



**HAL**  
open science

# Expression de protéines par voie " cell-free " : de la régulation in vitro aux protéoliposomes

Grégory Hansen

► **To cite this version:**

Grégory Hansen. Expression de protéines par voie " cell-free " : de la régulation in vitro aux protéoliposomes. Chimie organique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066543 . tel-01322409

**HAL Id: tel-01322409**

**<https://theses.hal.science/tel-01322409>**

Submitted on 27 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.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale n° 388 : Chimie physique et chimie analytique de Paris Centre

*UMR 8640 PASTEUR / Pôle Microfluidique / Equipe du Pr. Baigl*

***Expression de protéines par voie « Cell-free » : de la  
régulation in vitro aux protéoliposomes***

Par Grégory Pierre Rich Hansen

Thèse de doctorat de Chimie

Dirigée par Damien Baigl

Présentée et soutenue publiquement le 7 Décembre 2015

Devant un jury composé de :

Rapporteurs : Christophe DANELON  
Vincent NOIREAUX

Examineurs : Damien BAIGL  
Patricia BASSEREAU  
Sandra CORTES  
Mathieu MOREL

Directeur de thèse : Damien BAIGL



## Remerciements



## **Abréviations**

AA : Acide Aminé  
ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire  
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique  
AmpR : Gène de résistance à l'ampicilline  
ARN : Acide RiboNucléique  
ARNm : Acide RiboNucléique messenger  
ARNr : Acide RiboNucléique ribosomal  
ARNt : Acide RiboNucléique de transfert  
ATP : Adénosine TriPhosphate  
BEVS : Système d'Expression basé sur l'infection par Vecteurs Baculovirus  
bp : base pair ou paire de base  
BR : BactérioRhodopsine  
CAT : Chloramphénicol Acétyle Transférase  
CF : CarboxyFluorescéine  
CFPS : Cell-Free Protein Synthesis  
CFRPS : Cell-Free Reconstituted Protein Synthesis  
CHAPS : 3-((3-cholamidopropyl)diméthylammonio)-1-propanosulfonate  
CK : Créatine Kinase  
CMC : Concentration Micellaire Critique  
CMV : CytoMégaloVirus  
CoA : Coenzyme A  
CTP : Cytosine TriPhosphate  
Cx32 ou Cx43 : Connexine 32 ou Connexine 43  
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole  
DeGFP : Destabilized Green Fluorescent Protein  
DOPC: 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine  
DPPC : 1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholine  
DTT : Dithiothréitol  
ECE : Extrait d'Escherichia Coli  
E. Coli : Escherichia Coli  
EF : Facteur d'Elongation  
EF-Ts : Facteur d'Elongation Thermo stable  
EF-Tu : Facteur d'Elongation Thermo unstable  
eGFP : enhanced Green Fluorescent Protein  
EmGFP : Emerald Green Fluorescent Protein  
EPC: Egg L- $\alpha$ -phosphatidylcholine  
Erk : Extracellular signal-regulated kinase  
FACS : Cytométrie en Flux  
GDP : Guanosine DiPhosphate  
GFP : Green Fluorescent Protein  
GFP wt : GFP wild-type  
GM-CSF : Facteurs de Stimulation de Colonisation des Granulocytes Macrophages  
GMPc : Guanosine MonoPhosphate cyclique  
GPCR : Récepteur Couplé à une Protéine G  
GST : Glutathione S-Transférase

## Abréviations

---

GTP : Guanosine TriPhosphate  
GUV : Giant Unilamellar Vesicle  
HRP : Peroxydase de raifort  
IAM : Iodoacétamide  
ICE : Extrait de Cellule d'Insecte  
IF : Facteur d'Initiation  
Ig : Immunoglobuline  
IP<sub>3</sub> : Inositol triPhosphate  
ITO : Oxyde d'Indium-étain (Indium Tin Oxide)  
L<sub>B</sub> : Lymphocyte B  
LPS : Lipopolysaccharides  
LUV : Large Unilamellar Vesicle  
Lyso-PC : Lysophosphatidylcholine  
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase  
MLV : MultiLamellar Vesicle  
MM : Masse Moléculaire  
MVV : MultiVesicular Vesicle  
NaN<sub>3</sub> : Azoture de Sodium  
Nt : Nucléotide  
PBS : Tampon phosphate salin  
PC : Phosphocréatine  
PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne  
PDMS : PolyDiméthylSiloxane  
PEG : PolyEthylène Glycol  
PEP : Phosphoénolpyruvate  
PEPCK : Phosphoénolpyruvate Carboxykinase  
Pi : Phosphate inorganique  
PI : Iodure de Propidium  
PISA : Protein in situ arrays  
PRM : complexe Protéine-Ribosome-ARNm  
PSM : Palmitoyl Sphingomyéline  
PURE : Protein synthesis Using Recombinant Elements  
RBS : Ribosome Binding Site, Site de liaison du Ribosome  
RF : Facteur de Relâchement  
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire  
RP : Régime Permanent  
RRL : Lysat de Réticulocyte de Lapin  
RT-PCR : RétroTranscription-Réaction de Polymérisation en Chaîne  
SUV : Small Unilamellar Vesicle  
SD : ShineDalgarno  
scFv : Fragment variable simple chaîne  
TBS : Tris-Buffered Saline  
TBST : Tris-Buffered Saline and Tween 20  
TRITC : TétraméthylRhodamine IsoThioCyanate  
tTA : trans-activatrice  
UTP : Uracile TriPhosphate  
VLP : Virus Like Particle  
WGE : Extrait de Germes de Blé  
YFP : Yellow Fluorescent Protein

## Abréviations

---

### **Puissances :**

k : kilo  $10^3$

m : milli  $10^{-3}$

$\mu$  : micro  $10^{-6}$

n : nano  $10^{-9}$

### **Unités de mesure :**

°C : Degré Celsius

A : Ampère

Da : Dalton

L : Litre

M : Molaire

m : mètre

Osm : Osmolarité

V : Volt



## Table des matières

<b>Remerciements.....</b>	<b>3</b>
<b>Abréviations.....</b>	<b>5</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>9</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>13</b>
<b><u>Chapitre 1 : Systèmes « Cell-free » : principes et applications à l'étude des protéines</u>.....</b>	<b>15</b>
<b>Sommaire.....</b>	<b>17</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>19</b>
<b>1. L'expression de protéines.....</b>	<b>21</b>
1.1 Synthèse des protéines dans le vivant.....	21
1.2 Expression de protéines recombinantes en laboratoire.....	35
<b>2. Applications des systèmes CFPS et CFRPS.....</b>	<b>53</b>
2.1 Systèmes CFPS au service de la production Haut-Débit.....	53
2.2 Développement de solutions thérapeutiques grâce aux systèmes CFPS.....	55
2.3 CFPS et ingénierie des protéines.....	57
2.4 CFPS et protéines membranaires.....	59
2.5 Reconstitution d'assemblage protéique complexe en « cell-free ».....	60
<b>3. Bilan des stratégies de production et d'applications des systèmes « Cell-free ».....</b>	<b>64</b>
<b><u>Chapitre 2 : Régulation génétique et métabolique en système « Cell-free »</u>.....</b>	<b>67</b>
<b>Sommaire.....</b>	<b>69</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>71</b>
<b>1. Approche biosynthétique de la régulation de l'expression.....</b>	<b>73</b>
1.1 Régulation de l'expression par des modifications génétiques.....	73

1.2	Régulation de l'expression par des modifications chimiques et biochimiques en milieu « Cell-free » .....	79
<b>2.</b>	<b>Régulation par voie métabolique ou antibiotique de l'expression en « Cell-free » .....</b>	<b>86</b>
2.1	Utilisation du PURExpress® .....	86
2.2	Etude de la régulation de l'expression par le métabolisme .....	87
2.3	Régulation de l'expression par un antibiotique .....	93
<b>3.</b>	<b>Bilan et perspectives : Régulation de l'expression par voie métabolique et par un antibiotique.....</b>	<b>106</b>

**Chapitre 3 : Etude cinétique de la maturation des protéines en milieu**

<b><u>« Cell-free » .....</u></b>	<b>109</b>	
<b>Sommaire .....</b>	<b>111</b>	
<b>Introduction .....</b>	<b>113</b>	
<b>1. Etude cinétique de la maturation des protéines : Etat de l'Art.....</b>	<b>115</b>	
1.1	Les protéines fluorescentes.....	115
1.2	Etude de la maturation de la GFP .....	119
<b>2. Etude de la maturation de protéines fluorescentes en milieu CFRPS</b>	<b>128</b>	
2.1	Démarche expérimentale : exemple de la PhiYFPm .....	128
2.2	Application de la méthode à des variantes de la GFP et à la mcherry .....	138
<b>3. Conclusion et limitations.....</b>	<b>143</b>	

**Chapitre 4 : Liposomes et protéoliposomes : préparation et applications**

<b><u>Sommaire .....</u></b>	<b>147</b>	
<b>Introduction .....</b>	<b>149</b>	
<b>1. Les vésicules artificielles : le cas du liposome .....</b>	<b>151</b>	
1.1	Définition.....	151
1.2	Principales applications des liposomes.....	156
<b>2. Techniques de production des vésicules unilamellaires géantes.....</b>	<b>163</b>	
2.1	Hydratation d'un film de lipides.....	163
2.2	Electroformation .....	165
2.3	Transfert de gouttes .....	166
2.4	Approches microfluidiques.....	169
2.5	Bilan des techniques de production .....	172

<b>3. Les protéoliposomes : préparation et applications .....</b>	<b>175</b>
3.1 Méthode historique de production de protéoliposomes.....	175
3.2 Une variante de la méthode historique .....	176
3.3 Approche « Cell-free » .....	179
<b>4. Des liposomes aux protéoliposomes : bilan et perspectives.....</b>	<b>185</b>
<b><u>Chapitre 5 : Préparation « Cell-free » de protéoliposomes stimulables : exemple d'une connexine .....</u></b>	<b>187</b>
<b>Sommaire .....</b>	<b>189</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>191</b>
<b>1. Les protéines produites en « Cell-free ».....</b>	<b>193</b>
1.1 Les molécules amphiphiles couplées aux CFPS.....	194
1.2 Développement d'un système versatile pour la production de liposomes.....	195
<b>2. Suivi de l'insertion des protéines dans les liposomes .....</b>	<b>201</b>
2.1 Les protéines membranaires .....	201
2.2 Les connexines .....	202
2.3 La connexine 43 construction et caractérisation de l'expression .....	203
2.4 L'insertion de Cx43-eGFP : Un phénomène passif co-translationnel.....	209
<b>3. Tests de fonctionnalité des protéoliposomes .....</b>	<b>214</b>
3.1 Test de perméabilité.....	214
3.2 Test de perméabilité sélective.....	217
<b>4. Un système déclenchable et modulable .....</b>	<b>219</b>
4.1 Un système déclenchable sous contrôle de la température.....	219
4.2 Une perméabilité modulable.....	220
<b>5. Bilan et perspectives : Production et insertion versatiles d'une protéine membranaire dans des liposomes géants .....</b>	<b>225</b>
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>227</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>229</b>



## Introduction générale

La cellule est l'unité de base du vivant, elle est capable de s'auto-entretenir tout en interagissant avec son environnement. Elle représente l'image même d'un assemblage dont chaque élément est essentiel au bon fonctionnement de l'entité. Depuis des décennies, la cellule, procaryote ou eucaryote, est ainsi non seulement un sujet majeur de la biologie mais également un outil biotechnologique performant de production de biomolécules. De la recherche académique à la production industrielle, la cellule est devenue un allié technologique fiable offrant une machinerie robuste capable de produire à façon des molécules variées (ADN, peptides, protéines) avec des rendements importants. Pour ce type d'applications, l'utilisateur se repose sur des modules unitaires biologiques bien définis (réplication, transcription, traduction) où les propriétés spécifiques du vivant peuvent apparaître, en première approximation, comme un degré supplémentaire de complexité.

Depuis plusieurs décennies, dans un souci de performance et de reproductibilité, les chercheurs se sont donc intéressés à développer des systèmes minimaux se limitant aux fonctions essentielles à la production de molécules biologiques d'intérêt en s'affranchissant de la complexité inhérente à la cellule vivante. C'est ainsi qu'ont émergé dans les années 1960 les systèmes dits « cell-free », dans lesquels les protéines sont synthétisées *in vitro* à partir de leur ADN codant et en l'absence de cellules, par assemblage des constituants nécessaires aux réactions biochimiques mises en jeu. Compte tenu de leurs faibles rendements par rapport aux systèmes cellulaires, les systèmes « cell-free » ont été longtemps cantonnés à des études spécifiques de laboratoire. Avec l'amélioration des rendements de production, l'apparition de systèmes optimisés, l'intérêt grandissant pour la biologie synthétique, un regain d'intérêt est apparu récemment pour ces systèmes, allant d'études fondamentales des systèmes de régulation jusqu'à la production industrielle de protéines d'intérêt.

Les systèmes « cell-free » constituent donc des outils potentiellement très puissants pour la synthèse de protéines à façon. Néanmoins, compte tenu de leur utilisation intensive relativement récente, un certain nombre de défis restent à relever. En particulier, le contrôle dynamique de la production protéique « cell-free » par des stimuli de natures diverses reste relativement mal documenté. De même, il reste à inventer des méthodes permettant de mettre en œuvre ces systèmes pour la synthèse efficace de protéines complexes comme, par exemple,

les protéines membranaires. Cette thèse a ainsi pour principal objectif de s'intéresser à ces deux questions.

Dans une première partie, nous nous intéresserons ainsi à l'étude et la mise en place de systèmes de régulations peu étudiés jusqu'à présent dans un contexte « cell-free » (régulation métabolique, antibiotique). Dans la deuxième partie, nous nous focaliserons sur la reconstitution de protéines fonctionnelles, en mettant en place non seulement un protocole de synthèse de protéines membranaires stimulables au sein de liposomes géants, mais également en étudiant les possibilités de modification post-traductionnelle de ces dernières.

Ce manuscrit est ainsi organisé de la manière suivante : il est constitué de deux parties divisées en chapitres. Chaque partie débute par un chapitre bibliographique (chapitres 1 et 4) offrant un état de l'art du domaine suivi par un ou plusieurs chapitres décrivant les résultats que j'ai obtenus.

La première partie porte ainsi sur la régulation de l'expression de protéines en milieu « cell-free ». Nous montrerons tout d'abord comment le système peut être affecté par la modification de sa composition (régulation par voie métabolique). Nous décrirons également l'utilisation d'un antibiotique permettant de contrôler de manière dynamique l'expression d'une protéine d'intérêt (chapitre 2). Enfin, nous exploiterons l'utilisation de cet antibiotique afin de caractériser la cinétique de maturation des protéines fluorescentes (chapitre 3).

La deuxième partie porte sur la reconstitution d'une protéine membranaire stimulable, la connexine Cx43 (protéine impliquée dans la formation de jonctions communicantes), dans la membrane d'édifices lipidiques artificiels, les liposomes géants. Nous décrirons la mise en place et la caractérisation d'un nouveau protocole permettant de produire et de fonctionnaliser des protéoliposomes géants fonctionnels. Nous montrerons que l'insertion des protéines dans les membranes est co-traductionnelle, mettant en évidence un rôle à la fois de support et de chaperon de la membrane des liposomes. Nous caractériserons la fonctionnalité de la protéine et montrerons que le contrôle de l'expression par voie thermique permet de préparer des entités fonctionnelles stimulables (contrôle du relargage, par exemple). Nous montrerons enfin des premiers résultats sur la modification post-traductionnelle in situ de ces protéines membranaires reconstituées (chapitre 5).

## **Chapitre 1 : Systèmes « Cell-free » : principes et applications à l'étude des protéines**

Les protéines sont des édifices primordiaux impliqués dans la régulation des fonctions physiologiques de tous les êtres vivants. Il y a donc un intérêt naturel à mieux comprendre les divers mécanismes qui régulent la production, la structure et l'activité de ces biopolymères. D'un point de vue plus applicatif, les protéines sont aujourd'hui non seulement au cœur des développements pharmaceutiques mais sont aussi impliquées dans les avancées biotechnologiques, par exemple dans le domaine de la détection de molécules.

Après un rappel sur les mécanismes biologiques menant à la production des protéines, ce chapitre passe en revue les stratégies d'expression qui ont été développées afin de produire et d'étudier ces édifices. Nous abordons tout d'abord les systèmes vivants et leur isolement en laboratoire pour une utilisation dirigiste. Nous nous intéressons ensuite tout particulièrement aux systèmes « cell-free » en distinguant tout d'abord ceux issus de l'extraction des machineries cellulaires, puis en décrivant les systèmes reconstitués à partir de la purification des éléments de la machinerie de synthèse protéique.



# Sommaire

<b>Introduction .....</b>	<b>19</b>
<b>1. L'expression de protéines .....</b>	<b>21</b>
1.1 Synthèse des protéines dans le vivant.....	21
1.1.1 La Transcription.....	22
1.1.2 La Traduction.....	27
1.1.3 Modifications co-/ post-traductionnelles.....	32
1.2 Expression de protéines recombinantes en laboratoire.....	35
1.2.1 Les systèmes d'expression Procaryotes .....	37
1.2.1.1 Escherichia Coli.....	37
1.2.1.2 Souches de Bacilli .....	39
1.2.2 Les systèmes Eucaryotes.....	41
1.2.2.1 Les levures.....	41
1.2.2.2 Les champignons filamenteux .....	41
1.2.2.3 Les cellules d'insectes et de mammifères.....	42
1.2.2.3.1 Système Baculovirus-cellules d'insecte .....	42
1.2.2.3.2 Les cellules de mammifères .....	43
1.2.3 Systèmes d'expression à base d'extraits cellulaires et systèmes reconstitués .....	44
1.2.3.1 Les extraits cellulaires procaryotes .....	47
1.2.3.2 Les extraits cellulaires Eucaryotes .....	48
1.2.3.3 Les systèmes reconstitués.....	49
<b>2. Applications des systèmes CFPS et CFRPS.....</b>	<b>53</b>
2.1 Systèmes CFPS au service de la production Haut-Débit.....	53
2.2 Développement de solutions thérapeutiques grâce aux systèmes CFPS .....	55
2.3 CFPS et ingénierie des protéines .....	57
2.4 CFPS et protéines membranaires.....	59
2.5 Reconstitution d'assemblage protéique complexe en « cell-free » .....	60
<b>3. Bilan des stratégies de production et d'applications des systèmes « cell-free » .....</b>	<b>64</b>



## **Introduction**

Les protéines sont des objets biologiques responsables des fonctions biologiques de tous les organismes vivants. D'un point de vue structurel, les protéines sont des enchaînements d'acides aminés qui se replient dans l'espace pour donner un édifice tridimensionnel doté d'une fonction spécifique. Parmi les fonctions réalisées par les protéines, on trouve par exemple la transformation de molécules biologiquement pertinentes, catalysée par l'action d'une enzyme, la transmission de signaux par des récepteurs dédiés ou encore les échanges contrôlés d'ions entre les milieux intra- et extracellulaires à l'aide de canaux ou de pompes ioniques.

