afin de déterminer si la protéine n'a pas précipité pendant l'expérience, l'échantillon contenu dans la chambre expérimentale a été récupéré et la quantité de protéine, après centrifugation pour culoter les éventuels agrégats, a été mesurée. La différence de concentration entre le début et la fin de l'expérience est d'environ 10%. La protéine est donc suffisamment résistante à la température pour que le changement de conformation observé par fluorescence en augmentant la température soit réversible.

La courbe de fluorescence des tryptophanes ne semble pas montrer une transition nette (

Figure III-6A). Afin de voir si la protéine peut se replier, la protéine a été incubée à 100°C pendant 20min puis la fluorescence des tryptophanes a été mesurée tous les degrés jusqu'à 20°C. A 20°C la protéine retrouve la même intensité de fluorescence que lors de l'expérience précédente à 20°C, et le même ratio 320nm/360nm.

Pour les deux expériences, il semble que la protéine ne s'agrège pas avec la température. De plus, la mesure de la fluorescence des tryptophanes en fonction de la décroissance de la température indique que la protéine retrouve sa conformation d'origine, ce qui indique que la protéine n'a pas précipité. La protéine est donc extrêmement stable à haute température. Cela a été mis à profit lors de la purification de la protéine. (annexe Figure 2)

Afin d'avoir une méthode permettant d'estimer un effet des métaux sur la stabilité des protéines d'assemblages, une approche de dénaturation à l'urée a été envisagée.

Le suivi de la dénaturation à l'urée consiste à mesurer la fluorescence des tryptophanes des protéines en ajoutant de l'urée. L'urée va dénaturer la protéine et par conséquent les tryptophanes de la protéine seront exposés au solvant, ce qui va modifier la fluorescence de ces derniers.



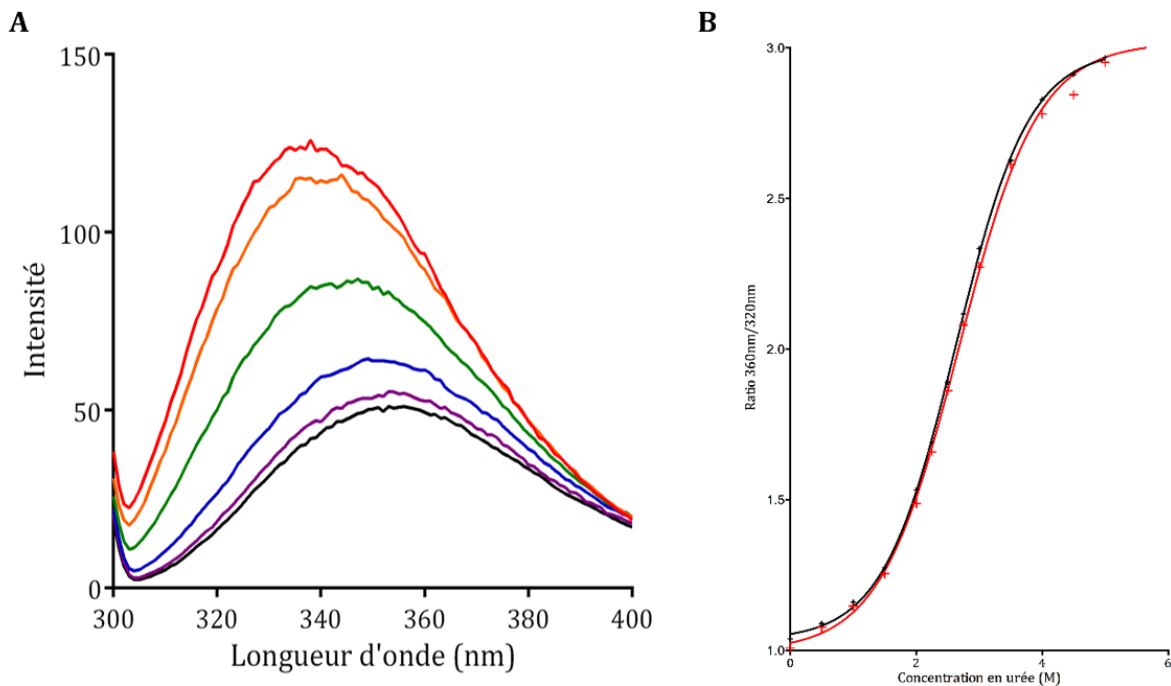


Figure III-7 : Déplieement de la protéine MSP1 à l'urée, A Spectre de fluorescence des tryptophane ( $\lambda_{ex}$  295nm), en rouge est représenté la fluorescence de la protéine MSP1, en orange après ajout de 1M d'urée, en vert avec 2M d'urée, en bleu avec 3M d'urée, en violet avec 4M d'urée, en noir avec 5M d'urée La protéine a une concentration de 1,55mg/ml. B. Le graphique représente le ratio entre la fluorescence des tryptophanes à 360nm sur la fluorescence des tryptophanes à 320nm ( $\lambda_{ex}$  295nm) en fonction de la concentration en urée (M). En noir en l'absence de calcium, en rouge avec 1,3mM chlorure de calcium.

Les deux courbes de dénaturation avec et sans calcium sont superposables (Figure III-7B), ce qui indique que la présence du calcium n'influe pas sur la résistance à l'urée de la protéine. Ce résultat est en faveur de l'hypothèse selon laquelle la stabilité n'est pas modifiée par le calcium mais que celui-ci joue un rôle dans l'oligomérisation des protéines d'assemblage des nanodisques.

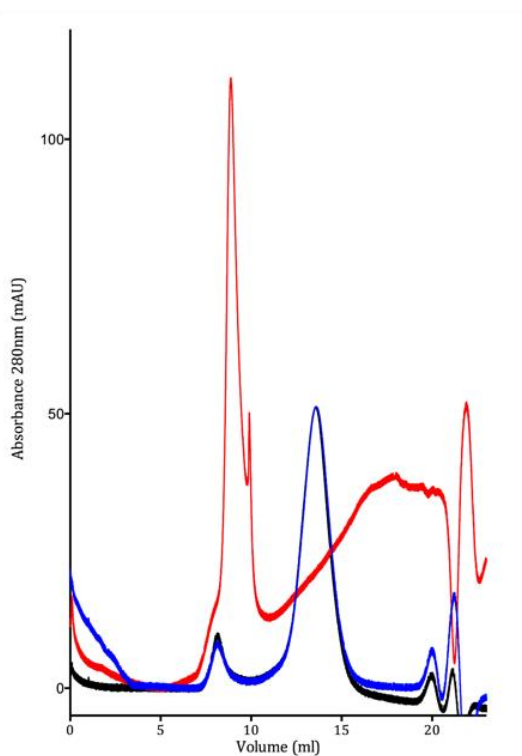
Nos résultats ont montré que les protéines d'assemblages sont très stables. En revanche, les ions divalents interagissent, directement ou indirectement, avec les MSP et jouent un rôle dans l'oligomérisation de celles-ci. On peut supposer que le calcium favorise les interactions protéine-protéine entre les apolipoprotéines. Une meilleure compréhension de ces interactions est primordiale pour améliorer l'assemblage des nanodisques.

#### III.2.4. Rôle des ions avec les nanodisques

Les résultats présentés dans le paragraphe précédent montrent que les métaux présents dans les tampons interagissent sur la protéine seule, mais l'effet sur les nanodisques reste à déterminer. La protéine d'assemblage a des conformations très différentes dans sa forme soluble et dans sa forme avec des lipides, en nanodisques (cf introduction partie II1) et les interactions entre hélices adjacentes sont donc différentes également. De plus, il a été montré que les ponts salins jouent un rôle primordial dans la stabilisation des nanodisques<sup>64</sup>. Les métaux pourraient déstabiliser ces ponts salins, ou créer des interactions entre les hélices.

Nous avons réalisé des assemblages de nanodisques en présence ou absence de métaux afin de déterminer si les métaux ont un effet sur l'assemblage des nanodisques. Les nanodisques ont été préparés pour ces expériences avec des lipides POPC.

A



B

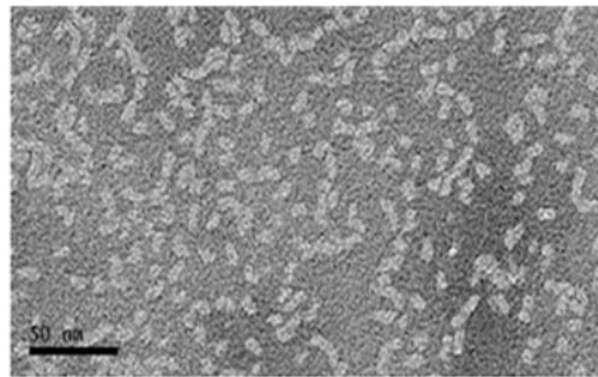


Figure III-8 : Assemblage de nanodisques avec différents métaux A Chromatographie d'exclusion de taille d'assemblage de nanodisques avec différents métaux, en bleu assemblage contrôlé, en noir assemblage avec ajout de 2mM  $MgCl_2$ , en rouge assemblage avec ajout de 2mM  $CaCl_2$  B Image de microscopie électronique en coloration négative (SST) du pic correspondant à l'échantillon avec ajout de 2mM  $CaCl_2$  (en rouge)

Le mélange d'assemblage comprenant la protéine MSP1, des lipides POPC a été séparé en trois échantillons. Pour celui-ci, le volume d'élution observé correspond au volume d'élution des nanodisques vides (environ 13mL, soit environ 160kDa). La masse molaire théorique des nanodisques est de 140kDa ; la différence observée peut être due au fait que la chromatographie d'exclusion de taille sépare les particules en fonction de leur rayon de Stokes. La masse calculée est une estimation pour une protéine globulaire, alors que les nanodisques ne le sont pas.

Aucun changement dans le volume d'élution n'est observé après ajout de chlorure de magnésium. A l'inverse, lorsque du calcium est ajouté, un décalage du volume d'élution apparaît. Ce volume (9mL) n'est pas le volume mort de la chromatographie d'exclusion de taille, ce qui indique la formation de particules qui ont un rayon de Stokes plus important. Pour observer ces particules, un échantillon de la fraction principale de ce pic a été observé en microscopie électronique, par coloration négative (Figure III-8 B). Les tailles des objets observés ne diffèrent pas de la taille des nanodisques, mais il semble que les nanodisques interagissent plus entre eux et semblent être liés ensemble pour former des sortes de chapelets. On peut imaginer que ces interactions sont médiées par le calcium. (Figure III-8 B)

Pour connaître l'impact des métaux sur la stabilité des nanodisques, les mêmes expériences décrites pour la protéine MSP1 et MSP1E3 seule ont aussi été réalisées avec des nanodisques vides. Tout d'abord, nous avons suivi l'effet des métaux sur les nanodisques par chromatographie d'exclusion de taille.

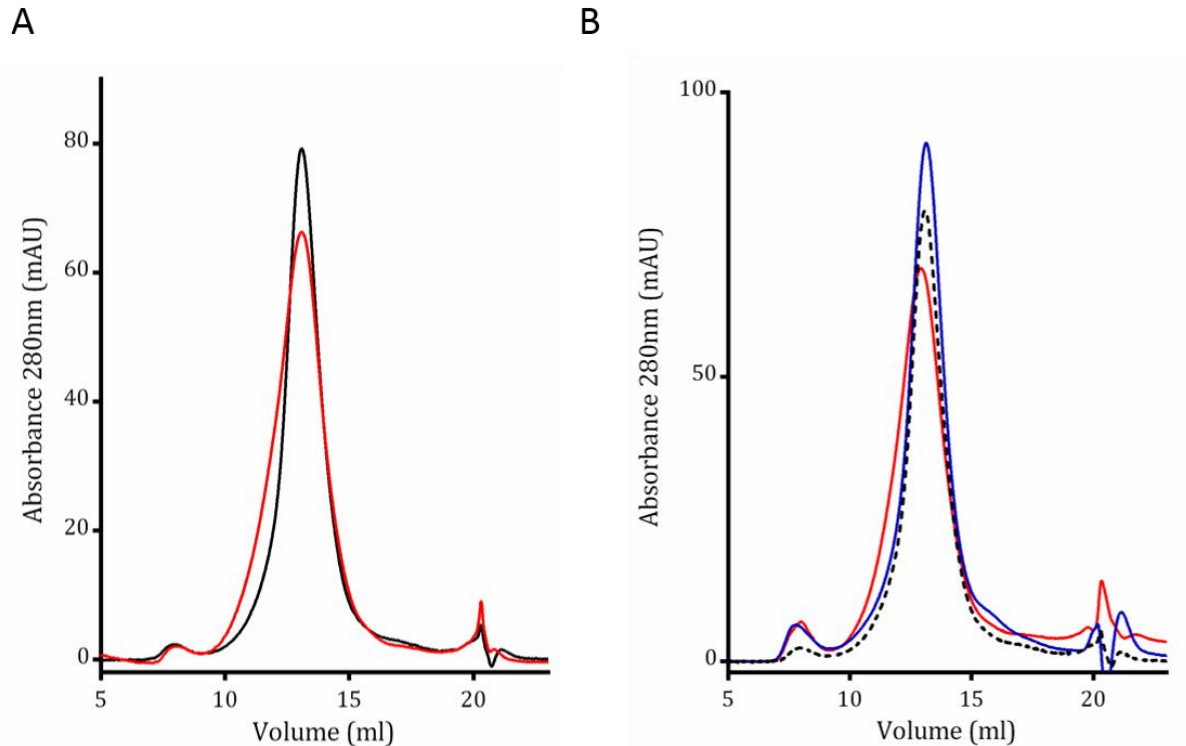


Figure III-9 : Comparaison des nanodisques dans un tampon traité ou non avec la résine Chelex. A. Chromatographie d'exclusion de taille, Superdex 200 10/300, (tampon 20mM Hepes, 100mM NaCl), en noir les nanodisques dans un tampon sans métaux, avec le tampon de course de la chromatographie sans métaux, en rouge, les nanodisques dans un tampon non traité par la résine Chelex, et le tampon de course de la chromatographie n'est pas traité avec la résine Chelex B. Chromatographie d'exclusion de taille Superdex 200 10/300, en pointillé noir, nanodisques dans un tampon sans métaux, avec le tampon de la chromatographie sans métaux, en rouge, nanodisques dans un tampon sans métaux, avec le tampon de la chromatographie non traité par la résine Chelex, et en bleu, nanodisques non traité par la résine Chelex dans un tampon sans métaux.

Les nanodisques vides sont élués à un volume de 13mL. La symétrie du pic d'éluion est améliorée lorsque le tampon de la protéine MSP1 ainsi que le tampon d'éluion est traité avec la résine Chelex. En effet, l'épaule visible sur la courbe rouge disparaît (Figure III-9). Toutefois, l'aire sous les courbes est quasi identique pour les nanodisques dans le tampon sans métaux et pour les nanodisques dans le tampon non traité indiquant que la quantité de protéine d'assemblage est la même dans les deux cas. Comme contrôle, des nanodisques dans un tampon non traité sont passés sur la colonne avec un tampon traité (en bleu, Figure III-9 B), et des nanodisques dans un tampon traité sont passés sur la colonne avec un tampon non traité (en rouge, Figure III-9 B). L'épaule disparaît quand les nanodisques sont passés avec un tampon traité, cela indique que le temps d'incubation qui correspond à un passage sur la colonne est suffisant pour avoir un effet

sur les nanodisques. Il semble donc que la présence de traces de métaux dans le tampon agit sur l'homogénéité des nanodisques.

Nous avons également évalué l'effet des métaux par des mesures de turbidité (cf partie II 1 b, Figure 5). Les mesures ont été faites sur des nanodisques assemblés avec les protéines d'assemblages MSP1 et MSP1E3D1 comprenant du POPC, dans un tampon sans métaux traité avec la résine Chelex ou dans le même tampon non traité.

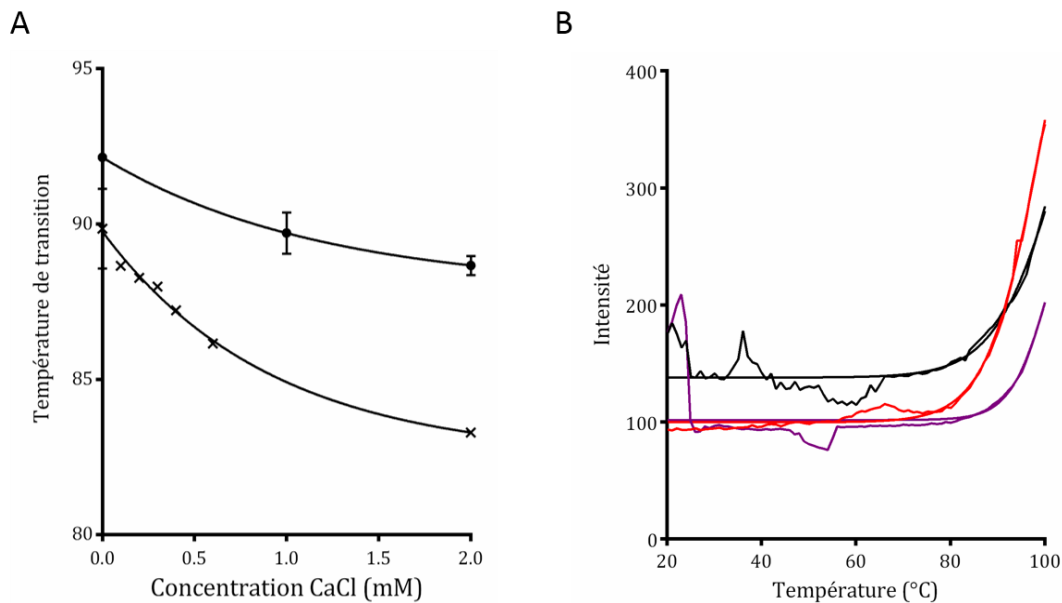


Figure III-10 : Mesure de la turbidité de la solution à 500nm à l'aide d'un fluorimètre ( $\lambda_{exc}$  500nm,  $\lambda_{em}$  500nm) des nanodisques POPC dans des tampons traités ou non avec la résine Chelex A Représentation de la température de transition des nanodisques en fonction de la concentration en CaCl. B Mesure de la turbidité de la solution de nanodisques MSP1E3D1 dans un tampon traité par la résine Chelex (en noir et en violet), ou non traité (en rouge)

Les nanodisques MSP1/POPC qui sont dans le tampon non traité avec la résine Chelex ont une température de transition qui est plus faible que ceux qui ont été traités avec la résine (Figure III-10 A). Le tampon traité avec la résine Chelex semble aider à l'obtention d'une meilleure homogénéité des nanodisques, en étant moins favorable à l'apparition de particules ou d'agrégats. Pour les nanodisques MSP1E3D1/POPC, nous n'avons pas atteint de plateau en augmentant la température (Figure III-10 B). Il semblerait donc que la température de transition pour ces nanodisques soit plus importante que pour ceux formés avec MSP1, même si l'absence de plateau ne permet pas de déterminer avec précision la valeur de celle-ci.

L'effet des métaux n'est pas complètement clair, mais ils influent sur l'homogénéité et semblent nécessaire pour la stabilité des nanodisques. Ce gain d'homogénéité est précieux lorsque l'on veut utiliser certaines méthodes biophysiques, comme par exemple la cristallographie.

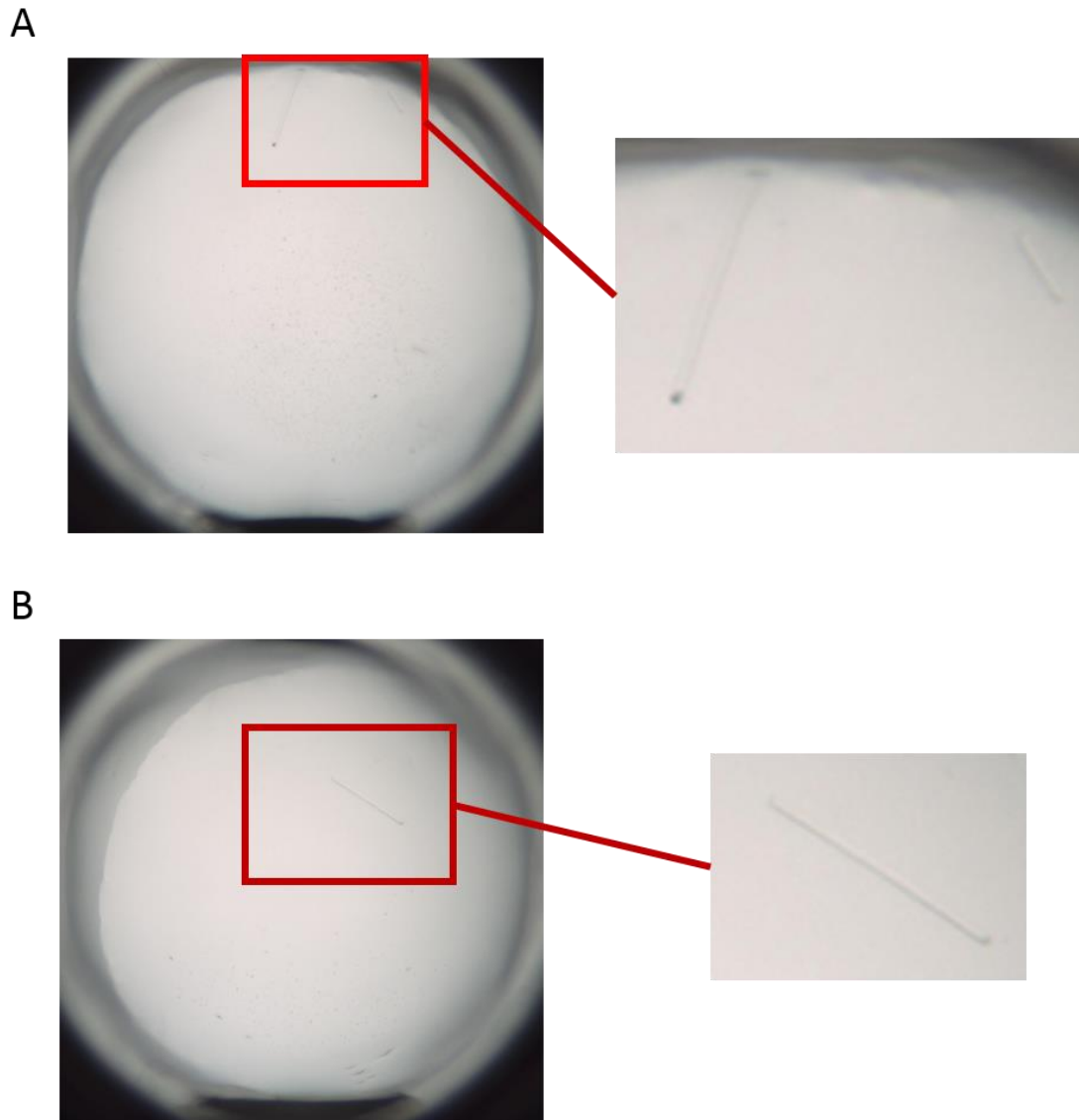
### **III.2.5. Essais de cristallisation des nanodisques**

Les gains en homogénéité obtenus en utilisant des tampons en absence de métaux sont intéressants pour cristalliser des nanodisques. Nous avons donc réalisé des essais dans ces conditions.

La cristallisation de protéines membranaires incorporées dans les nanodisques permettrait d'obtenir leurs structures dans un environnement lipidique et donc de s'affranchir des biais liés aux détergents. La cristallisation de nanodisques permettrait d'avoir plus de possibilité dans la composition lipidique que dans le cas de la cristallisation avec la méthode de phase cubique. Le lipide utilisé pour former la phase cubique est la monoloéine. Dans l'optique de cristallisation de protéine membranaire incorporée dans les nanodisques, l'utilisation de lipides plus variés est un avantage pour obtenir la structure de la protéine dans des conditions proches des conditions natives.

La première étape pour espérer réussir à cristalliser des nanodisques contenant des protéines membranaires a été de faire des essais de cristallogenèse de nanodisques vides. Les premiers essais ont été conduits avec des nanodisques formés avec MSP1 et du POPC comme lipides. Les essais de cristallisation ont été réalisés par diffusion de vapeur, en gouttes assises avec un échantillon à une concentration de 2 mg/mL. Ces essais ont été conduits en absence ou présence de complexe lanthanide. Les complexes lanthanides ont été utilisés pour aider à la détermination des phases associées aux ondes diffractées dont la connaissance est nécessaire à la résolution de la structure. La fixation des complexes de lanthanides sur la protéine permettrait de résoudre le problème de phase par des méthodes *de novo* grâce à un fort signal anomal (collaboration E. Girard, IBS).

Les nanodisques utilisés pour ces essais ont été préparés dans un tampon préalablement traité avec la résine Chelex puisque nous avons précédemment montré que ce traitement permettait d'améliorer l'homogénéité des assemblages.



*Figure III-11 : Essais de cristallisation de nanodisques vides A Cristaux obtenus en présence de PEG3350 et de tampon Tris à pH 8,5, B Cristaux obtenus en présence de PEG200 et d'acide succinique à pH7*

Deux formes cristallines différentes ont été obtenues. Un cristal formant une baguette a été obtenu en présence de PEG 3350 et de Tris à pH 8,5 (Figure III-11 A) et deux cristaux formant des cylindres ont été obtenus en présence de PEG200 et d'acide succinique à pH

7 (Figure III-11 B). L'absence de sels dans ces conditions de cristallisation laisse à penser qu'il ne s'agit pas ici de cristaux de sels.

Les cristaux ont été congelés et testés à l'ESRF sur la ligne ID13. Aucune tâche de diffraction n'a été observée mais il semble bien que ces cristaux ne soient pas des cristaux de sel.

Des cristaux ont donc été obtenus, probablement de nanodisques. Néanmoins, l'hypothèse de cristaux correspondant à la protéine seule n'est pas à exclure. Une optimisation des cristaux doit être conduite. En parallèle, des essais de cristallisation de nanodisques contenant des protéines membranaires ont aussi été réalisés (cf partie IV 2.3).

### **III.3. Assemblage de nanodisques à partir d'une membrane native**

L'extraction des protéines membranaires avec des détergents peut entraîner une inactivation de la protéine, à cause notamment de la délipidation ou d'une dénaturation. La possibilité d'extraire directement des protéines membranaires, sans l'aide de détergents, et de les garder solubles dans leur environnement natif grâce aux protéines d'assemblages, pourrait être très avantageuse.

Le mécanisme qui permet la formation des nanodisques n'est pas encore complètement compris et l'assemblage des nanodisques pourrait se faire sans nécessiter la présence de partenaire protéique<sup>50</sup>.

Dans le cadre de ma thèse, l'un de mes objectifs était d'insérer en nanodisques la protéine *hAAC1* humaine produite par synthèse *in vitro*. L'ensemble des essais d'incorporation s'étant révélés infructueux, nous avons envisagé d'extraire la protéine directement à partir de membranes mitochondriales.

De la protéine d'assemblage MSP1E3D1 a été incubée directement avec de la membrane mitochondriale interne, préalablement purifiée à partir de cœur de chamois (PhD Vera Moiseeva, IBS). Aucun détergents n'est ajouté dans la solution. La membrane interne contenant une quantité importante du transporteur AAC, nous pouvions espérer former



des nanodisques contenant ce transporteur. L'échantillon a ensuite été purifié par chromatographie d'affinité permettant de récupérer les nanodisques grâce à l'étiquette histidine portée par MSP1, puis analysé par chromatographie d'exclusion de taille (Figure III-12).

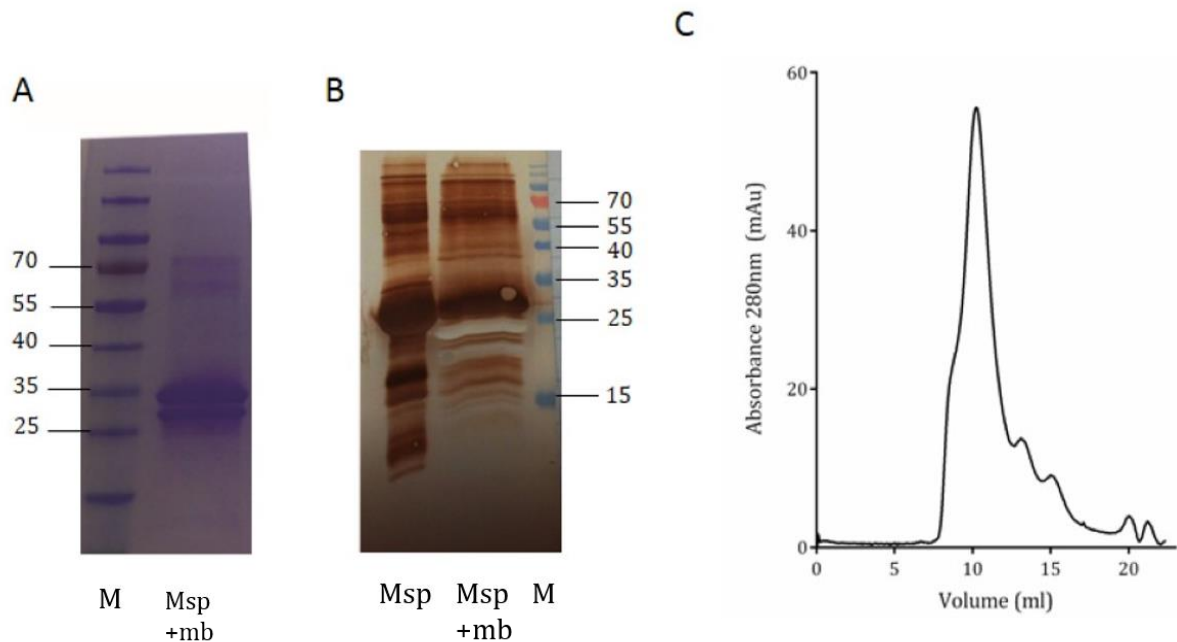


Figure III-12 : Assemblage de nanodisques à partir de membranes. A Gel SDS PAGE des nanodisques concentrés (dépôts 20µl) B Western Blot révélé avec des anticorps anti-His, la fraction Msp correspond à un échantillon de la protéine His MSP1E3D1 témoin, la fraction Msp+mb correspond à la protéine MSP1E3D1 avec des membranes mitochondriales. C Chromatographie d'exclusion de taille Superdex 200 10/300.