L'ensemble des fonctions physiologiques d'un organisme vivant (unicellulaire ou pluricellulaire) ou même non appartenant au vivant (i.e. virus), se trouve sous le contrôle des protéines. Un fort intérêt est donc porté à la compréhension de la production et aux mécanismes d'action de ces biopolymères. En plus de l'amélioration des connaissances fondamentales, des motivations plus pratiques en bio- et nanotechnologies sont également identifiables.

En effet, les développements de ces dernières années dans les domaines des biotechnologies font appel à l'utilisation de ces biopolymères à des fins très variées. La compréhension des mécanismes de production ainsi que du fonctionnement de certaines protéines permet, par exemple, de produire aujourd'hui celles-ci dans un but purement thérapeutique. L'étude de la localisation cellulaire de certaines protéines membranaires est un exemple de mise en pratique des protéines fluorescentes (Chudakov et al., 2005)(Shaner et al., 2005). Dans le cadre de la production de bio-capteurs, l'utilisation de protéines est très développée pour leurs propriétés de reconnaissance spécifique ou pour leur activité d'oxydo-réduction vis-à-vis d'une molécule particulière (Lipscomb et al., 1958)(Vaitukaitis, 2004).

L'étude et l'application de ces protéines nécessitent d'avoir accès à ces édifices macromoléculaires tels qu'ils sont trouvés dans la nature, c'est-à-dire qu'ils doivent présenter les mêmes repliements et les mêmes modifications qui sont nécessaires à leur fonctionnement. De plus, pour certaines études et/ou applications, les protéines doivent être produites en grande quantité. A cela peut s'ajouter la nécessité d'obtenir ces éléments sans contamination, par d'autres molécules ou macromolécules, pouvant interférer avec le fonctionnement des

## **Chapitre 1 : Systèmes « Cell-free » : principes et applications à l'étude des protéines**

---

protéines ou ne permettant pas une utilisation optimale de celles-ci. C'est pour répondre à ces problématiques que différents systèmes de production de protéines ont été développés au cours des dernières décennies.

A la suite d'un rappel général sur les mécanismes de synthèse des protéines, ce chapitre présentera les propriétés des différents outils de production et des applications issues de leurs développements. Il mettra l'accent sur la description des différents systèmes existant à l'heure actuelle ainsi que des applications qui en ont découlé, allant de l'étude des protéines *in vitro* à la reconstitution d'objets biologiques d'intérêt, en passant par les applications thérapeutiques et l'étude des propriétés *in vitro*. Je m'attarderai tout particulièrement sur les systèmes « cell-free » dont mes travaux de thèse ont fait grande utilisation.

# **1. L'expression de protéines**

Dans cette section, nous verrons les mécanismes qui permettent aux cellules de décoder et d'utiliser l'information contenue dans leur génome ou leurs plasmides ; afin de produire des protéines qui jouent des rôles très variés dans la physiologie cellulaire (récepteur, enzyme, structure et dynamique, *etc.*). Puis nous aborderons l'utilisation en laboratoire de différents systèmes procaryotes, eucaryotes ou issus de ces organismes, pour produire des protéines dans l'optique de réaliser des études de biologie structurale, de pharmaceutique, mais aussi pour la production de solutions thérapeutiques et d'outils biotechnologiques.

## **1.1 Synthèse des protéines dans le vivant**

Sachant que les protéines sont les constituants principaux des cellules, le décodage spatio-temporel du génome détermine non seulement la taille, la forme, les propriétés biochimiques et le comportement cellulaire, mais aussi les phénotypes de chaque organisme sur Terre.

L'information que contient le génome de tout être vivant est codée par l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique). Néanmoins, l'ADN du génome ne dirige pas directement la synthèse de protéines, mais passe par une molécule intermédiaire : l'ARNm (Acide RiboNucléique messenger). Lorsque l'organisme a besoin d'une protéine particulière, la séquence correspondante est trouvée dans l'immense ADN génomique, puis est copiée en ARN, via un processus appelé transcription. Ce sont ces molécules d'ARNm qui encodent l'information et qui permettront la synthèse de protéines via un processus appelé traduction. La traduction comme son nom l'indique correspond à une transmission de l'information par le passage d'un type de molécule à un autre. Toutes les cellules, du monde vivant, utilisent ce système pour produire leurs protéines [Figure 1.1].

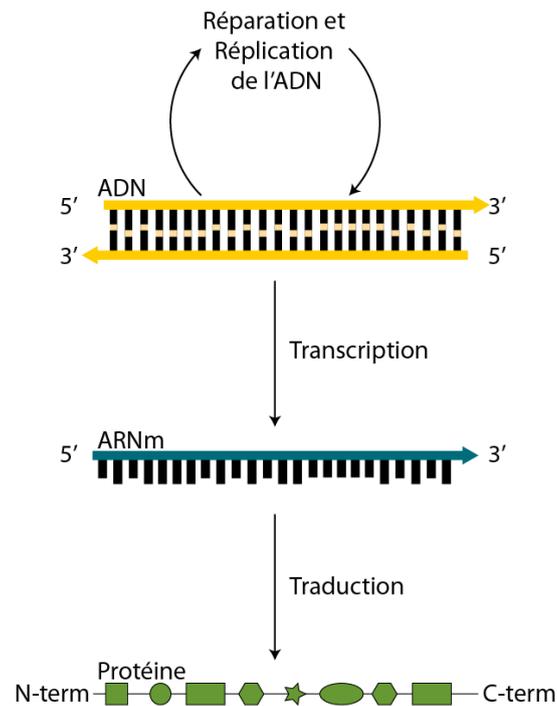


Figure 1.1 : Schéma classique simplifié du passage de l'information génétique à la production d'une protéine fonctionnelle

A ce chemin, commun à tous les êtres vivants, s'ajoutent des étapes intermédiaires en fonction des organismes considérés. Les travaux de thèse ne s'appuyant pas sur ces fonctions cellulaires, je ne développerai pas les différents mécanismes mis en jeu lors des modifications des ARN, tels que l'épissage ainsi que les notions d'intron et d'exon qui ne s'appliquent que chez les eucaryotes.

Nous verrons que la transcription est un enchaînement de réactions coordonnées par des protéines, qui permet le passage de l'ADN, une macromolécule double brin, à l'ARN, un biopolymère simple brin. Nous verrons également la traduction, ensemble d'étapes correspondant au passage de l'information codée par un gène, l'ARN messager, à sa fonction, la protéine.

### 1.1.1 La Transcription

Chaque brin d'ADN est un polymère linéaire orienté, composé d'un enchaînement de nucléotides, ce qui explique le terme d'Acide DésoxyriboNucléique. En effet, une liaison

phosphodiester s'établit entre la fonction alcool en 3' du pentose et le groupe phosphate du nucléotide suivant. [Figure 1.2]

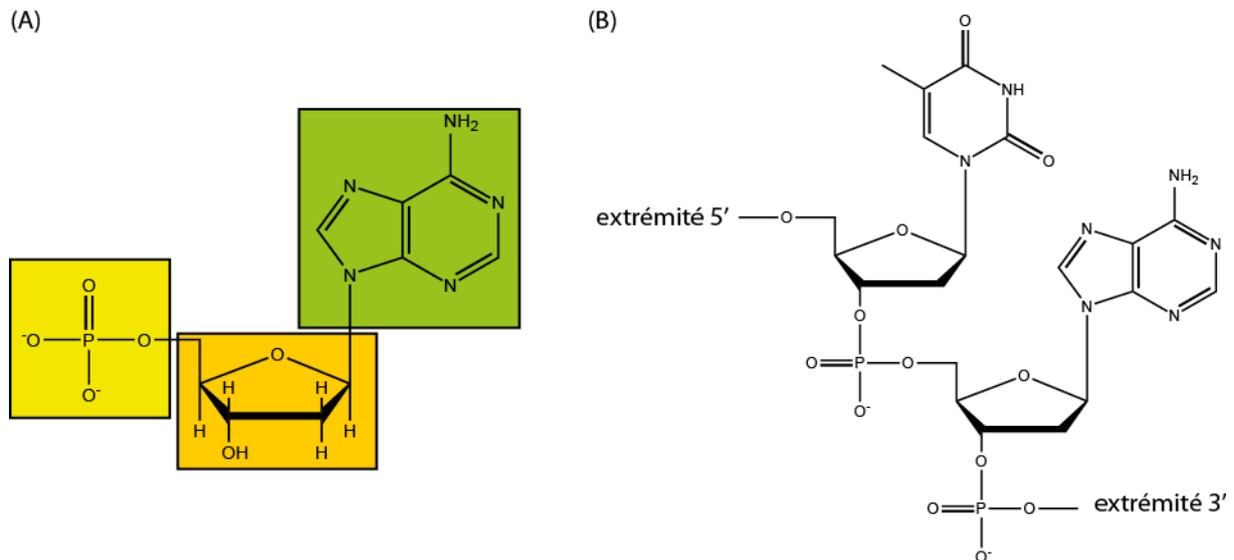


Figure 1.2 : (A) Un monomère d'une chaîne simple brin d'ADN, avec l'assemblage d'un groupement phosphate, d'un désoxyribose et d'une base azotée, ici l'adénine. (B) Orientation de la molécule d'ADN autour d'une liaison phosphodiester entre deux nucléotides.

Un brin d'ADN est composé d'un squelette alternant un groupe phosphate et un pentose portant une base azotée (A, Adénine ; T, Thymine ; G, Guanine ; C, Cytosine). Conventionnellement, on lit un enchaînement de nucléotides de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. La succession des nucléotides au sein d'un brin d'ADN, appelée séquence, permet le codage de l'information génétique [Figure 1.2].

La première étape permettant d'exprimer l'information contenue dans le code est de copier la portion de la séquence nucléotidique d'ADN codant pour une protéine. Cette portion d'ADN correspondant à un gène, est donc transcrite en une séquence nucléotidique d'ARN messager [Figure 1.3].

L'ARN comme l'ADN est un polymère linéaire orienté, transitoirement hybridé avec le brin support d'ADN pendant sa synthèse, il est majoritairement simple brin. A la différence de l'ADN, l'ARN comporte un ribose et n'est pas codé par les mêmes nucléotides (A, Adénine ; U, Uracile ; G, Guanine ; C, Cytosine).

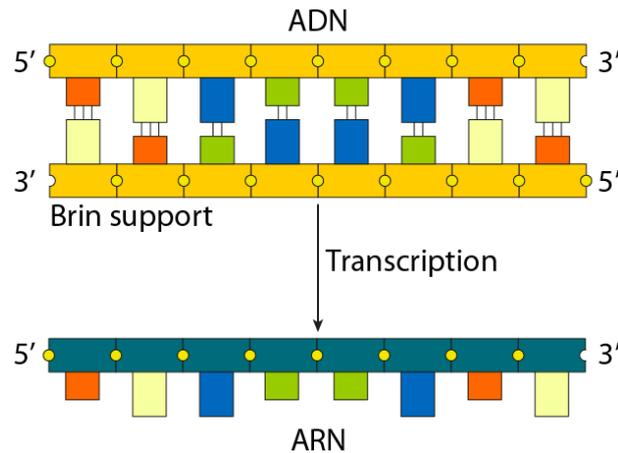


Figure 1.3 : La transcription de l'ADN donne une molécule d'ARN simple brin complémentaire du brin support.

La transcription commence par l'ouverture et le déroulement d'une petite portion de la double hélice, afin d'exposer les bases azotées de chaque brin d'ADN. Le brin d'ADN support 3'-5' sert ensuite de matrice pour la synthèse d'une molécule d'ARN. La séquence nucléotidique de la molécule d'ARN sera déterminée par l'association complémentaire des bases azotées. Lorsque le ribonucléotide complémentaire du brin d'ADN support est trouvé, il est lié de manière covalente à la chaîne d'ARN grandissante. Cette réaction est catalysée par des enzymes appelées ARN polymérases.

Les ARN polymérases catalysent la formation de la liaison phosphodiester qui lie les ribonucléotides entre eux pour former une chaîne linéaire. L'ARN polymérase se déplace par étape sur l'ADN, déroulant la double hélice en avant de son site de polymérisation pour exposer les résidus du brin support. De cette manière, la chaîne d'ARN croissante est allongée par un nucléoside triphosphate (ATP, CTP, GTP et UTP). L'hydrolyse de la liaison à haute énergie procure l'énergie nécessaire à l'avancement de la réaction de polymérisation [Figure 1.4].

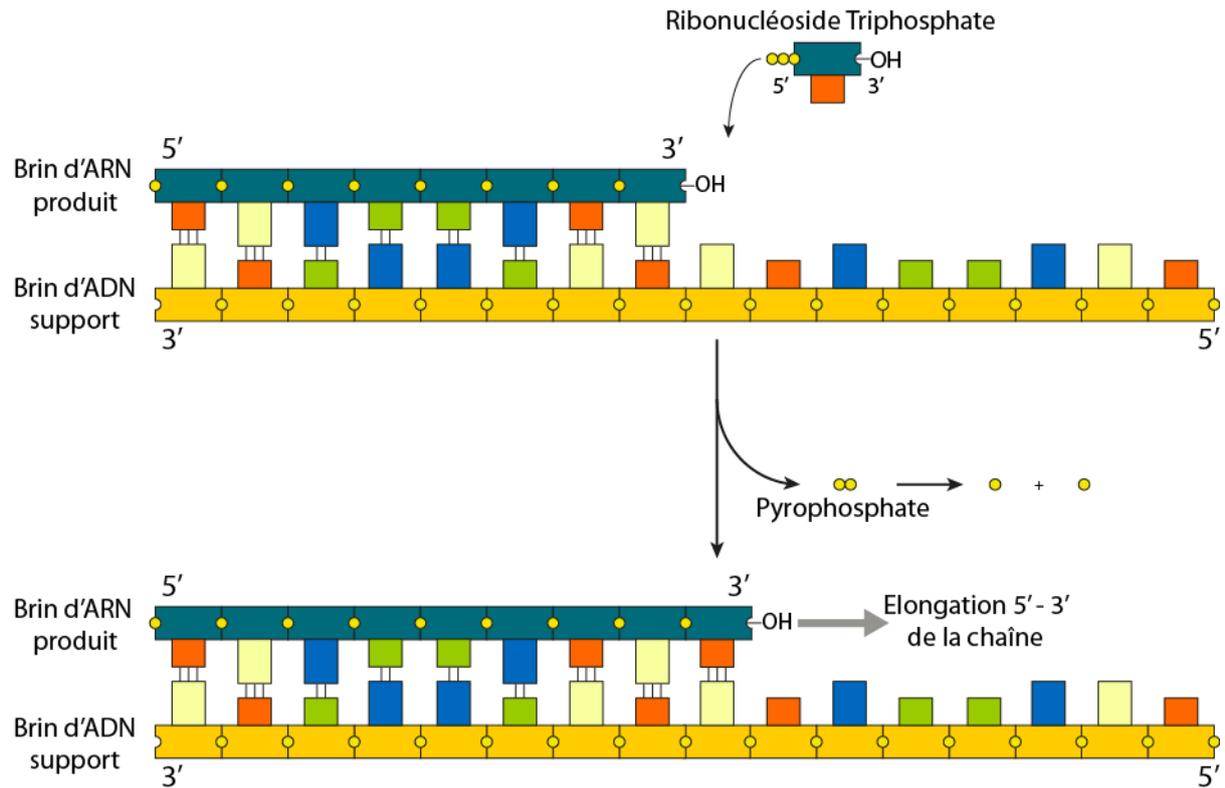


Figure 1.4 : Synthèse d'ARN catalysée par une ARN polymérase. L'ARN polymérase catalyse étape par étape l'addition de ribonucléotides, complémentaires à ceux du brin support, à l'extrémité 3'-OH de la chaîne en cours de formation. La rupture de la liaison  $\alpha$  du Ribonucléotide triphosphate, libérant un pyrophosphate qui s'hydrolyse en deux phosphates inorganiques, fournit l'énergie à l'avancement de l'élongation.

L'hybridation entre le brin d'ADN support et l'ARN nouvellement formé n'est que transitoire afin de permettre à plusieurs ARN polymérases de travailler l'une à la suite de l'autre. Ainsi, une centaine de copies du même gène peuvent être produites dans un intervalle de temps d'une heure [Figure 1.5].

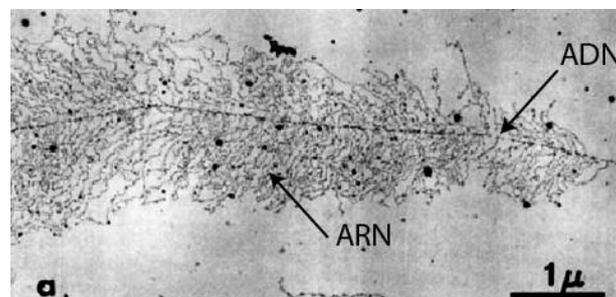


Figure 1.5 : Image de microscopie électronique à transmission d'un brin d'ADN en cours de transcription en de multiples points (Miller and Beatty, 1969). Nous pouvons voir sur cette photographie l'ADN au centre qui est transcrit en brins d'ARNm orientés vers la périphérie de l'image.

La transcription ne se fait pas aléatoirement sur le génome et seules certaines portions de l'ADN sont dites codantes, les gènes. Pour transcrire précisément un gène, l'ARN polymérase doit être capable de reconnaître le début d'un gène et doit être en mesure d'arrêter la transcription lorsqu'elle arrive à la fin de celui-ci.

Mes travaux de thèse se basent sur un système simplifié ne présentant pas l'ensemble des mécanismes de transcription comme ils peuvent être trouvés dans un modèle procaryote ou eucaryote. Il sera donc fait abstraction des explications des processus n'étant pas critiques pour la compréhension du contenu du manuscrit de thèse.

L'initiation de la transcription est une étape particulièrement importante car s'agit d'une des clés de la régulation de la production de protéines dans une cellule. Cette régulation définira quelle protéine produire, à quel moment et en quelle quantité.

Lors d'évènements stochastiques au sein de la cellule, les ARN polymérases (type T7) entrent en contact avec l'ADN. Ces interactions sont généralement de faible affinité et l'enzyme se dissocie de l'ADN après avoir « glissé » sur une certaine portion. Au cours de ces évènements, l'ARN polymérase peut être amenée à rencontrer des séquences dites promotrices. Celles-ci correspondent à des séquences spécifiques de nucléotides permettant d'indiquer à l'ARN polymérase de se lier fortement et d'initier le début de la synthèse d'ARN.

Le second signal clef de la transcription est la séquence terminatrice. Pour la plupart des gènes bactériens, la séquence terminatrice consiste en un enchaînement de paires de nucléotides A-T précédé par deux séquences symétriques d'ADN. Une fois transcrites en ARN, ces séquences se replieront en une structure dite en « épingle à cheveux ». La séquence poly-A, qui ne forme que deux liaisons hydrogènes A-U, et la structure en épingle à cheveux vont réduire l'affinité de l'ARN polymérase pour l'ADN. Cette dernière va donc relâcher le complexe ARN-ADN qui va lui aussi se dissocier.

Suite à la transcription, l'ARNm nouvellement formé va être pris en charge par l'appareil de traduction afin de produire la protéine pour laquelle il code.



L'ARNm ne reconnaît pas directement l'AA correspondant lors de la phase de traduction. En réalité, la lecture se fait grâce à une molécule d'ARN intermédiaire, l'ARN de transfert. Grâce au principe de complémentarité des bases vu précédemment et à la séquence des ARNt, ceux-ci vont former des structures tridimensionnelles en forme de trèfle. Les « feuilles du trèfle » étant des boucles d'ARN simple brin ; l'une d'entre elles, porteuse de l'anticodon, sera impliquée dans la reconnaissance avec la séquence d'ARNm portant le codon complémentaire. La deuxième partie très importante de l'ARNt correspond au dernier codon en 3' de l'ARNt, qui est porteur de l'AA qui sera transféré pendant la traduction [Figure 1.7].

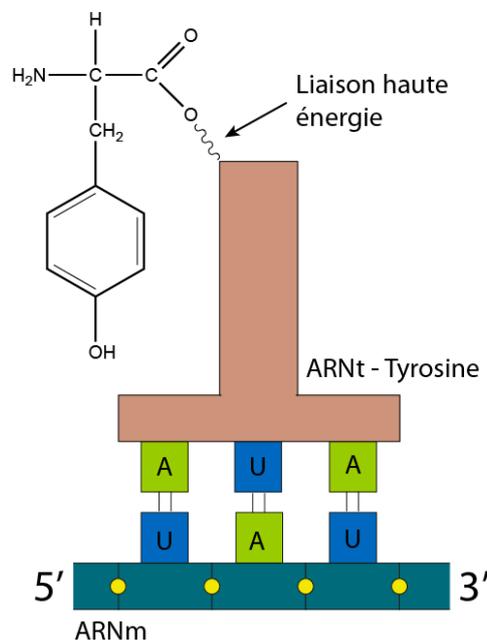


Figure 1.7 : Représentation schématique de la reconnaissance entre un ARNt porteur d'une Tyrosine et du codon correspondant porté par un ARNm

Comme nous avons pu le constater, l'ARNm est le support de l'information lorsqu'il s'agit de la synthèse de protéines. Le mécanisme responsable de la formation de la chaîne polypeptidique a lieu quant à lui dans le ribosome. Ce dernier réalise la synthèse d'une chaîne polypeptidique en conservant l'exactitude de l'information codée par l'ARNm. Le ribosome est un complexe catalytique composé de plus d'une cinquantaine de protéines et de plusieurs molécules d'ARN ribosomiaux (ARNr). Ce complexe est composé de deux sous-unités, une petite sous-unité qui sert de support pour l'alignement de l'ARNt avec l'ARNm, alors que la grande sous-unité catalyse la formation de la liaison peptidique [Figure 1.8].

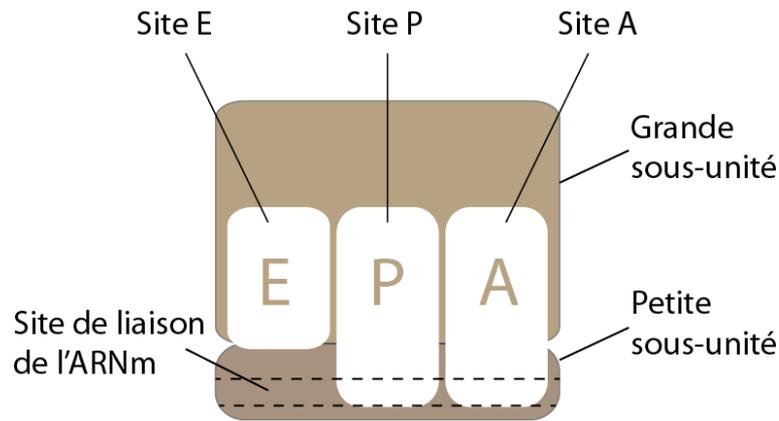


Figure 1.8 : Représentation schématique d'un ribosome assemblé avec présentation des différents sites d'intérêt du ribosome

Les protéines à l'instar de l'ADN et de l'ARN sont des biopolymères d'AA linéaires comportant une orientation. Par convention, le premier AA de la structure primaire est celui dont la fonction  $\alpha$ -aminée n'est pas engagée dans une liaison peptidique (extrémité  $\text{NH}_2$ -terminale), le dernier AA est celui dont la fonction carboxylique, du carbone n°1, n'est pas engagée dans une liaison peptidique. Ainsi la formation de la chaîne peptidique se fait de la partie N-terminale à la partie C-terminale de la protéine.

Les deux sous-unités d'un ribosome sont séparées dans le cas où elles ne sont pas impliquées dans la synthèse d'une protéine, mais se rejoignent sur la partie 5' terminale d'un ARNm pour initier la traduction. Dans les bactéries, l'initiation de la traduction se fait grâce à la reconnaissance d'un site de liaison spécifique. Il s'agit de la séquence Shine-Dalgarno, nommée d'après les noms de ses découvreurs, qui est localisée en amont (5') du codon initiateur AUG de la traduction (codant pour une méthionine). Cette séquence consensus 5'-GGAGGU-3' s'apparie avec la petite sous-unité du ribosome 16S afin de positionner le codon AUG dans le site P du ribosome. Cette étape est sous le contrôle d'un ensemble de facteurs d'initiation, et est primordiale puisqu'un décalage du cadre de lecture d'un nucléotide entraînerait la formation d'une protéine totalement différente.

L'ARNm passe ensuite à l'intérieur du ribosome pour former le polypeptide, chaque AA est ainsi ajouté pour allonger la protéine naissante, il s'agit de l'élongation. Le phénomène d'élongation suit un cycle à trois étapes qui est illustré dans la Figure 1.9.

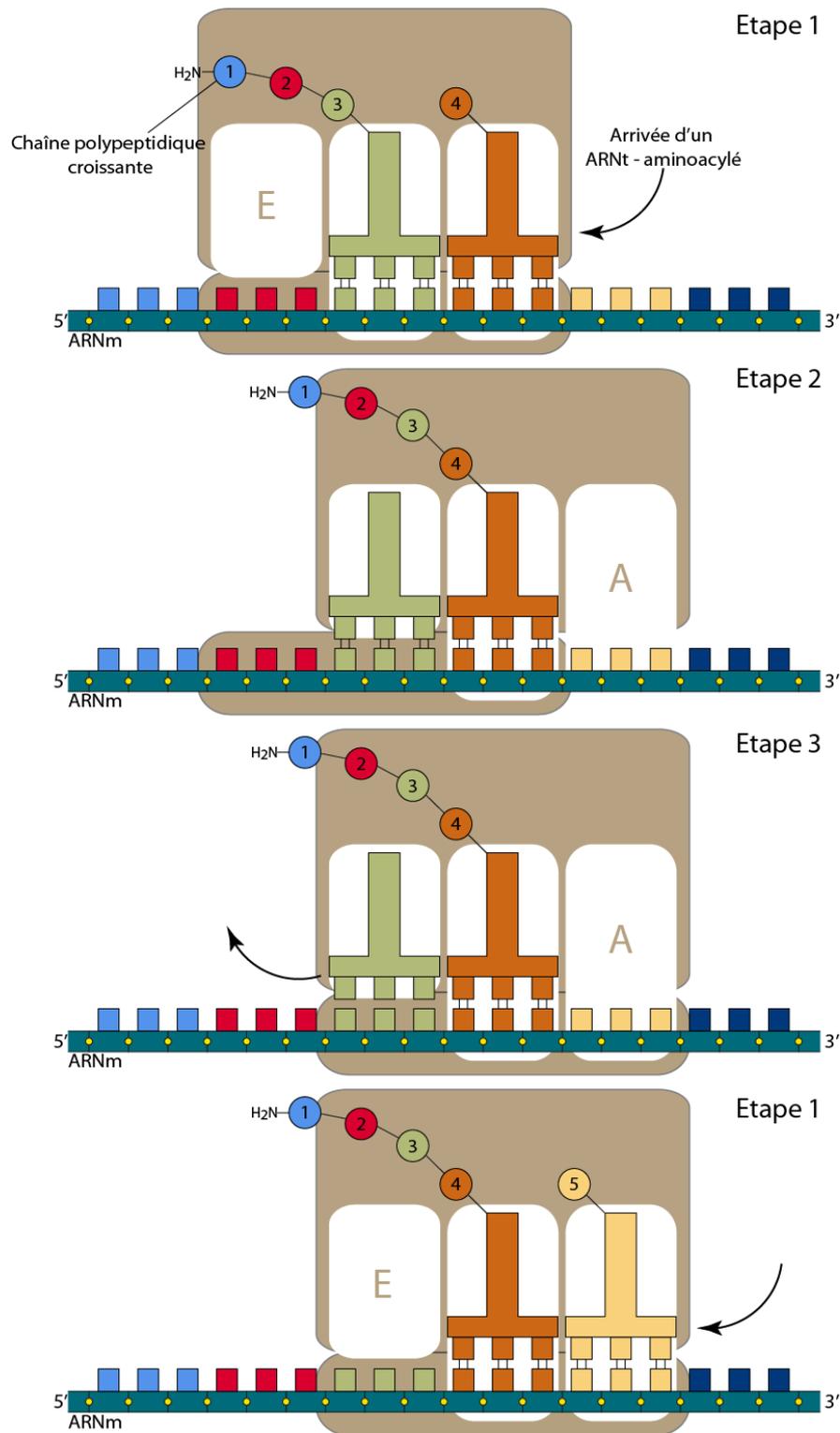


Figure 1.9 : Traduction d'une molécule d'ARNm. Chaque AA est ajouté à la chaîne polypeptidique croissante grâce à la reconnaissance codon – anticodon entre l'ARNm et l'ARNt chargé de l'AA. Les trois étapes présentées sur le schéma ci-dessus se répètent jusqu'à la fin de la phase d'élongation (lecture d'un codon stop).

Dans le cas présent nous prendrons en compte que l'initiation de la traduction a déjà eu lieu et que le polypeptide est en cours d'élongation.

Le couple ARNt-AA et le facteur d'élongation « thermo unstable » GTP (EF-Tu GTP), se lie au ribosome grâce à la formation des liaisons complémentaires entre le codon de l'ARNm et l'anticodon de l'ARNt. EF-Tu GTP permet la reconnaissance initiale codon-anticodon tout en empêchant la formation de la liaison peptidique. La reconnaissance du codon conduit le facteur à hydrolyser son GTP en Guanosine diphosphate et phosphate inorganique (GDP et Pi), EF-Tu GDP est ensuite relâché par le ribosome. Ainsi les sites P et A contiennent chacun un ARNt lié à l'ARNm.

La liaison entre la partie C-terminale de la chaîne polypeptidique accrochée à l'ARNt du site P est rompue, pour être liée au groupement amine libre de l'AA porté par l'ARNt du site A afin de former une nouvelle liaison peptidique. Cette réaction clef de la synthèse protéique est sous le contrôle de l'activité peptidyltransférase de la grande sous-unité ribosomale. Une série de changements de conformation amène ensuite les deux ARNt, initialement dans les sites P et A, respectivement dans les sites E et P [Figure 1.9].

La dernière étape contient une série de changements de conformation qui va engendrer un déplacement de l'ARNm d'exactly trois nucléotides. Les changements de conformation sont possibles grâce à l'action d'un autre facteur d'élongation, EF-G. La liaison de ce facteur porteur d'un GTP, dans ou proche du site A active la fonction GTPasique de EF-G, entraînant l'hydrolyse du GTP porté en GDP plus Pi. Cette hydrolyse est responsable d'un changement de conformation drastique de EF-G qui entraîne le déplacement du ribosome par rapport à l'ARNm. Le ribosome est ainsi prêt pour recevoir l'aminoacyl-ARNt suivant et recommencer un nouveau cycle.

La terminaison de l'élongation se fait lorsqu'un codon stop arrive dans le site A d'un ribosome. Il n'existe pas d'ARNt-stop, ainsi lorsqu'un codon stop est rencontré par le ribosome, l'ARNt est remplacé par une protéine dite facteur de relâchement qui va venir se fixer dans le site A du ribosome. Cette fixation force la peptidyltransférase à catalyser l'addition d'une molécule d'eau sur le groupement carboxyle terminal qui vient d'être libéré de l'ARNt auquel il était lié. A partir de cet instant, la protéine est relâchée dans le cytosol, le ribosome libère l'ARNm et se décompose ensuite sous forme de petite et grande sous-unités

qui peuvent s'assembler sur une nouvelle molécule d'ARNm pour entamer une nouvelle traduction.

### **1.1.3 Modifications co-/ post-traductionnelles**

La chaîne polypeptidique nouvellement formée correspond à la structure primaire d'une protéine. En effet, une protéine possède plusieurs niveaux de structuration qui lui permettent d'acquérir sa fonction.

La structure primaire correspond à l'enchaînement d'AA, qui va permettre de mettre en place une structuration dite secondaire au cours de la synthèse de la chaîne. Cet arrangement tridimensionnel s'opère grâce à la rotation des atomes de la chaîne peptidique les uns par rapport aux autres. Il existe plusieurs types de structures secondaires, dont l'hélice  $\alpha$  qui fait tourner la chaîne carbonée par rapport à elle-même, et les feuilletts  $\beta$  où les chaînes antiparallèles voient leurs carbonyles se lier par liaisons hydrogènes avec les amines de la chaîne voisine.

La structure tertiaire est le résultat de liaisons hydrogènes, hydrophobes, électrostatiques et covalentes entre des AA de la même chaîne peptidique mais non voisins dans la structure primaire. Les mêmes liaisons, entre des AA de chaînes peptidiques différentes correspondant aux sous-unités de la protéine, permettent la mise en place de la structure quaternaire.

En plus du repliement permettant à la protéine d'obtenir sa structure et sa fonction, les chaînes polypeptidiques subissent au cours de leur traduction ou quand elles sont entièrement synthétisées, des modifications chimiques que l'on appelle modifications co-traductionnelles ou post-traductionnelles.

Parmi les modifications [Tableau 1.1 et Tableau 1.2], on peut citer : la déformylation de l'acide aminé en position N-terminale des protéines des procaryotes, l'élimination de la méthionine en position N-terminale des protéines des procaryotes et des eucaryotes, la formation des ponts disulfures et bien d'autres.

Ces modifications ont pour but de :

- permettre le repliement correct de la protéine
- réguler l'activité des protéines
- les « étiqueter » afin qu'elles soient reconnues par d'autres molécules ou par des systèmes de dégradation
- les ancrer dans une membrane
- les intégrer à une cascade de signalisations
- les « adresser » à un compartiment cellulaire (eucaryote)

La protéine ainsi modifiée adopte une structure et des propriétés physicochimiques, potentiellement très différentes de la molécule directement codée par le gène.

<b>Modification</b>	<b>Co-facteur requis</b>	<b>Site de la modification (Acides aminés)</b>	<b>Exemples de protéines modifiées</b>
<b>Acétylation</b>	Acétyl-CoA	Acide aminé N-terminal ou K	Histones
<b>ADP-ribosylation</b>		Addition de poly-(ADP-ribose)	Histones, lamine B, enzymes métabolisme ADN
<b>Amidation</b>	Vitamine C	Acide aminé C-terminal	Gastrine ; neuropeptides et hormones peptidiques
<b>Biotinylation</b>	Biotine (vitamine H)	K	Carboxylase
<b>Carboxylation</b>	vitamines K	D, E, K	Prothrombine
<b>Glycosylation</b>	Dolichol phosphate	O-glycosylation sur S, T et hydroxylysine N-glycosylation sur N	Protéines des groupes sanguins Collagène
<b>Hydroxylation</b>	Vitamine C	P, K, D et Y	Collagène
<b>Méthylation</b>	S-adénosyl-L-méthionine	K, H, R, D, E	Actine ; calmoduline ; cytochrome C
<b>Phosphorylation</b>	Divers (AMPC, ATP)	Y, S, T	Kinases
<b>Sulfatation</b>	Adénosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate	Y	Gastrine ; héparine
<b>Ubiquitinylation</b>	Ubiquitine (protéine)	K	Protéines destinées à être dégradées
<b>SUMOylation</b>	Protéines SUMO	K	Très grand nombre de protéines

Tableau 1.1 : Ensemble des modifications post-traductionnelles possibles pour une protéine eucaryote, permettant à cet édifice d'obtenir sa structure tertiaire active et/ou l'adressage vers le compartiment cellulaire adapté. D : Acide aspartique ; E : Acide glutamique ; H : Histidine ; K : Lysine ; P : Proline ; R : Arginine ; S : Serine ; T : Threonine ; Y : Tyrosine.