Une purification a été réalisée avec l'étiquette histidine de la protéine MSP1E3D1 afin de récupérer seulement les nanodisques formés et la protéine MSP1E3D1 seule. Deux chromatographies d'exclusion successives ont ensuite été faites, la deuxième est faite sur les fractions correspondant à des nanodisques.

En chromatographie d'exclusion de taille (Figure III-12 C), le pic est élué vers 12mL. Un épaulement est aussi visible, correspondant aux objets dont la taille est supérieure à 600kDa et aux agrégats. Le pic principal correspond à la taille de nanodisques. Les échantillons déposés en microscopie électronique révèlent la présence de nanodisques. (annexe figure 3)

Le gel SDS PAGE (Figure III-12 A), montre quatre bandes dont l'une correspond à la protéine MSP1E3D1. Les bandes à 70kDa et 60kDa sont des contaminants sont présent

lors de la purification avec l'étiquette histidine de la protéine d'assemblage. La bande à environ 35kDa correspond à la protéine MSP1E3D1. La deuxième bande (~30kDa) a été analysée par séquençage N-terminal afin de déterminer s'il s'agissait d'une protéine mitochondriale. Elle correspond à la protéine MSP dont la partie N-terminale avait été clivée. Aucune incorporation n'a donc pu être détectée sur gel SDS PAGE coloré en bleu de Coomassie. Il n'est pas à exclure que des protéines membranaires soient présentes en très faible quantité, et pourraient être observables avec une coloration à l'argent, mais de telles quantités ne seraient pas utilisables pour des études bio-physiques.

Pour conclure, il y a formation de nanodisques lorsque l'on mélange des membranes avec la protéine d'assemblage. Cependant, la majeure partie des membranes utilisées n'est pas solubilisée et reste dans le culot. L'assemblage se fait aussi sans incorporation de protéines membranaires, ce qui est en faveur du modèle où l'assemblage se fait en arrachant des lipides à la couche lipidique extérieure. Ces nanodisques contenant les lipides natifs des membranes mitochondriales pourrait être utilisés pour une incorporation de la protéine *hAAC* au cours d'une expression *in-vitro*.

De manière surprenante, la protéine MSP1E3D1 est clivée pendant l'incubation avec la membrane mitochondriale. La délétion concerne les 15 premiers acides aminés, et la protéine résultante commence par une sérine (SKLRE). La cause de cette délétion n'est pas comprise, nous ne l'avons jamais observée ailleurs. Elle peut être due à la présence de protéases dans la préparation membranaire.

### III.4. Discussion

La structure des nanodisques et des particules sphériques, ainsi que les mécanismes qui sont responsables de leurs formations sont encore sujets à débat. Pour rappel, les protéines type MSP sans lipide ont une conformation avec 4 hélices principales en faisceau et deux hélices en N-terminal, et lorsqu'il y a des lipides, la protéine va changer de conformation et entourer une bicouche lipidique. Lorsqu'il y a plus de lipides, la formation de particule sphérique va avoir lieu.

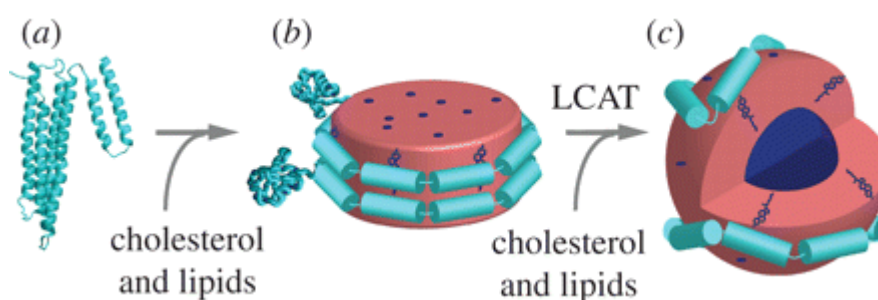


Figure III-13 : Représentation de la formation des particules HDL <sup>71</sup>(a) protéine apolipoprotéine sans lipides, (b) particule HDL discoïdale, (c) particule HDL sphérique

Avoir une meilleure compréhension des mécanismes permettrait assurément une optimisation de l'assemblage des nanodisques.

Nos travaux ont montré que les protéines d'assemblages sont très stables, résistent à de très hautes températures (au-dessus de 100°C), ce qui a ouvert la voie à des purifications simplifiées des protéines d'assemblage.

La protéine d'assemblage semble interagir avec les métaux, notamment le calcium et le magnésium. L'ajout de ces métaux modifie la dynamique d'oligomérisation des protéines MSP1 et MSP1E3D1, en favorisant l'apparition de particules de plus haut poids moléculaires. La protéine MSP1E3D1 s'oligomériser plus facilement que la protéine MSP1. Les ions divalents ont aussi un effet sur les nanodisques formés par MSP1 ou MSP1E3D1 et les lipides. Plus la concentration de calcium est importante, et plus les nanodisques vont former des grandes particules de type HDL ou des agrégats. Les nanodisques dans un tampon sans ions sont moins à même de former ces particules ou agrégats. De manière intéressante, les nanodisques MSP1E3D1 sont plus résistants que les nanodisques MSP1. Cela peut s'expliquer par le fait que la forme monomérique de la

protéine MSP1E3D1 pourrait former plus facilement des nanodisques, la protéine dans une conformation en nanodisques serait favorisée par rapport à la protéine dans une conformation globulaire. Une autre hypothèse serait que l'ajout des trois hélices à la protéine MSP1E3D1 comparée à MSP1 aurait rendu le passage de la forme discoïdale à la forme sphérique moins favorable, ou l'aurait rendu impossible.

Cependant, si le calcium a un effet sur les nanodisques, les nanodisques en présence d'EDTA ne sont pas stables et précipitent. Cela confirme qu'il y a une interaction entre les nanodisques et les ions divalents.

Le rôle de cette interaction entre les ions divalents et les protéines d'assemblages n'est pas encore très clair, mais il semblerait que les ions favorisent l'oligomérisation de la protéine. D'un autre côté, les expériences faites avec les nanodisques formés montrent que les métaux jouent un rôle sur leur stabilité. Il est possible que les métaux soient importants dans le processus de formation des particules HDL, ce qui expliquerait le fait qu'ils aident pour l'oligomérisation de la protéine MSP, et influent sur la taille des particules des nanodisques.

Nous avons ainsi par ces observations améliorées nettement l'homogénéité des échantillons de nanodisques grâce à l'utilisation de tampon sans trace de métaux. Cette amélioration a permis d'obtenir des cristaux de nanodisques.

## IV. Etudes fonctionnelles des protéines hémiques YedZ et SpNox

### IV.1. Introduction

Lors de ma thèse, je me suis intéressé à la famille des NADPH oxydases. Cette famille de protéine à la particularité de posséder des hèmes, contenant du fer. Aucune donnée structurale n'est pour l'instant disponible pour ces protéines. Je me suis intéressé à la protéine SpNox, NADPH oxydase procaryote, et YedZ, protéine homologue des NADPH oxydase. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'équipe de F. Fieschi à l'IBS qui a mis au point l'expression, la purification et la caractérisation de ces protéines.

Les hèmes qui sont dans ces protéines ont un maximum d'absorbance de 411nm pour la protéine YedZ et 416nm pour la protéine SpNox. Grâce à cette coloration, il est aisé de suivre leur présence à chaque étape de la purification et de l'incorporation dans les nanodisques. Cela permet aussi de doser la protéine en mesurant l'absorbance de l'hème et non l'absorbance des tryptophanes, qui sont également présents dans les protéines d'assemblage. Ces protéines ont donc été des modèles idéaux pour l'insertion des protéines membranaires dans les nanodisques.

La première protéine étudiée, appelée YedZ, est une protéine d'*Escherichia coli*. De fonction pour l'instant inconnue, elle possède un domaine commun avec les protéines de la famille des NADPH oxydases, appelé ACRATA (Figure IV-1). Les NADPH sont des complexes membranaires impliqués dans la catalyse de la réaction d'oxydation du NADPH par le dioxygène, formant du NADP<sup>+</sup>, du H<sup>+</sup> et de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup>. YedZ pourrait jouer un rôle dans cette réaction, mais aucune donnée au niveau moléculaire n'a pour l'instant étayée cette hypothèse.

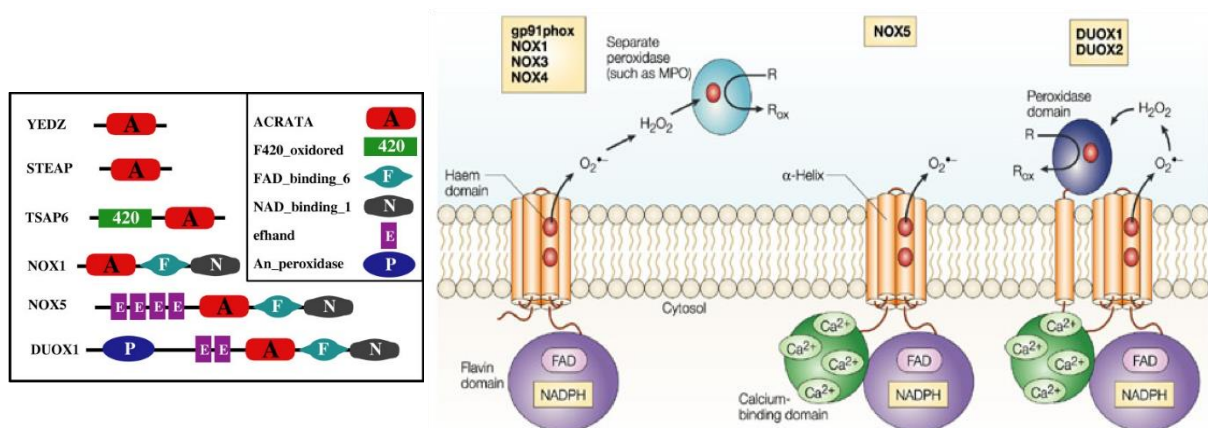


Figure IV-1 : Différents domaines la famille des NADPH oxydase et leur activité<sup>155,156</sup>

Deux partenaires potentiels ont été décrits pour cette protéine : YedY, protéine soluble exprimée dans le même opéron que YedZ et la protéine cytoplasmique Fre. La protéine Fre est une flavine réductase, qui catalyse la réduction d'un substrat. La protéine utilise la flavine pour réduire le NADPH, et libérer du NADP. L'électron libéré par la réduction est transmis à une protéine acceptatrice qui correspondrait à la protéine YedZ.

Les premiers résultats d'insertion de YedZ en nanodisques ayant été probants, le projet a été poursuivi au-delà de l'objectif initial qui était d'utiliser YedZ comme une protéine modèle pour valider les protocoles d'assemblage en nanodisques.

Une des questions importantes quant au fonctionnement de YedZ concerne l'interaction avec ses deux partenaires potentiels, Fre et YedY. En détergent des expériences de pontage chimique semblent indiquer qu'il y a une interaction entre la protéine YedZ et Fre, et de manière moins concluante entre YedZ et YedY. Cependant, les interactions protéine-protéine sont parfois difficiles à étudier avec des protéines en détergent; les détergents peuvent empêcher les interactions.

Notre objectif était d'étudier ces interactions dans un environnement plus physiologique, en utilisant YedZ insérée en nanodisques.

La deuxième protéine hémique sur laquelle j'ai travaillé est la protéine SpNox. C'est la première NADPH oxydase provenant d'un organisme procaryote *Streptococcus pyogenes*. Cette protéine a été caractérisée en détergent (thèse Christine Hajjar, IBS) et des essais de cristallisation ont conduit à l'obtention de cristaux diffractant à une résolution maximale de 6 Å.

Pour la protéine SpNox, un des objectifs était de déterminer les différences d'activité entre la protéine en détergent et la protéine reconstituée dans des membranes lipidiques. Nous avons également initié des essais de cristallisation de la protéine en nanodisques.

## **IV.2. Etude de la protéine YedZ**

### **IV.2.1. Incorporation dans des nanodisques**

La purification de la protéine YedZ a été réalisée comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes. YedZ a ensuite été mélangée avec des lipides POPC, du détergent cholate de sodium et la protéine d'assemblage à un ratio spécifique. Après avoir éliminé le détergent à l'aide de biobeads, les nanodisques sont purifiés grâce à une chromatographie d'affinité et une chromatographie d'exclusion de taille.

L'absorbance de l'hème permet de suivre la présence de la protéine YedZ dans les différentes étapes de purification. Les caractéristiques spectrales de l'hème dépendent de son état de coordination. Libre, son maximum d'absorption est à 403 nm, lorsqu'il est dans la poche de fixation dans la protéine, et donc interagissant avec les histidines de la poche, le maximum est à 411 nm. Une chromatographie d'exclusion de taille permet de séparer les différentes composantes de l'assemblage de nanodisques YedZ (Figure IV-2 A).

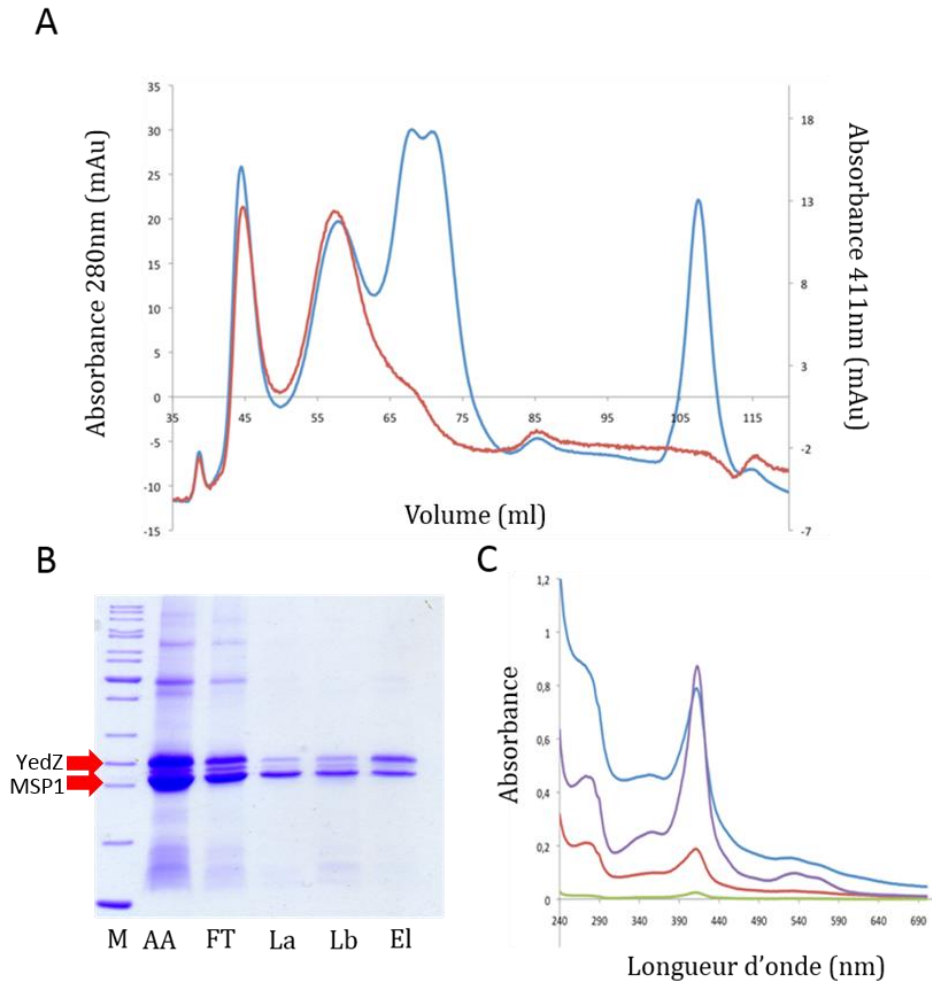


Figure IV-2 : Purification des nanodisques avec YedZ incorporée; A. Chromatographie d'exclusion de taille avec une colonne Superdex 200 16/60 d'un assemblage de nanodisques YedZ, en bleu, l'absorbance à 280nm; en rouge, l'absorbance à 411nm, B. Gel SDS PAGE de la purification par chromatographie d'affinité avec une résine NiNTA, de gauche à droite, AA, après assemblage, FT, fraction non retenue, La, lavage avec le tampon SEC avec 20mM imidazole, Lb, lavage avec le tampon SEC avec 50mM imidazole, El, Elution avec le tampon SEC, 300mM imidazole C. Spectre d'absorbance des différentes étapes de la purification par chromatographie d'affinité sur résine de nickel. En bleu, l'échantillon FT, en rouge, l'échantillon La, en vert, l'échantillon Lb, en violet, l'échantillon El.

L'absorbance de l'hème permet de suivre la présence de la protéine YedZ dans les différentes étapes de purification. Les caractéristiques spectrales de l'hème dépendent de son état de coordination. Libre, son maximum d'absorption est à 403nm, lorsqu'il est dans la poche de fixation dans la protéine, et donc interagissant avec les histidines de la poche, le maximum est à 411nm. Une chromatographie d'exclusion de taille permet de séparer les différentes composantes de l'assemblage de nanodisques YedZ (Figure IV-2 A). Le pic d'éluion à 45mL relié à une absorbance à 280nm et à 411nm correspond au volume mort de la colonne et donc à des agrégats. Un pic avec un volume d'éluion de



57mL est relié aussi à une absorbance à 280nm et à 411nm ; ce pic à 57mL correspond à des particules de grande taille. Le fait d'être relié à 280nm montre la présence de protéines probablement formant des nanodisques, et la présence d'une absorption à 411nm au même volume indique la présence de la protéine YedZ dans ces nanodisques. Deux autres pics sont reliés à l'absorption à 280nm, à 67mL et 70mL de volume d'élution, alors qu'un épaulement relié à l'absorbance à 411 nm est présent à environ 66mL. Le pic à 66mL correspond donc aux nanodisques contenant la protéine YedZ, alors que le pic à 70mL correspond aux nanodisques vides. Une étape de purification par chromatographie d'affinité permet ensuite de séparer les nanodisques vides des nanodisques contenant YedZ, la protéine YedZ ayant une étiquette histidine

La bande sur le gel SDS PAGE, présente dans tous les puits, visible à une taille d'environ 23kDa correspond à la protéine MSP1. Dans le premier puit, où le mélange de formation des nanodisques est déposé, une deuxième bande est observée, à une taille d'environ 30kDa. Cette bande correspond à la protéine YedZ. Dans la fraction non retenue, une quantité importante de protéine YedZ est présente. Une proportion importante de YedZ est peut être mal repliée dans les nanodisques, ce qui gênerait sa fixation à la résine. Dans les fractions de lavages, la protéine MSP1 est majoritaire ; les nanodisques vides sont éliminés de la résine. Dans la fraction d'élution, YedZ est à un ratio d'environ 1/1 avec la protéine MSP. En parallèle de la vérification sur gel SDS PAGE, des mesures d'absorbances sont faites sur chaque fraction (Figure IV-2 C). Dans la fraction non retenue, le ratio entre l'absorbance à 280nm et à 411nm est d'environ 1/1. Ce ratio est augmenté dans la fraction d'élution, l'absorbance à 411nm est deux fois plus importante que l'absorbance à 280nm. La purification permet donc bien d'enrichir l'échantillon en nanodisques YedZ en éliminant les nanodisques vides.

L'assemblage des nanodisques YedZ présente deux problèmes, le premier est la présence de nanodisques de tailles plus importantes, et le deuxième est un rendement faible, de l'ordre de 10%.

Afin d'optimiser l'assemblage de nanodisques, nous avons testé différents ratios molaires entre les lipides, la protéine d'assemblage MSP1 et la protéine YedZ (MSP1/POPC/YedZ) : (1/20/0,5), (1/25/0,5), (1/30/0,5), (1/30/0,5), (Figure IV-3).

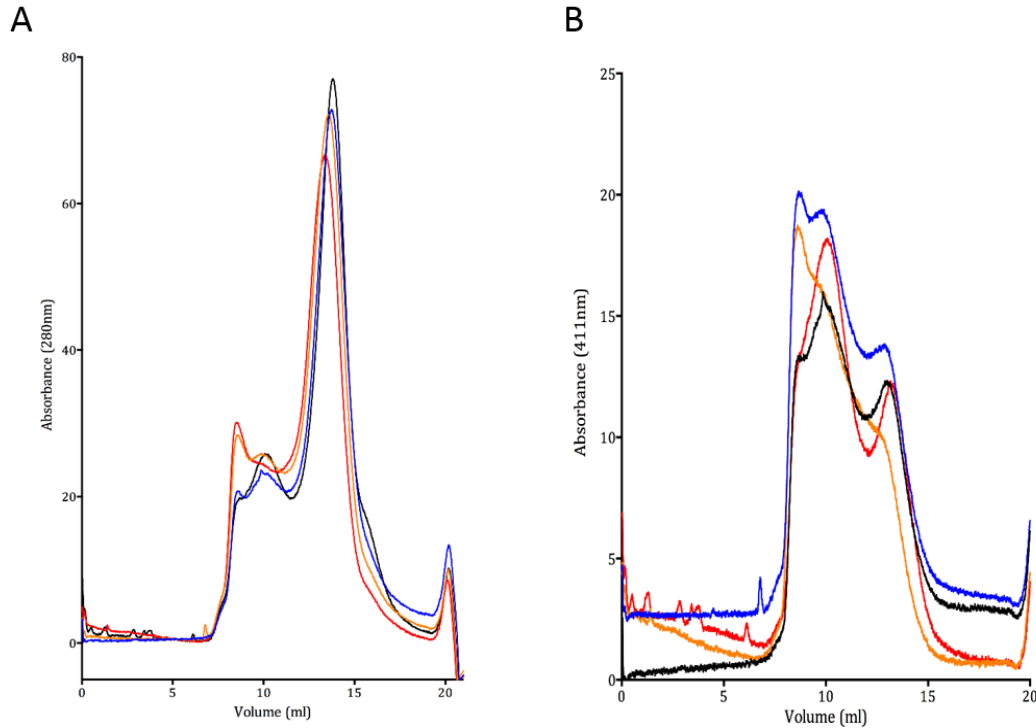


Figure IV-3 : Optimisation de l'assemblage des nanodisques YedZ A et B Chromatographies d'exclusion de taille, Superdex 200 10/300, A. suivi de l'absorbance à 280nm B. suivi de l'absorbance à 411nm. A en bleu le ratio 1/20/0,2, en orange, le ratio 1/25/0,2, en rouge, le ratio 1/30/0,2, en vert, le ratio 1/35/0,2.

Étonnamment, même avec un ratio assez bas en lipides (1/20/0,2), des nanodisques de taille plus importante sont toujours observés alors même qu'un épaulement correspondant à la protéine d'assemblage seule est présent à environ 16mL (Figure IV-3). La présence de nanodisques de plus grosse taille ne semble donc pas être due uniquement à un excès de lipides. Le ratio utilisé pour la formation des nanodisques incorporant YedZ a été maintenu à 1/20/0,2, car c'est celui qui entraîne le moins d'agrégats et le rendement de nanodisques le plus élevé.

Une caractérisation de la protéine membranaire dans les nanodisques a été réalisée en utilisant la spectrométrie de masse (plateforme IBS). Dans un premier temps, nous avons mesuré une masse principale de 23 329Da qui correspond à la masse de la protéine d'assemblage MSP1 sans étiquette histidine. Un très faible pic est aussi observable, à 25660 Da, ce qui correspond à la masse de YedZ (Figure IV-4 A). Cependant ce signal est très bruité et il est difficile de conclure à la présence de la

protéine YedZ. Nous avons donc utilisé la méthode de « ultra thin layer spectrometry »<sup>136</sup>. Cette méthode permet de déterminer la masse de la protéine insérée dans les nanodisques. Le protocole utilisé est décrit dans la partie Matériel et Méthodes.

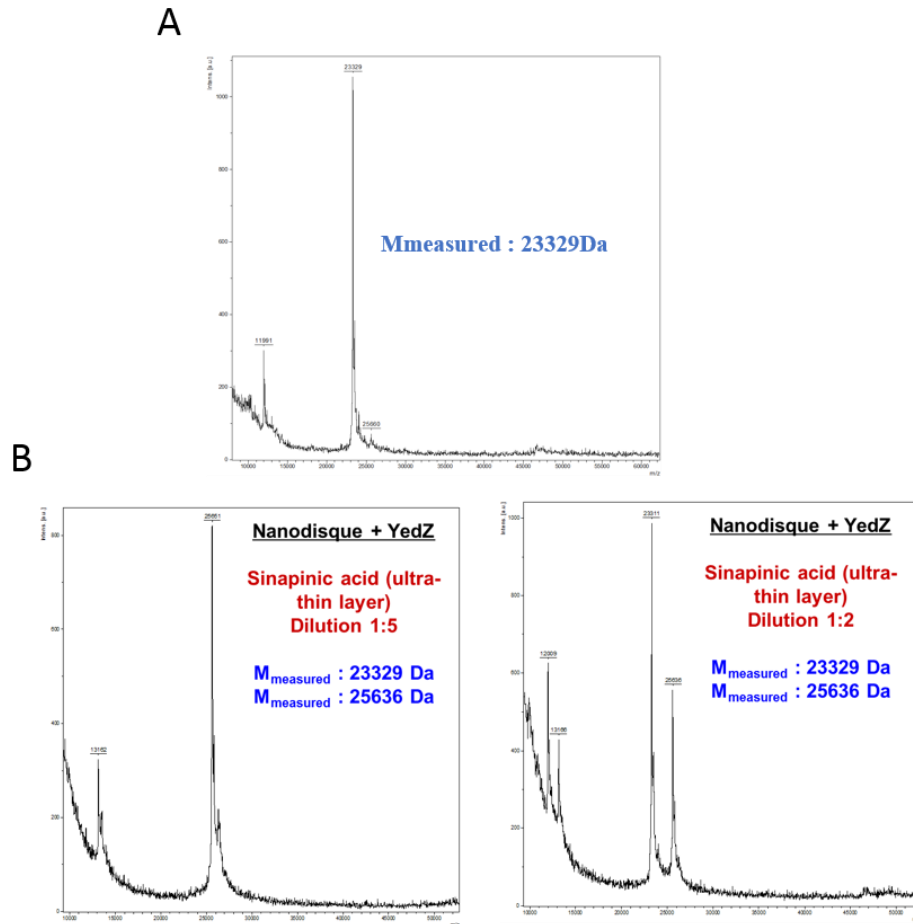


Figure IV-4 : Mesure par spectrométrie de masse de nanodisques YedZ A Mesure par MALDI TOFF, B Mesure par MALDI TOFF, avec la méthode "ultra thin layer", dilution de 1/5 (4,6 $\mu$ M) C Mesure par MALDI TOFF, avec la méthode "ultra thin layer", dilution de 1/2 (11,5 $\mu$ M)

En jouant sur la dilution de l'échantillon, le signal de la protéine MSP1 peut être masqué et seul le signal de la protéine membranaire est visible (Figure IV-4 B). Avec une dilution de 1/2, on observe deux pics, à 23329Da et 25636Da qui correspondent respectivement à la protéine MSP1 et YedZ. Avec une dilution de 1/5, on observe principalement le pic à 25636Da qui correspond à la protéine YedZ. L'effet de cette dilution n'est pas compris.

Avec cette méthode, nous disposons d'une technique efficace et nécessitant peu de matériel pour vérifier la présence d'une protéine membranaire dans des nanodisques.

Pour vérifier que la protéine est correctement repliée dans les nanodisques, des tests de réduction de l'hème ont été effectués. Ce test consiste à rajouter aux nanodisques YedZ le partenaire Fre, avec ses co-facteurs NADPH et FAD. S'il y a transfert d'électrons entre le fer contenu dans l'hème et Fre, la signature spectrale de l'hème va être différente. Une cinétique est réalisée en suivant l'absorbance à 427 nm, cette absorbance correspond au maximum d'absorbance des hèmes liés à l'oxygène.

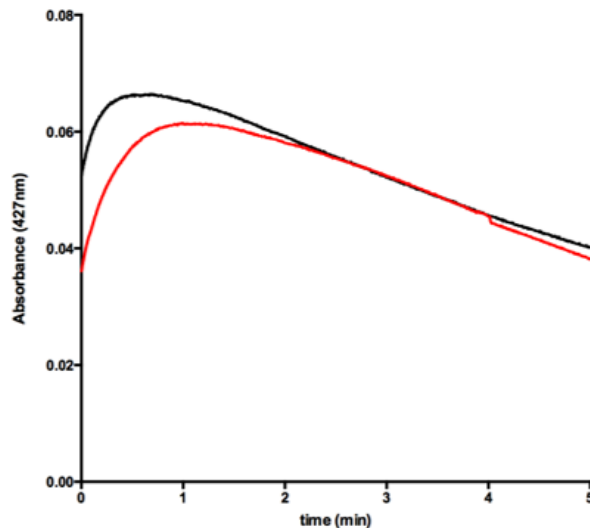


Figure IV-5 : Comparaison entre la réduction de l'hème avec la protéine YedZ solubilisée en détergent, Cymal5 (en rouge) et incorporée en nanodisques avec les lipides POPC (en noir).

Immédiatement après ajout des co-facteurs, l'absorbance à 427nm augmente rapidement, puis diminue. L'augmentation de l'absorbance est liée à l'oxydation de l'hème, alors que la décroissance de l'absorbance correspond à la réduction de l'hème.