<b>Modifications impliquant des acides gras</b>	<b>Modification</b>	<b>Site de la modification</b>	<b>Exemples de protéines modifiées</b>
	Isoprénylation	Cystéine en position C-terminale et le farnésyl ou le géranyl-géranyl	Ras
	Myristoylation N-terminale O-acylation	Glycine en position N-terminale et acide myristique (myristoyl-CoA) Sérine et un acide gras (liaison oxyester simple)	NADH-cytochrome b5
	S-palmitoylation (ou S-acylation) N-palmitoylation	Cystéine interne et acide palmitique : liaison thioester Cystéine N-terminale et acide palmitique : liaison amide	Rhodopsine
	Glypiation (ancrage glycosyl phosphatidylinositol GPI)	Protéolyse contrôlée d'une protéine de la surface extracellulaire et ancre de GPI	Protéine prion (PrP)

Tableau 1.2 : Ensemble des modifications post-traductionnelles impliquant des acides gras pour une protéine eucaryote

## 1.2 Expression de protéines recombinantes en laboratoire

Afin de répondre à la demande croissante de protéines recombinantes, c'est-à-dire produites par une cellule dont le matériel génétique a été modifié par recombinaison génétique, la biologie moléculaire a très rapidement développé des techniques permettant la modification et l'utilisation d'organismes unicellulaires ou de lignées cellulaires. Chacun de ces systèmes possède des propriétés intrinsèques parfois partagées avec d'autres ou uniques au système. Ces propriétés discutées tout au long du chapitre sont le fondement de la production de protéines recombinantes fonctionnelles. C'est pourquoi la capacité de l'hôte à produire fidèlement une protéine, lors de l'expression de gènes recombinants clonés dans un système d'expression est une des considérations très importantes. Cette protéine offrira une conformation et une fonctionnalité similaires à celles trouvées dans le type cellulaire dont elle a été clonée.

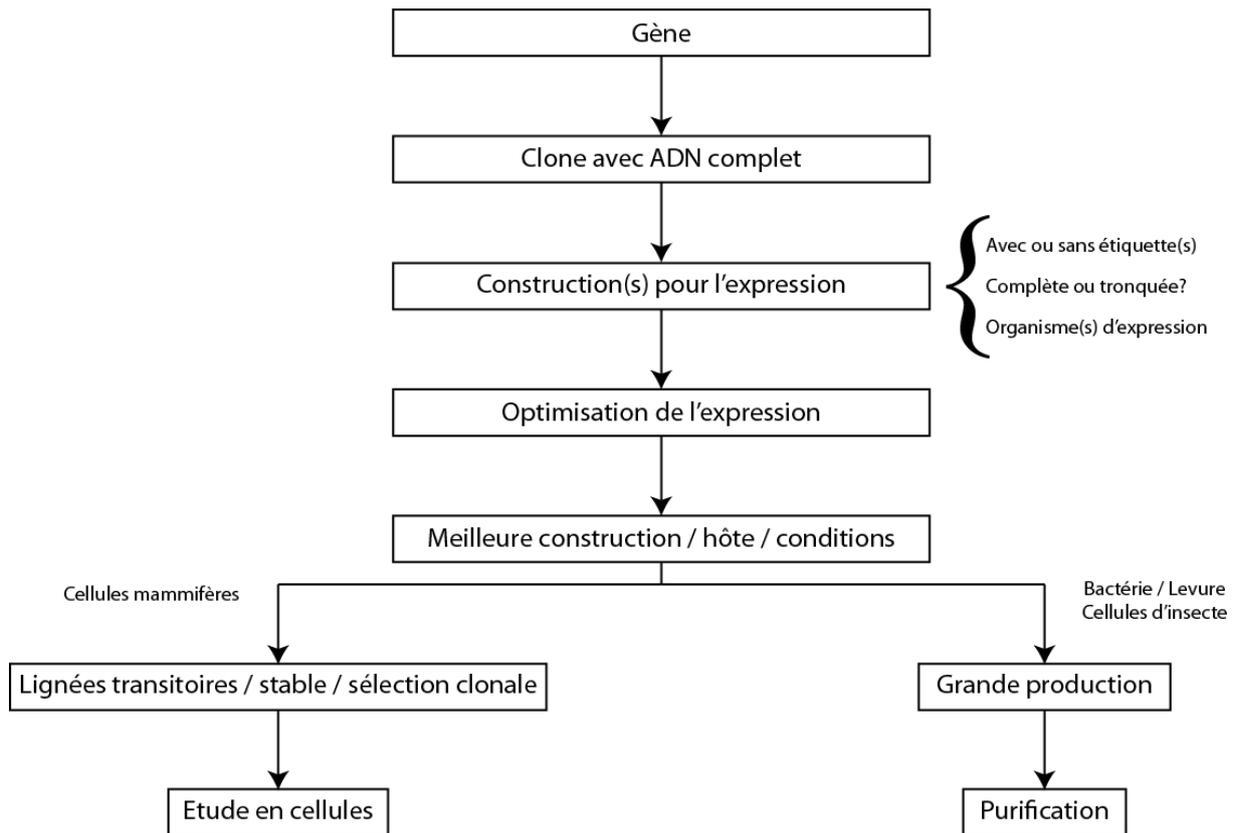


Figure 1.10 : Schéma de réflexion et de travail typiquement adopté pour l'expression de protéines *in vivo*

La création du système d'expression est bien souvent difficile, en fonction des études nous choisissons d'utiliser la protéine complète ou partielle, cela n'en reste pas moins une décision déterminante pour l'étude puisque certaines protéines comme les protéines membranaires ont des domaines transmembranaires très hydrophobes qui posent généralement des problèmes lors de l'expression. Le choix de la souche d'expression dépendra des caractéristiques de la protéine : complexité, nécessité de modifications post-traductionnelles, origine eucaryote ou procaryote, objectif à atteindre (étude en cellules, purification, *etc.*) [Figure 1.10].

Concernant les protéines eucaryotes, cela implique souvent beaucoup de modifications post-traductionnelles de la protéine, comme la glycosylation, la phosphorylation et les adressages moléculaires. De plus, des interactions spécifiques sont essentielles pour aboutir à un repliement correct du polypeptide, afin d'atteindre la structure tertiaire finale. Une protéine dont le repliement n'est pas correct sera toujours biologiquement inactive.

Toutes les étapes de biologie moléculaire et surtout de culture cellulaire sont particulièrement chronophages lorsque l'on souhaite arriver à un système efficace de

production de protéines [Figure 1.10]. Cela est d'autant plus vrai lorsque la production de protéines se fait en cultures eucaryotes.

### **1.2.1 Les systèmes d'expression Procaryotes**

Dès 1972, avec les premières manipulations *in vitro* de gènes et d'enzymes de restriction, le biochimiste Paul Berg obtient le premier ADN recombinant (Singer and Berg, 1976). Avec les développements de la biologie moléculaire apparaît en 1980 la première protéine humaine recombinante sur le marché : l'insuline (Humulin-US/ Humuline-EU). Elle devient ainsi le premier traitement recombinant approuvé par la « Food and Drug Administration ».

Depuis ces années et pour répondre à la demande croissante de protéines recombinantes, des systèmes d'expression ont été développés et optimisés à des fins de recherches fondamentales ou pour le développement de nouvelles technologies.

Les systèmes procaryotes restent les plus attractifs et les plus communément employés, en partie dû au fait qu'ils ont une mise en œuvre peu coûteuse, une utilisation rapide et délivrent dans certains cas de très hauts rendements.

#### **1.2.1.1 Escherichia Coli**

Le système procaryote le plus utilisé pour la production de protéines hétérologues est sans conteste : *Escherichia Coli*. Il s'agit d'une bactérie gram négative dont la génétique et la physiologie sont très bien décrites dans la littérature (Chou, 2007), notamment dû au fait que le génome complet de *Escherichia Coli K-12* a été séquencé en 1997 (Blattner et al., 1997). Cette compréhension approfondie des mécanismes de développement et de fonctionnement de la bactérie a permis une implantation massive de celle-ci dans les laboratoires. Depuis les premiers développements en ingénierie génétique et protéique, des dizaines de variantes cellulaires d'*E. Coli* ont été construites afin de répondre aux problèmes posés, par exemple par les protéines eucaryotes et leurs propensions à posséder des codons rarement utilisés chez *E. Coli*. Des souches ont été développées afin de permettre une meilleure formation des ponts disulfure au sein des protéines, étape clé pour la formation de la structure tertiaire de certaines protéines.

La production de protéines au sein des bactéries est régulée, entre autres au niveau de la transcription par exemple via la présence de promoteurs en amont des gènes à transcrire. Un autre système de régulation pour éviter l'accumulation de protéines pouvant amener à une mort cellulaire prématurée est la dégradation des protéines dans le cytosol (dans des conditions naturelles). En laboratoire, lors de la production de protéines sous régulation d'un promoteur inductible, type opéron lactose (Jacob and Monod, 1961), la viabilité cellulaire n'est plus un critère pris en considération car l'expression est induite en fin de phase de croissance logarithmique. Cette induction tardive permet d'obtenir un rendement optimal malgré l'aspect cytotoxique que pourrait présenter une protéine. Afin de maximiser les rendements de production des mutants déficitaires en protéases *lon* et *ompT* ont été développés.

Malgré les développements effectués sur les différentes souches d'*E. Coli*, d'autres systèmes d'hôtes deviennent de plus en plus intéressants pour la production de protéines. Une des raisons à cela est l'amélioration de la génomique qui permet une meilleure comparaison des codons utilisés entre les organismes hôtes et « parents ». Ainsi, un hôte qui utilise les codons de manière similaire à l'organisme parent et qui possède un appareil de modifications co-/post-traductionnelles comportant les mêmes schémas de modifications que l'organisme « parent » sera un système optimal.

La préparation simple et peu coûteuse, les hauts rendements de synthèse et d'accumulation de protéines, le repliement de certaines protéines complexes et le savoir-faire concernant la biochimie et la méthodologie génétique font qu'*E. Coli* possède des qualités indéniables en tant qu'hôte pour l'expression de protéines exogènes.

Un inconvénient majeur de la production de protéines chez *E. Coli* est l'absence de certaines modifications post-traductionnelles comme la glycosylation, l'hydroxylation, *etc.* pouvant se révéler limitante pour la production de protéines eucaryotes.

Souche E. Coli	Dérivée de	Traits caractéristiques
<b>AD494</b>	K-12	Mutant <i>trxB</i> ; facilite la formation de ponts disulfure
<b>BL21</b>	B834	Déficiente en protéases <i>lon</i> et <i>ompT</i>
<b>BL21 trxB</b>	BL21	Mutant <i>trxB</i> ; facilite la formation de ponts disulfure ; Déficiente en protéases <i>lon</i> et <i>ompT</i>
<b>BL21 CodonPlus-RIL</b>	BL21	Renforce l'expression de protéines eucaryotes contenant des codons peu utilisés en <i>E. Coli</i> : AGG, AGA, AUA, CUA ; Déficiente en protéases <i>lon</i> et <i>ompT</i>
<b>BL21 CodonPlus-RP</b>	BL21	Renforce l'expression de protéines eucaryotes contenant des codons peu utilisés en <i>E. Coli</i> : AGG, AGA, CCC ; Déficiente en protéases <i>lon</i> et <i>ompT</i>
<b>BLR</b>	BL21	Mutant <i>recA</i> ; stabilise les répétitions tandems ; Déficiente en protéases <i>lon</i> et <i>ompT</i>
<b>B834</b>	Souche B	Auxotrophe pour la Met ; permet le marquage 35S-met
<b>C41</b>	BL21	Mutant construit pour la production de protéines membranaires
<b>C43</b>	BL21	Double mutant construit pour la production de protéines membranaires
<b>HMS174</b>	K-12	Mutant <i>recA</i> ; Résistance Rif
<b>JM 83</b>	K-12	Utilisable pour la sécrétion de protéines recombinantes dans le périplasma
<b>Origami</b>	K-12	Mutant <i>trxB/gor</i> ; Facilite grandement la formation de ponts disulfure ; Déficiente en protéases <i>lon</i> et <i>ompT</i>
<b>Origami B</b>	BL21	Mutant <i>trxB/gor</i> ; Facilite grandement la formation de ponts disulfure ; Déficiente en protéases <i>lon</i> et <i>ompT</i>
<b>Rosetta</b>	BL21	Renforce l'expression de protéines eucaryotes contenant des codons peu utilisés en <i>E. Coli</i> : AUA, AGG, AGA, CGG, CCC et GGA ; Déficiente en protéases <i>lon</i> et <i>ompT</i>
<b>Rosetta-gami</b>	BL21	Renforce l'expression de protéines eucaryotes contenant des codons peu utilisés en <i>E. Coli</i> : AUA, AGG, AGA, CGG, CCC et GGA ; Déficiente en protéases <i>lon</i> et <i>ompT</i> ; Mutant <i>trxB/gor</i> ; Facilite grandement la formation de ponts disulfure

Tableau 1.3 : Liste non-exhaustive de différentes souches d'E.Coli développées en laboratoire pour répondre aux problématiques d'expression de protéines exogènes chez E. Coli (adapté de Terpe, 2006)

### 1.2.1.2 Souches de Bacilli

Après *E. Coli*, le système le plus intéressant est la souche Bacilli [Figure 1.11]. Les souches de Bacilli sont intéressantes de par l'absence de lipopolysaccharides (LPS) à la surface de leur membrane externe. Les LPS sont des endotoxines produisant des effets

## Chapitre 1 : Systèmes « Cell-free » : principes et applications à l'étude des protéines

pyrogéniques chez l'Homme et les autres mammifères, réduisant ainsi leur utilisation en pharmaceutique en l'absence d'étapes de purification supplémentaires.

Le second avantage des souches Bacilli est leur capacité sécrétrice naturelle, permettant l'exportation directe des protéines dans le milieu extracellulaire.

Le fait que nos connaissances des voies de modifications post-traductionnelles chez les organismes procaryotes soient limitées et que leurs capacités à réaliser ces modifications soient très restreintes, font que leur employabilité reste limitée à la production de protéines ne présentant pas par exemple de motifs de glycosylation ou d'impairs fonctionnels en l'absence de cette modification.

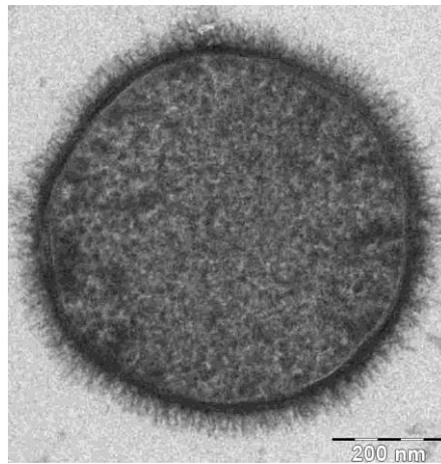


Figure 1.11 : Image de microscopie électronique à transmission de la bactérie *Bacillus subtilis* prise par Allon Weiner (Institut de Science Weizmann, Rehovot, Israel 2006).

Il existe bien évidemment d'autres systèmes d'expression basés sur des organismes procaryotes tels que *Staphylococcus carnosus* (Dilsen et al., 2000) et les bactéries du genre *Streptomyces*, dont les sociétés pharmaceutiques font déjà usage pour produire deux tiers des antibiotiques commercialisés ainsi que d'autres molécules bioactives. Ces solutions d'expression restent néanmoins des niches de recherches (Paradkar et al., 2003) qui demandent plus de développement afin de devenir suffisamment robuste.

Deuxième système procaryote employé après *E. Coli*, les souches de Bacilli présentent deux avantages majeurs que sont leur capacité sécrétrice naturelle et l'absence de LPS à leur surface. Elles possèdent aussi le même inconvénient concernant les modifications post-traductionnelles.

### 1.2.2 Les systèmes Eucaryotes

Afin de pallier les manques des systèmes procaryotes, la production de protéines en système eucaryote a très vite été développée. En effet, les systèmes procaryotes ont rapidement démontré leurs limites dans le cadre de la production de protéines eucaryotes complexes, requérant des modifications post-traductionnelles (glycosylation etc...), une assistance au repliement par des protéines chaperonnes spécifiques, que la machinerie ou que les modèles procaryotes ne peuvent réaliser.

#### 1.2.2.1 Les levures

Les levures, au même ordre que les systèmes bactériens (comme *E. Coli* ou *Bacillus*), ont une croissance rapide, peu coûteuse et permettant d'être amenées à de hautes densités cellulaires. De plus, elles offrent l'avantage d'avoir un système de modifications post-traductionnelles plus complet permettant notamment la formation de ponts disulfures et la N-/O-glycosylation. Néanmoins, les protéines exogènes nécessitant des motifs de glycosylations bien spécifiques, peuvent souffrir du système des levures (Hollenberg and Gellissen, 1997) qui ne suit pas les mêmes schémas de glycosylation que les organismes eucaryotes supérieurs.

Avec leur temps de doublement rapide, leur système de modifications post-traductionnelles et les connaissances pratiques dont nous disposons, les levures sont un modèle de choix pour produire des protéines exogènes eucaryotes.

#### 1.2.2.2 Les champignons filamenteux

Les champignons filamenteux sont des organismes plus complexes que les levures et ont donc des appareils de modifications post-traductionnelles plus complexes. Ceux-ci sont ainsi plus similaires aux modèles mammifères.

La production est grandement diminuée pour des protéines d'origine humaine, cela est potentiellement dû à des restrictions dans les étapes métaboliques post-traductionnelles, comme le transport intracellulaire et les repliements. Même si les champignons sont utilisés depuis des décennies, ils ne sont pas autant caractérisés, au niveau génétique et/ou

physiologique (Punt et al., 2002), que d'autres modèles présentés dans ce chapitre, ainsi peu de savoir existe au sujet de leur métabolisme sécrétoire et de leurs manipulations génétiques. D'autre part, la production de souches comportant un matériel génétique exogène est grandement entravée par le faible rendement des techniques de biologie moléculaire appliquées aux champignons filamenteux et par la dégradation, au sein du champignon, du matériel inséré.

Les niveaux d'expression sont aussi limités par le « turn-over » des ARN, le mauvais traitement des ARNm étrangers, le repliement et la sécrétion incomplète des protéines qui, comme pour les levures, sont dus aux motifs de glycosylation (Punt et al., 2002).

Les champignons possèdent un système de modifications post-traductionnelles plus proche de celui des eucaryotes supérieurs. Néanmoins, leur physiologie fait qu'il est plus difficile de produire des souches stables d'expression.

### **1.2.2.3 Les cellules d'insectes et de mammifères**

La culture de cellules animales est le système le plus comparable au modèle humain lorsqu'on en vient aux motifs et capacités de modifications post-traductionnelles de l'appareil cellulaire. Néanmoins, leur culture plus complexe et coûteuse représente un réel désavantage, d'autant plus que les rendements de production ne sont pas aussi élevés que ceux des modèles précédemment cités.

#### **1.2.2.3.1 Système Baculovirus-cellules d'insecte**

Le système d'expression basé sur l'infection par des vecteurs Baculovirus (BEVS) de culture cellulaire d'insecte, créé au début des années 1980, est le plus versatile et le plus utilisé pour la production de protéines eucaryotes. Il a été utilisé pour produire avec succès plusieurs protéines recombinantes, des protéines thérapeutiques, mais aussi des structures virales plus complexes telles que les Virus-Like Particles (VLPs) dont le sujet sera discuté plus tard, dans le cadre des applications des systèmes « cell-free » [section 2.6].

La production de protéines recombinantes via BEVS se réalise en deux étapes. Une première étape de croissance cellulaire puis une infection par le Baculovirus. Comme d'autres virus, celui-ci va prendre le contrôle de la machinerie d'expression de la cellule hôte et

déclencher les cascades de production, qui en temps normal permettraient au virus de se répliquer mais qui dans le cas présent permettent d'obtenir la protéine cible sans réplication du virus.

Ces cellules ont l'avantage d'être moins sujettes au stress et permettent donc une manipulation plus aisée des cultures, en plus d'être plus productives et moins coûteuses à entretenir que le modèle mammifère.

Plusieurs désavantages sont à noter, en partie dû à l'infection par le Baculovirus :

- Un traitement inefficace et une détérioration des capacités de repliement et de sécrétion des protéines (McCarroll and King, 1997).
- Une haute activité des protéases, en partie encodées par le virus nécessitant alors l'usage d'inhibiteurs dans le milieu de culture ou le développement de nouveaux vecteurs viraux (Ikonomou et al., 2003).
- Une expression faible et des variations au niveau des motifs de modifications post-traductionnelles qui sont normalement retrouvés dans les conditions physiologiques.

Avant l'utilisation de cellules de mammifères, les cellules d'insecte infectées par Baculovirus représentent le modèle le plus proche pour l'expression de protéines d'eucaryotes supérieures nécessitant un ensemble de modifications post-traductionnelles complexes comme les ponts disulfures et la N-glycosylation.

### **1.2.2.3.2 Les cellules de mammifères**

Les systèmes mammifères comme les cellules CHO (Ovariennes d'Hamster Chinois) ou les cellules HEK (Rein Embryon Humain), sont considérés comme étant des lignées plus stables génétiquement et avec de meilleurs rendements de transformation et de croissance, quel que soit le moyen de culture choisi (en adhérence ou submergé).

Ces types cellulaires présentent le grand avantage d'offrir un spectre de modifications post-traductionnelles identique aux modèles eucaryotes supérieurs (Gervais et al., 2003). Ces cellules permettent un niveau de repliement et de formation de ponts disulfures qu'aucun modèle précédemment cité ne peut atteindre. Leur appareil de glycosylation permet une fonctionnalisation variée des protéines qui n'est pas uniquement dépendante des protéines mais aussi des conditions d'expression, comme le pH, la température, les nutriments, le taux

d'oxygène, l'hôte d'expression, *etc.*(Butler, 2006) Ceci permet un contrôle très précis de la modification des protéines recombinantes.

Dans certains cas, l'expression en modèle mammifère est la seule solution viable pour obtenir des protéines correctement modifiées. L'exemple de l'expression du transporteur de la sérotonine du rat dans différents modèles a montré dans le cas présent les limites de chaque modèle lors de l'expression de protéines hétérologues :

- Chez *E. Coli* la protéine était partiellement dégradée,
- Chez *Pichia* (Levure), le repliement n'était pas correct,
- Le modèle insecte produisait une protéine avec un motif de glycosylation incorrect.

Les cellules mammifères possèdent toutes les caractéristiques afin de réaliser des modifications post-traductionnelles sur des protéines comportant des motifs identiques à ceux des eucaryotes supérieurs. Qu'il s'agisse de lignées d'expression stables ou transitoires, elles présentent les désavantages d'être coûteuses et de comporter des étapes de mise en culture et de multiplication plus longues. De plus, les rendements d'expression sont nettement inférieurs aux modèles présentés précédemment.

### 1.2.3 Systèmes d'expression à base d'extraits cellulaires et systèmes reconstitués

Les systèmes de synthèse de protéines « cell-free » (CFPS) dérivés d'extraits cellulaires sont utilisés depuis des décennies comme des outils de recherche en biologie fondamentale et appliquée. Ils ont joué un rôle tout particulier dans la découverte du code génétique lors des expériences pionnières de Nirenberg et Matthaei (Nirenberg et Matthaei, 1961)(Martin et al., 1962). Depuis leurs balbutiements, ces systèmes ont beaucoup évolué au regard de leur méthode de production ou même en fonction du type d'organisme dont ils sont issus. Il est surtout notable qu'il existe aujourd'hui des systèmes entièrement reconstitués (CFRPS) à partir des éléments manuellement purifiés des machineries cellulaires.

Plus récemment, les CFPS (systèmes de synthèse de protéines « cell-free ») se sont révélés être des outils de premier ordre dans le cadre des technologies de synthèse protéique (Katzen et al., 2005)(Swartz, 2006), incluant la production de protéines thérapeutiques (Goerke and Swartz, 2008)(Kanter et al., 2007)(Yang et al., 2004)(Zawada et al., 2011), et la

production haut-débit de bibliothèques de protéines dans le cadre d'études de l'évolution des protéines et de génomique structurale (Goshima et al., 2008)(Griffiths and Tawfik, 2003).

Pour produire des protéines d'intérêt, les systèmes CFPS intègrent un ensemble de composants catalytiques pour la production d'énergie et la synthèse de protéines à partir d'un lysat de bactéries, de cellules animales ou végétales [Figure 1.12]. Ces lysats contiennent les éléments nécessaires à la transcription, traduction, au repliement des protéines et au métabolisme énergétique : ribosomes, acides ribonucléiques de transfert (ARNt), aminoacyl-ARNt synthétase, les facteurs d'initiation et d'élongation de la traduction, les facteurs de relâchement ribosomal « ribosome release factors », les enzymes de recyclage des nucléotides, des voies métaboliques, des protéines chaperonnes, *etc.*

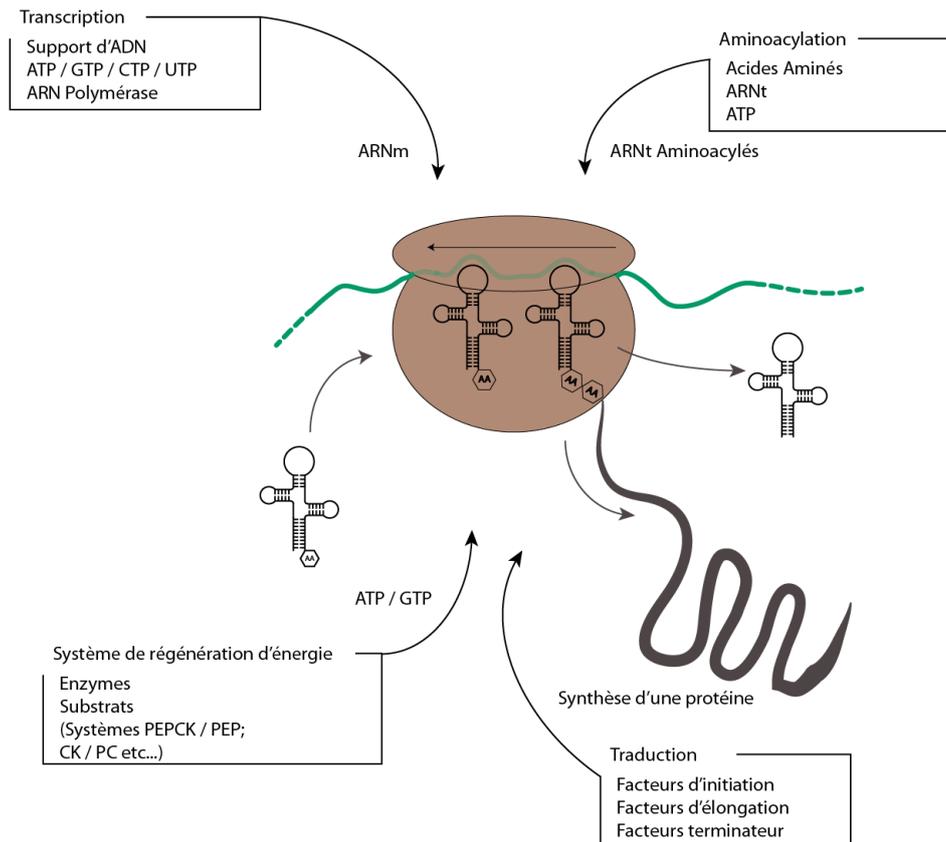


Figure 1.12 : Le système CFPS. Une production efficace de protéines recombinantes nécessite la présence d'ARNt (Acides ribonucléiques de transfert), d'énergie, de facteurs de traduction et la transcription d'ARNm. Cette dernière requiert la présence d'ADN, de ribonucléotides et d'enzymes tels que l'ARN polymérase T7 ou SP6. La traduction requiert des facteurs d'initiation, d'élongation et terminateurs de la traduction ainsi que les composants nécessaires à l'aminocyclation des ARNt tels que les ARNt et l'ATP. Le système de régénération d'énergie a besoin d'enzymes et de leurs substrats comme la Phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) / le phosphoénolpyruvate (PEP), la créatine kinase (CK) / la phosphocréatine (PC). Les extraits cellulaires comportent les facteurs de traduction et les enzymes pour l'aminocyclation, alors que dans les systèmes reconstitués, les éléments purifiés sont ajoutés individuellement.

Ces éléments catalytiques agissent au sein du lysat cellulaire pour produire et replier les produits protéiques désirés. Cette production est soumise à l'incubation du lysat avec des substrats essentiels, comprenant les acides aminés, les nucléotides, l'ADN ou l'ARNm codant la protéine cible, les substrats énergétiques, les cofacteurs, ainsi que les ions.

Une fois le système CFPS ou CFRPS « démarré », il va continuer de produire la protéine cible jusqu'au moment où un des substrats (ATP, cystéine, *etc.*) est totalement consommé ou que la concentration de produits intermédiaires de réaction (phosphates inorganiques) ait atteint un seuil critique d'inhibition.

Bien que n'importe quel organisme puisse fournir un lysat, les systèmes d'expression « cell-free » les plus communs sont obtenus à partir d'extraits provenant d'*Escherichia Coli* (ECE), de Réticulocytes de lapins (RRL), de germes de blé (WGE), et de cellules d'insectes (ICE). Sachant que ces cellules ont des propriétés intrinsèques singulièrement différentes, comme nous avons pu le voir lors de la présentation de certains modèles d'expression, les lysats qui en sont obtenus ont donc des comportements tout aussi particuliers.

Par conséquent, il faut choisir avant tout la source du lysat en fonction de la protéine biologiquement active que nous cherchons à produire en utilisant un système CFPS.

Cette décision est prise naturellement en considérant la disponibilité du matériel, la facilité de préparation de l'extrait, le rendement protéique nécessaire, l'origine et la complexité de la protéine, les procédés mis en jeu en aval de la production et les coûts.

Comme pour les systèmes d'expression vivants vus précédemment, il existe deux classes de systèmes CFPS, les procaryotes et eucaryotes.

### **1.2.3.1 Les extraits cellulaires procaryotes**

Le système CFPS basé sur des extraits cellulaires d'*E. Coli* (ECE) est le plus populaire. Il s'est imposé pour plusieurs raisons évidentes. Premièrement, la fermentation à grande échelle d'*E. Coli* est possible à bas coûts et ces productions sont facilement lysables grâce aux homogénéisateurs haute-pression. Cela permet une préparation simple et peu onéreuse d'extraits.

Deuxièmement, les systèmes basés sur *E. Coli* offrent généralement les rendements les plus élevés, de la centaine de microgrammes par millilitre aux milligrammes par millilitre en « réaction batch », en fonction de la protéine d'intérêt. Il faut bien noter que tout comme pour les systèmes vivants, la production d'une protéine normalement synthétisée par l'organisme hôte obtiendra des rendements nettement supérieurs (Chloramphénicol Acétyl Transférase (CAT) 1,7 mg.mL<sup>-1</sup> (Kim et al., 2011)), à ceux obtenus pour une protéine de fusion issue d'un organisme eucaryote (0,7 mg.mL<sup>-1</sup> de facteurs de stimulation de colonisation des granulocytes macrophages (GM-CSF)) (Zawada et al., 2011), ou encore les 0,022 mg.mL<sup>-1</sup> d'hydrogénase FeFe qui nécessitent une expression anaérobie stricte (Boyer et al., 2008).

Troisièmement, ils ont le plus bas coût d'utilisation. Cela est en partie dû au fait qu'il est possible d'activer les voies métaboliques de l'extrait permettant d'obtenir un haut

rendement de production sans avoir recours à des substrats énergétiques coûteux tel que l'acide phosphoenolpyruvique (Swartz, 2006).

Sachant que l'on discute d'un système extrait d'*E. Coli*, nous allons évidemment retrouver les mêmes désavantages que lors de la production de protéines dans l'organisme original de l'extrait. Ainsi tout comme lors de la production en *E. Coli*, le système n'est pas capable de produire des protéines présentant des modifications co-/post-traductionnelles. Cela limite grandement la production de protéines eucaryotes dans ce type de système CFPS, car l'obtention de protéines fonctionnelles est dans la plupart des cas nécessaire aux études ou applications découlant de leur production.

Pour pallier certaines de ces limitations, il peut être envisagé de compléter le système avec les enzymes et substrats nécessaires à la réalisation des modifications. Dans le cadre de l'amélioration de la formation des ponts disulfures, l'extrait peut être traité par l'iodoacétamide (IAM), et la composition du tampon peut être adaptée en ajoutant de la glutathionne oxydée et réduite. De plus, une disulfure isomérase d'*E. Coli* peut être ajoutée afin de réarranger les ponts disulfures incorrectement formés (Yang et al., 2005).

Les extraits d'*E. Coli* possèdent non seulement les mêmes qualités concernant l'expression des protéines exogènes que l'organisme dont ils sont issus mais il s'agit aussi d'un système ouvert qui permet un ensemble de modifications *in situ*.

Concernant les modifications post-traductionnelles et la variabilité d'expression, ces extraits présentent les mêmes inconvénients que l'organisme original. De plus, les extraits contiennent un grand nombre de protéases et autres enzymes qui peuvent nuire à ses performances.

### 1.2.3.2 Les extraits cellulaires Eucaryotes

Les systèmes CFPS eucaryotes les plus utilisés sont : WGE, RRL et ICE. Leurs procédures de production sont généralement plus complexes, plus chères et leurs rendements de production sont plus faibles. En termes de rendement de production, le système WGE, produit par Endo et associés, est le plus productif. Il est produit à partir d'embryons isolés de graines de blé (Madin et al., 2000)(Takai et al., 2010), et permet d'obtenir des rendements, qui, en fonction de la protéine et du format de production, vont de l'ordre de plusieurs

centaines de microgrammes à plusieurs milligrammes de protéines recombinantes par millilitre de milieu de réaction. Il n'est néanmoins pas le plus approprié lorsqu'il est question de réaliser des modifications post-traductionnelles sur la protéine cible, telle que la glycosylation (Tarui et al., 2001).

Les réactions en système RRL ont un rendement de plusieurs dizaines de microgrammes de protéines par milligramme de réaction (Shields and Blobel, 1978)(Jackson and Hunt, 1983). De même les réactions en système ICE, préparées à partir de cellules de *Spodoptera frugiperda* (Ezure et al., 2010), ont un rendement de l'ordre de plusieurs dizaines de microgrammes par millilitre.

Les deux systèmes précédemment cités présentent des rendements plus faibles. Néanmoins, ces derniers sont les plus à même de produire des protéines comportant différents types de modifications post-traductionnelles, telles que l'isoprénylation (Hancock, 1995)(Suzuki et al., 2007), acétylation (Gibbs et al., 1985)(Suzuki et al., 2006), N-myristoylation (Suzuki et al., 2006), phosphorylation (Safer and Jagus, 1979), régulation de traitements par peptides signals (Shields and Blobel, 1978), glycosylation (Tarui et al., 2001).

Afin de restreindre le sujet aux systèmes les plus employés et les mieux décrits, j'ai volontairement fait abstraction des systèmes CFPS eucaryotes issus d'extraits de levures (Iizuka et al., 1994), de cellules cancéreuses (Weber et al., 1975) et d'hybridomes (Mikami et al., 2006) qui ont été développés au cours des années précédentes.

Les extraits de cellules eucaryotes possèdent toutes les caractéristiques afin de réaliser des modifications post-traductionnelles identiques à celle des eucaryotes supérieurs. Les extraits présentent les désavantages d'être coûteux et chronophages à produire. De plus, les rendements d'expression sont variables en fonction de l'extrait.