On observe un décalage entre les courbes ascendantes, qui est dû au fait que le déclenchement de la réaction n'a pas été fait au même moment. Après deux expériences, la moyenne de la pente descendante est de  $-6,4 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  pour YedZ en détergent, et de  $-6,1 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  pour YedZ en nanodisques. Les valeurs des pentes ascendantes et descendantes sont voisines entre la protéine en détergent Cymal 5 et en nanodisques POPC (Figure IV-5). La vitesse de réduction de l'hème est donc identique dans les deux cas. Cette expérience a permis de vérifier que le transfert d'électron de la protéine YedZ en nanodisques est similaire à celle de la protéine en détergent.

#### IV.2.2. La problématique liée à l'Hème

Un des objectifs a été de caractériser la poche de fixation de l'hème pour la protéine YedZ. Cette protéine possède la particularité de ne pas coordonner ses deux hèmes avec 4 Histidines. Deux arginines sont suspectés d'interagir avec les hèmes. Afin d'étudier cette poche de fixation et déterminer l'importance des différents résidus de la poche, des mutants ont été précédemment purifiés (H151A, H91A, R78A) par A. Picchiochi. (équipe Fieschi, IBS)

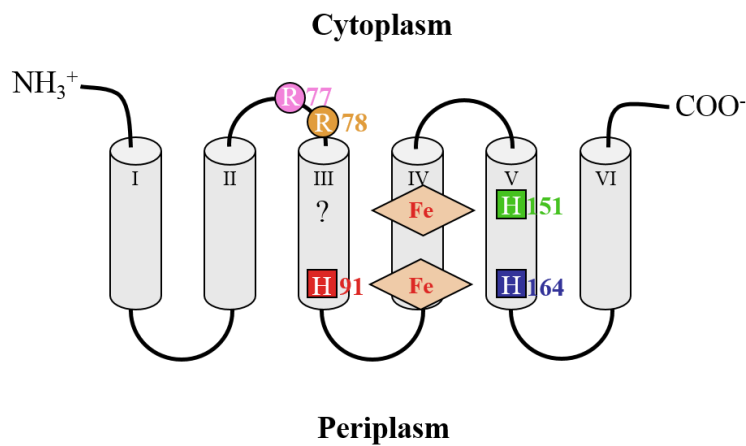


Figure IV-6 : Topologie prédite de la protéine YedZ, les losanges représentent la position des hèmes, les H représentent la position des histidines qui interagissent avec les hèmes, les R représentent les arginines qui pourraient interagir avec les hèmes (image provenant d'Antoine Picchiochi)

Pour comparer les différentes capacités de fixation de l'hème des différents mutants, la première étape a été de vérifier que toutes ces protéines sont incorporables dans les nanodisques. Les ratios utilisés entre les lipides, les protéines d'assemblage sont les mêmes que pour la protéine native. L'intégrité des nanodisques a été vérifiée par chromatographie d'exclusion de taille. (Annexe figure 4)

Une titration de l'hème a été effectuée avec la protéine YedZ incorporée dans des nanodisques (Figure IV-7 A).

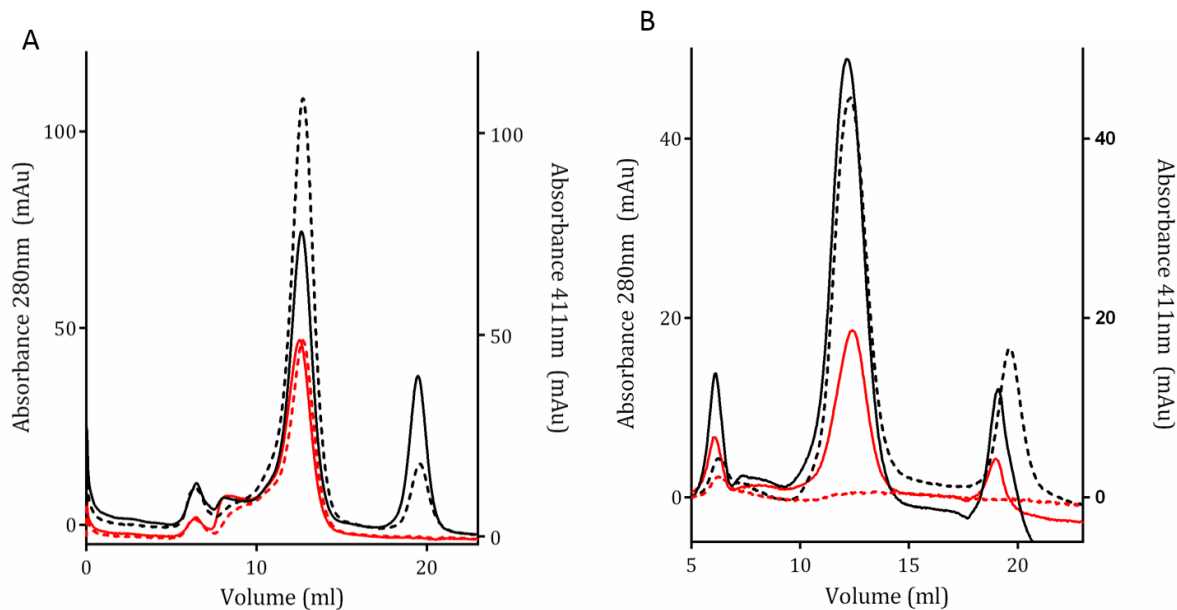


Figure IV-7 : Titration de l'hème avec YedZ A Chromatographie d'exclusion de taille, Superdex 200 10/300, nanodisques YedZ, en pointillé avant ajout de l'hème (5 $\mu$ M), en trait plein, après ajout de l'hème, en noir l'absorbance à 280nm, en rouge l'absorbance à 411nm. B Chromatographie d'exclusion de taille, Superdex 200 10/300, nanodisques vides, en pointillé avant ajout de l'hème (5 $\mu$ M), en trait plein, après ajout de l'hème, en noir l'absorbance à 280nm, en rouge l'absorbance à 411nm.

Pour les nanodisques YedZ (en pointillé) et les nanodisques YedZ auxquels est rajouté de l'hème (trait plein), des pics de chromatographie d'exclusion de taille sortent au même volume d'élution, 13mL, à la fois aux absorbances à 280 nm et à 411 nm. Ce pic correspond aux nanodisques formés avec des protéines YedZ incorporées. Le ratio d'absorbance 280/411 est plus faible dans le cas des nanodisques YedZ avec ajout d'hèmes. Il y a donc un enrichissement des nanodisques YedZ avec l'hème. Comme contrôle négatif, j'ai réalisé la même expérience mais avec des nanodisques vides. Après ajout de 5  $\mu$ M d'hème, un pic d'absorbance à 411 nm est détecté correspondant au pic d'élution des nanodisques vides (Figure IV-7 B). Un spectre d'absorbance de ces nanodisques a un pic majoritaire à 403 nm, caractéristique d'une interaction non spécifique (Donnée non montrée).

Afin de palier à l'interaction non spécifique entre les hèmes et les nanodisques, nous avons souhaité saturer le milieu d'hème pour enlever les hèmes qui interagissent de manières non spécifiques. Pour cela, nous avons utilisé la protéine hémophile HasA.

Cette protéine a la propriété d'interagir avec les hèmes<sup>139</sup>. Pour vérifier son efficacité, les nanodisques contenant YedZ sont incubés avec de l'hème libre, puis placés en présence de la protéine HasA. La protéine HasA et les nanodisques sont ensuite séparés grâce à une chromatographie d'exclusion de taille.

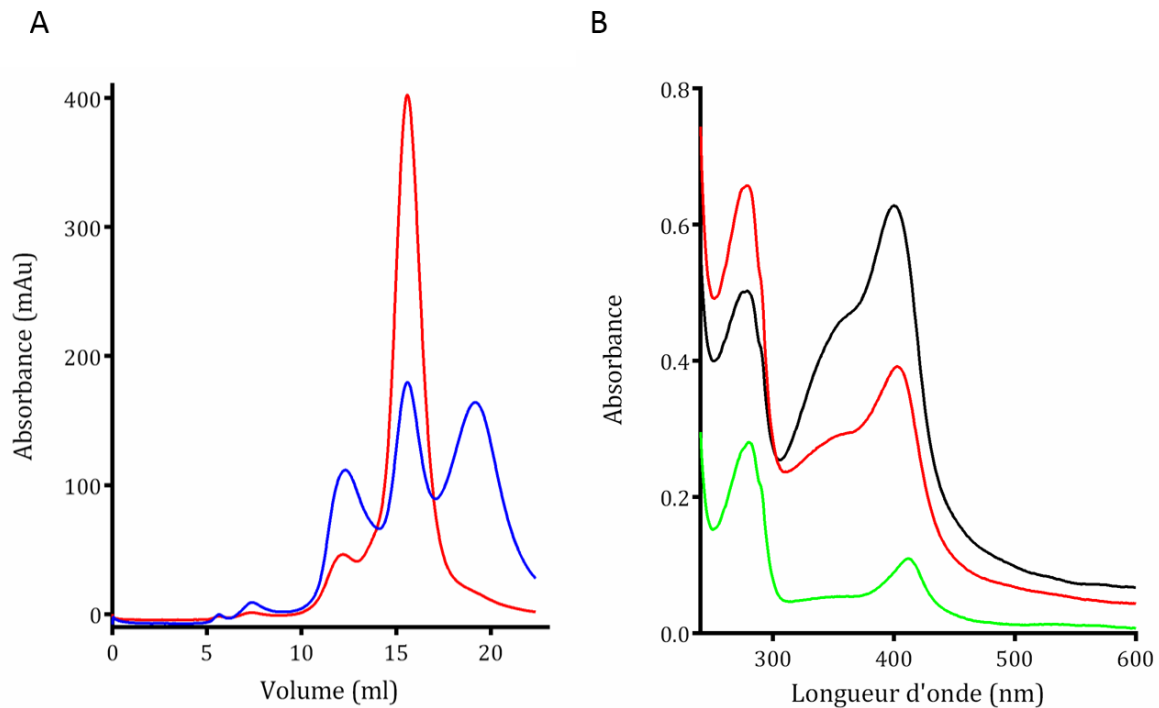


Figure IV-8 ; Elimination des hèmes grâce à la protéine HasA, A Chromatographie d'exclusion de taille Superdex 200 des nanodisques YedZ incubés avec de l'hémine (5 $\mu$ M) et de la protéine HasA, en rouge absorbance à 411nm, en bleu absorbance à 280nm. B Spectre d'absorbance des nanodisques dans les différentes conditions, en vert, les nanodisques YedZ initiaux, en noir après ajout de l'hème, en rouge après chromatographie d'exclusion de taille

Trois pics principaux sont observés à 280nm dans le chromatogramme présenté en A de la Figure IV-8, le premier pic à 12mL d'élution (environ 270kDa) correspond aux nanodisques contenant YedZ et le second à 16mL d'élution correspond à la protéine HasA seule. Le troisième pic localisé à la fin de la colonne correspond à des particules très petites, probablement pas des protéines. La colonne permet une bonne séparation des nanodisques et de la protéine HasA. Pour vérifier que l'élimination des hèmes libres est un succès, des spectres d'absorbances des nanodisques sont réalisés avant et après ajout de l'hème, et après la chromatographie d'exclusion de taille (Figure IV-8 B). Après ajout de l'hème, le pic dû à l'absorbance de l'hème est décalé à 403nm (courbe noire) à cause d'un excès d'hème libre qui se fixe de manière non spécifique aux nanodisques. Enfin, après la chromatographie d'exclusion de taille, l'absorbance des nanodisques

contenant YedZ due aux hèmes est décalée à 408nm (courbe rouge). L'absorbance n'est pas revenue au maximum de 411nm qui peut être observé avant l'ajout de l'hème (courbe verte), indiquant qu'il reste probablement des hèmes libres.

Le ratio 280/411 qui est supérieur à 1 après rajout de l'hème, redevient inférieur à 1 après la chromatographie d'exclusion de taille.

La protéine HasA permet donc de retirer les hèmes qui interagissent de manière non spécifiques avec les nanodisques. Il n'est pas exclu que la protéine HasA enlève aussi de l'hème correctement fixé dans la poche de fixation de la protéine. Des expériences complémentaires sont nécessaires, la différence d'absorbance de l'hème en fonction de sa fixation dans la poche catalytique est un bon outil pour vérifier s'il reste ou non des hèmes qui interagissent de manière non spécifique. Faire les mêmes expériences avec les mutants pourrait permettre de déterminer quelles sont les capacités de fixation des différents mutants, la perte d'hème pendant la purification ou l'incorporation serait compensée par cette technique.

#### **IV.2.3. Etude de l'interaction entre YedZ, Fre et YedY**

##### **2.3.a Expériences de pontage chimique**

Des expériences de pontages chimiques avaient été préalablement réalisées en détergent par l'équipe de F. Fieschi (Céline Jullian Binard, communication personnelle) afin de démontrer l'existence d'interaction entre YedZ et Fre et YedZ et YedY. Ces réactions de pontage chimique ont été réalisées avec de l'EGS (éthylène glycol bis(succinimidyl succinate)) qui permet de lier covalamment deux protéines, l'EGS permettant une réaction entre deux groupements amines.

Ces études ont mis en évidence une interaction entre YedZ et ses deux partenaires présumés. Comme expliqué dans l'introduction, les détergents peuvent être problématiques pour étudier les interactions entre protéines, soit parce que le manteau de détergent présent au niveau des parties transmembranaires peut être situé sur le site



d'interaction, soit par une interaction de molécules individuelles de détergent avec les sites d'interaction entre protéines.

Nous avons réalisé le même type d'étude en nanodisques, avec comme lipides du POPC. Afin de vérifier que l'EGS ne détruit pas les nanodisques, des chromatographies d'exclusion de taille sur une colonne de 3mL de résine ont été réalisées avec et sans l'agent chimique.

Une expérience avec les partenaires de YedZ, les protéines solubles Fre et YedY, a donc été réalisée.

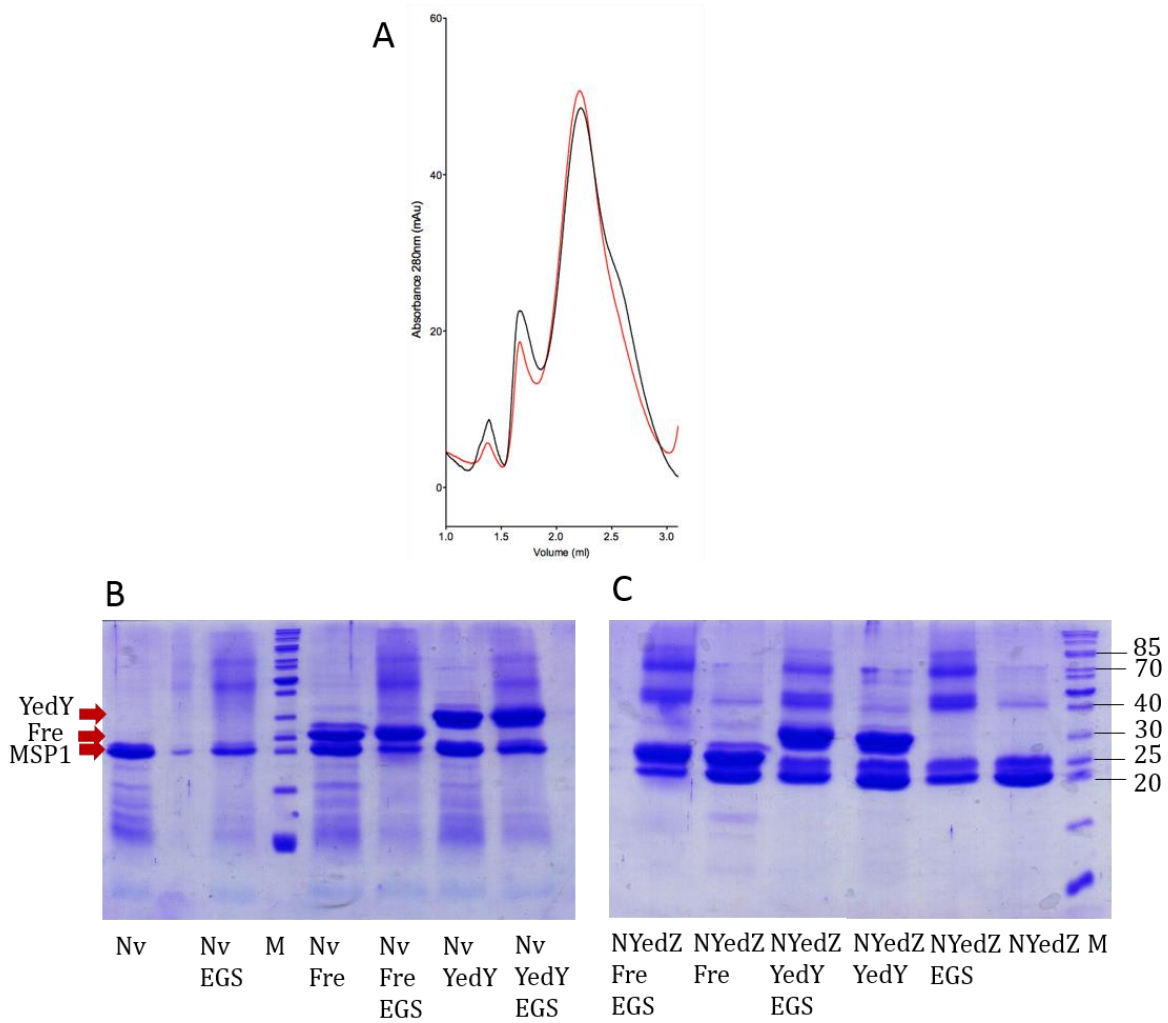


Figure IV-9 : Expériences de pontage chimique entre les nanodisques YedZ et Fre et YedY A Chromatographie d'exclusion de taille, Superdex 10/150. En noir, les nanodisques vides, en rouge les nanodisques incubés avec l'agent pontant EGS. B Gels SDS PAGE les expériences de pontage chimique avec les nanodisques vides, la concentration de protéine Fre et YedY est de 1mg/mL, 18,7 $\mu$ M pour les nanodisques vides C avec les nanodisques contenant YedZ, la concentration utilisée pour Fre et YedY est de 1mg/mL, 7,5 $\mu$ M pour les nanodisques YedZ

Le pic d'éluion présent dans l'échantillon contrôle à 1,6mL de volume d'éluion correspond à la taille des nanodisques (Figure IV-9 A). Lorsque l'EGS est ajouté et incubé pendant une heure, le pic d'éluion à 1,6mL est retrouvé après la chromatographie. Cela indique que l'intégrité des nanodisques est conservée après utilisation de l'EGS. Lorsque les nanodisques seuls sont chimiquement pontés, on observe deux bandes qui apparaissent à 50kDa et à 70kDa. Elles correspondent respectivement à deux MSP1 et à trois protéines MSP1 (Figure IV-9 A, Puits Nv, Nv EGS). Pour les contrôles avec les nanodisques vides mélangés avec Fre et YedY, on retrouve aussi ces deux bandes. Avec

les nanodisques contenant YedZ, on retrouve après incubation avec l'EGS les deux bandes caractéristiques d'un dimère et d'un trimère de MSP1. Si on les compare au contrôle, la bande à 50kDa est beaucoup plus intense, et on observe une diminution de la bande correspondant à YedZ, ce qui serait en faveur d'une dimérisation de YedZ. Cependant, il est aussi envisageable qu'il y ait des hétéro-dimères YedZ-MSP1, favorisés par la proximité entre ces deux protéines.

Quand les nanodisques YedZ sont incubés avec les protéines Fre et YedY, aucune nouvelle bande notable n'est visible (Figure IV-9 C). Le problème de cette expérience est que la masse de tous les partenaires est très proche, ce qui rend difficile l'interprétation de ces gels. Par exemple, la masse d'un dimère de MSP1 est sensiblement proche de celle du complexe Fre-YedZ.

Le pontage chimique ne détruit pas les nanodisques, mais les liaisons amines qui sont présentes avec les lipides POPC et la protéine MSP1 peuvent entraîner une grande variation de complexes. Ces réactions de pontages entre la protéine et les lipides pourraient expliquer la présence d'un bruit important quand les nanodisques sont incubés avec l'EGS. Cette méthode ne semble pas la plus adaptée pour étudier l'interaction de YedZ avec ses partenaires en nanodisques.

### **2.3.b Expériences de résonance plasmonique de surface**

Pour étudier l'interaction entre YedZ et les protéines Fre et YedY, nous avons alors envisagé la technique de résonance plasmonique de surface.

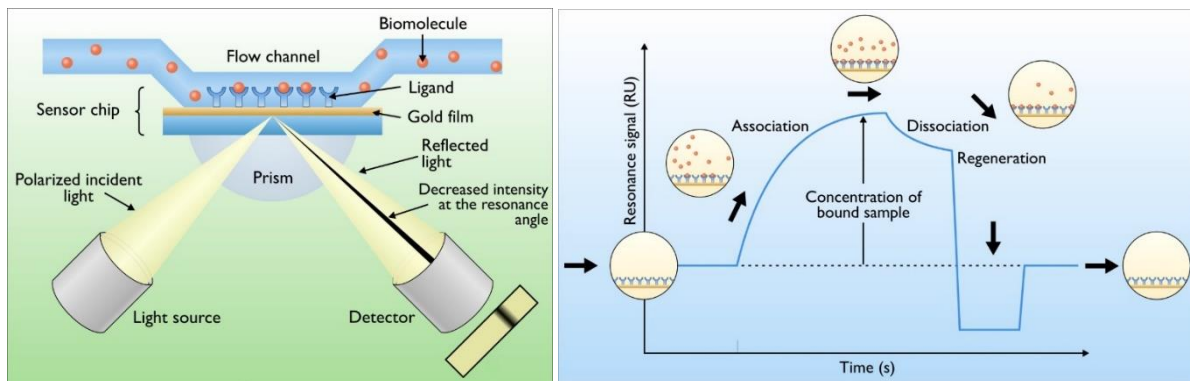


Figure IV-10 : Représentation de la technique de résonance plasmonique de surface. A Schéma représentant une expérience de résonance plasmonique de surface. B Réponse caractéristique d'une interaction

La résonance plasmonique de surface permet de mesurer l'interaction entre une protéine fixée sur une surface et un ligand qui est dans une solution mise au contact de la surface. Une source lumineuse est réfléchi sur un film d'or sur lequel est posée la surface avec la protéine fixée. Lorsque le ligand se fixe, cela va modifier la réflexion de la lumière, et c'est ce qui va être mesuré lors d'une interaction. Après l'association qui entraîne une augmentation de la réponse, le lavage de la surface entraîne une phase de dissociation où des ligands se décrochent. Pour réutiliser la surface, tous les ligands doivent être dissociés de la protéine. Pour trouver la condition idoine pour régénérer la surface, des solutions variées sont testées (acide, basique, concentrée en sels). La difficulté est de trouver des conditions qui permettent de régénérer la surface mais sans endommager les protéines qui y sont fixées.

La surface utilisée est la surface CM5 qui est composée de fonction carbonyle. La surface est fonctionnalisée avec le réactif N-hydroxysuccinimide (NHS). Un autre réactif est ajouté, 1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC), avec la protéine Fre ou YeY, ce qui permet de fixer les protéines à la surface de façon covalente par leurs groupements amines.

Les protocoles de fixation des protéines Fre et YedY ont été mis au point par l'équipe de Frank Fieschi, IBS. Les nanodisques contenant YedZ ont été utilisés comme analytes.

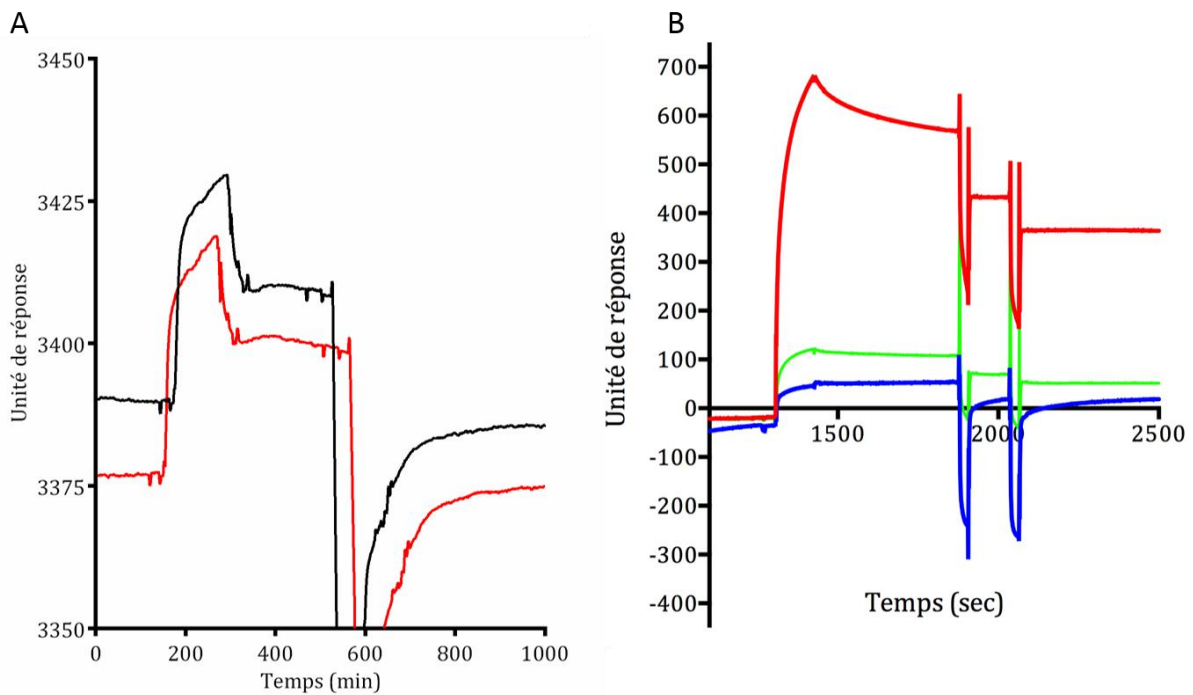


Figure IV-11 : Réponse mesurée d'expériences de résonance plasmonique de surface, A. passage de nanodisques vides ( $10\mu\text{M}$ ) sur une piste avec YedZ fixés sur une surface CM5 (environ 2000 Unité de réponse de greffe). En noir premier passage, en rouge deuxième passage. B. passage de nanodisques YedZ, en rouge une piste avec YedY fixée (environ 4000 Unité de réponse de greffe), en vert une piste avec YedY fixé, (environ 2000 Unité de réponse de greffe), en bleu une piste avec Fre fixée (environ 2000 Unité de réponse de greffe),  $1,4\mu\text{M}$  de nanodisques YedZ ont été injectés

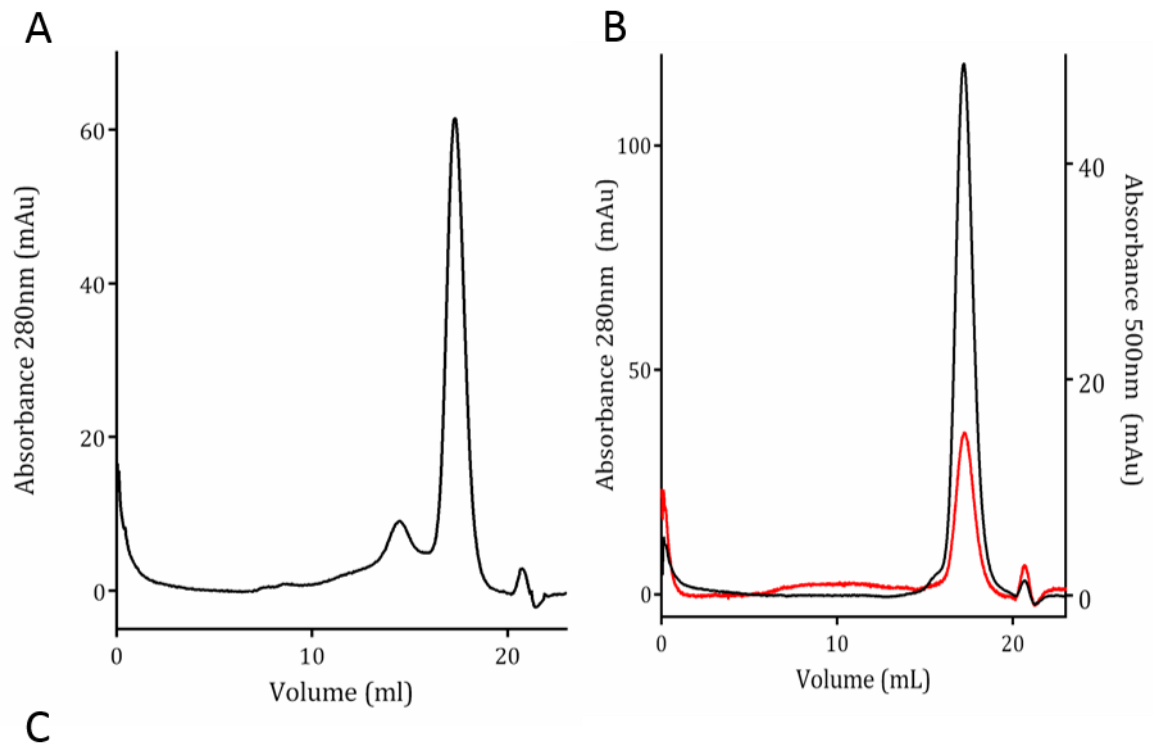
Lorsque les nanodisques vides sont passés sur une surface CM5 avec YedY fixé (Figure IV-11 A courbe noir) avec une concentration 10 fois plus importante que pour les nanodisques avec YedZ, une augmentation faible est observé (environ 40 unité de réponse). Le repassage de nanodisques vides donne lieu à une réponse similaire (courbe rouge). Lors de l'injection des nanodisques YedZ, il y a une augmentation de la valeur de réponse suite à la fixation des nanodisques YedZ. Une fois l'injection finis, une décroissance due au décrochage d'une partie des nanodisques est mesuré (Figure IV-11 B, courbe rouge et verte). La quantité de protéine YedY fixé est plus importante pour la piste rouge que pour la piste verte. Pour la protéine Fre, la réponse est moins importante et pourrait être dû à une interaction non spécifique, aucune dissociation n'est observé (Figure IV-11 A, courbe bleue). La différence d'intensité de la réponse après injection des nanodisques vides (Figure IV-11 A) et les nanodisques YedZ (Figure IV-11 B, courbe verte) semblent indiquer une interaction entre YedZ et YedY. En effet la réponse lorsque YedY est fixé est de plus de 100RU, alors qu'elle est d'environ 40RU

pour les nanodisques, avec une concentration 10 fois plus importante. Cependant cette expérience, répétée 3 fois, n'a jamais permis de retrouver une réponse suffisante pour pouvoir déterminer des constantes d'affinité. L'autre problème que nous avons rencontré est une régénération insuffisante de la surface après passage de tampon divers (acide, base, force ionique). Une solution serait d'utiliser une approche de type « single cycle kinetics », qui permet de s'affranchir de l'étape de régénération.

### **2.3.c Spectrométrie de masse native**

L'objectif de cette approche était aussi de caractériser le complexe formé par les protéines YedZ, YedY et Fre. Cette technique consiste à injecter le complexe par électro spray, puis de casser le complexe dans une chambre contenant du gaz. On peut ici obtenir la masse de chaque élément, puis la masse totale et la stœchiométrie du complexe.

Un des pré-requis pour pouvoir faire ces mesures est d'éliminer les sels contenus dans l'échantillon, car ils entraînent un bruit très important. Les échantillons ont donc été transférés dans un tampon adéquat, l'acétate d'ammonium, à 0,2M. Nous avons vérifié que les protéines solubles YedY et Fre sont stables dans ce tampon, puis comme contrôle, la masse de chaque composant a été mesurée individuellement par spectrométrie de masse, en utilisant la technique de MALDI TOFF (Figure IV-12). La spectrométrie MALDI TOFF consiste à sécher un échantillon sur une matrice. L'échantillon sera ionisé par un laser et le temps de vol de l'échantillon est mesuré.



Echantillons	Masse observé (Da)	Masse théorique (Da)	Masse deviation (Da)	Masse précision (ppm)	Observations
YedZ	32670,0 32850,8 33063,4	33382,11	26 17	808 525	Fragments possible : Sequence 1-291, 1-292, 1-294
Fre	15166,2 11489,7 7926,7	26110,85			Les masses ne correspondent pas

Figure IV-12 ; Caractérisation des protéines Fre et YedY **A**. Chromatographie d'exclusion de taille avec une colonne superdex 200 10/300 avec un tampon 0,2M acétate d'ammonium, de la protéine Fre **B**. Chromatographie d'exclusion de taille de la protéine YedY, avec un tampon 0,2M acétate d'ammonium. En noir, l'absorbance à 280nm, en rouge, l'absorbance à 500 nm **C**. Mesure par spectrométrie de masse MALDI TOFF des protéines YedY et Fre

Les chromatographies d'exclusion de taille des protéines YedY et Fre montrent qu'il n'y a pas de pic dans les volumes morts des colonnes, correspondant à des agrégats (Figure IV-12 A et B). Les protéines sont donc stables en acétate d'ammonium. Cependant les mesures MALDI TOFF montrent que plusieurs masses sont présentes pour les deux protéines (Figure IV-12 C). Ces variations vont considérablement augmenter la complexité de l'analyse des spectres mesurés lors des expériences de spectrométrie de masse native.

Malgré la présence de plusieurs espèces des différents partenaires, des expériences de spectrométrie de masse native ont été conduites pour voir le complexe entre YedZ, YedY et Fre (collaboration Elisabetta Boeri Erba, IBS).

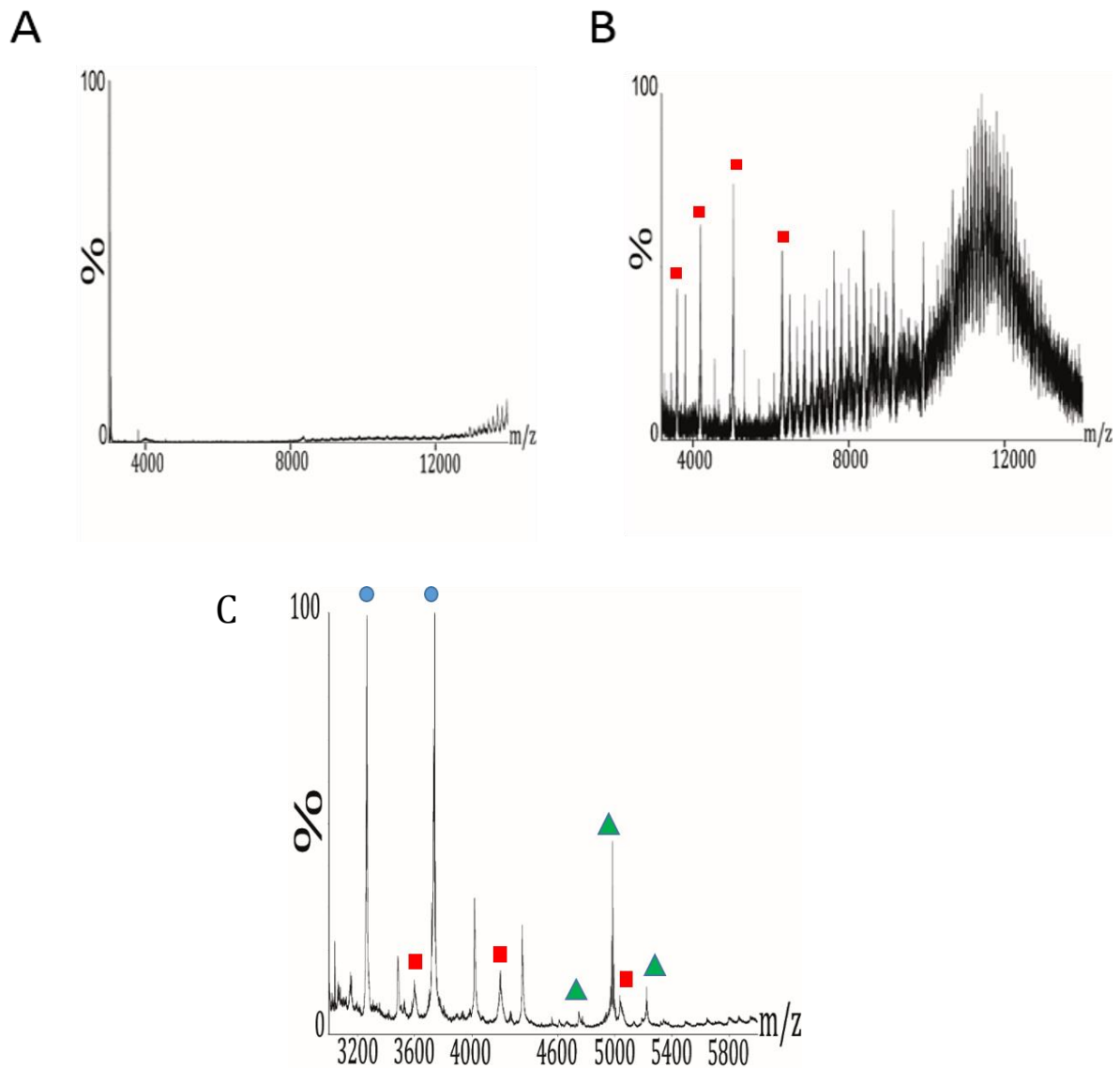


Figure IV-13 : Essai de caractérisation du complexe YedZ/Fre/YedY A Spectre de spectrométrie de masse native des nanodisques vides B Spectre de spectrométrie de masse native des nanodisques YedZ. C Spectre de spectrométrie de masse des nanodisques YedZ avec Fre., Les carrés rouges correspondent aux pics venant du spectre de nanodisques avec YedZ, les cercles bleus correspondent aux pics venant de la protéine Fre. Les triangles verts sont au-dessus des pics qui n'étaient pas dans les spectres des nanodisques YedZ et des spectres de Fre.



Pour les nanodisques vides, aucun pic n'est observé qui pourrait correspondre à la masse de YedZ. (Figure IV-13) Plusieurs pics sont mesurés avec les nanodisques YedZ, et plusieurs pics ont la masse de YedZ, correspondant à différents états d'ionisation est présent (Figure IV-13 A, carrés rouge).

Lorsque l'on ajoute la protéine YedY aux nanodisques YedZ, le profil obtenu est superposable avec celui obtenu avec les nanodisques YedZ seuls. Aucun nouveau pic n'est observé dans ce cas. Un complexe comprenant YedY et YedZ n'est pas observé. À l'inverse, après ajout de la protéine Fre, un pic ayant la masse de la protéine Fre et de la protéine YedZ est observé (Figure IV-13 B). Toutefois, nous n'avons pas pu reproduire l'expérience pour l'interaction YedZ et Fre de façon très fiable.

Le complexe YedZ, Fre et YedY n'a pas pu être déterminé avec cette méthode de spectrométrie de masse native. Une optimisation des conditions de purification des protéines Fre et YedY est nécessaire afin d'avoir un signal moins bruité et plus facilement interprétable.

### **IV.3. Etude de la protéine SpNox**

Tous les travaux sur la protéine SpNox ont été réalisés en collaboration avec Jérôme Dupuy (IBS). La protéine SpNox a été purifiée soit en DDM, soit en MNG3.

#### **IV.3.1. Incorporation dans des nanodisques**

Le ratio utilisé pour faire les nanodisques MSP1/POPC avec SpNox est le même que celui utilisé pour faire les nanodisques avec YedZ, partant du principe que le comportement de SpNox devrait être proche de celui de YedZ étant donné l'homologie entre les deux protéines. Pour les nanodisques le ratio MSP1/extrait de lipides d'*E.coli* utilisé est 1/60.

Après assemblage, les nanodisques sont séparés des agrégats grâce à l'utilisation d'une chromatographie d'exclusion de taille (Figure IV-14).

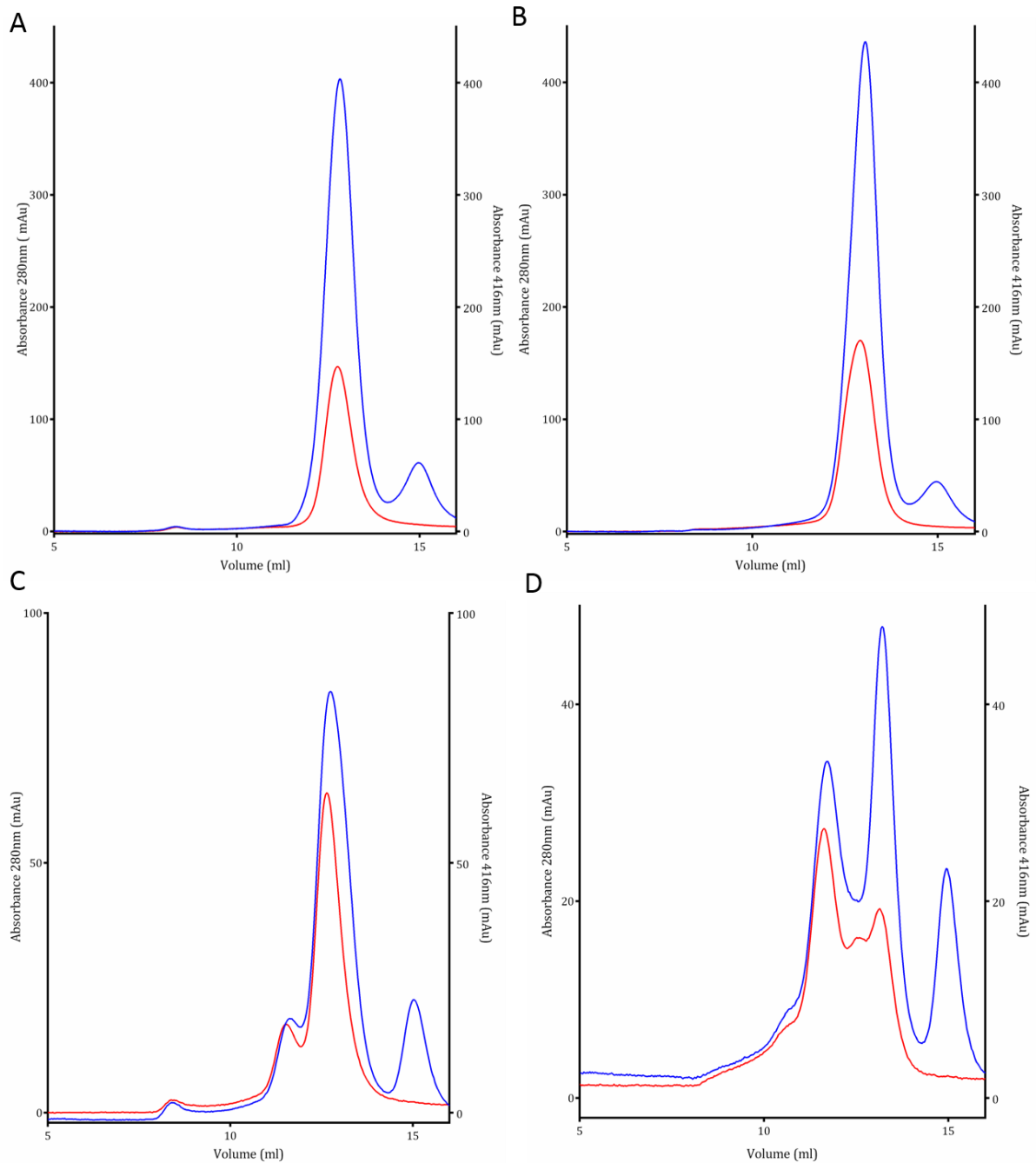


Figure IV-14 : Purification des nanodisques SpNox Chromatographie d'exclusion de taille des préparations de nanodisques SpNox, en bleu absorbance à 280nm, en rouge absorbance 416nm. A et C à partir de la protéine solubilisée en MNG3, B et D à partir de la protéine solubilisée en DDM, A et B. Utilisation des lipides POPC, C et D. Utilisation des extraits de lipides de E.coli

La chromatographie d'exclusion des nanodisques formés avec le POPC présente deux pics principaux (Figure IV-14, A et B), un pic à 15mL de volume d'éluion correspond à la protéine MSP1 seule, et un pic à environ 13mL qui correspond à la taille de nanodisques.

Le pic en rouge à 13mL environ de volume d'élution (environ 160kDa) correspond à l'absorbance à 416nm des hèmes. La co-élution de molécules absorbant à 280nm et à 416nm, à 13mL indique une bonne incorporation de la protéine SpNox dans les nanodisques.

Pour les nanodisques réalisés avec les lipides extraits *d'E.coli*, deux profils très différents sont observés. Les nanodisques assemblés à partir de la protéine solubilisée en DDM ont plusieurs tailles apparentes. La courbe d'absorption à 280nm présente trois pics principaux, un à environ 12mL correspondant à des nanodisques d'environ 266kDa, un à environ 13mL qui correspond à la taille d'un nanodisque avec deux MSP1 par particules, et le dernier pic à 15mL correspondent à la protéine MSP1 seule sous forme monomérique. Ce pic indique que la présence de nanodisques de taille plus importante n'est pas dû à un excès lipidique. En effet, lorsque il y a un excès de lipides, il y a présence de particules de taille plus importante que la taille des nanodisques, mais il n'y pas la présence de la protéine seule. Dans cette même chromatographie d'exclusion de taille, la courbe d'absorption à 416nm présente trois pics, correspondant en particulier aux pics d'élution à 12mL et 13mL; ces pics contiennent des nanodisques ayant incorporés la protéine SpNox. A environ 12,5mL de volume d'élution, le troisième pic ne correspond pas clairement à une absorption à 280nm. La présence de ce pic serait en faveur de l'existence d'une troisième taille de nanodisques, ou de nanodisques contenant plus d'un SpNox (environ 207kDa).

Pour les nanodisques assemblés à partir de la protéine SpNox solubilisée avec le détergent MNG3, le profil à 280nm présente trois pics correspondant aux mêmes volumes d'élution que pour la chromatographie précédente. L'intensité relative des pics est cependant différente, le maximum à 12mL est environ cinq fois plus petit que celui à 13mL, alors que pour le chromatogramme précédent, le rapport est plus proche de deux. Une hypothèse pour la différence entre les deux préparations est que le MNG3 défavorise l'oligomérisation de la protéine SpNox, ce qui expliquerait que l'on voit moins de nanodisques plus gros.

### IV.3.2. Test d'activité

La protéine SpNox permet de transporter les électrons de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur. Ces électrons vont former de l' $O_2^-$ , qui en présence de cytochrome c oxydé, va transmettre un électron à celui-ci, et va le réduire (Figure IV-15 A). Les signatures spectrales du cytochrome C oxydé et celle du cytochrome C réduit sont complètement différentes (Figure IV-15 B). Le cytochrome C réduit présente un pic d'absorbance caractéristique à 558nm, dans les bandes de Soret. On peut ainsi suivre la réduction du cytochrome C en mesurant l'absorbance à 550nm en fonction du temps. Une représentation de la réduction du cytochrome C en fonction du temps est présentée sur Figure IV-15 C.

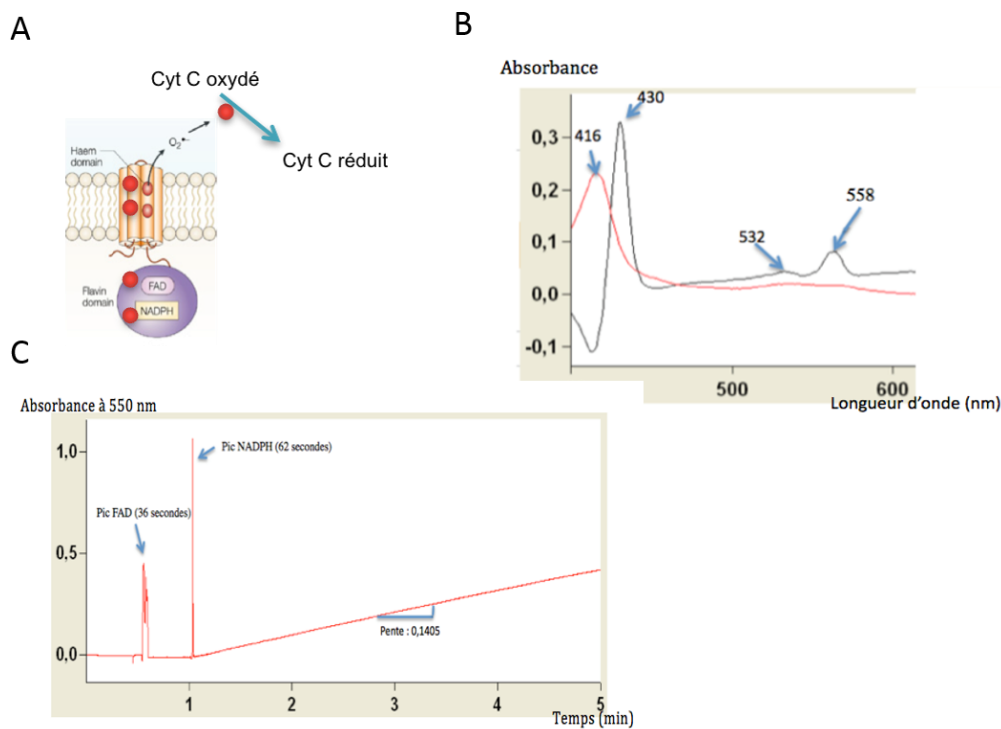


Figure IV-15 : Activité de la protéine SpNox A Schéma représentant le complexe NADPH et la réduction du cytochrome C B Spectre d'absorbance du cytochrome C, en rouge lorsqu'il est réduit, en noire, la différence entre le spectre réduit et le spectre oxydé. C Mesure de l'activité de la protéine SpNox en suivant l'absorbance à 550nm correspondant à la réduction du cytochrome C

Un pic est présent lors de l'ajout du FAD dans le mélange réactionnel à 36 secondes, correspondant à l'ajout du FAD dans le mélange réactionnel. Aucune réduction du Cyt C n'est observée. Lors de l'ajout du NADPH à 62 secondes, une augmentation linéaire de l'absorbance est observée à 550nm, qui correspond à la réduction du Cyt C, en utilisant

le NADPH comme donneur d'électron. L'activité est calculée en déterminant la pente de la droite. L'activité de la protéine SpNox en liposomes et en nanodisques a été mesurée et comparée en normalisant avec l'activité de la protéine en détergent (DDM ou MNG3). Pour calculer l'activité spécifique de la protéine SpNox lorsqu'elle est insérée en nanodisques, les hèmes contenus dans les nanodisques ont permis de connaître la quantité de protéine.

Solubilisation de SpNox	MNG3	ND Lipides POPC	ND Lipides <i>E. coli</i>	DDM	ND Lipides POPC	ND Lipides <i>E. coli</i>	Liposomes POPC
Activité (%)	100	92	262	100	78	382	4

*Tableau IV-1 : Comparaison de l'activité de SpNox en environnement lipidique et en détergents Tableau comparatif des différentes activités mesurées de la protéine SpNox, dans le cadre bleu, la protéine SpNox a été solubilisée dans le détergent MNG3, dans le cadre rouge, la protéine SpNox a été solubilisée dans le détergent DDM. (ND correspond à nanodisques)*

L'activité de la protéine reconstituée en liposomes POPC est quasiment nulle comparée à l'activité de la protéine en détergent (Tableau IV-1). L'activité de la protéine en nanodisques étant égale ou supérieure à l'activité de la protéine en détergent, la reconstitution de la protéine en nanodisques permet à la protéine d'avoir a priori une conformation plus favorable à son activité.

L'activité de la protéine dans les nanodisques réalisés avec le POPC est similaire ou légèrement inférieure à celle de la protéine en détergent. En revanche, la protéine contenue dans les nanodisques contenant les extraits de lipides d'*E.coli* possède une activité beaucoup plus importante que la protéine en détergent, jusqu'à environ 4 fois plus d'activité pour le cas des nanodisques assemblés à partir de protéine solubilisée en DDM. La composition lipidique est la seule différence entre les nanodisques avec du POPC et ceux avec les extraits lipides d'*E.coli*. La protéine a donc besoin de certains lipides d'*E.coli* pour avoir une activité optimale. Ces lipides sont un mélange de POPE (67%), POPG (23,2%) et de cardiolipide (9,8%). Comme beaucoup de protéines

membranaires, il est possible que SpNox ait besoin de lipides chargés pour avoir une activité maximale.

#### **IV.3.3. Cristallogenèse par diffusion de vapeur**

La bicouche lipidique étant très dynamique, on peut s'attendre à ce que la dynamique des lipides influe sur la qualité de la diffraction d'un cristal composé de nanodisques. Avec des nanodisques contenant des protéines membranaires, le ratio protéique/lipide augmente. Si des contacts cristallins se font entre les protéines membranaires, on peut espérer que cela stabilise l'assemblage cristallin et limite la diffusion de la protéine membranaire dans les nanodisques.

Des expériences de cristallogenèse ont été réalisées sur la plateforme HTX de l'ISBG. 576 conditions ont été testées, à partir de kits commerciaux (wizard I + II Rigaku, JCSG, Classics suite Qiagen, PEGs I Quiagen, MemGold Molecular Dimensions).

L'échantillon était à une concentration de 1mg/mL pour la protéine SpNox. Comme dans la partie III.2.5, les expériences ont été réalisées en présence de lanthanides. Les cristaux ont pu être manuellement reproduits dans l'équipe d'Eric Girard (étudiant en thèse Sylvain Engilberge).

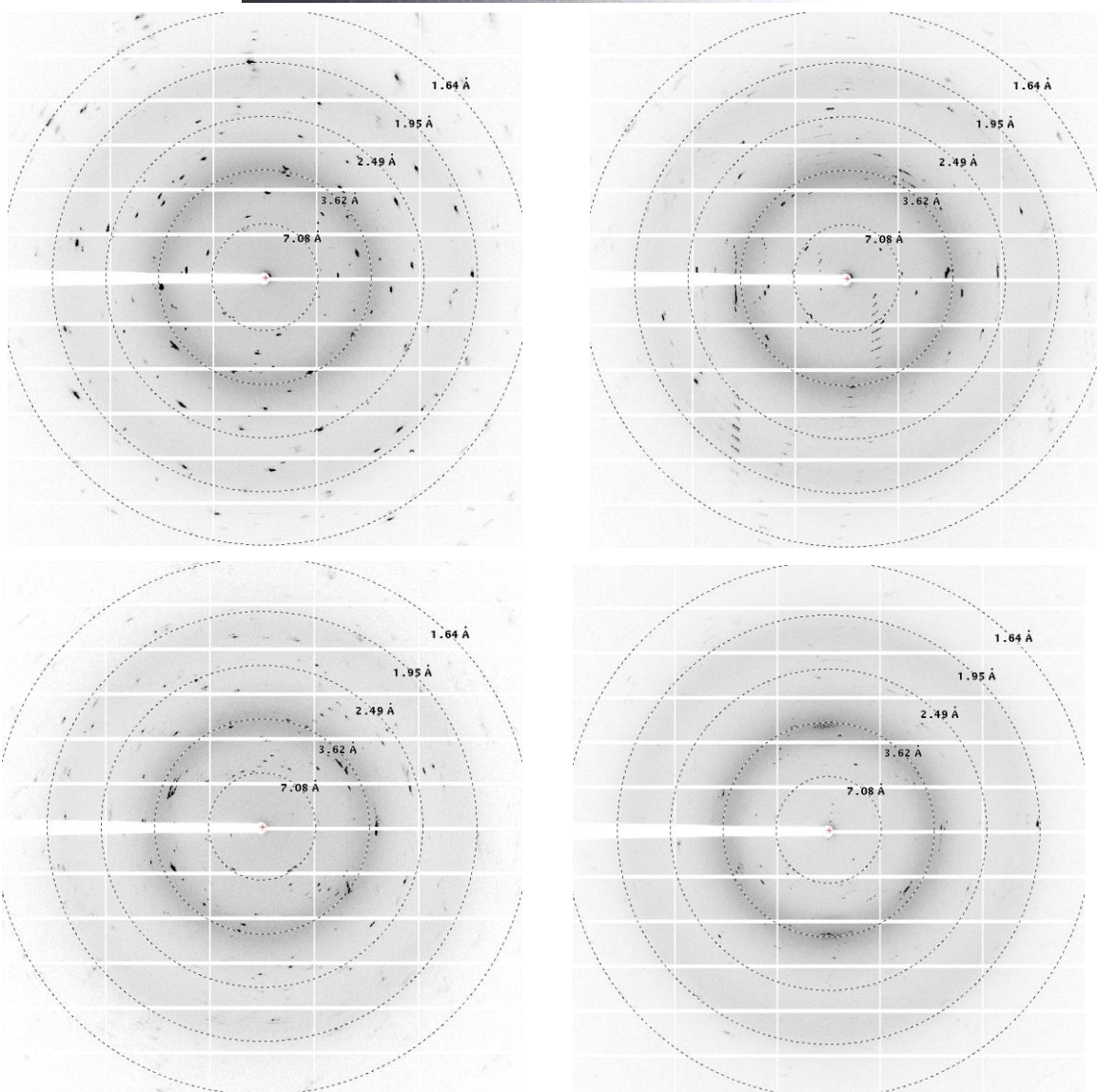
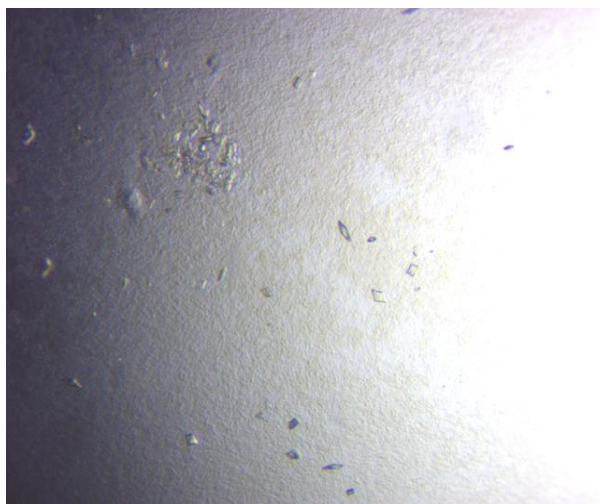


Figure IV-16 : Cristaux de nanodisques YedZ, dans la condition 2-méthylpentanediol (MPD), 100 mM imidazole reproduits et clichés de diffractions

Les cristaux ont été testés sur la ligne ID29. Les clichés de diffraction ne correspondent à priori pas à la diffraction de la protéine SpNox (Figure IV-16) L'espacement de tâches mesurés ont une taille compatible avec une bicouche lipidique (environ 4,5nm). Cela est en faveur de la présence de bicouche lipidique. Pour la participation des protéines d'assemblage, des tâches sont observés à basse résolution, allant dans le sens de la présence de la protéine MSP1.



#### IV.4. Discussion

Les protéines YedZ et SpNox ont été incorporées avec succès dans des nanodisques. Pour la détermination de l'existence d'un complexe Fre/YedY/YedZ, les approches de pontage chimique n'ont pas permis de confirmer avec certitude les interactions entre les protéines à cause peut-être des tailles proches entre toutes ces protéines. Les expériences de résonance plasmonique de surface semblent indiquer une interaction entre YedZ et YedY, mais l'absence de reproductibilité de l'expérience et le manque de données pour déterminer les constantes d'affinité rend l'interprétation des résultats impossible. Les expériences de spectrométrie de masse native semblent indiquer l'existence d'une interaction entre YedZ et Fre. Cependant, de même que pour la SPR, l'absence de reproductibilité des expériences empêche l'interprétation des résultats. Pour établir l'existence des interactions, les expériences de résonance plasmonique de surface pourraient être reconduites, en utilisant la méthode de « single cycle kinetic », pour éviter le problème de la régénération de la surface. Les expériences de spectrométrie de masse native pourraient aussi être poursuivies si le problème de l'inhomogénéité des protéines YedY et Fre pouvait être réglé en amont.