### 1.2.3.3 Les systèmes reconstitués

Comme vu précédemment, les systèmes « cell-free » sont généralement construits à partir d'extraits cellulaires, qui contiennent les composants nécessaires à la synthèse de protéines. Au travers des développements récents réalisés sur les systèmes CFPS extraits d'*E. Coli*, des rendements de l'ordre du milligramme ont pu être obtenus. Néanmoins, l'utilisation d'extraits cellulaires comme base du système de production pose certains problèmes. En effet

les extraits cellulaires contiennent une grande partie, si ce n'est l'ensemble du protéome des cellules lysées au temps  $t$  donné, ainsi un ensemble de réactions secondaires peuvent avoir lieu et mener à l'épuisement énergétique rapide ou à la dégradation des acides nucléiques ou des protéines. Ces réactions secondaires non-contrôlées, variables et non-quantifiables rendent ces systèmes CFPS moins reproductibles d'un échantillon à un autre.

Le manque d'information concernant les composants contenus dans le système est la cause d'une faible fiabilité en regard de l'utilisation de ces systèmes pour des applications nécessitant une reproductibilité importante (Shimizu and Ueda, 2010).

Le système « cell-free » reconstitué (CFRPS) à partir de facteurs purifiés et des enzymes nécessaires à la traduction a été développé afin de répondre aux exigences de robustesse et de reproductibilité.

Le système PURE (Protein synthesis Using Recombinant Elements) est basé sur le mécanisme traductionnel d'*E. Coli*. A l'inverse des extraits cellulaires, chaque élément composant le système PURE est identifié, le rendant ainsi plus facilement contrôlable (Ribosomes purifiés, ARNt, facteurs de traduction, aminoacyl-ARNt synthétase, et plusieurs autres enzymes clés de la synthèse protéique) [Tableau 1.4] (Shimizu et al., 2001).

Le PURE présente l'avantage d'être très pauvre nucléases, cela permet de faire abstraction de l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques comme dans d'autres systèmes. De plus, il offre la possibilité d'utiliser un code génétique étendu ou reconfiguré, en modulant la composition des codons des ARNm, des ARNt et de facteurs spécifiques de relâchement.

<b>Composition chimique du PURE</b>	<b>Concentration molaire ou quantité de produit ajouté</b>
Acétate de magnésium	9 mM
Phosphate de potassium	5 mM
Glutamate monopotassique	95 mM
Chlorure d'ammonium	5 mM
Chlorure de Calcium	0,5 mM
Spermidine	1 mM
Putrescine	8 mM
Dithiothréitol (DTT)	1 mM
ATP, GTP	2 mM
CTP, UTP	1 mM
Phosphate de Créatine	10 mM
Mélange d'ARNt (Roche, Mannheim, Germany)	A <sub>260</sub> = 2,8
Acide 10-formyl-5, 6, 7, 8-tétrahydrofolique	0,5 µg
Chaque AA	0,1 mM
<b>Composition en facteurs purifiés du PURE</b>	<b>Concentration ou quantité ou nombre d'unités ajoutées</b>
Ribosome	12 pmol
IF1	1 µg
IF2	2 µg
IF3	0,75 µg
EF-G	1 µg
EF-Tu	2 µg
EF-Ts	1 µg
RF1	0,5 µg
RF3	0,5 µg
RRF	0,5 µg
Aminoacyl-ARNt synthétase	30-300 unités
Méthionyl-ARNt formyltransférase	30-300 unités
Créatine kinase	0,2 µg (Roche)
Adénylate cyclase	0,15 µg (Sigma-Aldrich)
Nucléoside-diphosphate kinase	0,054 µg
Pyrophosphatase	0,1 unité
ARN polymérase T7	0,5 µg

Tableau 1.4 : Composition moléculaire du système PURE system® (Pour 50 µL) (Shimizu et al., 2001)

Le système CFRPS comme le PURE est très reproductible et est ouvert aux modifications. Il présente les mêmes avantages de production qu'*E. Coli*. Il comporte cependant les mêmes inconvénients concernant les modifications post-traductionnelles.

Les systèmes d'expression protéiques précédemment décrits ont tous des avantages et des inconvénients en fonction du type d'application ou de recherche que nous souhaitons mettre en place. Certains systèmes sont incontestablement plus avantageux au regard des rendements de production qu'ils offrent, d'autres offrent la possibilité de produire des structures protéiques plus complexes. Enfin la dernière catégorie offre une liberté encore plus grande en termes de possibles modifications sur le système, permettant par exemple d'augmenter les rendements du système ou bien d'ajouter des fonctions de modification à celui-ci.

Les systèmes CFPS et CFRPS ont permis des découvertes majeures du 20<sup>ème</sup> siècle dans les années 1960 et sont aujourd'hui couramment utilisés dans les laboratoires de recherche. Mes travaux de thèse s'appuyant sur l'utilisation d'un système dérivé du PURE, nous discuterons dans la partie suivante des axes majeurs de développements autour des CFPS et CFRPS.

## **2. Applications des systèmes CFPS et CFRPS**

Les progrès réalisés en termes de productivité, coût, échelle et complexité des protéines recombinantes synthétisées ont rapidement étendu les champs d'utilisation des systèmes « cell-free ». Dans cette section, j'aborderai les domaines d'application émergents rendus possibles par les CFPS et CFRPS, tels que la production de bibliothèques de protéines, la médecine personnalisée, l'ingénierie des protéines, les protéines membranaires, les VLPs (« Virus Like Particles »).

### **2.2 Systèmes CFPS au service de la production Haut-Débit**

Dans cette ère post-génomique, les plateformes d'expression haut-débit de protéines deviennent de plus en plus importantes et les systèmes « cell-free » ont les avantages requis pour peser dans la balance.

Premièrement, il est possible en système CFRPS et CFPS (dans ce dernier en présence d'inhibiteurs) d'éviter la dégradation des fragments d'ADN linéaires, ce qui permet l'utilisation de produits de PCR comme support d'expression et évite les étapes chronophages du clonage moléculaire (Sun et al., 2014).

Deuxièmement, les améliorations réalisées sur les rendements font que le criblage et la production de protéines en plaques multi-puits (96 ou 384) est rentable.

Troisièmement, ces systèmes présentent un potentiel d'utilisation dans la miniaturisation et l'automatisation de micropuces avec l'exemple des Protein In Situ Arrays (He and Taussig, 2007).

Quatrièmement, l'absence de membrane rend la manipulation des conditions expérimentales très facile, de plus il n'y a pas de phénomène de cytotoxicité dans les systèmes « cell-free ». Il est ainsi très aisé d'incorporer des acides aminés isotopiques marqués. Ces marquages protéiques, ont un rôle très important dans les projets de biologie structurale liés à la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ou à la diffraction aux rayons X. Les rendements d'incorporation des acides aminés marqués, d'expression de protéines et la pureté des produits d'expression sont des avantages clés des systèmes CFPS qui permettent ainsi de réaliser directement des analyses hétéronucléaires de RMN sans étape préalable de purification

(Morita et al., 2003)(Ozawa et al., 2005)(Takai et al., 2008). Plusieurs milliers de structures ont déjà été déterminées grâce à l'utilisation de systèmes « cell-free » (Endo and Sawasaki, 2003).

Les plateformes de synthèse CFPS sont aussi une technologie clé pour la production de bibliothèques de protéines à des fins de génomique fonctionnelle. Ainsi, l'étude à grande échelle de l'interaction entre protéines est un des développements des systèmes CFPS. Les méthodes d'arrangement de protéines, exprimées en milieu cellulaire, sur des surfaces, font face à des obstacles techniques tels que l'obtention d'un grand nombre de protéines, la rétention sur le long terme de leur structure et de leur fonction.

Les systèmes CFPS permettent de réaliser en parallèle la production et l'immobilisation sur une surface ; il est ainsi possible de générer rapidement à partir d'ADN des arrangements de protéines sur des surfaces : les PISA (Protein In Situ Arrays). Cela présente l'avantage, par rapport aux systèmes d'expression *ex situ*, d'éviter les étapes de purification et de stockage des protéines avant leur immobilisation. De plus, les systèmes CFPS eucaryotes, permettent la mise en place de modifications, tel que l'ajout d'étiquettes fluorescentes, par l'intermédiaire d'utilisation d'acides aminés non-naturels qui seront incorporés à des endroits spécifiques de la protéine (Albayrak et Swartz, 2013)(Zimmerman et al., 2014).

Le principe des Protein in situ arrays (PISA) est de produire les protéines *in situ* sur un substrat pré-fonctionnalisé via un agent de capture, faisant de la protéine *de novo* produite une cible spécifique [Figure 1.13].

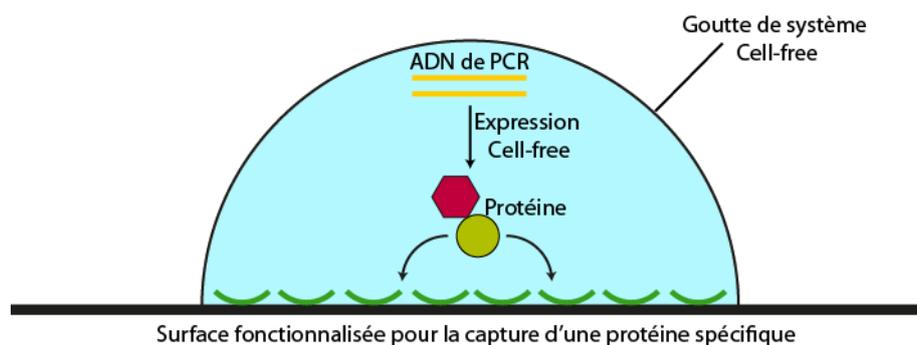


Figure 1.13 : La synthèse des protéines et l'immobilisation de celles-ci a lieu *in situ*, dans un format de gouttes de système CFPS, déposées sur une surface fonctionnalisée permettant la capture des protéines marquées (adapté de He et Taussig, 2007).

L'immobilisation de la protéine se fait grâce à un marquage en position N- ou C-terminale de celle-ci. Par exemple, pour une surface fonctionnalisée avec des anticorps anti-GST (Glutathione S-tranférase), la construction génétique de la protéine cible intégrera la séquence de la GST (He and Taussig, 2007)(He et al., 2008).

Une autre illustration des applications potentielles des systèmes « cell-free » vient d'une mise en pratique du système WGE (Wheat Germ Extract) pour la production de 13364 protéines humaines différentes. Des 12996 protéines produites (97,2%), beaucoup ont montré qu'elles étaient fonctionnelles (58 des 75 phosphatases testées) et 99,86% d'entre elles ont été utilisées pour fonctionnaliser une lamelle de verre afin de créer une micropuce (Goshima et al., 2008).

L'approche « cell-free » supprime le besoin de synthétiser, purifier et d'immobiliser les protéines de manière séparée, offrant ainsi les avantages d'une boîte à outils améliorée pour réaliser plus rapidement des études variées des fonctions protéiques.

### **2.3 Développement de solutions thérapeutiques grâce aux systèmes CFPS**

Les problèmes liés aux coûts, et aux échelles de production et de repliements des protéines n'étant plus des obstacles insurmontables à l'adoption des systèmes « cell-free », ceux-ci vont se voir exploités pour la production commerciale de solutions thérapeutiques (Zawada et al., 2011).

La médecine personnalisée est une notion qui se développe depuis quelques années déjà. Cette notion peut s'appliquer tout particulièrement aux stratégies de vaccination contre des cancers.

Une des méthodes pour l'immunothérapie du lymphome est d'utiliser l'antigène idiotypique de la tumeur comme vaccin pour déclencher une réponse immunitaire anti-idiotype.

La plupart des lymphomes à lymphocytes B ( $L_B$ ) sont issus de la transformation et de la multiplication anarchique d'un seul  $L_B$ , qui exprime à sa surface une immunoglobuline comportant une séquence de région variable caractéristique qui lui est propre. De par l'extrême variabilité de cette séquence, l'immunothérapie du lymphome à  $L_B$  nécessite un développement vaccinal spécifique à chaque patient.

Les protéines idiotypiques peuvent être produites en culture de cellules mammifères, ou en cultures de bactéries, en grande quantité. Néanmoins, le temps et les efforts associés à ces méthodes de production empêchent de les appliquer à un modèle de développement de vaccins spécifique à un patient.

Dans un effort de production de solutions propres à chaque individu, Kanter et al. ont synthétisé, dans un système CFPS (ECE), une cytokine fusionnée à un fragment variable simple chaîne (scFv) d'une immunoglobuline (Ig) dont l'idiotype est trouvé à la surface des L<sub>B</sub> spécifiques d'un lymphome (Kanter et al., 2007) [Figure 1.14].

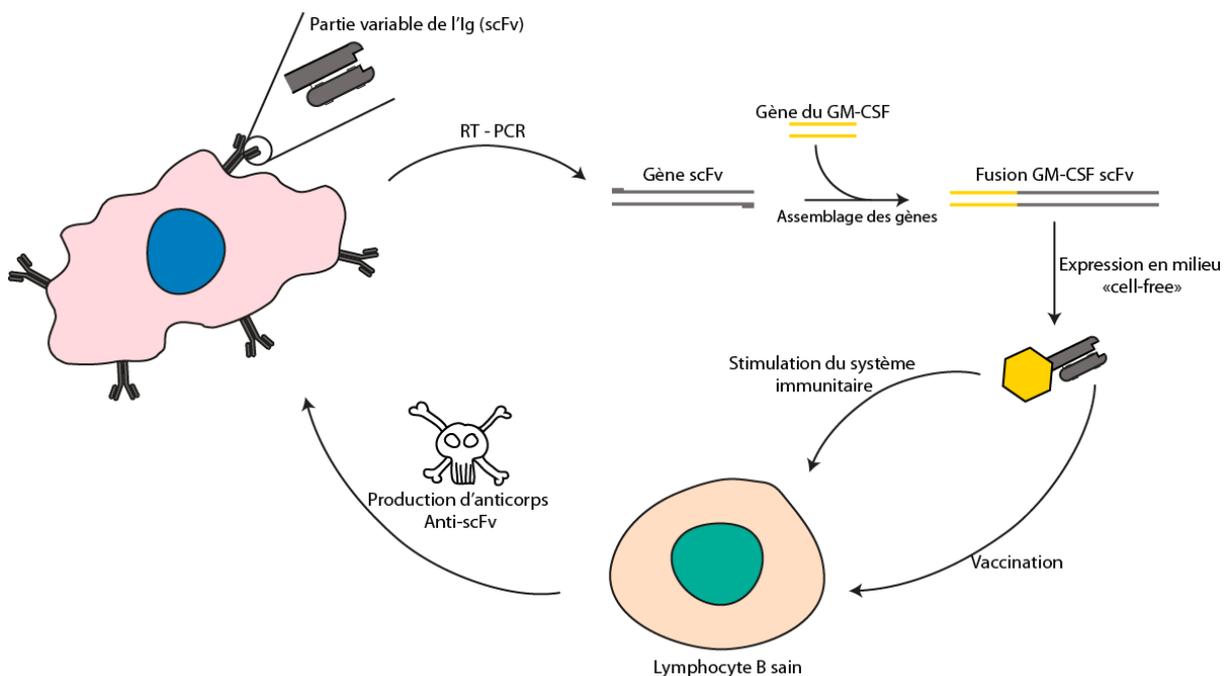


Figure 1.14 : Schéma simplifié de la démarche de développement d'un vaccin personnalisé anti-lymphome. Dans un premier temps, des cellules cancéreuses sont extraites de l'individu puis le fragment de gène correspondant à l'idiotype de la tumeur est récupéré par PCR. Celui-ci est récupéré et fusionné à la séquence codante du GM-CSF. La protéine de fusion est ainsi produite en système CFPS ECE.

Cette fusion scFv personnalisée spécifique du lymphome du patient a réussi à lever une réponse immunitaire contre l'Ig native. En comparaison avec un système d'expression en cellules mammifères, la production de ce vaccin aurait pris plusieurs mois au lieu de quelques jours nécessaires dans le cas de l'ECE. Ce sont ces capacités d'expression rapides, flexibles et à haut-rendements qui, combinées à des procédés d'utilisation simples, démontrent les nouvelles possibilités d'utilisation de ces produits dans le cadre de la médecine personnalisée.

En dehors du domaine de cette médecine, les systèmes CFPS pourraient aider à identifier de nouvelles molécules pour les traitements du cancer, les hépatites et la malaria. Les plateformes d'expression rapides ont un rôle croissant dans la découverte de cibles thérapeutiques potentielles. Tsuboi et al., (2008, 2010) ont par exemple utilisé le système WGE pour exprimer 124 gènes du génome de la malaria comme des candidats possibles pour la production de vaccins. Un autre exemple de développement est la mise en évidence de cibles potentielles pour la création d'un vaccin contre la toxine botulique (Zichel et al., 2010).

### 2.4 CFPS et ingénierie des protéines

La versatilité d'utilisation que procurent les systèmes CFPS en fait des plateformes de choix pour l'ingénierie des protéines et des enzymes. Depuis les années 1990, plusieurs méthodes d'évolution dirigées, telles que le ribosome display (Mattheakis et al., 1994)(Zahnd et al., 2007), mRNA display (Roberts et Szostak, 1997), et la compartimentation *in vitro* (Tawfik et Griffiths, 1998)(Griffiths et Tawfik, 2003), ont été développées à partir des systèmes CFPS.

Le ribosome display est en certains points similaire aux PISA vus précédemment. Le ribosome display sert dans ce cas de support de présentation, reliant ainsi la protéine naissante à son ARNm correspondant, via un complexe PRM (protéine-ribosome-ARNm). Ces complexes PRM permettent d'isoler à la fois une protéine spécifique et son ARNm, en se basant sur le même système d'immobilisation spécifique que pour les PISA. Après l'immobilisation du complexe, l'ARNm peut être récupéré sous forme d'un fragment d'ADN par retro-transcription couplée à une réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR) [Figure 1.15].

La formation de ces complexes PRM est rendue possible par la délétion du codon stop en 3' de la fin de séquence de l'ARNm. En l'absence de ce codon, les facteurs de relâchement ne peuvent entrer en action, la protéine naissante et l'ARNm ne se dissocient donc pas du ribosome et sont donc physiquement associés. Des méthodes alternatives pour former ces complexes PRM, utilisent les antibiotiques ou l'interaction entre le polypeptide en formation et son ARNm (Mattheakis et al., 1994)(He and Taussig, 2005).