Pour les études structurales, le choix de la protéine à cristalliser s'est porté sur la protéine SpNox pour deux raisons : la première étant que la formation de nanodisques est plus homogène qu'avec YedZ et le rendement est meilleur. La seconde est que SpNox possède un domaine extra membranaire important, ce qui pourrait permettre de former des contacts cristallins entre les protéines membranaires. Des cristaux ont été obtenus par diffusion de vapeur.

## V. Etude structurale de transporteurs ABC: BmrA et BceB-RS

### V.1. Introduction

Les transporteurs ABC (« ATP-binding Cassette ») sont responsables de l'import ou de l'export de nombreux substrats (lipides, cations, sucres, peptides, acides aminés) dont la plupart sont essentiels pour la survie des cellules. L'hydrolyse de l'ATP permet de fournir l'énergie nécessaire pour le transport.

Dans le cadre de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressé à deux protéines de cette superfamille, BmrA et BceB-RS, exportateurs bactériens impliqués dans des résistances aux antibiotiques.

Les exportateurs ABC sont composés de trois parties, la partie transmembranaire (TMD pour TransMembrane Domain), qui compte généralement 6 hélices transmembranaires, les domaines de liaison aux nucléotides où se fixent l'ATP (NBD pour Nucleotide Binding Domain), et un domaine intracellulaire (ICD pour IntraCellular Domain) qui fait la jonction et la communication entre le TMD et le NBD. L'unité fonctionnelle des transporteurs ABC est composée de 4 domaines, deux TMD et deux NBD.

Plusieurs structures de transporteurs ABC ont été résolues par cristallographie aux rayons X<sup>140</sup>. Ces structures ont été obtenues en présence ou absence de nucléotides liés aux domaines NBD. La protéine Sav1886 a été cristallisée et la structure résolue à une résolution de 3Å en présence de d'ADP liés sur les domaines NBD<sup>141</sup>. Des structures ont aussi été obtenues en absence d'ADP, avec les domaines NBD qui restent en contact<sup>3</sup>. Cette observation structurale a amené une proposition de mécanisme, où dans l'état de repos de la protéine les NBD restent associés ensemble. Dans ce modèle, l'écartement du domaine ICD est suffisant pour permettre le passage des différents substrats (

Figure V-1).

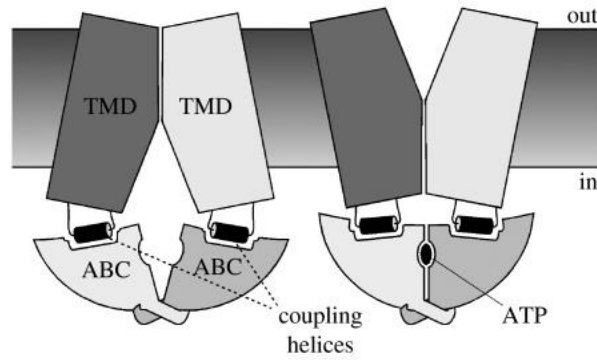


Figure V-1 : Mécanisme de fonctionnement proposé pour les transporteurs ABC<sup>142</sup>

Cependant d'autres structures ont été résolues en absence de nucléotides, où les domaines NBD sont écartés l'un de l'autre. C'est le cas pour la protéine Pgp<sup>143</sup> et la protéine MsbA<sup>144</sup>. Un autre mécanisme est proposé, avec tout d'abord la fixation d'un ligand qui va entraîner la fermeture de la protéine. L'ATP va ensuite se fixer sur les NBD, et la protéine va changer de conformation, l'ouverture de la protéine se faisant alors vers le milieu extérieur. Cela permet au ligand de partir vers le milieu extérieur. L'hydrolyse de l'ATP permet la dissociation des NBD, et donc le retour à l'état de repos de la protéine (Figure V-2 B).

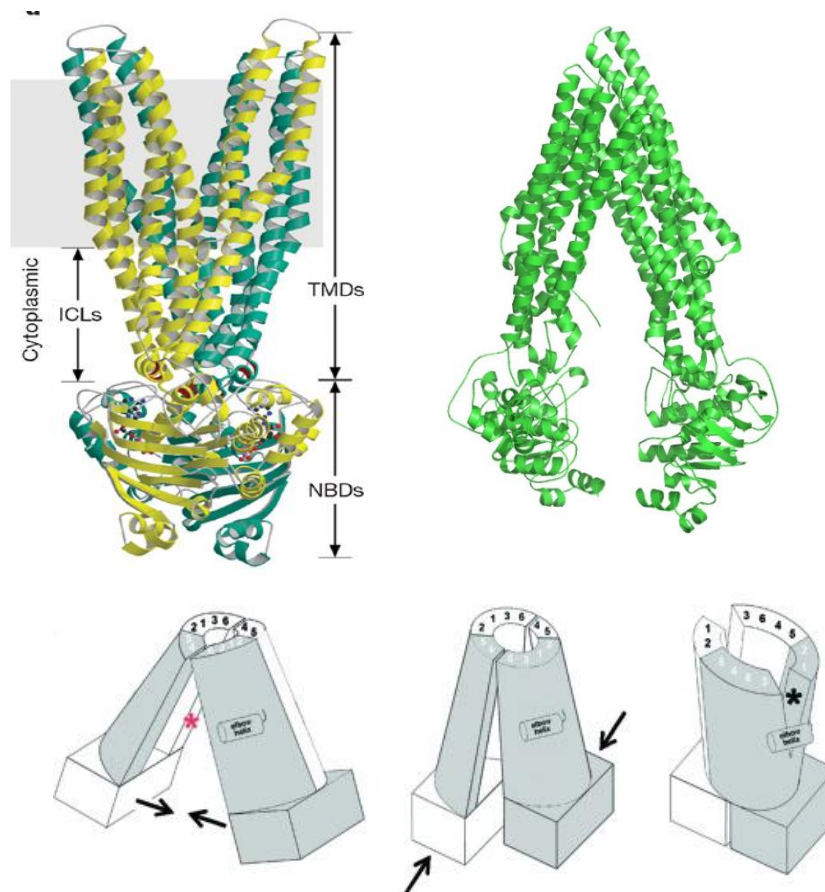


Figure V-2 : Mécanisme d'action des transporteurs ABC, En haut à gauche, structure de Sav1866 avec un nucléotide lié, En haut à droite, structure de MsbA, En bas, mécanisme d'action proposé basé sur la structure de MsbA

BmrA est une protéine homodimerique de *Bacillus Subtilis*. Elle a été choisie comme protéine modèle pour répondre à cette question sur le mécanisme des transporteurs ABC. Cette protéine possède la propriété de former une structure en anneau, appelée roulette, lorsqu'elle est en présence de lipide et de détergent à une concentration inférieure à la cmc. Ces roulettes ont été étudiées avec la microscopie électronique<sup>145-146</sup>. Deux conformations sont observées grâce à la microscopie électronique, une conformation ouverte et une conformation fermée. Cependant, malgré la présence de lipides, les conformations ne sont pas observées dans un environnement natif. Des travaux récents, sur les protéines PgP et MsbA, solubilisée grâce à un nouveau peptide solubilisant en feuillet bêta, montre une coexistence des conformations ouvertes et fermées<sup>147</sup>.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai cherché à étudier les conformations que peut prendre la protéine BmrA native dans un environnement lipidique. Pour aider l'analyse de la protéine native, nous avons utilisé deux mutants, qui permettent de bloquer la protéine en conformations ouvertes ou fermées. Le premier mutant, BmrA E504Q est bloqué en conformation fermée en présence de magnésium et d'ATP. A l'inverse, le mutant BmrA T123C E468C permet de bloquer la protéine en conformation ouverte où les domaines de liaison aux nucléotides, dans le cadre de notre hypothèse, ne seraient pas en contact.

## V.2. Etude de la protéine BmrA

### V.2.1. Incorporation dans des nanodisques

La protéine BmrA sauvage et les mutants BmrA E504Q et BmrA T123C E428C sont insérés dans les nanodisques selon le même protocole décrit dans la partie Matériel et Méthodes. Les protéines purifiées en DDM sont mélangées aux lipides et à MSP1E3D1 puis après l'étape d'assemblage l'échantillon est purifié par chromatographie d'affinité afin d'éliminer les nanodisques vides (Figure V-3A). Les nanodisques contenant BmrA sont élués de la colonne puis analysés par chromatographie d'exclusion de taille (Figure V-3 B)

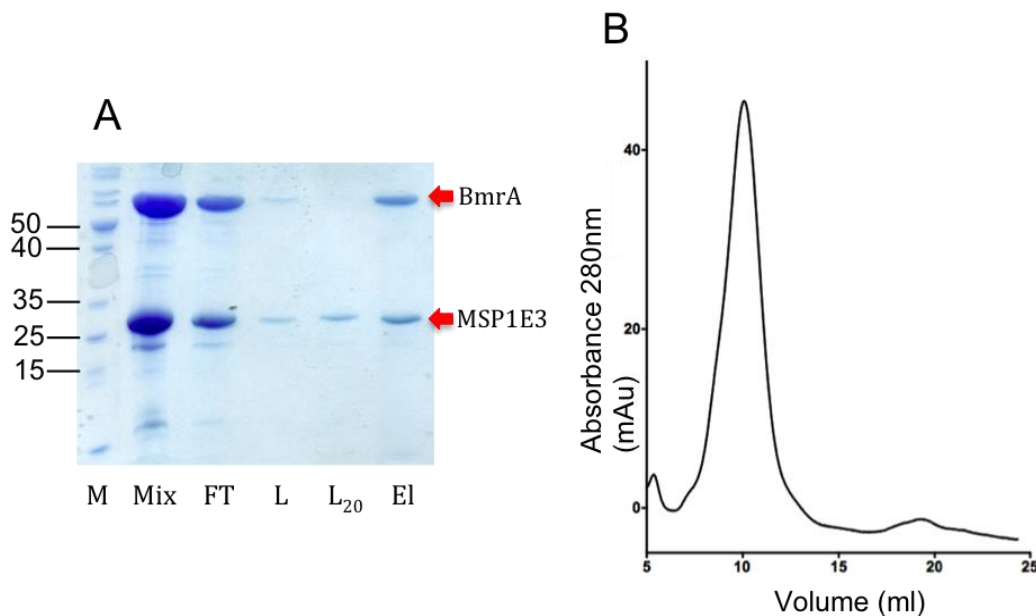


Figure V-3 : Purification des nanodisques avec BmrA A. Gels SDS PAGE 15% des différentes étapes de purification des nanodisques, la fraction Mix correspond au mélange MSP1E3D1, BmrA et lipides extrait d' *E. coli* après élimination du détergent, FT correspond à la fraction non retenue, L au lavage avec le tampon SEC (Hepes pH 7,4, 100mM NaCl), L<sub>20</sub> au lavage avec le tampon SEC avec 20mM d'imidazole, El à l'élué avec le tampon SEC avec 300mM d'imidazole B. Chromatographie d'exclusion de taille, Superdex 200 10/300 de la fraction d'élué

L'absence de la bande correspondant à la protéine BmrA (65KDa) et la présence de MSP1E3D1 dans les fractions de lavage de la résine montrent que des nanodisques vides sont éliminés de la résine. Dans la fraction d'élué, le ratio de l'intensité des bandes de BmrA vs MSP1E3D1 est plus proche de 1:1. A l'inverse dans le mélange final

d'assemblage des nanodisques, la bande correspondant à MSP1E3D1 est beaucoup plus intense que celle de BmrA. Le volume d'élué du pic obtenu par chromatographie d'exclusion de taille est d'environ 11mL. Les nanodisques vides étant élués vers 13mL, le pic obtenu à 11mL est cohérent avec l'obtention de nanodisques ayant incorporé BmrA. L'absence de pic correspondant aux nanodisques vides est aussi une indication de l'élimination de ces nanodisques. Ces éléments indiquent que la purification sur résine de Nickel permet d'éliminer des nanodisques vides.

### V.2.2. Caractérisation fonctionnelle

Afin de vérifier l'intégrité fonctionnelle de la protéine insérée en nanodisques, un test d'activité a été réalisé. Nous avons utilisé un test ATPasique basé sur une réaction enzymatique couplée, où la diminution du NADH est mesurée (cf Matériel et méthode).

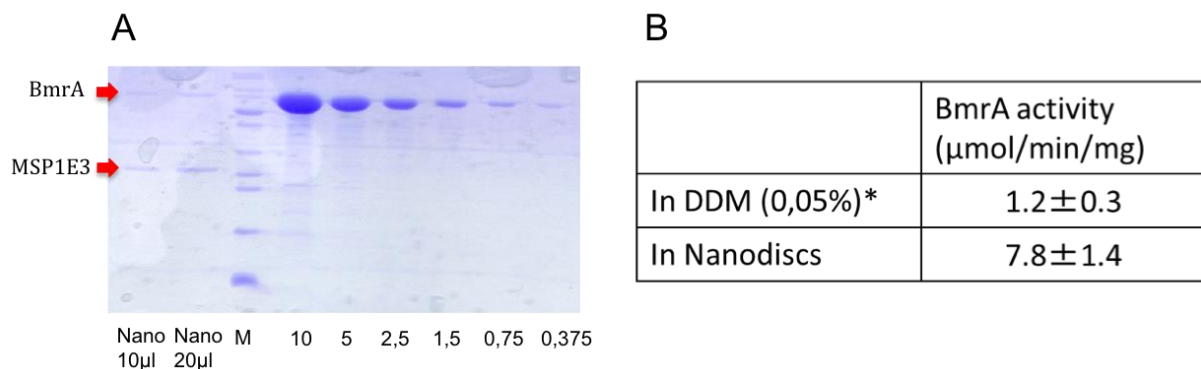


Figure V-4 : Mesure de l'activité de la protéine BmrA A. Gel SDS PAGE 15%, à gauche du marqueur les échantillons de nanodisques BmrA, à droite du marqueur la gamme de BmrA. B. Comparaison de l'activité de la protéine BmrA en détergent et en nanodisques.

Le calcul de l'activité spécifique de BmrA requiert de connaître la quantité de protéine dans l'échantillon. Il n'était pas possible d'utiliser une mesure par absorbance car MSP1E3D1 et BmrA absorbent à 280 nm. La quantification de BmrA a donc été réalisée par densitométrie à partir d'un gel SDS PAGE comme celui de la Figure V-4.

Les tests réalisés montrent que BmrA a une activité jusqu'à 5 fois plus élevée en nanodisques qu'en détergent DDM. Les nanodisques sont donc un bon modèle pour étudier la protéine BmrA.

Les deux mutants BmrA E504Q et BmrA T123C E428C sont des mutants inactifs, il n'est donc pas possible de valider leur insertion par des tests d'activité ATPasique. Cependant la protéine BmrA possède la propriété d'être résistante à la digestion par la trypsine lorsqu'elle est dans une conformation fermée, c'est-à-dire dans la conformation où les domaines NBD fixent l'ATP et le magnésium. La protéine peut être bloquée en conformation fermée en ajoutant du vanadate. Le mutant BmrA E504Q peut être bloqué en conformation fermée simplement en présence d'ATP et de magnésium. Cette propriété a été utilisée pour caractériser l'incorporation du mutant dans les nanodisques. La Figure V-5 montre l'analyse sur gel SDS PAGE de la digestion à la trypsine du mutant et de contrôles à différents temps d'incubation.



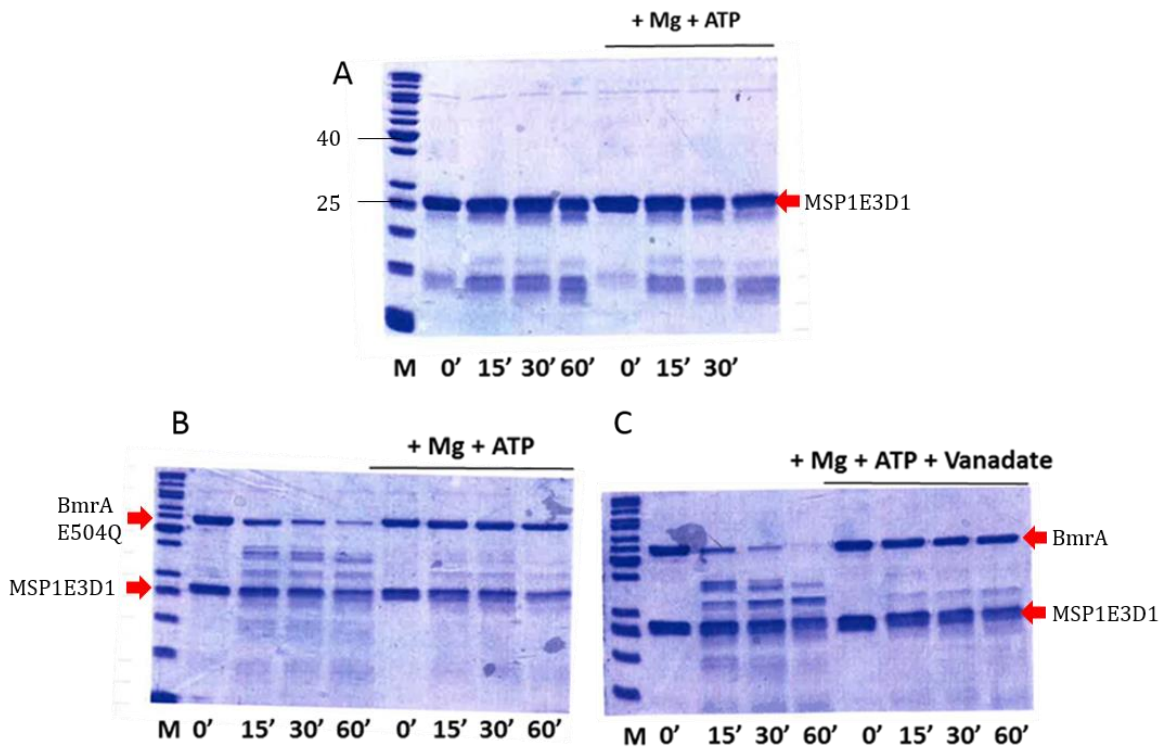


Figure V-5 : Digestion à la trypsine des nanodisques BmrA. A. Gel SDS PAGE 15%, les nanodisques sont déposés après différents temps d'incubation avec la trypsine, le ratio est de 12,5 $\mu$ g de trypsine par unité d'absorbance à 280nm mesurée. B les nanodisques contenant BmrA E504Q, avec ou sans Mg, ATP. C les nanodisques BmrA natives, avec ou sans Mg et ATP et vanadate.

Une bande correspondant à la protéine MSP1E3D1 est observée à une taille apparente d'environ 27 kDa dans tous les puits, pour les nanodisques vides. Des bandes apparaissent sous la bande principale, qui témoignent de la dégradation d'une partie des nanodisques (Figure V-5 A). La protéine d'assemblage semble donc résistante à la digestion à la trypsine lorsqu'elle est en conformation « nanodisques ». Avec la protéine BmrA native incorporée en nanodisques, on peut observer deux bandes principales, l'une dont la taille apparente correspond à la protéine d'assemblage MSP1E3D1 et l'autre dont la taille apparente de 65kDa correspond à la protéine BmrA (Figure V-5 C). En présence d'ATP, de magnésium et de vanadate, l'intensité de la bande correspondant à BmrA ne varie pas. Au contraire, l'intensité diminue lorsque le vanadate n'est pas présent et de nombreuses bandes apparaissent progressivement en dessous de celle-ci. Pour le mutant BmrA E504Q, en présence d'ATP et de magnésium, l'intensité de la bande correspondant à la protéine BmrA E504Q ne diminue pas, de même que celle correspondant à la protéine d'assemblage MSP1E3D1 (Figure V-5 B). La

propriété du mutant BmrA E504Q d'être résistant à la trypsine se retrouve donc aussi quand la protéine est incorporée dans les nanodisques.

### V.2.3. Etude structurale à l'aide de la Cryo-microscopie électronique

#### 2.3.a Observation des nanodisques par microscopie électronique

Afin d'identifier et visualiser les deux conformations de la protéine BmrA, nous avons utilisé la microscopie électronique en transmission, en coloration négative et en conditions cryo. Les nanodisques ont été préparés selon la même méthode que précédemment. Les nanodisques purifiés ont été séparés des agrégats et l'homogénéité des nanodisques vérifiée grâce à une chromatographie d'exclusion de taille (Figure V-6). Un épaulement est toujours visible à gauche du pic principal, ce qui indique une certaine hétérogénéité de l'échantillon.

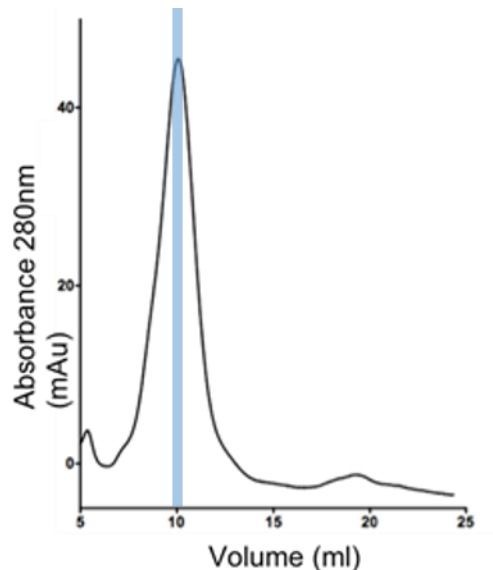


Figure V-6 : Fraction utilisée pour la microscopie électronique, chromatographie d'exclusion de taille, en bleu la fraction utilisée

Afin d'avoir les échantillons les plus homogènes possible, seule la fraction du pic correspondant au pic principal des nanodisques est utilisée et concentrée si besoin (Figure V-6, fraction bleue). Différentes concentrations ont été testées, ces

concentrations étant mesurées par densitométrie sur gel SDS PAGE avec comme standard la protéine BmrA en détergent. La concentration optimale de BmrA est de 1 $\mu$ M. L'homogénéité des nanodisques est toujours vérifiée à l'aide des images prises en coloration négative.

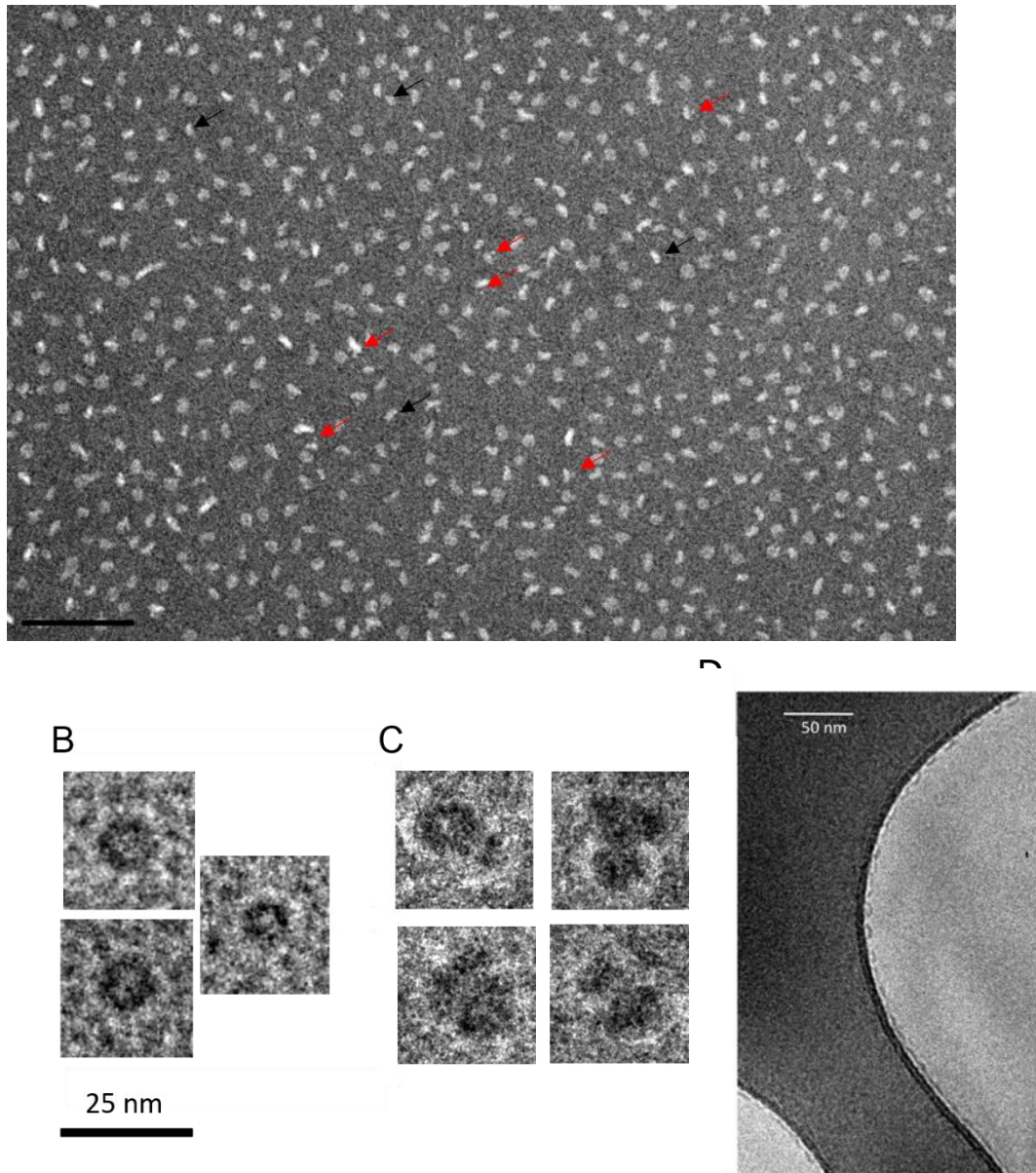
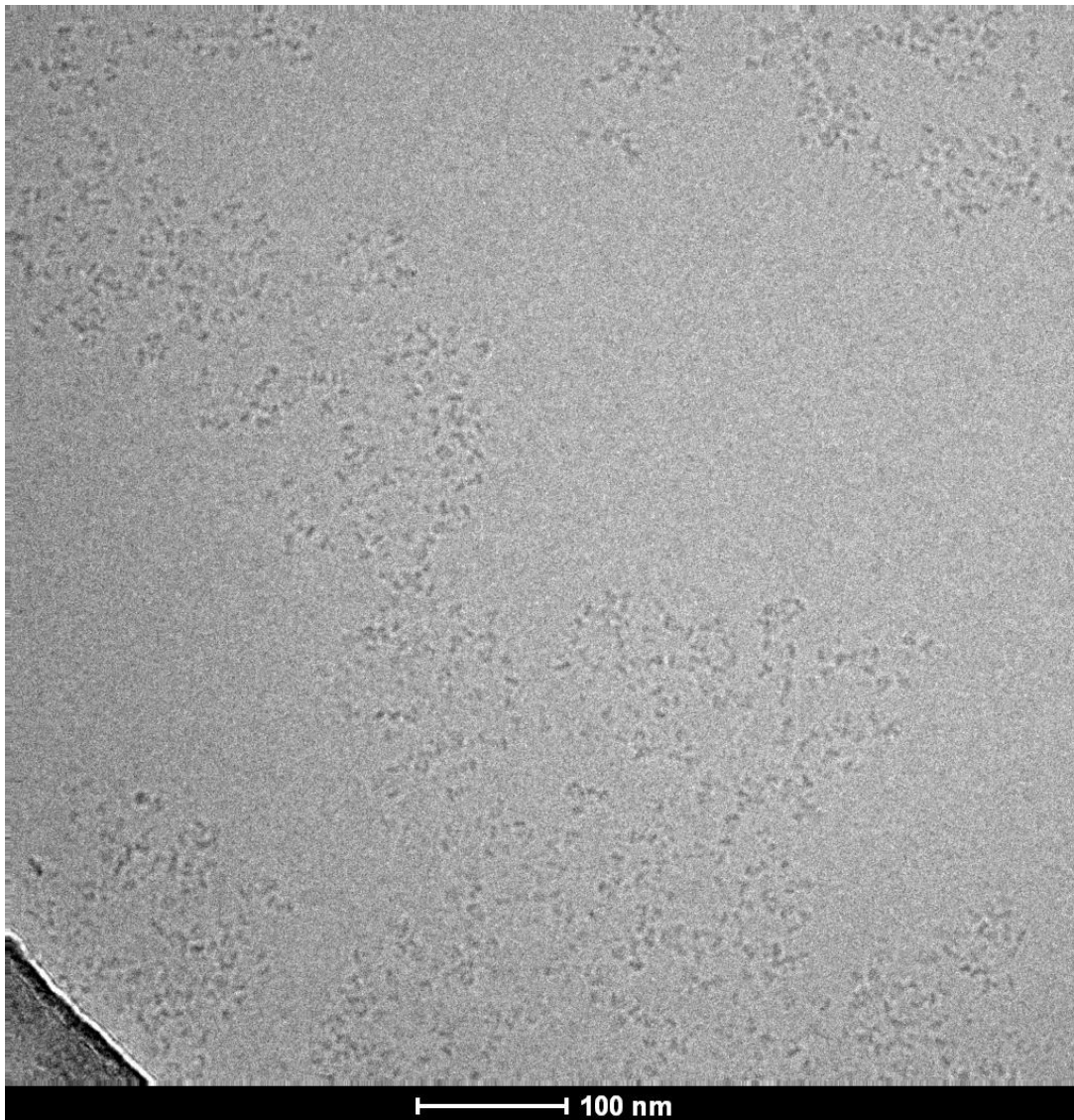


Figure V-7 : Observation des nanodisques BmrA à l'aide de la microscopie électronique. A. Nanodisques BmrA E504Q en coloration négative, SST, les flèches rouges indiquent des nanodisques qui contiennent la protéine BmrA E504Q, alors que les flèches noires indiquent les nanodisques dans lesquels on ne voit pas de protéine membranaire incorporée. B. Nanodisques vides en cryo-microscopie électronique. C. Particules isolées à partir d'une image de nanodisques BmrA E504Q en cryo-microscopie électronique. D. Nanodisques vide observé en cryo microscopie électronique en faible grossissement, pour voir l'interface entre la glace et le carbone

Les images en coloration négative permettent de voir la protéine BmrA dans certaines particules (Figure V-7 A). Malheureusement, le nombre de particules dans lesquelles la protéine BmrA peut être identifiée est assez faible comparé au nombre de particules totales (environ 20% des vues de cotés ont une densité correspondant à la protéine BmrA). Les nanodisques ont pourtant été purifiés à l'aide d'une chromatographie d'affinité, et le ratio entre l'intensité des bandes BmrA vs MSP1E3D1 sur gel SDS PAGE est de 1. Cela indique que les nanodisques restant devraient être majoritairement des nanodisques contenant la protéine BmrA. La présence de nanodisques dans lesquels on ne voit pas la protéine BmrA pourrait s'expliquer par le fait que l'inclinaison des nanodisques empêcherait de visualiser la protéine BmrA et/ou par un problème de coloration. Un autre problème rencontré est le fait que les nanodisques sont à l'interface entre la surface et la glace.



*Figure V-8 : Images de Cryo-microscopie électronique des nanodisques avec BmrA E504Q*

Sur les clichés, beaucoup de particules agrégées sont observées, et assez peu de particules seules. Pour certaines, on peut observer une densité qui correspondrait aux NBD qui dépasse de la membrane (Figure V-8), mais leur nombre est insuffisant pour pouvoir faire une reconstruction 3D. De plus, sur certaine images, le bruit de fond est assez important avec de plus petites particules observées en arrière-plan. Afin de les éliminer de l'échantillon, une stratégie visant à traiter préalablement l'échantillon à la trypsine a été mise au point. Si les particules correspondent à des protéines BmrA seules, ou à des protéines d'assemblages qui n'ont pas la conformation en ceinture autour d'une bicouche lipidique, elles devraient être digérées par la trypsine.

### **2.3.b Optimisation des échantillons pour la microscopie électronique**

Les nanodisques BmrA E504Q ne sont pas digérés lorsqu'ils ont été incubés avec du magnésium et de l'ATP préalablement (Cf partie V1.2). Les nanodisques non digérés par la trypsine sont purifiés (Figure V-9 A) et la moitié est passée sur chromatographie d'exclusion de taille (courbe noire Figure V-9 A). L'épaule à gauche du pic, indique la présence de nanodisques de plus grosse taille. L'autre moitié des nanodisques est digérée par la trypsine. Ces nanodisques sont analysés par chromatographie d'exclusion de taille (courbe rouge Figure V-9 A). Quand on compare les deux profils, l'épaule visible avec les nanodisques non digérés n'est plus présent après traitement à la trypsine. Sur le gel SDS PAGE (Figure V-9 C), dans le puits correspondant aux nanodisques BmrA digérés à la trypsine, une bande à 65kDa est présente correspondant à BmrA. Etrangement, la bande correspondant à MSP1E3D1 n'est pas observée, mais cela peut être dû à la faible concentration de l'échantillon.

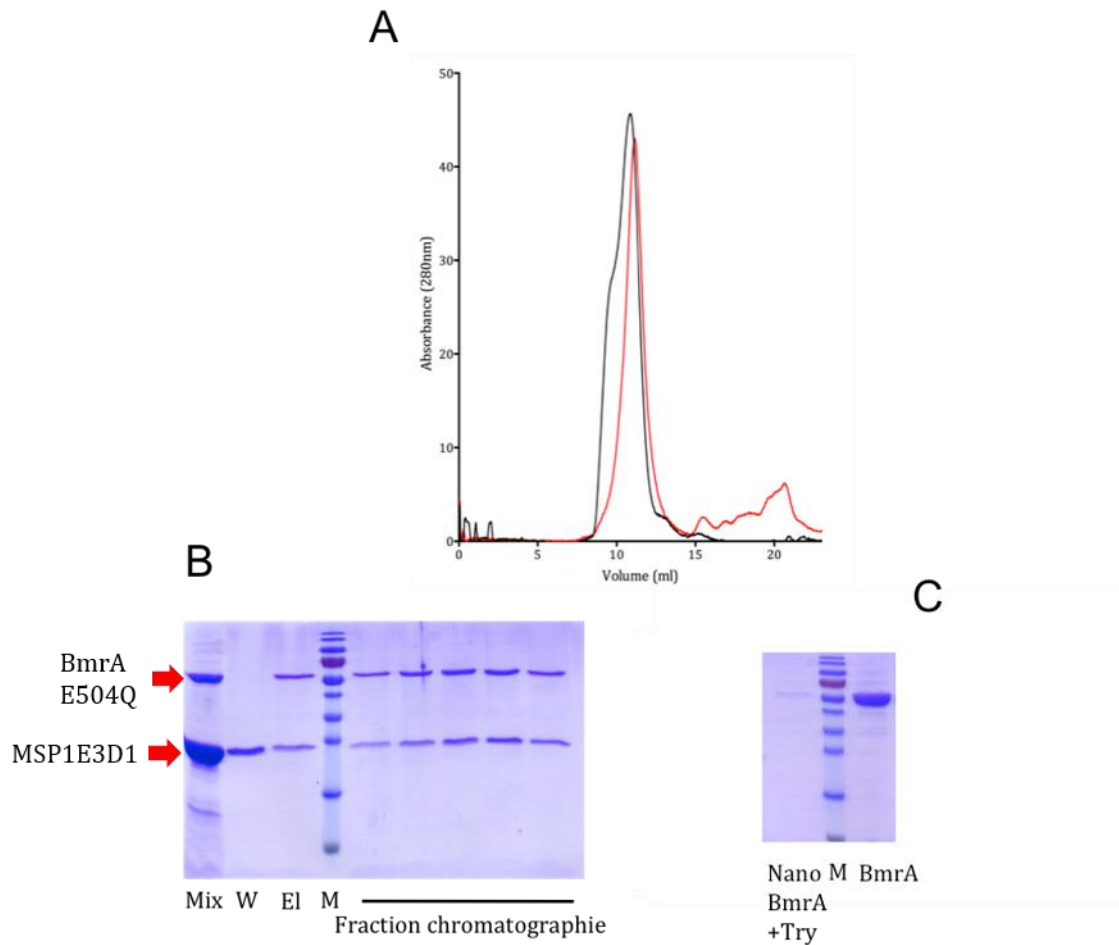


Figure V-9 : Digestion des nanodisques BmrA E504Q incubés avec du magnésium et de l'ATP avec la trypsine  
 A Chromatographie d'exclusion de taille, Superdex 200 10/300 des nanodisques BmrA E504Q non digérés (en bleu) et digérés (en rouge) B. Gels SDS PAGE 15%, à gauche du marqueur purification des nanodisques BmrA, Mix correspond aux mélange d'assemblage des nanodisques avec BmrA E504Q, W correspond aux lavage de la résine avec le tampon SEC avec 20mM imidazole, El correspond à l'élution avec le tampon SEC avec 300mM imidazole. A droite du marqueur, les fractions de la chromatographie d'exclusion de taille sont déposées. C. Gels SDS PAGE 15%, à gauche du marqueur, échantillon des nanodisques BmrA digérés, à droite du marqueur, échantillon BmrA solubilisé en DDM contrôle.

Malheureusement, ce gain d'homogénéité observé par chromatographie d'exclusion de taille ne s'est pas accompagné d'une amélioration significative des images de microscopie électronique. L'utilisation des images en coloration négative pour déterminer les différentes conformations de la protéine BmrA semblent plus prometteurs que la cryo-microscopie électronique.

#### **V.2.4. Essais de cristallisation en phase cubique**

Le transfert de protéines membranaires incorporées dans des nanodisques à d'autres systèmes comprenant une bicouche lipidique a déjà été documenté <sup>148</sup>. De plus, au sein de l'IBS, l'équipe de V. Gordeliy a réussi à cristalliser la bactériorhodopsine en phase cubique à partir d'une protéine incorporée en nanodisques (communication personnelle). Nous avons donc tenté de cristalliser un des mutants de la protéine BmrA en utilisant cette approche. La protéine incorporée en nanodisques a été mélangée avec la phase cubique composée de monooléine. Le mélange a été déposé dans des plaques commerciales, CPI, CPII et Memgold. Les gouttes ont une taille de 50nl, et les plaques sont conservées à 20°C. A ce jour, les essais de cristallisation n'ont pas permis d'obtenir des cristaux.

#### **V.3. Etude de la protéine BceAB dans les nanodisques**

L'étude de la protéine BceAB de *Bacillus subtilis* est un projet annexe. L'insertion dans les nanodisques de transporteurs ABC ayant été réalisée avec succès, il était intéressant d'utiliser cette technique pour caractériser le complexe BceAB. Le complexe BceAB-RS est un complexe qui donne un phénotype résistant à la bacitracine.

BceAB représente la partie ABC du système et BceRS représente la partie qui répond au signal. BceRS est un système à deux composants (TCS), avec une histidine kinase (HK) et une protéine de réponse à la régulation (RR). La protéine BceAB a une partie transmembranaire qui ne correspond pas à la topologie habituelle, elle a 10 hélices transmembranaires et une boucle extracellulaire de 200 acides aminés entre les hélices VII et VIII. C'est dans cette boucle que se fixent les peptides antimicrobiens (AMP), comme la bacitracine. La fixation de la bacitracine va entraîner une réponse du signal en activant la protéine HK, qui va phosphoryler la protéine RR et induire une transduction de signal qui va amplifier la production du transporteur ABC (Figure V-10). L'AMP va être transportée à travers les domaines transmembranaires, en utilisant l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie.



Cette protéine est associée à des domaines NBD qui interagissent au domaine transmembranaire. La stœchiométrie du complexe est de 1 domaine transmembranaire pour 2 NBD (Gebhard 2012).

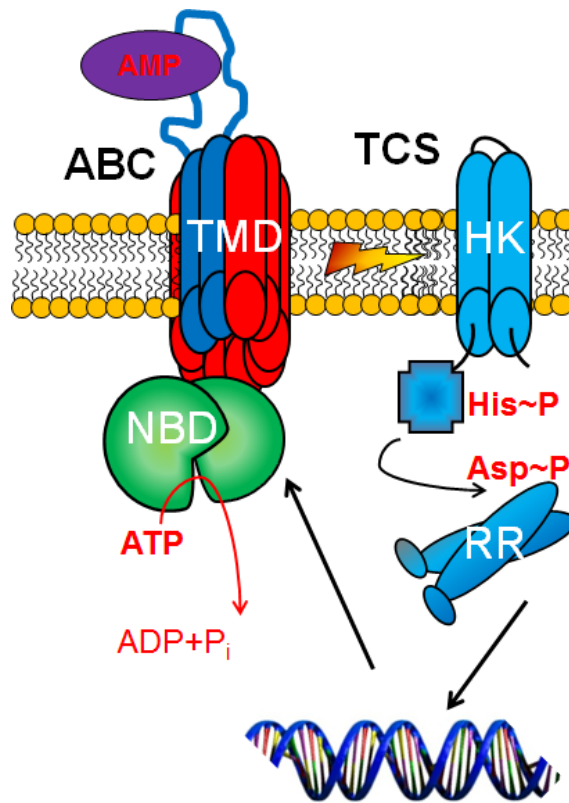


Figure V-10 : Mécanisme du complexe BceAB-RS  
(image provenant de Jaroslav Vorac)

L'objectif était d'étudier ce transporteur ABC afin de déterminer son activité qui n'avait jamais été décrite. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec Jaroslav Vorac (IBS).

### V.3.1. Insertion de la protéine BceAB en nanodisques

La protéine BceAB a été sur-exprimée et purifiée en détergent par Jaroslav Vorac. La protéine est maintenue en solution grâce au détergent MNG3.

La protéine BceAB a été reconstituée dans les nanodisques, en utilisant les mêmes conditions que pour la protéine BmrA (cf matériel et méthode). Brièvement, la protéine BceAB a été mélangée avec des extraits de lipides de *E. coli* solubilisés par du DDM, et de la protéine d'assemblage MSP1E3D1 avec le ratio 0,2/1/60 en masse. Le détergent MNG3 n'a pas été utilisé pour solubiliser les lipides puisqu'il est très compliqué de le retirer en utilisant les biobeads. La dilution qui a lieu après ajout de la protéine MSP1E3D1 et des lipides est suffisante pour que la concentration du MNG3 soit en dessous de la cmc et donc ne gêne pas la formation des nanodisques. Après avoir enlevé les biobeads, les nanodisques sont purifiés par chromatographie d'exclusion de taille afin d'éliminer les agrégats (Figure V-11 A). On observe un seul pic principal à un volume d'élution de 12,7mL. Il n'y a pas de séparation de pic entre les nanodisques contenant la protéine membranaire et ceux qui sont vides, la taille de la partie extra-membranaire n'est pas suffisante pour avoir un rayon de Stokes différent.

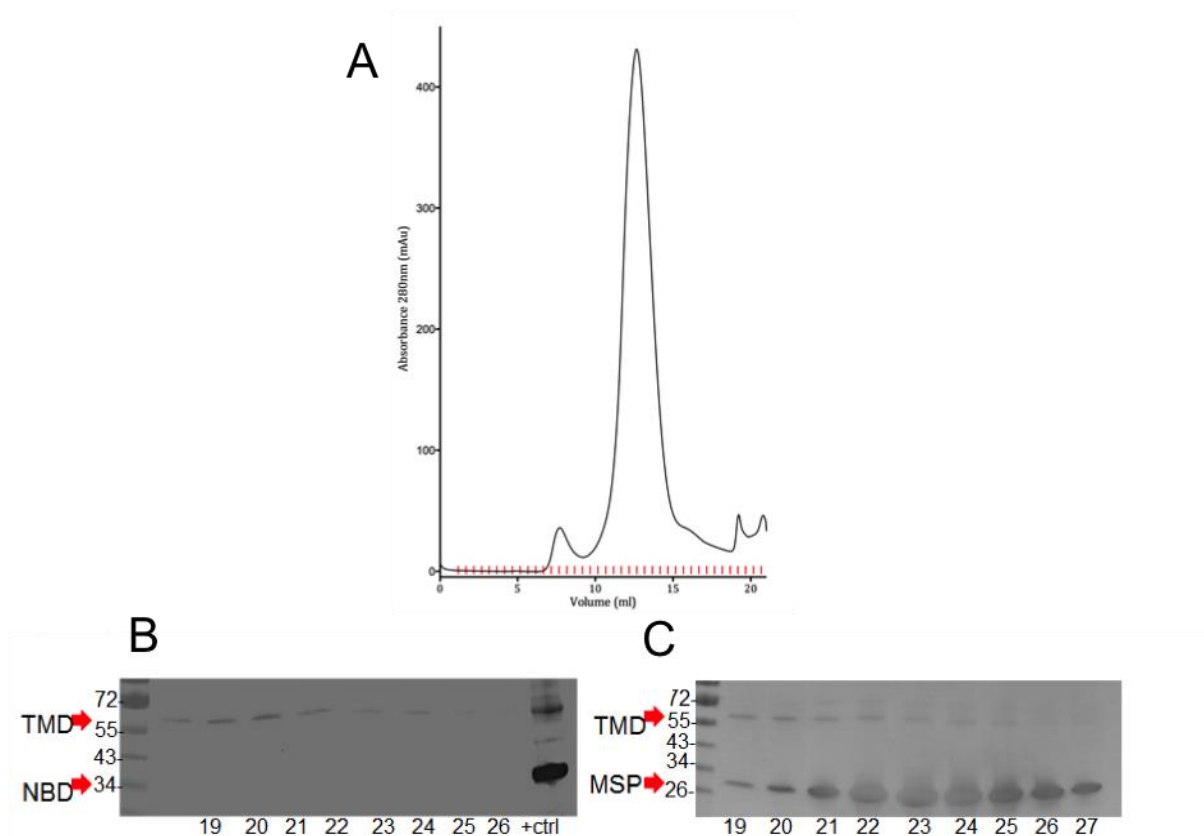


Figure V-11 : Purification des nanodisques BceAB A Chromatographie d'exclusion de taille, Superdex 200 10/300 de la préparation de nanodisques. B Western Blot des échantillons correspondant au pic de la chromatographie d'exclusion de taille, , avec des anticorps contre l'étiquette Histidines. C Gels SDS PAGE 15% des échantillons correspondant au pic de la chromatographie d'exclusion de taille.

La purification a été analysée par gel SDS PAGE (Figure V-11 C). On observe deux bandes principales correspondant aux domaines transmembranaires BceAB, et à la protéine MSP1E3D1. La bande correspondant aux domaines NBD est très faible sur le gel, alors que normalement, avec la protéine purifiée, le ratio visible sur le gel est d'environ 1 :1 en intensité. Lors de l'incorporation, il semble que le NBD se soit dissocié des TMD, ce qui est confirmé par l'absence de bande correspondant au domaine NBD après un Western Blot (Figure V-11 B) Etrangement, aucun pic n'est observé en chromatographie d'exclusion de taille qui correspond au domaine NBD. Une possibilité serait que la protéine précipite durant l'incubation avec les biobeads.

### **V.3.2. Activité du transporteur BceAB**

Afin de pouvoir connaître l'activité spécifique de la protéine, une estimation de la quantité de protéine incorporée dans les nanodisques a été réalisée par densitométrie avec comme standard la protéine solubilisée en détergent, MNG3 0,005%. Par exemple, la concentration de TMD est de 0,22mg/mL  $\pm$  0.06 pour le gel SDS PAGE présenté en Figure V-12 A.

L'activité a été mesurée en utilisant le même test d'activité que pour la protéine BmrA. Les domaines NBD ont été rajoutés au mélange réactionnel. Ils ont été préparés préalablement durant la purification de la protéine BceAB. Un pic est présent lors de la chromatographie d'exclusion de taille pour la purification de BceAB qui correspond aux domaines NBD seuls. L'activité a aussi été mesurée avec la protéine solubilisée en détergent MNG3 (Figure V-12 B). Comme contrôle, l'activité des protéines NBD seules est aussi mesurée. L'activité du domaine transmembranaire du complexe BceAB incorporé dans les nanodisques est identique à celle des NBD seuls. Lorsque les domaines NBD sont rajoutés aux domaines transmembranaires à un ratio 1 :1 (mole), l'activité est environ 4 fois plus importante que l'activité des NBD seuls ou du domaine transmembranaire seul. La formation du complexe entre les NBD et le domaine transmembranaires permet donc de retrouver une activité.

L'activité du complexe en détergent (MNG3) a aussi été mesurée. L'activité du complexe formé en nanodisques est également environ 4 fois plus importante que l'activité en

détergent. L'incorporation en nanodisques permet donc d'avoir une meilleure activité qu'en détergent MNG3. L'activité a été testée en rajoutant de la bactitracine, mais aucune différence n'a été observée.

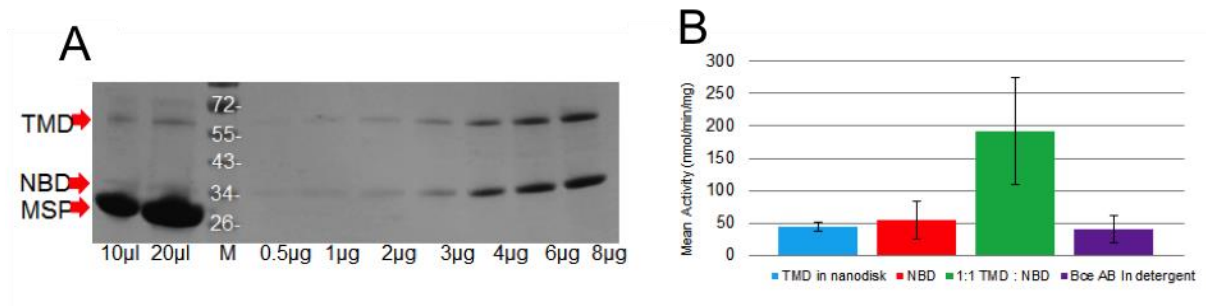


Figure V-12 : Mesure de l'activité ATPasique de BceAB. A. Gels SDS PAGE 15% utilisés pour faire un dosage par densitométrie de la protéine BceAB, à gauche du marqueur, dépôts de 10µL et de 20µL des nanodisques BceAB, à droite du marqueur, gamme de concentration de la protéine BceAB de 0,5µg à 8µg B. Activité ATPase du domaine transmembranaire seul en nanodisques (en bleu), des domaines NBD seuls (en rouge), des nanodisques avec le domaine NBD à un ratio 1 :1 (en vert), du complexe BceAB en détergent MNG3 (en violet).

Si l'activité est plus faible en détergent, cela peut être dû au fait qu'il pourrait empêcher la protéine TMD d'adopter certaines conformations nécessaires à son activité. Il est possible que le TMD ait besoin de certains lipides pour son activité. Pour vérifier cette hypothèse, des incorporations de la protéine dans d'autres environnements lipidiques pourraient être réalisées et leur activité testée. L'activité de la protéine BceAB en détergent étant variable en fonction des préparations, la reconstitution permet d'avoir une protéine fonctionnelle dans un environnement lipidique. Aucune d'activité ayant précédemment été décrite, nous avons obtenu avec les nanodisques la meilleure activité spécifique décrite à ce jour.

## V.4. Discussion

Les protéines BmrA et BceAB ont été incorporées avec succès dans des nanodisques avec des lipides d'extraits d'*E. coli*. L'activité de ces transporteurs ABC est 5 fois plus importante qu'en détergent. La conformation de ces protéines est donc meilleure dans les nanodisques. Pour la protéine BceAB, les nanodisques peuvent être utilisés pour essayer de découvrir les effets des différents ligands. De plus, la dissociation des domaines NBD et du domaine TMD peut permettre de comprendre de façon plus fine le mécanisme des transporteurs ABC. De la même manière, les nanodisques peuvent être utilisés pour tester les effets de différents composants sur l'activité de BmrA.

Pour les études structurales sur les différentes conformations de la protéine BmrA, l'approche par cryo-microscopie électronique n'a pas été un succès. Malgré des améliorations notables de l'homogénéité des échantillons, aucune conséquence sur les clichés de microscopie n'a été observée. La continuation de ces études pourrait être réalisée en coloration négative, en utilisant une approche comme celle développée par l'équipe de Bridget Carragher, Scripps.<sup>147</sup>

## VI. Conclusion générale

Les nanodisques sont nés il y a 12 ans, dans l'équipe de Sligar. Depuis, ils ont été intensivement utilisés comme alternative au détergent et aux liposomes. Beaucoup de travaux ont été conduits afin de démontrer la faisabilité de techniques en présence de nanodisques<sup>103,116</sup>. Les nanodisques permettent d'utiliser les principales approches biophysiques utilisées pour les protéines solubles, mais la présence d'une protéine d'assemblage et de lipides complique généralement les mesures effectuées et l'analyse des résultats observées.

Les activités des ABC transporteurs BmrA et BceAB ont été environ 5 fois supérieures dans un environnement lipidique que solubilisés en détergents. Cette augmentation de l'activité a déjà été documentée dans des travaux précédents (8). On peut imaginer que tous les ABC transporteurs ont besoin d'être dans un environnement lipidique pour avoir une activité optimale. Cela pourrait provenir du fait que l'activité des ABC transporteurs nécessite un changement de conformation important qui est contrarié lorsque la protéine est maintenue en solution avec des surfactants. Il est intéressant de noter que les protéines Pgp et MsbA maintenues en solution avec des peptides structurés en feuillet beta utilisés comme surfactants<sup>147</sup>, ont une valeur d'activité comprise entre celle dans un environnement lipidique et celle avec des détergents. Les deux conformations extrêmes, ouverte et fermée, adoptées durant le processus de transport ont été observées par microscopie électronique dans plusieurs environnements (détergents, liposomes ou peptides). Le changement de conformation semble maximal dans une membrane lipidique, minimal en détergent et intermédiaire en présence de peptides en feuillet beta. L'activité intermédiaire observée en présence de peptides en feuillet beta pourrait donc être corrélée à l'amplitude des changements de conformation.

Les nanodisques présente l'avantage de pouvoir tester l'effet de différentes compositions lipidiques sur l'activité de la protéine membranaire maintenue en solution. L'activité de la protéine NADPH oxydase SpNox est plus élevée en présence de lipides extraits d'*E.coli* qu'en POPC. A l'instar des modifications de l'activité des protéines MsbA et Pgp expliquées par des effets structuraux liés aux lipides, il est probable que l'augmentation de l'activité observée est due à la présence de lipides

particuliers dans les nanodisques. Pour vérifier l'hypothèse que la protéine SpNox a besoin de lipides contenus dans les extraits d'*E.coli*, une possibilité serait de tester l'activité de nanodisques SpNox avec des compositions lipidiques différentes. Les nanodisques sont donc des outils puissants pour pouvoir étudier l'activité de protéines membranaires et les déterminants de cette activité, qu'ils soient (1) physiques ou mécaniques, avec la possibilité pour les protéines membranaires d'exercer des changements de conformation ou une largeur de membranes adéquates pour la stabilité des protéines, (2) chimiques, avec la présence de lipides nécessaires à l'activité optimale des protéines membranaires <sup>149</sup>.

Pour les études d'interactions, les nanodisques ont été utilisés avec une grande variété de techniques (cf tableau 3). Nous avons essayé d'utiliser les nanodisques pour étudier les interactions entre une protéine membranaire et deux protéines solubles, avec différentes méthodes, pontage chimique, résonance plasmonique de surface ou spectrométrie de masse native. Le pontage chimique n'a pas permis de déterminer l'existence des interactions, mais cela peut être expliqué par la taille proche des protéines MSP1, Fre, YedZ et YedZ. L'EGS n'altérant pas l'intégrité des nanodisques, cette technique pourrait être utilisée pour déterminer des interactions entre des protéines membranaires et d'autres protéines. Pour la résonance plasmonique de surface, elle peut être utilisée avec les nanodisques fixés sur la surface ou comme analytes. Les études réalisées avec YedZ n'ont pas permis d'établir l'existence de ces interactions. Les nanodisques permettent de limiter l'effet de masse, mais la régénération des surfaces pose problème. Tous les travaux effectués jusqu'à maintenant utilisent la méthode de cinétique à cycle unique, qui permet de s'affranchir de cette étape de régénération.

L'objectif majeur de ma thèse était d'utiliser des nanodisques pour l'étude structurale de protéines membranaires. Les trois méthodes d'études structurales principales que sont la RMN, la microscopie électronique et la cristallographie ont été envisagées. La RMN a comme limitation la taille des objets observés, seuls des nanodisques de petites tailles ont été utilisés avec cette technique. Cette contrainte exclue la majorité des protéines que j'ai insérées. Les protéines YedZ et SpNox auraient pu être étudiées avec cette technique puisqu'elles sont insérées dans des nanodisques de petites tailles, mais la présence de l'hème complique l'interprétation des résultats de RMN. La microscopie

électronique est plus favorable à l'étude des protéines incorporées dans des nanodisques de grande taille. Des précédents dans la littérature (<sup>118,134,122</sup>) montrent que les nanodisques peuvent être utilisés pour la reconstruction de structures à partir d'images de particules isolées. Cependant, les seules structures avec une résolution convaincante sont les structures de la porine de l'anthrax, en coloration négative, et du translocon SEC, en cryo-EM. En effet, dans ces deux exemples les protéines possèdent un grand domaine extramembranaire qui permet de s'affranchir de l'hétérogénéité des nanodisques. Seules les études de complexes de grande taille, comme le translocon, tolèrent l'utilisation de nanodisques hétérogènes. La reconstitution peut alors se faire en alignant les complexes présents dans les particules, et l'hétérogénéité des nanodisques n'est plus problématique. Dans ces travaux, la reconstitution des nanodisques est très incomplète. L'utilisation des nanodisques pour la résolution de structures de protéines membranaires de tailles modestes (130kDa pour BmrA) est un défi. Certains ont essayé de résoudre des structures de protéines de petites tailles, mais la résolution de ces structures est faible, la différence avec la structure de nanodisques vides est tenue comme pour le cas de la protéine Bax. La diffusion des protéines membranaires dans la bicouche lipidique du nanodisque rend aussi la résolution de structures plus compliquée. Pour les nanodisques avec BmrA, l'hétérogénéité a été un problème important, et les différentes stratégies appliquées n'ont pas fonctionné, comme l'utilisation de la trypsine pour éliminer des nanodisques mal formés, ou l'utilisation de tampon sans métaux (données non montrées). Etrangement, des nanodisques homogènes en coloration négative ne l'étaient pas forcément en cryo-EM. Cela suggère que des optimisations seraient à faire dans le processus de congélation des échantillons. Un autre problème, rencontré cette fois-ci en coloration négative, concerne le taux de nanodisques comportant BmrA par rapport aux nanodisques vides. De manière paradoxale, les gels SDS-PAGE de vérification des purifications des nanodisques BmrA indiquent une perte des nanodisques vides et un enrichissement des nanodisques contenant BmrA alors que les clichés de microscopie électronique indiquent un taux d'incorporation faible. L'explication à ce phénomène est difficile, il est possible que l'orientation des nanodisques ne permette pas d'observer correctement la protéine incorporée, ou que le colorant utilisé et la préparation de l'échantillon ne permettent pas un contraste suffisant pour voir la protéine membranaire.