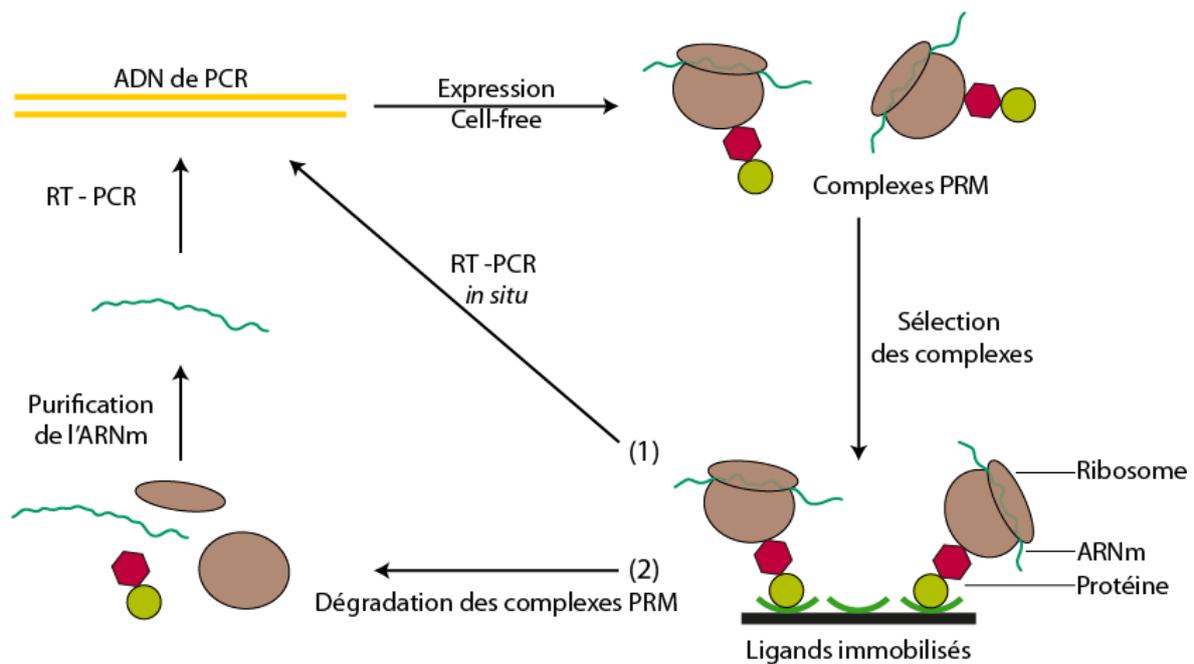


Figure 1.15 : Des fragments d'ADN amplifiés par PCR, sont ajoutés dans un système CFPS (procaryote ou eucaryote) pour produire des complexes PRM. Ces derniers vont interagir avec un ligand immobilisé sur la surface. L'ADNc de l'ARNm du complexe PRM est ensuite obtenu selon une des deux techniques ; (1) Une RT-PCR *in situ* dans le cas d'un système eucaryote ; (2) la dégradation du complexe PRM suivie d'une purification de l'ARNm et enfin une RT-PCR dans le cas d'un système procaryote.

Ces technologies ont démontré leurs avantages vis-à-vis des méthodes basées sur le vivant (*in vivo*-based display) et ont été utilisées avec succès pour la sélection de fragments d'anticorps scFvs (Fukuda et al., 2006), facteurs liants l'ADN (Ihara et al., 2006) et de molécules utilisées dans le traitement des cancers (Yan and Xu, 2006).

Stapleton et Swartz (2010) ont récemment développé une méthode haut-débit d'exposition d'hydrogénases, basée sur un système d'exposition en microbilles compartimentées en milieux *in vitro* et triées par FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting). Cette technologie trouve sa place dans le domaine de la production d'énergie puisque les hydrogénases catalysent la formation de dihydrogène ( $2\text{H}^{++} \rightarrow \text{H}_2$ ), ce qui en fait potentiellement des bio-catalyseurs clés dans la production d'hydrogène carburant. Ces enzymes sont néanmoins très sensibles à l'oxygène, c'est ici que les aspects d'ingénierie des protéines et de sélection évolutive de cette technologie trouvent tout leur sens.

### 2.5 CFPS et protéines membranaires

Comme nous le verrons dans la deuxième partie de la thèse, la production de protéines membranaires est un autre domaine d'application des systèmes CFPS. En effet, l'ensemble des protéines membranaires présentes dans notre organisme ne représente pas moins de 75% des cibles potentielles pour des traitements thérapeutiques (Ritter et Hall, 2009).

Ces modèles de surexpression sont difficilement utilisables en systèmes cellulaires car leurs structures complexes, leurs domaines transmembranaires hydrophobes, les étapes de repliements ainsi que la cytotoxicité due à la surexpression nécessitent des optimisations chronophages pour des rendements qui restent faibles.

L'idée avancée rendant possible la production avec de hauts rendements de protéines membranaires fonctionnelles en système CFPS, est d'effectuer cette synthèse en présence de lipides naturels/synthétiques et/ou de détergents qui facilitent la solubilisation de la protéine membranaire [Figure 1.16]. L'addition de surfactants ou de lipides purifiés peut prévenir l'agrégation de polypeptides membranaires (Klammt et al., 2005). L'utilisation de vésicules, comprenant une bicouche de phospholipides [Figure 1.16], issues d'*E. Coli*, a aussi été réalisé. En utilisant cette approche, deux protéines, *TetA* et *MtIA* (une pompe à tétracycline et une perméase à mannitol), ont été exprimées avec de hauts rendements en comparaison de la méthode précédemment mise en œuvre (Wuu et Swartz, 2008).

Les nanolipoprotéines, qui sont des disques de bicouches lipidiques de diamètre défini ( $\approx 10$  nm) confinées grâce à un anneau de protéines amphiphiliques (Nath et al., 2007)(Cappuccio et al., 2009), aussi bien que les liposomes unilamellaires (Goren et al., 2009)(Kaneda et al., 2009), ont démontré une partie de leur potentiel pour la production et purification de protéines membranaires fonctionnelles.

Noireaux et Libchaber (2004) ont utilisé des vésicules de phospholipides pour encapsuler leur système « cell-free ». Ils ont ainsi démontré qu'ils pouvaient exprimer l' $\alpha$ -hémolysine, une protéine formant des pores, que celle-ci s'intègre parfaitement à la bicouche de phospholipides et crée des canaux présentant une perméabilité sélective vis-à-vis de petites molécules.

Cette technologie a aussi démontré son utilité pour étudier l'interaction entre les protéines membranaires et les phospholipides de la bicouche lipidique (Chalmeau et al., 2011).

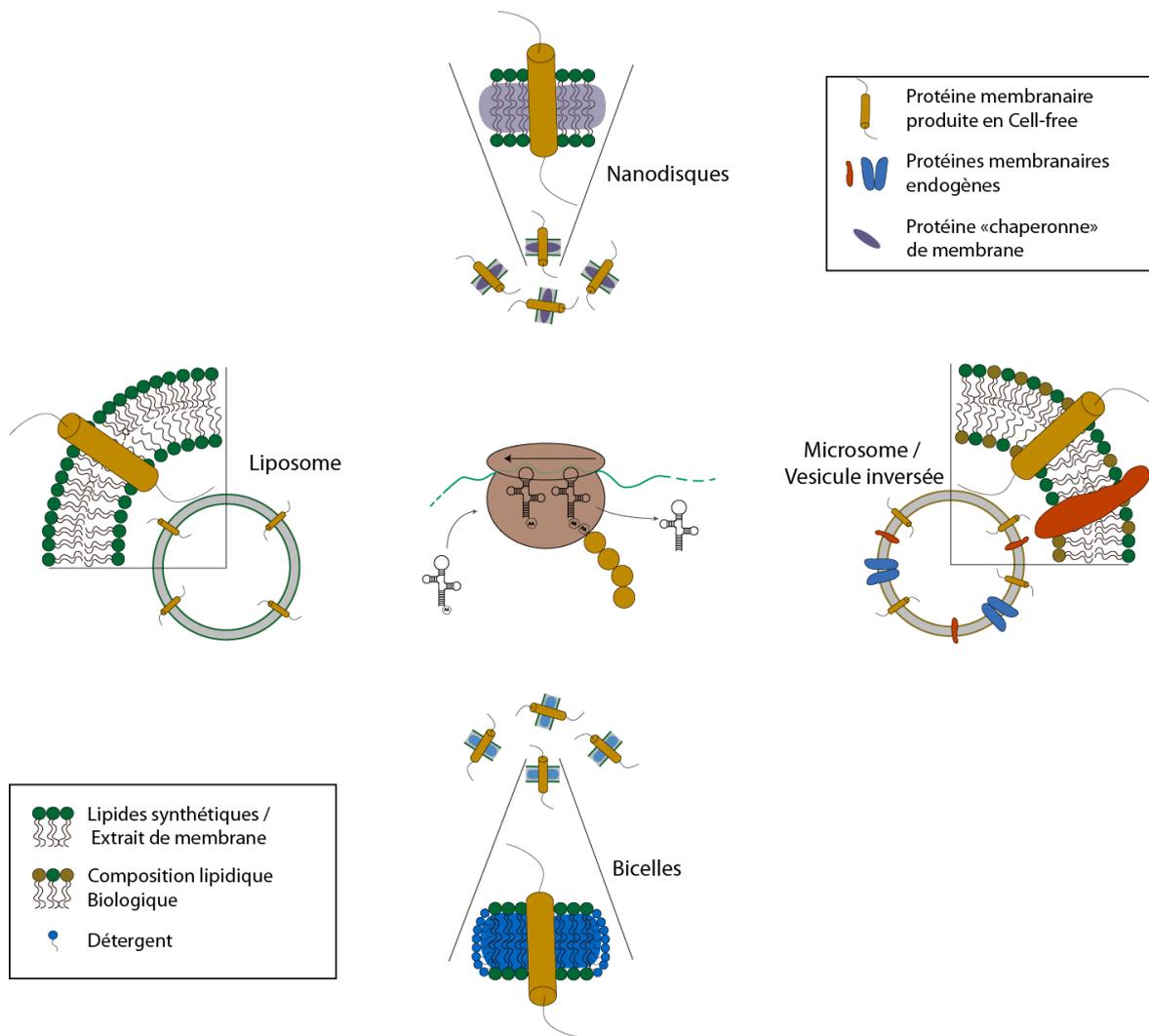


Figure 1.16 : Synthèse de protéines membranaires en présence de différentes structures lipidiques. Les systèmes CFPS Pro- ou Eucaryotes permettent la production de la protéine cible. La synthèse d'une protéine fonctionnelle est facilitée par l'adjonction dans le milieu réactionnel, de structures synthétiques comme les liposomes, les nanodisques ou les bicelles. L'utilisation de microsomes ou de vésicules inversées permet de conserver les processus actifs, co-translationnels, de translocation des protéines membranaires (adapté de Sachse et al., 2014).

## 2.6 Reconstitution d'assemblage protéique complexe en « cell-free »

Les Virus-like Particles (VLPs) sont des auto-assemblages complexes de 25-100 nm, d'une ou plusieurs protéines structurales (Johnson and Chiu, 2000). Leur nom provient du fait qu'ils sont structurellement similaires à des virus, de fait s'ils sont injectés dans un organisme (humain par exemple), ils vont induire une réponse immunitaire. Cette propriété pourrait faire de ces particules des candidats parfaits pour le développement de nouveaux

vaccins, d'autant plus que contrairement au virus, les VLPs ne contiennent pas de matériel génétique leur retirant ainsi leur propriété infectieuse (Jennings and Bachmann, 2008).

Leurs propriétés d'auto-assemblage en « structures creuses » font des VLPs de très bons candidats pour le ciblage de «drug delivery» et de thérapie génique (Bundy et al., 2008). Pour conserver leur pouvoir immuno-génique, la structure et la régularité des VLPs doivent être maintenues. La composition, consistance, pureté et distribution du produit final sont les concepts clés à prendre en considération lors de la production des VLPs.

La production de VLPs recombinantes *in vivo* pose certains obstacles, comme le manque de régularité structurale lorsque les échelles de production augmentent, la présence de protéines contaminantes issues de l'hôte (Pattenden et al., 2005), ainsi que les coûts élevés liés à la constitution de lignées recombinantes (Rothengass, 2007).

Des systèmes CFPS (ECE) ont été développés pour améliorer les rendements de production des VLPs (Bundy et al., 2008). De plus, certains de ces systèmes offrent la possibilité d'optimiser l'assemblage, quasiment en temps réel, permettant ainsi le développement de nouveaux VLPs, de l'échelle de la paillasse à l'échelle industrielle.

En parallèle de ces développements, les systèmes CFPS (ECE) permettent aussi de façon versatile l'insertion d'acides aminés non-naturels portant des fonctions utilisées en chimie Click (Patel et Swartz, 2011) [Figure 1.17]. Ces modifications offrent la possibilité de décorer ces VLPs avec des fragments d'anticorps, des facteurs de stimulation de colonisation des granulocytes macrophages (GM-CSF), d'ADN, et de polyéthylène glycol [Figure 1.17]. Des ligands multiples peuvent être ajoutés ensemble pour décorer les capsides, seul le ratio de fonctions disponibles et l'encombrement stérique définiront la composition finale de la surface.

Afin d'augmenter la stabilité des VLPs, Bundy et Swartz (2011) ont contrôlé le potentiel d'oxydo-réduction d'un système CFPS (ECE) afin de contrôler la formation de ponts disulfures entre les monomères de la capsid virale.

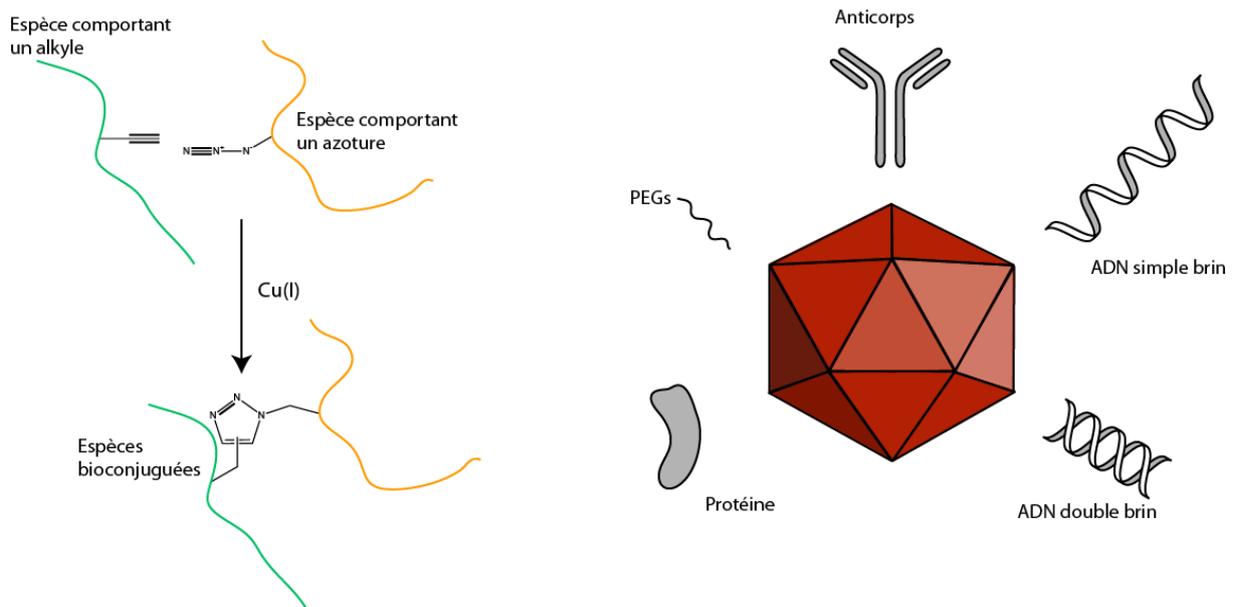


Figure 1.17 : Chimie Click et bioconjugaison de macromolécule sur des VLPs. L'utilisation d'AA non-naturels pendant la production des protéines en système CFPS permet par la suite d'utiliser des réactions de chimie Click pour la fonctionnalisation des VLPs avec différents types de macromolécules : ADN simple ou double brin, protéines, et Polyéthylène glycol.

Dans une étude récente sur l'expression de deux gènes de la capsid du bactériophage T4, l'équipe de Roy Bar Ziv a montré que l'expression séparée des gènes conduisait à la formation des structures physiologiques de chaque élément, alors que la co-expression des protéines formait de nouvelles structures. Dans leur publication, les auteurs supposent que cela est probablement dû au fait qu'il n'y a que deux des 18 gènes de structures présents (Daube et al., 2007).

Il a été démontré par la suite, qu'il était non seulement possible grâce à un système CFPS (ECE) de répliquer le génome viral complet du bactériophage T7 comportant 60 gènes (40 kpb), mais aussi d'exprimer les protéines structurales du virus et de voir les capsides se former [Figure 1.18]. Les deux processus concomitants amènent à la formation de virions totalement fonctionnels comme le montrent les auteurs (Shin et al., 2012). La même démonstration est réalisée pour le phage  $\Phi$ X174.