Enfin, la cristallisation des nanodisques est un projet novateur. A ce jour, seule la cristallisation en phase cubique lipidique permet d'avoir des cristaux de protéines dans un environnement lipidique. Les nanodisques ont l'avantage de pouvoir avoir des compositions lipidiques variées, même si l'utilisation de lipides insaturés peut avoir un impact sur l'homogénéité et la stabilité des nanodisques. Seule une publication mentionne des cristaux de nanodisques, avec une protéine d'assemblage différente. Mes travaux semblent avoir permis de cristalliser des nanodisques, dans des conditions sans sels. Ces cristaux pourraient aussi être des cristaux de PEG ou de lipides seuls, mais des tâches de diffraction à basse résolution sont en faveur d'un objet de plus grande dimension.

Parmi les méthodes d'études structurales à basse résolution, les méthodes d'analyse par SAXS et SANS n'ont pas été envisagées, bien qu'elles sont compatibles avec les nanodisques<sup>130</sup>. Ces approches n'auraient pas été utiles pour les études de BmrA, parce qu'elles n'auraient pas permis d'obtenir la proportion de conformations ouvertes et fermées pour la protéine native. Pour la spectrométrie de masse native, qui donne des informations sur la stœchiométrie de complexe, l'utilisation des nanodisques a déjà fait ces preuves, et l'absence de résultats pour le complexe YedZ/Fre/YedY tiendrait plus aux problèmes d'homogénéité de chaque composant, et à la nature possiblement transitoire du complexe.

Les nanodisques nous ont permis de caractériser des protéines membranaires, mais leur utilisation pour des études structurales a été difficile. Une des explications aux difficultés rencontrées peut venir du fait que malgré l'utilisation de cette technique depuis plusieurs années pour étudier des protéines membranaires, les mécanismes de formations des nanodisques, et des particules HDL ne sont pas connus.

Dans le cadre de ma thèse, je me suis attaché à mieux comprendre les mécanismes responsables de la formation des nanodisques et les déterminants impactant leur stabilité. La découverte d'une interaction entre les métaux et la protéine MSP1 et MSP1E3D1 m'a permis de montrer l'effet de ce paramètre sur l'homogénéité et la stabilité de la protéine seule ou en conformation en double hélice avec des lipides. L'identité du métal concerné, et le mécanisme par lequel il intervient dans l'oligomérisation reste encore à démontrer. Des expériences de spectroscopie sur plasma induit par laser ont été envisagées pour découvrir quel métal interagit avec les

protéines MSP. Les interactions avec le calcium et le magnésium ont été montrées de manière qualitative, mais des expériences complémentaires sont nécessaires pour déterminer les caractéristiques de ces interactions. Des mutations ciblées sur les sites potentiels de fixation des métaux pourraient être réalisées. L'effet d'un milieu sans métaux peut être déterminant pour l'utilisation des nanodisques pour toutes les expériences biophysiques nécessitant une grande homogénéité. Ce gain obtenu lors de mon travail de thèse a probablement permis la cristallisation des nanodisques.

La stabilité thermique de la protéine MSP1 à la température a aussi été montrée. La différence observée entre la stabilité de la protéine MSP1 et celle de la protéine Apolipoprotéine A-1 (données de la littérature) peut être expliquée par l'absence dans la protéine MSP1 de la partie N-terminale, qui est facteur d'instabilité. Cette stabilité de la protéine MSP1 est intéressante à plusieurs égards (1) une optimisation de la production peut être faite en purifiant la protéine par un choc thermique, des essais ont été menés et le problème de la contamination de l'échantillon par l'ADN n'a pas encore été résolu. Une purification par la chaleur est plus simple et rapide que le protocole actuel et peut permettre d'avoir des protéines MSP1 plus pures, (2) pour les assemblages de nanodisques à partir de la membrane, il est envisageable de jouer sur la température pendant l'incubation entre la protéine MSP1 et la membrane. La température est un facteur qui entraîne une plus grande fluidité des membranes, et la création de défauts pourrait aider à leurs solubilisations. La température à utiliser doit cependant être inférieure à 100°C, car les nanodisques ne sont plus stables au delà de cette température<sup>150</sup>.

La structure des éléments à chaque étape de la formation de la particule HDL est connue seulement partiellement (Apolipoprotéine A1 tronquée, RMN et rayons X ; particule HDL discoïdale, SAXS, SANS) mais les informations tirées de ces structures ne permettent pas d'expliquer complètement les mécanismes. Pour vraiment comprendre le mécanisme de formation des nanodisques et des particules HDL, des données structurales seraient nécessaires. A côté des essais de cristallisation des nanodisques, des essais ont été réalisés avec la protéine MSP1 seule. Des cristaux ont été obtenus dans certaines conditions mais nécessitent d'être reproduits. Des expériences de SANS et SAXS pourraient être envisagées sur les nanodisques sans métaux. Des études faites avec ces

méthodes ont préalablement débouché sur un nouveau modèle de nanodisques, avec une double hélice. Répéter ces expériences, en tenant compte des effets de métaux, pourrait donner un éclairage nouveau sur la structure des nanodisques en solution.

L'ensemble de ces travaux a donc contribué à optimiser l'utilisation des nanodisques et à mettre en lumière des paramètres importants qu'il faudrait encore explorer. Les approches utilisées avec les différentes protéines abordées ont aussi montré les forces et les faiblesses de l'utilisation des nanodisques, pas seulement pour les protéines étudiées, mais aussi de façon plus générale. En conclusion, cette méthode me paraît extrêmement prometteuse pour l'étude de protéines membranaires et mérite de figurer parmi les différents outils disponibles dans les équipes abordant structure et fonction de protéines membranaires.

## Annexe

### Séquence protéique des protéines étudiées

#### MSP1

MGSSHHHHHHENLYFQGLKLLDNWDSVTSTFSKLREQLGPVTQEFWDNLEKETEGLRQEMS  
KDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEM  
RDRARAHVDALRTHLAPYSDELQRQLAARLEALKENGGARLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPA  
LEDLRQGLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQ

#### MSP1E3D1

MGHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGSTFSKLREQLGPVTQEFWDNLEKETEGLRQEMSK  
DLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLG  
EEMRDRARAHVDALRTHLAPYLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQKLH  
ELQEKLSPLGEEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELQRQLAARLEALKENGGARLAEY  
HAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQ

#### BmrA

MSSSHHHHHMPTKKQKSKSKLKPFALVRRTNPSYGKLAFAFALASVVTTLVSLLIPLL  
TKQLVDGFSMSNLSGTQIGLIALVFFVQAGLSAYATYALNYNGQKIISGLRELLWKKLIK  
LPVSYFDTNASGETVSRVTNDTMVVKELITTHISGFITGIISVIGSLTILFIMDWKLTLLVL  
VVVPLAALILVPIGRKMFSISRETQDETARFTGLLNQILPEIRLVKASNAEDVEYGRGKM  
GISSLFKLGVREAKVQSLVGPLISLVLMAALVAVIGYGGMQVSSGELTAGALVAFILYLFQ  
IIMPMGQITTFFTQLQKSIGATERMIEILAEEDTDTGKQIENAHLPQLDRVSFGYKP  
DQLILKEVSAVIEAGKVTAIVGPSGGGKTTFLKLLERFYSPTAGTIRLGDEPVDTYSLES  
WREHIGYVSQESPLMSGTIRENICYGLERDVTDAEIEKAAEMAYALNFIKELPNQFDTE  
VGERGIMLSGGQRQRIAIARALLRNPSILMLDEATSSLDSQSEKSVQQALEVLMEGRTTI  
VIAHRLSTVVDADQLLFVEKGEITGRGTHHELMASHGLYRDFAEQQLKMNADLENKA  
G

#### YedZ

MRLTAKQVTWLKVCLHLAGLLPFLWLWVWAINHGGLGADPVRDIQHFTGRTALKFLLA  
TLLITPLARYAKQPLLRTRLLGLWCFAWATLHLTSYALLELGVNNLALLGKELITRP  
YLTLGIIISWVILLALAFTSTQAMQRKLGKHWQQLHNFVYLVAILAPIHYLWSVKIISPQP  
LIYAGLAVLLLALRYKKLRSFNRLRKQVHNKLSVEKLAHHHHHHHHH

### Partie III Méthodologie des nanodisques

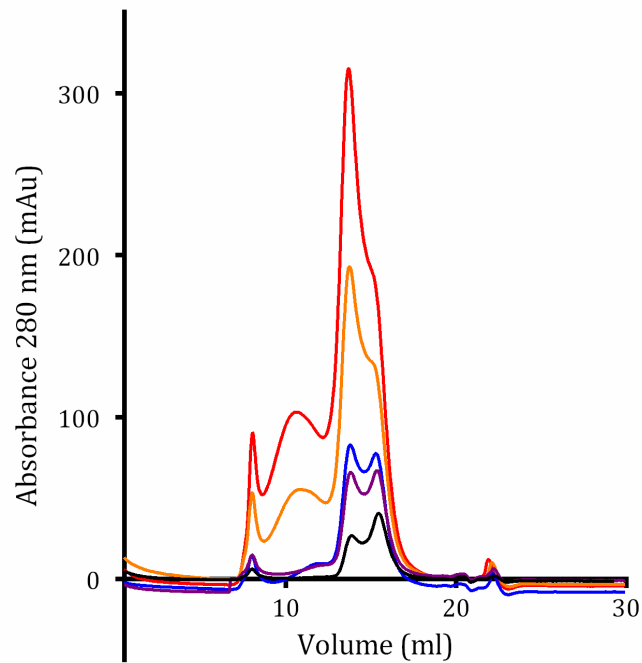


Figure 1 : Chromatographie d'exclusion de taille de la protéine MSP1 à différentes concentrations, dans un tampon traité avec de la résine Chelex, en rouge la protéine est concentrée à 5 mg/mL, en orange à 3 mg/mL, en bleu à 1,35 mg/mL, en violet à 1 mg/mL, en noir à 0,5 mg/mL.

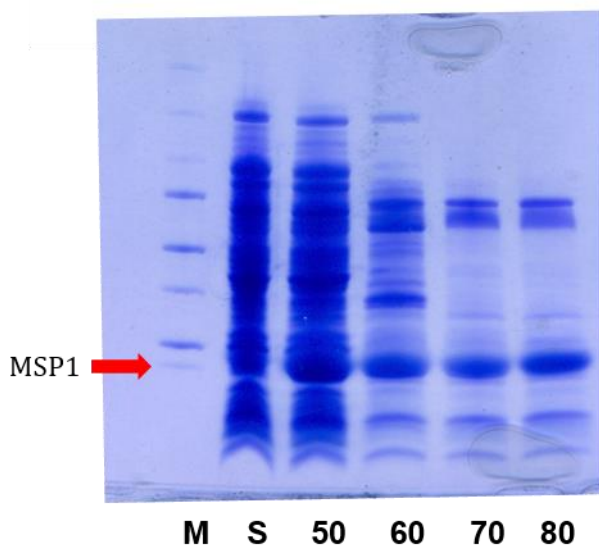
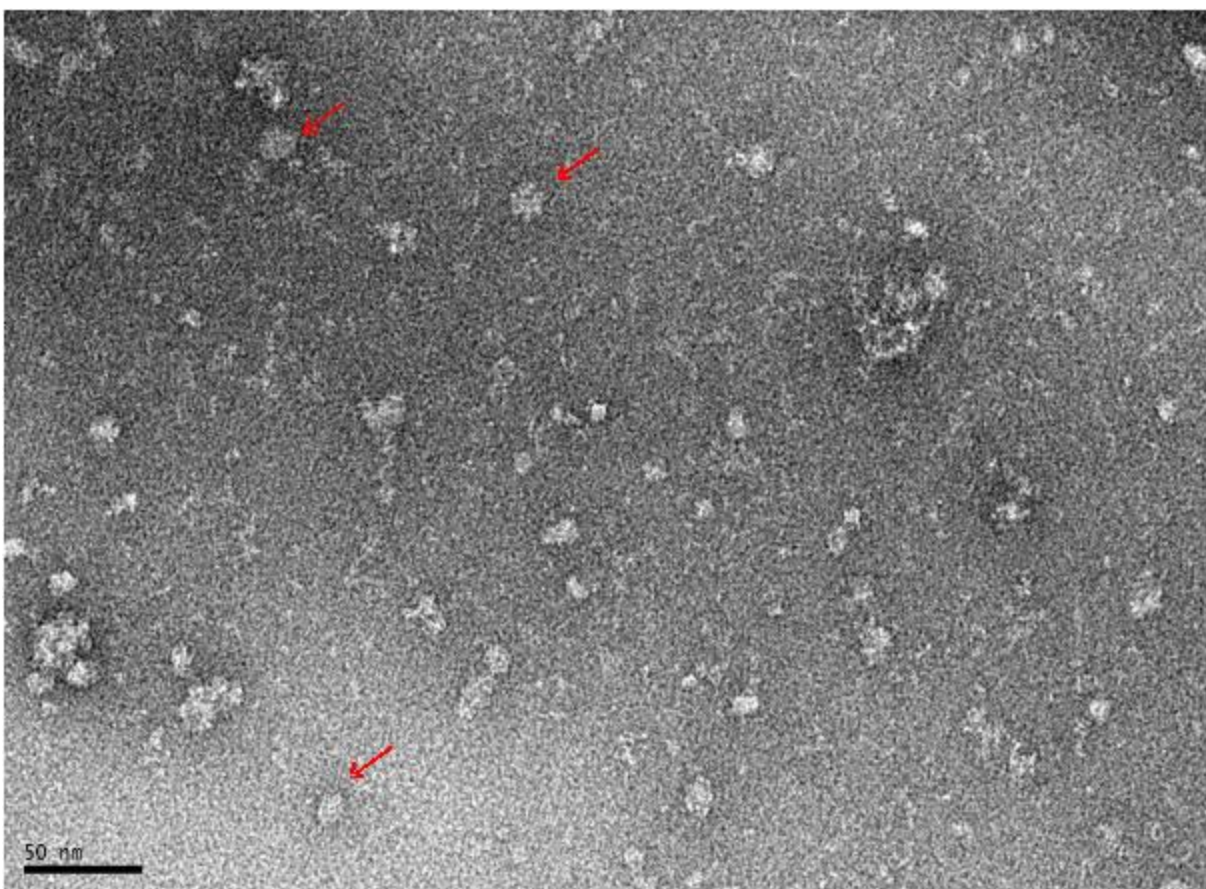
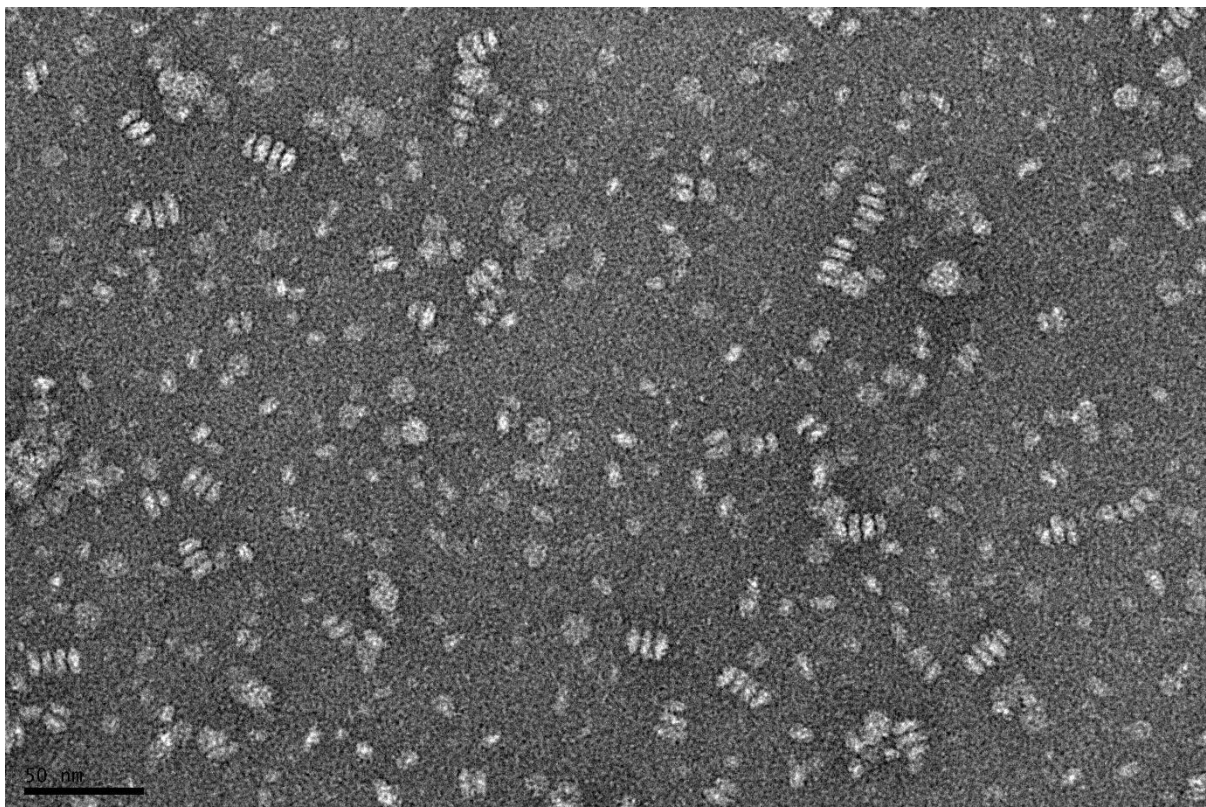


Figure 2 : Gels SDS PAGE 15% d'une purification en effectuant un choc thermique. Le puit M représente le marqueur, S les bactéries lysées après sonication, 50 représente 5 mL du lysat chauffé 20 min à 50 °C, 60 à 60 °C, 70 à 70 °C, 80 à 80 °C.



*Figure 3 : Microscopie électronique des nanodisques formés à partir de membrane, en haut nanodisques témoin vide, en bas dépôt de la fraction de chromatographie d'exclusion de taille correspondant à la taille de nanodisques. Les flèches rouges mettent l'accent sur des nanodisques.*

Partie IV : Etudes fonctionnelles des protéines hémiques YedZ et SpNox

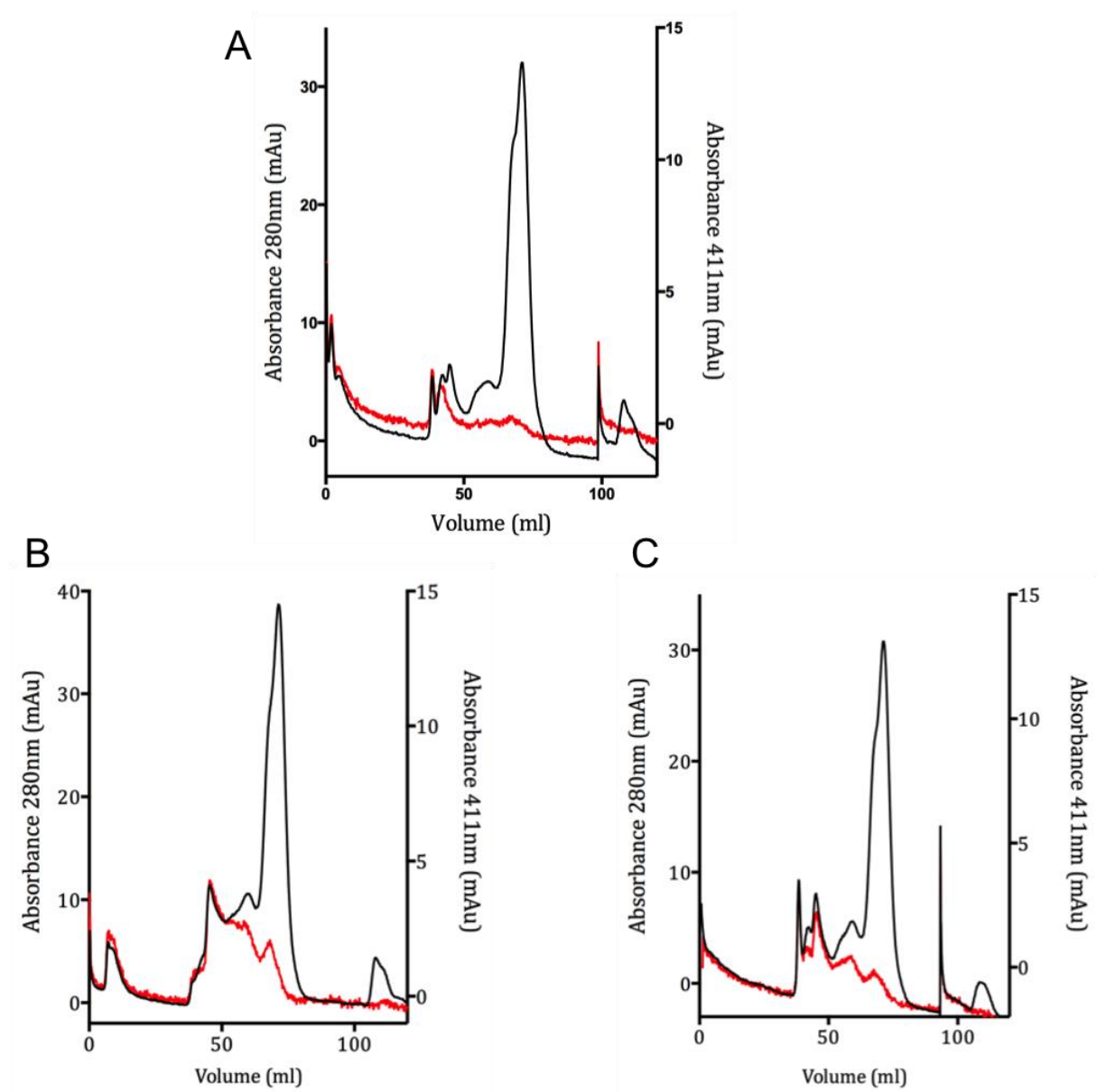


Figure 4 Chromatographie d'exclusion de taille des mutants YedZ, en A l'incorporation du mutant H91A, en B le mutant R78A, en C le mutant H151A

## Références

1. Horton HR. *Principles of Biochemistry*.
2. Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*. 2013;504(7478):107-112. doi:10.1038/nature12822.
3. Kim J, Wu S, Tomasiak TM, et al. Subnanometre-resolution electron cryomicroscopy structure of a heterodimeric ABC exporter. *Nature*. 2014;517(7534):396-400. doi:10.1038/nature13872.
4. White SH. The progress of membrane protein structure determination. 2005;(2004):1948-1949. doi:10.1110/ps.04712004.Figure.
5. Loll PJ. Membrane proteins, detergents and crystals: what is the state of the art? *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Commun*. 2014;70(12):1576-1583. doi:10.1107/S2053230X14025035.
6. Arnold T, Linke D. Phase separation in the isolation and purification of membrane proteins. *Biotechniques*. 2007;43(4):427-440. doi:10.2144/000112566.
7. Selber K, Tjerneld F, Collén A, et al. Large-scale separation and production of engineered proteins, designed for facilitated recovery in detergent-based aqueous two-phase extraction systems. *Process Biochem*. 2004;39(7):889-896. doi:10.1016/S0032-9592(03)00198-5.
8. Kawai T, Caaveiro JMM, Abe R, Katagiri T, Tsumoto K. Catalytic activity of MsbA reconstituted in nanodisc particles is modulated by remote interactions with the bilayer. *FEBS Lett*. 2011;585(22):3533-3537. doi:10.1016/j.febslet.2011.10.015.
9. Zoonens M, Comer J, Masscheleyn S, et al. Dangerous liaisons between detergents and membrane proteins. The case of mitochondrial uncoupling protein 2. *J Am Chem Soc*. 2013;135(40):15174-15182. doi:10.1021/ja407424v.
10. Ziani W, Maillard a. P, Petit-Hartlein I, et al. The X-ray Structure of NccX from *Cupriavidus metallidurans* 31A Illustrates Potential Dangers of Detergent Solubilization When Generating and Interpreting Crystal Structures of Membrane Proteins. *J Biol Chem*. 2014;289(45):31160-31172. doi:10.1074/jbc.M114.586537.



11. Chae PS, Rasmussen SGF, Rana R, et al. Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. 2011;7(12):1003-1008. doi:10.1038/nmeth.1526.Maltose-neopentyl.
12. Popot J-L. Amphipols, nanodiscs, and fluorinated surfactants: three nonconventional approaches to studying membrane proteins in aqueous solutions. *Annu Rev Biochem.* 2010;79:737-775. doi:10.1146/annurev.biochem.052208.114057.
13. Martinez KL, Gohon Y, Corringer PJ, et al. Allosteric transitions of Torpedo acetylcholine receptor in lipids, detergent and amphipols: Molecular interactions vs. physical constraints. *FEBS Lett.* 2002;528(1-3):251-256. doi:10.1016/S0014-5793(02)03306-9.
14. Gohon Y, Dahmane T, Ruigrok RWH, et al. Bacteriorhodopsin/amphipol complexes: structural and functional properties. *Biophys J.* 2008;94(9):3523-3537. doi:10.1529/biophysj.107.121848.
15. Pocanschi CL, Popot JL, Kleinschmidt JH. Folding and stability of outer membrane protein A (OmpA) from *Escherichia coli* in an amphiphilic polymer, amphipol A8-35. *Eur Biophys J.* 2013;42(2-3):103-118. doi:10.1007/s00249-013-0887-z.
16. Eric Feinstein H, Tifrea D, Sun G, Popot J-L, de la Maza LM, Cocco MJ. Long-Term Stability of a Vaccine Formulated with the Amphipol-Trapped Major Outer Membrane Protein from *Chlamydia trachomatis*. *J Membr Biol.* 2014;247(9-10):1053-1065. doi:10.1007/s00232-014-9693-5.
17. Tifrea DF, Sun G, Pal S, et al. Amphipols stabilize the *Chlamydia* major outer membrane protein and enhance its protective ability as a vaccine. *Vaccine.* 2011;29(28):4623-4631. doi:10.1016/j.vaccine.2011.04.065.
18. Sharma KS, Durand G, Giusti F, et al. Glucose-Based Amphiphilic Telomers Designed to Keep Membrane Proteins Soluble in Aqueous Solutions : Synthesis and Physicochemical Characterization Glucose-Based Amphiphilic Telomers Designed to Keep Membrane Proteins Soluble in Aqueous Solutions : Synthe. 2008;(12):13581-13590.
19. Bazzacco P, Billon-Denis E, Sharma KS, et al. Non-ionic homopolymeric amphipols: Application to membrane protein folding, cell-free synthesis, and solution NMR. *Biochemistry.* 2012:120123152316008. doi:10.1021/bi201862v.

20. Bazzacco P, Sharma KS, Durand G, et al. Trapping and stabilization of integral membrane proteins by hydrophobically grafted glucose-based telomers. *Biomacromolecules*. 2009;10(12):3317-3326. doi:10.1021/bm900938w.
21. Huynh KW, Cohen MR, Moiseenkova-Bell VY. Application of Amphipols for Structure-Functional Analysis of TRP Channels. *J Membr Biol*. 2014;843-851. doi:10.1007/s00232-014-9684-6.
22. Etzkorn M, Raschle T, Hagn F, et al. Cell-free expressed bacteriorhodopsin in different soluble membrane mimetics: Biophysical properties and NMR accessibility. *Structure*. 2013;21(3):394-401. doi:10.1016/j.str.2013.01.005.
23. Catoire LJ, Zoonens M, Heijenoort C Van, Giusti F, Popot JL, Guittet E. Inter- and intramolecular contacts in a membrane protein/surfactant complex observed by heteronuclear dipole-to-dipole cross-relaxation. *J Magn Reson*. 2009;197(1):91-95. doi:10.1016/j.jmr.2008.11.017.
24. Catoire LJ, Zoonens M, Van Heijenoort C, Giusti F, Guittet É, Popot JL. Solution NMR mapping of water-accessible residues in the transmembrane  $\beta$ -barrel of OmpX. *Eur Biophys J*. 2010;39(4):623-630. doi:10.1007/s00249-009-0513-2.
25. Polovinkin V, Gushchin I, Sintsov M, et al. High-Resolution Structure of a Membrane Protein Transferred from Amphipol to a Lipidic Mesophase. *J Membr Biol*. 2014;247(9-10):997-1004. doi:10.1007/s00232-014-9700-x.
26. Picard M, Dahmane T, Garrigos M, et al. Protective and inhibitory effects of various types of amphipols on the Ca<sup>2+</sup>-ATPase from sarcoplasmic reticulum: a comparative study. *Biochemistry*. 2006;45(6):1861-1869. doi:10.1021/bi051954a.
27. Breyton C, Gabel F, Abla M, et al. Micellar and biochemical properties of (hemi)fluorinated surfactants are controlled by the size of the polar head. *Biophys J*. 2009;97(4):1077-1086. doi:10.1016/j.bpj.2009.05.053.
28. Abla M, Durand G, Pucci B. Glucose-based surfactants with hydrogenated, fluorinated, or hemifluorinated tails: Synthesis and comparative physical-chemical characterization. *J Org Chem*. 2008;73(21):8142-8153. doi:10.1021/jo801379e.
29. Breyton C, Chabaud E, Chaudier Y, Pucci B, Popot JL. Hemifluorinated surfactants: A non-dissociating environment for handling membrane proteins in aqueous solutions? *FEBS Lett*. 2004;564(3):312-318. doi:10.1016/S0014-5793(04)00227-3.

30. Wang X, Huang G, Yu D, et al. Solubilization and Stabilization of Isolated Photosystem I Complex with Lipopeptide Detergents. *PLoS One*. 2013;8(9):e76256. doi:10.1371/journal.pone.0076256.
31. Privé GG. Lipopeptide detergents for membrane protein studies. *Curr Opin Struct Biol*. 2009;19(4):379-385. doi:10.1016/j.sbi.2009.07.008.
32. Wang X, Corin K, Baaske P, et al. Peptide surfactants for cell-free production of functional G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(22):9049-9054. doi:10.1073/pnas.1018185108.
33. Pebay-Peyroula E, Dahout-Gonzalez C, Kahn R, Trézéguet V, Lauquin GJ-M, Brandolin G. Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature*. 2003;426(6962):39-44. doi:10.1038/nature02056.
34. Hansen SB. Lipid agonism: The PIP2 paradigm of ligand-gated ion channels. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2015;1851(5):620-628. doi:10.1016/j.bbalip.2015.01.011.
35. Laganowsky A, Reading E, Allison TM, et al. Membrane proteins bind lipids selectively to modulate their structure and function. *Nature*. 2014;510(7503):172-175. doi:10.1038/nature13419.
36. Nimigean CM. A radioactive uptake assay to measure ion transport across ion channel-containing liposomes. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1207-1212. doi:10.1038/nprot.2006.166.
37. Johnson ZL, Lee S-Y. *Liposome Reconstitution and Transport Assay for Recombinant Transporters*. 1st ed. Elsevier Inc.; 2015. doi:10.1016/bs.mie.2014.11.048.
38. Das BB, Nothnagel HJ, Lu GJ, et al. Structure determination of a membrane protein in proteoliposomes. *J Am Chem Soc*. 2012;134(4):2047-2056. doi:10.1021/ja209464f.
39. Traaseth NJ, Shi L, Verardi R, Mullen DG, Barany G, Veglia G. Structure and topology of monomeric phospholamban in lipid membranes determined by a hybrid solution and solid-state NMR approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(25):10165-10170. doi:10.1073/pnas.0904290106.
40. Thiriou DS, Nevzorov A a., Zagayanskiy L, Wu CH, Opella SJ. Structure of the coat protein in Pf1 bacteriophage determined by solid-state NMR spectroscopy. *J Mol Biol*. 2004;341(3):869-879. doi:10.1016/j.jmb.2004.06.038.

41. Ketchum RR, Hu W, Cross T a. High-resolution conformation of gramicidin A in a lipid bilayer by solid-state NMR. *Science*. 1993;261(5127):1457-1460. doi:10.1126/science.7690158.
42. Park SH, De Angelis A a, Nevzorov A a, Wu CH, Opella SJ. Three-dimensional structure of the transmembrane domain of Vpu from HIV-1 in aligned phospholipid bicelles. *Biophys J*. 2006;91(8):3032-3042. doi:10.1529/biophysj.106.087106.
43. De Angelis A a, Howell SC, Nevzorov A a, Opella SJ. Structure Determination of a Membrane Protein with Two Tran-membrane Helices in Aligned Phospholipid Bicelles by Solid-State NMR Spectroscopy. *J Am Chem Soc*. 2006;128(10):12256-12267. doi:10.1021/ja063640w.
44. Wang H, Elferich J, Gouaux E. Structures of LeuT in bicelles define conformation and substrate binding in a membrane-like context. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19(2):212-219. doi:10.1038/nsmb.2215.
45. Faham S, Bowie JU. Bicelle crystallization: a new method for crystallizing membrane proteins yields a monomeric bacteriorhodopsin structure. *J Mol Biol*. 2002;316(1):1-6. doi:10.1006/jmbi.2001.5295.
46. Shaw AW, McLean M a, Sligar SG. Phospholipid phase transitions in homogeneous nanometer scale bilayer discs. *FEBS Lett*. 2004;556(1-3):260-264. doi:10.1016/S0014-5793(03)01400-5.
47. Francis G a. The complexity of HDL. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1801(12):1286-1293. doi:10.1016/j.bbalip.2010.08.009.
48. Fitzgerald ML, Morris a L, Chroni a, Mendez a J, Zannis VI, Freeman MW. ABCA1 and amphipathic apolipoproteins form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux. *J Lipid Res*. 2004;45(2):287-294. doi:10.1194/jlr.M300355-JLR200.
49. Phillips MC. New Insights into the Determination of HDL Structure by Apolipoproteins. *J Lipid Res*. 2012. <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/efetch.fcgi?dbfrom=pubmed&id=23230082&retmode=ref&cmd=prlinks>.
50. Reboul E, Dyka FM, Quazi F, Molday RS. Cholesterol transport via ABCA1: new insights from solid-phase binding assay. *Biochimie*. 2013;95(4):957-961.

doi:10.1016/j.biochi.2012.11.009.

51. Chistiakov DA, Bobryshev Y V, Orekhov AN. Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. 2015;XX(X):1-12. doi:10.1111/jcmm.12689.
52. Narayanaswami V, Kiss RS, Weers PMM. The helix bundle: a reversible lipid binding motif. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2010;155(2):123-133. doi:10.1016/j.cbpa.2009.09.009.
53. Borhani DW, Rogers DP, Engler J a, Brouillette CG. Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(23):12291-12296. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=24911&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
54. Mei X, Atkinson D. Crystal structure of C-terminal truncated apolipoprotein A-I reveals the assembly of high density lipoprotein (HDL) by dimerization. *J Biol Chem*. 2011;286(44):38570-38582. <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=21914797&retmode=ref&cmd=prlinks>.
55. Fukuda M, Nakano M, Miyazaki M, Handa T. Thermodynamic and kinetic stability of discoidal high-density lipoprotein formation from phosphatidylcholine/apolipoprotein A-I mixture. *J Phys Chem B*. 2010;114(24):8228-8234. doi:10.1021/jp101071t.
56. Spuhler P, Anantharamaiah GM, Segrest JP, Seelig J. Binding of apolipoprotein A-I model peptides to lipid bilayers. Measurement of binding isotherms and peptide-lipid headgroup interactions. *J Biol Chem*. 1994;269(39):23904-23910. <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=7929037&retmode=ref&cmd=prlinks>.
57. Martin DDO, Budamagunta MS, Ryan RO, Voss JC, Oda MN. Apolipoprotein A-I assumes a "looped belt" conformation on reconstituted high density lipoprotein. *J Biol Chem*. 2006;281(29):20418-20426. doi:10.1074/jbc.M602077200.
58. London E. Investigation of membrane structure using fluorescence quenching by spin-labels. A review of recent studies. *Mol Cell Biochem*. 1982;45(3):181-188. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6289077>.
59. Lins L, Piron S, Conrath K, et al. Enzymatic hydrolysis of reconstituted dimyristoylphosphatidylcholine-apo A-I complexes. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1151(2):137-142. doi:10.1016/0005-2736(93)90096-I.

60. Culot C, Durant F, Lazarescu S, et al. Structural investigation of reconstituted high density lipoproteins by scanning tunnelling microscopy. *Appl Surf Sci.* 2004;230(1-4):151-157. doi:10.1016/j.apsusc.2004.02.064.
61. Davidson WS, Thompson TB. The structure of apolipoprotein A-I in high density lipoproteins. *J Biol Chem.* 2007;282(31):22249-22253. doi:10.1074/jbc.R700014200.
62. Gu F, Jones MK, Chen J, et al. Structures of discoidal high density lipoproteins: a combined computational-experimental approach. *J Biol Chem.* 2010;285(7):4652-4665. doi:10.1074/jbc.M109.069914.
63. Jones MK, Zhang L, Catta A, et al. Assessment of the validity of the double superhelix model for reconstituted high density lipoproteins: A combined computational-experimental approach. *J Biol Chem.* 2010;285(52):41161-41171. doi:10.1074/jbc.M110.187799.
64. Segrest JP, Jones MK, Klonsky E, et al. A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1999;274(45):31755-31758. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10542194>.
65. Bashtovyy D, Jones MK, Anantharamaiah GM, Segrest JP. Sequence conservation of apolipoprotein A-I affords novel insights into HDL structure-function. *J Lipid Res.* 2011;52(3):435-450. doi:10.1194/jlr.R012658.
66. Sevugan Chetty P, Mayne L, Kan Z-Y, Lund-Katz S, Englander SW, Phillips MC. Apolipoprotein A-I helical structure and stability in discoidal high-density lipoprotein (HDL) particles by hydrogen exchange and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(29):11687-11692. doi:10.1073/pnas.1209305109.
67. Martin DDO. Apolipoprotein A-I Assumes a "Looped Belt" Conformation on Reconstituted High Density Lipoprotein. *J Biol Chem.* 2006;281(29):20418-20426. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M602077200>.
68. Wu Z, Gogonea V, Lee X, et al. *Double Superhelix Model of High Density Lipoprotein.*; 2009. doi:10.1074/jbc.M109.039537.
69. Shih AY, Sligar SG, Schulten K. Molecular models need to be tested: the case of a solar flares discoidal HDL model. *Biophys J.* 2008;94(12):L87-L89. doi:10.1529/biophysj.108.131581.

70. Gursky O. Crystal structure of  $\Delta(185-243)$ ApoA-I suggests a mechanistic framework for the protein adaptation to the changing lipid load in good cholesterol: from flatland to sphereland via double belt, belt buckle, double hairpin and trefoil/tetrafoil. *J Mol Biol.* 2013;425(1):1-16. doi:10.1016/j.jmb.2012.09.027.
71. Shih AY, Sligar SG, Schulten K. Maturation of high-density lipoproteins. *J R Soc Interface.* 2009;6(39):863-871. doi:10.1098/rsif.2009.0173.
72. Henrich E, Dötsch V, Bernhard F. Screening for Lipid Requirements of Membrane Proteins by Combining Cell-Free Expression with Nanodiscs. 2015;556:351-369. doi:10.1016/bs.mie.2014.12.016.
73. Nakano M, Fukuda M, Kudo T, et al. Static and Dynamic Properties of Phospholipid Bilayer Nanodiscs. 2009;(20):8308-8312.
74. Stepien P, Polit A, Wisniewska-Becker A. Comparative EPR studies on lipid bilayer properties in nanodiscs and liposomes. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1848(1PA):60-66. doi:10.1016/j.bbamem.2014.10.004.
75. Segrest JP, Jackson RL, Morrisett JD, Gotto a M. A molecular theory of lipid-protein interactions in the plasma lipoproteins. *FEBS Lett.* 1974;38(3):247-258.
76. Epand RM, Gawish A, Iqbal M, et al. Studies of synthetic peptide analogs of the amphipathic helix. Effect of charge distribution, hydrophobicity, and secondary structure on lipid association and lecithin:cholesterol acyltransferase activation. *J Biol Chem.* 1987;262(19):9389-9396. <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=3597415&retmode=ref&cmd=prlinks>.
77. Tanaka M, Takamura Y, Kawakami T, Aimoto S, Saito H, Mukai T. Effect of amino acid distribution of amphipathic helical peptide derived from human apolipoprotein A-I on membrane curvature sensing. *FEBS Lett.* 2013;587(5):510-515. doi:10.1016/j.febslet.2013.01.026.
78. Hristova K, Wimley WC, Mishra VK, Anantharamiah GM, Segrest JP, White SH. An amphipathic alpha-helix at a membrane interface: a structural study using a novel X-ray diffraction method. *J Mol Biol.* 1999;290(1):99-117. doi:10.1006/jmbi.1999.2840.
79. Fischer NO, Blanchette CD, Segelke BW, et al. Isolation, characterization, and

- stability of discretely-sized nanolipoprotein particles assembled with apolipoprotein III. *PLoS One*. 2010;5(7):e11643. doi:10.1371/journal.pone.0011643.
80. Blanchette CD, Law R, Benner WH, et al. Quantifying size distributions of nanolipoprotein particles with single-particle analysis and molecular dynamic simulations. *J Lipid Res*. 2008;49(7):1420-1430. doi:10.1194/jlr.M700586-JLR200.
  81. Baker SE, Hopkins RC, Blanchette CD, et al. Hydrogen production by a hyperthermophilic membrane-bound hydrogenase in water-soluble nanolipoprotein particles. *J Am Chem Soc*. 2009;131(22):7508-7509. doi:10.1021/ja809251f.
  82. Li Y, Kijac AZ, Sligar SG, Rienstra CM. Structural analysis of nanoscale self-assembled discoidal lipid bilayers by solid-state NMR spectroscopy. *Biophys J*. 2006;91(10):3819-3828. doi:10.1529/biophysj.106.087072.
  83. Long AR, Brien CCO, Malhotra K, et al. A detergent-free strategy for the reconstitution of active enzyme complexes from native biological membranes into nanoscale discs. *BMC Biotechnol*. 2013;13(1):1. doi:10.1186/1472-6750-13-41.
  84. Jamshad M, Charlton J, Lin Y, et al. G-protein coupled receptor solubilization and purification for biophysical analysis and functional studies, in the total absence of detergent. *Biosci Rep*. 2015;35(2):1-10. doi:10.1042/BSR20140171.
  85. Ritchie TK. Reconstitution of Membrane Proteins in Phospholipid Bilayer Nanodiscs. *Changes*. 2009;79(1):997-1003. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.
  86. Pandit A, Shirzad-Wasei N, Wlodarczyk LM, et al. Assembly of the major light-harvesting complex II in lipid nanodiscs. *Biophys J*. 2011;101(10):2507-2515. doi:10.1016/j.bpj.2011.09.055.
  87. Degrip WJ, Vanoostrum J, Bovee-Geurts PH. Selective detergent-extraction from mixed detergent/lipid/protein micelles, using cyclodextrin inclusion compounds: a novel generic approach for the preparation of proteoliposomes. *Biochem J*. 1998;330 ( Pt 2):667-674. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1219188&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
  88. Michel E, Wüthrich K. High-yield Escherichia coli-based cell-free expression of human proteins. *J Biomol NMR*. 2012;53(1):43-51. doi:10.1007/s10858-012-9619-4.



89. Cappuccio JA, Hinz AK, Kuhn EA, et al. Cell-free expression for nanolipoprotein particles: building a high-throughput membrane protein solubility platform. *Methods Mol Biol.* 2009;498:273-296. <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=18988032&retmode=ref&cmd=prlinks>.
90. Shenkarev ZO, Lyukmanova EN, Butenko IO, et al. Lipid-protein nanodiscs promote in vitro folding of transmembrane domains of multi-helical and multimeric membrane proteins. *BBA - Biomembr.* 2013;1828(2):776-784. doi:10.1016/j.bbamem.2012.11.005.
91. Lyukmanova EN, Shenkarev ZO, Khabibullina NF, et al. Lipid-protein nanodisks for cell-free production of integral membrane proteins in a soluble and folded state: Comparison with detergent micelles, bicelles and liposomes. *BBA - Biomembr.* 2011:1-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.10.020>.
92. Bayburt TH, Carlson JW, Sligar SG. Reconstitution and imaging of a membrane protein in a nanometer-size phospholipid bilayer. *J Struct Biol.* 1998;123(1):37-44. doi:10.1006/jsbi.1998.4007.
93. Moustaine D El, Doumazane E, Scholler P, et al. Distinct roles of metabotropic glutamate receptor dimerization in agonist activation and G-protein coupling. 2012. doi:10.1073/pnas.1205838109/-/DCSupplemental. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1205838109](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1205838109).
94. Shi L, Shen Q-T, Kiel A, et al. SNARE proteins: one to fuse and three to keep the nascent fusion pore open. *Science.* 2012;335(6074):1355-1359. doi:10.1126/science.1214984.
95. Ritchie TK, Kwon H, Atkins WM. Conformational analysis of human ATP-binding cassette transporter ABCB1 in lipid nanodiscs and inhibition by the antibodies MRK16 and UIC2. *J Biol Chem.* 2011;286(45):39489-39496. doi:10.1074/jbc.M111.284554.
96. Wu Z, Liu AQ, Hjort K. Microfluidic continuous particle/cell separation via electroosmotic-flow-tuned hydrodynamic spreading. *J Micromechanics Microengineering.* 2007;17(10):1992-1999. doi:10.1088/0960-1317/17/10/010.
97. Glück JM, Koenig BW, Willbold D. Nanodiscs allow the use of integral membrane proteins as analytes in surface plasmon resonance studies. *Anal Biochem.* 2011;408(1):46-52. doi:10.1016/j.ab.2010.08.028.

98. Gao T, Petrova J, He W, et al. Characterization of de novo synthesized GPCRs supported in nanolipoprotein discs. *PLoS One*. 2012;7(9):e44911. doi:10.1371/journal.pone.0044911.
99. Ranaghan MJ, Schwall CT, Alder NN, Birge RR. Green proteorhodopsin reconstituted into nanoscale phospholipid bilayers (nanodiscs) as photoactive monomers. *J Am Chem Soc*. 2011;133(45):18318-18327. doi:10.1021/ja2070957.
100. Kuszak AJ, Pitchiaya S, Anand JP, Mosberg HI, Walter NG, Sunahara RK. Purification and functional reconstitution of monomeric mu-opioid receptors: allosteric modulation of agonist binding by Gi2. *J Biol Chem*. 2009;284(39):26732-26741. doi:10.1074/jbc.M109.026922.
101. Bayburt TH, Leitz AJ, Xie G, Oprian DD, Sligar SG. Transducin activation by nanoscale lipid bilayers containing one and two rhodopsins. *J Biol Chem*. 2007;282(20):14875-14881. doi:10.1074/jbc.M701433200.
102. Bayburt TH, Grinkova Y V, Sligar SG. Assembly of single bacteriorhodopsin trimers in bilayer nanodiscs. *Arch Biochem Biophys*. 2006;450(2):215-222. doi:10.1016/j.abb.2006.03.013.
103. Zocher M, Roos C, Wegmann S, et al. Single-molecule force spectroscopy from nanodiscs: an assay to quantify folding, stability, and interactions of native membrane proteins. *ACS Nano*. 2012;6(1):961-971. doi:10.1021/nn204624p.
104. Alvarez FJD, Orelle C, Davidson AL. Functional reconstitution of an ABC transporter in nanodiscs for use in electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J Am Chem Soc*. 2010;132(28):9513-9515. doi:10.1021/ja104047c.
105. Das A, Varma SS, Mularczyk C, Meling DD. Functional investigations of thromboxane synthase (CYP5A1) in lipid bilayers of nanodiscs. *Chembiochem*. 2014;15(6):892-899. doi:10.1002/cbic.201300646.
106. Näsvisk Öjemyr L, von Ballmoos C, Gennis RB, Sligar SG, Brzezinski P. Reconstitution of respiratory oxidases in membrane nanodiscs for investigation of proton-coupled electron transfer. *FEBS Lett*. 2012;586(5):640-645. doi:10.1016/j.febslet.2011.12.023.
107. Das A, Zhao J, Schatz GC, Sligar SG, Van Duyne RP. Screening of type I and II drug binding to human cytochrome P450-3A4 in nanodiscs by localized surface plasmon resonance spectroscopy. *Anal Chem*. 2009;81(10):3754-3759. doi:10.1021/ac802612z.

108. Das A, Grinkova Y V, Sligar SG. Redox potential control by drug binding to cytochrome P450 3A4. *J Am Chem Soc.* 2007;129(45):13778-13779. doi:10.1021/ja074864x.
109. Bayburt TH, Sligar SG. Single-molecule height measurements on microsomal cytochrome P450 in nanometer-scale phospholipid bilayer disks. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(10):6725-6730. doi:10.1073/pnas.062565599.
110. Dalal K, Nguyen N, Alami M, et al. Structure, binding, and activity of Syd, a SecY-interacting protein. *J Biol Chem.* 2009;284(12):7897-7902. doi:10.1074/jbc.M808305200.
111. Borch J, Roepstorff P, Møller-Jensen J. Nanodisc-based co-immunoprecipitation for mass spectrometric identification of membrane-interacting proteins. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10(7):O110.006775. doi:10.1074/mcp.O110.006775.
112. Marty MT, Wilcox KC, Klein WL, Sligar SG. Nanodisc-solubilized membrane protein library reflects the membrane proteome. *Anal Bioanal Chem.* 2013;405(12):4009-4016. doi:10.1007/s00216-013-6790-8.
113. Hernández-Rocamora VM, García-Montañés C, Rivas G, Llorca O. Reconstitution of the Escherichia coli cell division ZipA-FtsZ complexes in nanodiscs as revealed by electron microscopy. *J Struct Biol.* 2012;180(3):531-538. doi:10.1016/j.jsb.2012.08.013.
114. Hebling CM, Morgan CR, Stafford DW, Jorgenson JW, Rand KD, Engen JR. Conformational analysis of membrane proteins in phospholipid bilayer nanodiscs by hydrogen exchange mass spectrometry. *Anal Chem.* 2010;82(13):5415-5419. doi:10.1021/ac100962c.
115. Borch J, Torta F, Sligar SG, Roepstorff P. Nanodiscs for immobilization of lipid bilayers and membrane receptors: kinetic analysis of cholera toxin binding to a glycolipid receptor. *Anal Chem.* 2008;80(16):6245-6252. doi:10.1021/ac8000644.
116. Goluch ED, Shaw AW, Sligar SG, Liu C. Microfluidic patterning of nanodisc lipid bilayers and multiplexed analysis of protein interaction. *Lab Chip.* 2008;8(10):1723. <http://xlink.rsc.org/?DOI=b806733c>.
117. Yan R, Mo X, Paredes AM, et al. Reconstitution of the platelet glycoprotein Ib-IX complex in phospholipid bilayer Nanodiscs. *Biochemistry.* 2011;50(49):10598-10606. doi:10.1021/bi201351d.

118. Katayama H, Wang J, Tama F, et al. Three-dimensional structure of the anthrax toxin pore inserted into lipid nanodiscs and lipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(8):3453-3457. doi:10.1073/pnas.1000100107.
119. Gogol EP, Akkaladevi N, Szerszen L, et al. Three dimensional structure of the anthrax toxin translocon-lethal factor complex by cryo-electron microscopy. *Protein Sci*. 2013;22(5):586-594. doi:10.1002/pro.2241.
120. McCoy JG, Rusinova R, Kim DM, et al. A KcsA/MloK1 Chimeric Ion Channel Has Lipid-dependent Ligand-binding Energetics. *J Biol Chem*. 2014;289(14):9535-9546. doi:10.1074/jbc.M113.543389.
121. Choi W-S, Rice WJ, Stokes DL, Collier BS. Three-dimensional reconstruction of intact human integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3: new implications for activation-dependent ligand binding. *Blood*. 2013;122(26):4165-4171. doi:10.1182/blood-2013-04-499194.
122. Xu X-P, Zhai D, Kim E, et al. Three-dimensional structure of Bax-mediated pores in membrane bilayers. *Cell Death Dis*. 2013;4:e683. doi:10.1038/cddis.2013.210.
123. Murray SC, Gillard BK, Ludtke SJ, Pownall HJ. Direct Measurement of the Structure of Reconstituted High Density Lipoproteins by Cryo-EM. *Biophys J*. 2015;110(February):1-7. doi:10.1016/j.bpj.2015.10.028.
124. Yu T-Y, Raschle T, Hiller S, Wagner G. Solution NMR spectroscopic characterization of human VDAC-2 in detergent micelles and lipid bilayer nanodiscs. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1818(6):1562-1569. doi:10.1016/j.bbamem.2011.11.012.
125. Hagn F, Etzkorn M, Raschle T, Wagner G. Optimized phospholipid bilayer nanodiscs facilitate high-resolution structure determination of membrane proteins. *J Am Chem Soc*. 2013;135(5):1919-1925. doi:10.1021/ja310901f.
126. Miyazaki M, Tajima Y, Handa T, Nakano M. Static and dynamic characterization of nanodiscs with apolipoprotein A-I and its model peptide. *J Phys Chem B*. 2010;114(38):12376-12382. doi:10.1021/jp102074b.
127. Glu JM, Wittlich M, Feuerstein S, Hoffmann S, Willbold D. Integral Membrane Proteins in Nanodiscs Can Be Studied by Solution NMR Spectroscopy spectroscopy is limited by slow rotational diffusion of the particles . *J Am Chem Soc*. 2009;131(34):12060-12061. doi:10.1021/ja904897p.
128. Raschle T, Hiller S, Yu T-YYTY, Rice AJAAJ, Walz T, Wagner G. Structural and

- functional characterization of the integral membrane protein VDAC-1 in lipid bilayer nanodiscs. *J Am Chem Soc.* 2009;131(49):17777-17779. doi:10.1021/ja907918r.Structural.
129. Yao Y, Fujimoto LM, Hirshman N, et al. Conformation of BCL-XL upon Membrane Integration. *J Mol Biol.* 2015;427(13):2262-2270. doi:10.1016/j.jmb.2015.02.019.
  130. Maric S, Skar-Gislinge N, Midtgaard S, et al. Stealth carriers for low-resolution structure determination of membrane proteins in solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2014;70(Pt 2):317-328. doi:10.1107/S1399004713027466.
  131. Kynde S a R, Skar-Gislinge N, Pedersen MC, et al. Small-angle scattering gives direct structural information about a membrane protein inside a lipid environment. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2014;70(Pt 2):371-383. doi:10.1107/S1399004713028344.
  132. Midtgaard SR, Pedersen MC, Arleth L. Small-Angle X-Ray Scattering of the Cholesterol Incorporation into Human ApoA1-POPC Discoidal Particles. *Biophys J.* 2015;109(2):308-318. doi:10.1016/j.bpj.2015.06.032.
  133. Puthenveetil R, Vinogradova O. Optimization of the design and preparation of nanoscale phospholipid bilayers for its application to solution NMR. *Proteins.* 2013;81(7):1222-1231. doi:10.1002/prot.24271.
  134. Frauenfeld J, Gumbart J, Sluis EO Van Der, et al. Cryo-EM structure of the ribosome-SecYE complex in the membrane environment. *Nat Struct Mol Biol.* 2011;18(5):614-621. doi:10.1038/nsmb.2026.
  135. Levy D, Bluzat A, Seigneuret M, Rigaud J. A systematic study of liposome and proteoliposome reconstitution involving Bio-Bead-mediated Triton X-100 removal. 1990;1025:179-190.
  136. Marty MT, Das A, Sligar SG. Ultra-thin layer MALDI mass spectrometry of membrane proteins in nanodiscs. *Anal Bioanal Chem.* 2012;402(2):721-729. doi:10.1007/s00216-011-5512-3.
  137. Elsayed MM a, Cevc G. Turbidity spectroscopy for characterization of submicroscopic drug carriers, such as nanoparticles and lipid vesicles: Size determination. *Pharm Res.* 2011;28(9):2204-2222. doi:10.1007/s11095-011-0448-z.
  138. Zehender F, Ziegler A, Scho H, Seelig J. Thermodynamics of Protein Self-

Association and Unfolding. The Case of Apolipoprotein A-I. 2012.

139. Izadi N, Henry Y, Haladjian J, et al. Purification and characterization of an extracellular heme-binding protein, HasA, involved in heme iron acquisition. *Biochemistry*. 1997;36(23):7050-7057. doi:10.1021/bi962577s.
140. Dawson RJP, Locher KP. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature*. 2006;443(7108):180-185. doi:10.1038/nature05155.
141. Higgins CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature*. 2007;446(7137):749-757. doi:10.1038/nature05630.
142. Locher KP. Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol*. 2004;14(4):426-431. doi:10.1016/j.sbi.2004.06.005.
143. Aller SG, Yu J, Ward A, et al. Structures of P-glycoproteins reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science (80- )*. 2009;323(5922):1718-1722. doi:10.1126/science.1168750.Structure.
144. Reyes CL, Ward A, Yu J, Chang G. The structures of MsbA: Insight into ABC transporter-mediated multidrug efflux. *FEBS Lett*. 2006;580(4):1042-1048. doi:10.1016/j.febslet.2005.11.033.
145. Orelle C, Gubellini F, Durand A, et al. Conformational change induced by ATP binding in the multidrug ATP-binding cassette transporter BmrA. *Biochemistry*. 2008;47(8):2404-2412. doi:10.1021/bi702303s.
146. Fribourg PF, Chami M, Sorzano COS, et al. 3D cryo-electron reconstruction of BmrA, a bacterial multidrug ABC transporter in an inward-facing conformation and in a lipidic environment. *J Mol Biol*. 2014;426(10):2059-2069. doi:10.1016/j.jmb.2014.03.002.
147. Moeller A, Lee SC, Tao H, et al. Distinct Conformational Spectrum of Homologous Multidrug ABC Transporters. *Structure*. 2015:1-11. doi:10.1016/j.str.2014.12.013.
148. Lai G, Renthal R. Integral membrane protein fragment recombination after transfer from nanolipoprotein particles to bicelles. *Biochemistry*. 2013;52(52):9405-9412. doi:10.1021/bi401391c.
149. D'Avanzo N, Cheng WWL, Doyle D a, Nichols CG. Direct and specific activation of human inward rectifier K<sup>+</sup> channels by membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem*. 2010;285(48):37129-37132.

doi:10.1074/jbc.C110.186692.

150. Jayaraman S, Cavigliolo G, Gursky O. Folded functional lipid-poor apolipoprotein A-I obtained by heating of high-density lipoproteins: relevance to high-density lipoprotein biogenesis. *Biochem J.* 2012;442(3):703-712. doi:10.1042/BJ20111831.
151. Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1666(1-2):105-117. doi:10.1016/j.bbamem.2004.04.011.
152. Catte A, Patterson JC, Jones MK, et al. Novel changes in discoidal high density lipoprotein morphology: a molecular dynamics study. *Biophys J.* 2006;90(12):4345-4360. doi:10.1529/biophysj.105.071456.
153. Chromy B a, Arroyo E, Blanchette CD, et al. Different apolipoproteins impact nanolipoprotein particle formation. *J Am Chem Soc.* 2007;129(46):14348-14354. doi:10.1021/ja074753y.
154. Segrest JP, De Loof H, Dohlman JG, Brouillette CG, Anantharamaiah GM. Amphipathic helix motif: classes and properties. *Proteins.* 1990;8(2):103-117. doi:10.1002/prot.340080202.
155. Sanchez-Pulido L, Rojas AM, Valencia A, Martinez-A C, Andrade M a. ACRATA: a novel electron transfer domain associated to apoptosis and cancer. *BMC Cancer.* 2004;4:98. doi:10.1186/1471-2407-4-98.
156. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(3):181-189. doi:10.1038/nri1312.