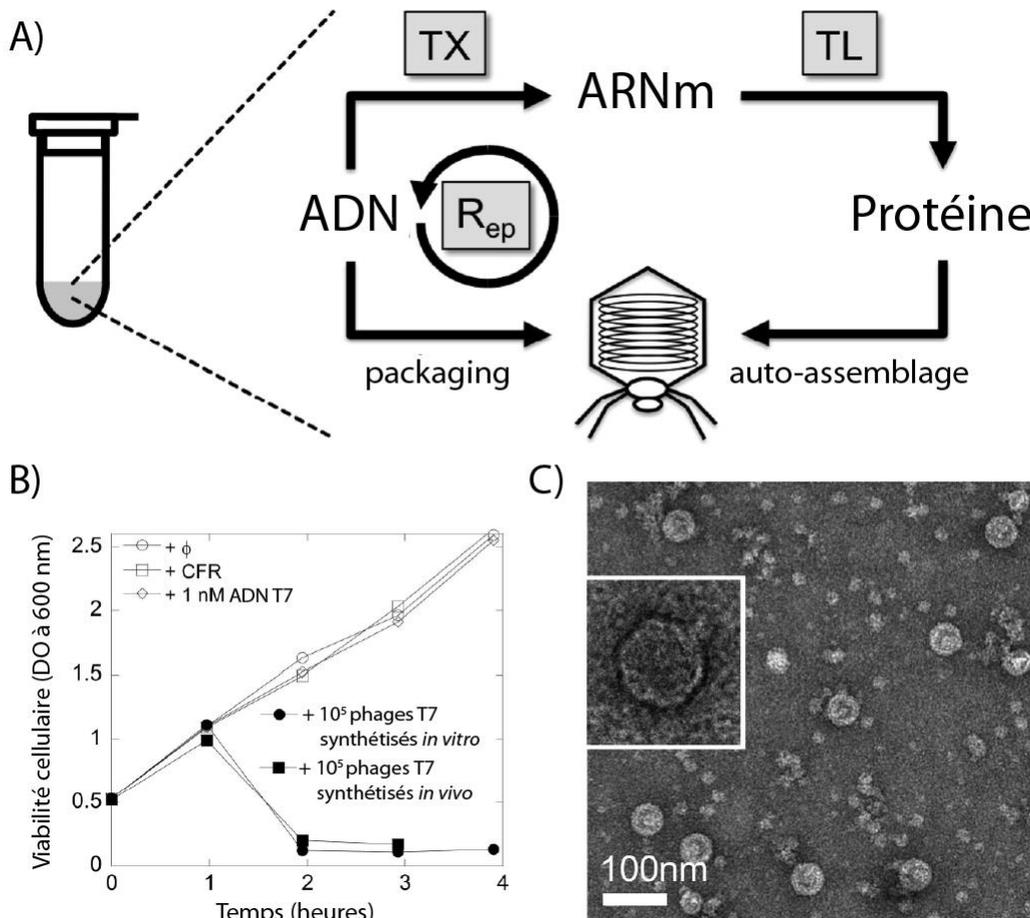


Figure 1.18 : Synthèse du bactériophage T7 en système CFPS ECE. A) Schéma des réactions de transcription (TX) et de traduction (TL) concomitantes à la réplication du génome ( $R_{ep}$ ) qui aboutissent à la synthèse du phage. B) Mesure de la viabilité cellulaire d'*E. coli* par mesure de densité optique (DO) à 600 nm. La souche B d'*E. coli* est mise en croissance en milieu de culture *lysogeny broth* (LB) à 37 °C. A une DO de 0,5, cinq cultures identiques de 5 mL sont respectivement inoculées avec 0  $\mu$ L de réaction « cell-free » (CFR) ( $\emptyset$ ), 1  $\mu$ L de CFR incubé à 29 °C pendant 12 h supplémenté avec un plasmide codant pour une protéine fluorescente (eGFP), 1  $\mu$ L d'une solution de génome du phage T7 suspendu dans une CFR à une concentration de 1 nM (sans incubation), 1  $\mu$ L d'une solution de génome du phage T7 suspendu dans une CFR à une concentration de 1 nM incubé pendant 12 h et contenant en fin d'incubation  $10^8$  phages T7.mL<sup>-1</sup>, enfin 1  $\mu$ L d'une solution contenant  $10^8$  phages T7.mL<sup>-1</sup> produits *in vivo* (Infection d'une souche B d'*E. coli*). C) Image en microscopie électronique à transmission (TEM) de phages T7 synthétisés en CFR (grossissement : 59000X). Encart : zoom sur un phage T7, la capside, de 55 nm de diamètre et la queue de 20 nm sont visibles (adapté de Shin et al., 2012).

Ces avancées démontrent les mérites des systèmes CFPS comme de potentielles puissantes plateformes de programmation, via l'utilisation d'un génome viral complet, mais aussi et surtout de production de complexes protéiques comme les VLPs, à des fins de nano-ingénierie de structures, de « drug delivery » et d'applications vaccinales.

### 3. Bilan des stratégies de production et d'applications des systèmes « cell-free »

Comme nous avons pu le voir au cours de ce chapitre, il existe un vaste choix de systèmes pour l'expression de protéines. Qu'il soit basé sur des cellules procaryotes ou eucaryotes ou qu'il soit issu d'extraits cellulaires bruts ou purifiés, chaque modèle d'expression possède ses avantages et ses inconvénients [Tableau 1.5].

En particulier, les systèmes « cell-free » (CFPS) ont des avantages marqués par rapport aux méthodes de production *in vivo*, grâce notamment à leur potentiel à produire rapidement des protéines recombinantes bioactives.

Les CFPS permettent l'optimisation de l'extrait cellulaire pour la production exclusive d'une protéine, sans prendre le parti de maintenir des processus auxiliaires nécessaires à la viabilité et à la croissance cellulaire. L'absence de membrane cellulaire fait de ces systèmes des environnements ouverts et versatiles pour le suivi actif, l'échantillonnage et les manipulations en parallèle de la synthèse protéique. Enfin, le format « cell-free » permet d'accélérer grandement les étapes de manipulation génétique [Figure 1.10], rendant possible l'exploitation et le développement de projets beaucoup plus rapidement.

Malgré des aspects prometteurs, plusieurs obstacles ont limité l'utilisation des systèmes « cell-free » en tant que technologies de production de protéines. Plusieurs de ces problèmes ont été adressés au cours des années passées, tels que les faibles rendements de production, la nécessité d'approvisionner de manière continue en énergie et en substrats sans avoir les effets concomitants délétères de la modification de l'environnement chimique (Spirin et al., 1988)(Calhoun and Swartz, 2005).

En comparaison du système d'expression que représente *E. Coli*, ces méthodes présentent l'avantage de permettre la production de protéines qu'ils ne seraient pas possibles de synthétiser en bactéries. Ces systèmes permettent notamment la production de protéines toxiques, d'éviter l'agrégation et la dégradation des protéines recombinantes, de synthétiser certains types de complexes protéiques et de réaliser des modifications post-traductionnelles *in situ* des protéines produites (Chang et al., 2005).

Type	Avantages / Inconvénients	Applications
<b>Extrait cellulaire d'<i>E. Coli</i> (ECE)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Haut rendement de synthèse</li> <li>+ Savoir-faire concernant la biochimie et les méthodes de génétique</li> <li>+ Capacités de repliement de protéines complexes</li> <li>+ Productions de protéines toxiques</li> <li>- Modifications post-traductionnelles limitées</li> <li>- Protéines contaminantes</li> </ul>	<p><b><u>Reconstitution d'assemblages protéiques :</u></b> (Daube et al., 2007)(Bundy et al., 2008)(Shin et al., 2012) (Elbaz et al., 2004)</p> <p><b><u>Thérapeutique :</u></b> (Kanter et al., 2007)(Zawada et al., 2011)</p> <p><b><u>Structure protéique :</u></b> (Ozawa et al., 2005)</p>
<b>Système reconstitué à partir d'<i>E. Coli</i> (PURExpress®)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Haute Reproductibilité du système</li> <li>+ Système ouvert aux modifications</li> <li>+ Production de protéines toxiques</li> <li>+ Haut rendement de synthèse</li> <li>+ Capacités de repliement de protéines complexes</li> <li>- Modifications post-traductionnelles limitées</li> <li>- Prix</li> <li>- Système minimal nécessitant l'ajout de co-facteurs d'expression, de repliement, <i>etc.</i></li> </ul>	<p><b><u>Reconstitution de protéines membranaires :</u></b> (Kuruma et al., 2005) (Liu et al., 2013)</p> <p><b><u>Contrôle de l'expression indirecte :</u></b> (Venancio-Marques et al., 2012)</p> <p><b><u>AA non naturel :</u></b> (Forster et al., 2004) (Hipolito and Suga, 2012)</p> <p><b><u>Cellule minimaliste :</u></b> (Jewett and Forster, 2010)</p>
<b>Extrait d'embryons de germes de blé (WGE)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Champs large d'expression de protéine eucaryote réussie avec succès</li> <li>+ Haut rendement de production avec des protéines complexes</li> <li>- Rendement de préparation à partir des cellules faible</li> <li>- Préparation longue et fastidieuse</li> <li>- Souche peu modifiée</li> </ul>	<p><b><u>Bibliothèque de protéines :</u></b> (Endo and Sawasaki, 2003) (Goshima et al., 2008)</p> <p><b><u>Reconstitution de protéines membranaires :</u></b> (Goren and Fox, 2008a)</p> <p><b><u>Structure protéique :</u></b> (Vinarov and Markley, 2005) (Takai et al., 2008)</p>
<b>Lysat de réticulocyte de lapin (RRL)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Lyse cellulaire et préparation rapide et facile de l'extrait</li> <li>+ Modifications post-traductionnelles spécifiques aux protéines eucaryotes</li> <li>- Manipulation complexe de tissus issus d'animaux</li> <li>- Eventail de protéines exprimées faible</li> <li>- Quantités importantes d'ARNm de globine et de Rnase M</li> <li>- Souche peu modifiée</li> <li>- Rendement de synthèse protéique faible</li> </ul>	<p><b><u>Reconstitution de protéines membranaires :</u></b> (Kaneda et al., 2009a)</p> <p><b><u>Protéomique fonctionnelle :</u></b> (Miersch and LaBaer, 2011)</p>

Type	Avantages / Inconvénients	Applications
<p align="center"><b>Extrait de cellule d'insecte (ICE)</b></p>	<p>+ Lyse cellulaire et préparation rapide et facile de l'extrait                      + Modifications post-traductionnelles spécifiques aux protéines eucaryotes                      + Traitement des signaux d'adressage                      - Culture cellulaire préparatoire chronophage et chère                      - Souche peu modifiée</p>	<p><b><u>Reconstitution de protéines membranaires :</u></b>                      (Tsumoto and Yoshimura, 2009)  <b><u>Vaccins :</u></b>                      (Felberbaum, 2015)</p>

Tableau 1.5 : Comparaison des différents systèmes « Cell-free » et de certaines de leurs applications.

Mes travaux de thèse présentés dans les chapitres à venir nécessitent l'utilisation d'un système offrant une grande reproductibilité et permettant en même temps des modifications en temps réel de celui-ci. Comme nous l'aborderons, les modifications du système d'expression que nous réaliserons feront intervenir des molécules simples, des protéines ou des structures supramoléculaires comme les liposomes géants.

Compte tenu de l'expertise dont dispose le laboratoire concernant l'utilisation de systèmes reconstitués comme le PURE system® (Estévez-Torres et al., 2009)(Saito et al., 2009)(Rudiuk et al., 2011), il est tout à fait naturel que mon choix de stratégie de production de protéines se soit tourné vers un système analogue, le PURExpress® (Yamada et al., 2010) qui offre de nombreux avantages, comme une composition parfaitement déterminée ainsi qu'une bonne reproductibilité.

## Chapitre 2 : Régulation génétique et métabolique en système « Cell-free »

Comme nous avons pu le voir au cours du chapitre 1, les protéines sont des édifices biologiques primordiaux. Ces structures biologiquement actives ont un rôle essentiel dans les régulations physiologiques des organismes. C'est pourquoi leur production est hautement régulée dans les cellules. Il paraît donc important de développer des méthodes de contrôle spatio-temporel de l'expression des protéines en milieu « cell-free ».

Après un bref rappel sur les systèmes classiques de régulation *in vitro*, nous explorons tout d'abord des voies métaboliques qui ont été peu étudiées en système « cell-free ». Nous analysons ainsi l'effet de métabolites énergétiques (ATP, GTP) et d'une enzyme (kinase) sur les profils d'expression au sein du CFRPS PURExpress®.

Nous décrivons ensuite la mise en place d'un système original d'inhibition réversible basé sur une triade enzyme-substrat-antibiotique.



## Sommaire

<b>Introduction .....</b>	<b>71</b>
<b>1. Approche biosynthétique de la régulation de l'expression.....</b>	<b>73</b>
1.1 Régulation de l'expression par des modifications génétiques .....	73
1.1.1 Exemples de régulations transcriptionnelles.....	73
1.1.1.1 Opérons : Promoteurs et Répresseurs .....	73
1.1.1.1.1 Le répresseur tryptophane .....	74
1.1.1.1.2 L'opéron <i>lac</i> : Activateur et répresseur .....	74
1.1.1.1.3 Le système Tet-Off, Tet-On .....	75
1.1.2 Exemple de régulation traductionnelle : la séquence Shine-Dalgarno.....	76
1.1.3 Créations de circuits génétiques avec des protéines de régulation .....	77
1.2 Régulation de l'expression par des modifications chimiques et biochimiques en milieu « Cell-free ».....	79
1.2.1 Régulation conformationnelle de l'ADN comme moyen de régulation .....	79
1.2.2 Applications d'agents de compaction photosensibles en « Cell-free ».....	81
<b>2. Régulation par voie métabolique ou antibiotique de l'expression en « Cell-free » .....</b>	<b>86</b>
2.1 Utilisation du PURExpress®.....	86
2.2 Etude de la régulation de l'expression par le métabolisme .....	87
2.2.1 Influence de l'ATP et du GTP sur la production de eGFP .....	88
2.2.2 Influence de la MAPK sur l'expression de l'eGFP .....	91
2.3 Régulation de l'expression par un antibiotique.....	93
2.3.1 Inhibition de l'expression protéique .....	94
2.3.2 Un mode d'inhibition réversible .....	99
<b>3. Bilan et perspectives : Régulation de l'expression par voie métabolique et par un antibiotique.....</b>	<b>106</b>



# Introduction

Nous avons pu voir au chapitre précédent les différentes étapes de production de protéines, les étapes de transcription de l'ADN en ARNm, ainsi que la traduction de l'ARNm en protéines qui sont communes aux organismes vivants et aux systèmes *in vitro* issus de ces organismes. Au cours de ces processus, des systèmes de régulation ont été mis en place par les cellules permettant un contrôle fin de l'expression des protéines. Ces mécanismes physiologiques ne sont pour le moment pas tous compris et seulement certains d'entre eux sont mis en application dans les systèmes de régulation de production de protéines *in vitro*.

Au cours de ce chapitre, nous aborderons dans un premier temps les notions de promoteurs et de répresseurs, dans le cadre de la régulation transcriptionnelle *in vivo*. Nous constaterons qu'il existe différents systèmes qui sont aujourd'hui utilisés en routine dans les laboratoires afin de contrôler la production de protéines dans des systèmes vivants. Nous aborderons ensuite la régulation traductionnelle avec la séquence Shine-Dalgarno et les séquences trans-activatrices. Nous observerons que le couplage de ce type de systèmes permet de réaliser des circuits « synthétiques », permettant par exemple la réalisation d'oscillateurs bactériens.

Dans un deuxième temps, nous verrons que le mécanisme naturel de compaction de l'ADN présent chez les eucaryotes peut être mimé en se basant sur les propriétés de ce polymère biologique et qu'il permet la régulation de l'expression génétique non pas *in vivo* mais en systèmes « cell-free ». En particulier, différents développements autour des agents de compaction photosensibles ont permis de réaliser une régulation de la production de protéines par la lumière (Venancio-Marques et al., 2012) non seulement par la compaction non spécifique de l'ADN codant pour la protéine (Estévez-Torres et al., 2009) mais aussi de manière plus fine en localisant les molécules actives en amont du gène sur le plasmide (Rudiuk et al., 2011). Nous verrons que l'utilisation d'aptamères dans les séquences amont des gènes permet aussi une régulation de la production de protéine.

Enfin nous aborderons les résultats expérimentaux, dont les résultats des études de l'influence de la supplémentation du milieu d'expression, avec des métabolites ainsi qu'avec une kinase, sur l'efficacité de l'expression.

Le PURExpress® étant un système reconstitué issu d'E. Coli, il n'échappe pas à certaines règles qui s'appliquent à son organisme d'origine. Ainsi nous avons proposé pour

cette thèse une approche originale qui consiste en la régulation de l'expression de protéines par l'intermédiaire d'un antibiotique. Il sera fait la démonstration que l'inhibition de l'expression par cette molécule est robuste, réversible et que son utilisation présente des avantages et des inconvénients.

# 1. Approche biosynthétique de la régulation de l'expression

L'ADN d'un organisme encode tous les ARN et les protéines afin de permettre le fonctionnement et la multiplication d'une cellule. Pour autant, la description complète du génome d'un organisme, qu'il ne soit composé que de quelques millions de nucléotides comme celui d'une bactérie ou de plusieurs milliards comme celui d'un humain, ne permet pas de reconstruire cet organisme. Le problème réside dans la compréhension de « quand et avec quelle intensité » les éléments de la séquence présents dans ce génome sont mobilisés. Preuve en est faite puisque dans un organisme pluricellulaire, différents types cellulaires auront des molécules d'ADN quasi similaires.

## 1.1 Régulation de l'expression par des modifications génétiques

Comme nous avons pu le voir au chapitre 1, le processus d'initiation et de terminaison de la transcription implique une série de reconnaissances et de transitions structurales de protéines, de l'ADN et des molécules d'ARN qui sont le fruit de milliards d'années d'une sélection évolutive très fine.

### 1.1.1 Exemples de régulations transcriptionnelles

#### 1.1.1.1 Opérons : Promoteurs et Répresseurs

L'initiation de la transcription se fait lorsque l'ARN polymérase reconnaît une séquence promoteur. Néanmoins, si nous venions à comparer les séquences promoteurs des bactéries, nous constaterions que, bien que les séquences sont hétérogènes, elles sont cependant reconnues comme étant des promoteurs et initient la transcription. En réalité, les promoteurs sont un consensus de séquence, c'est-à-dire qu'en comparant un ensemble de ces séquences entre elles, on peut enregistrer et moyenniser pour une position donnée dans la séquence, l'utilisation d'un nucléotide. Il s'agit dans ce cas d'une régulation de l'expression dépendant de la séquence. La raison pour laquelle la séquence des promoteurs bactériens (ou eucaryotes) varie réside dans le fait que leur séquence détermine leur force, © le nombre

d'initiation par minute (Li and Zhang, 2014). Les processus évolutifs ont fait que chaque promoteur va promouvoir avec une force plus ou moins importante la production d'ARN spécifiques codés par le ou les gènes présents en aval de ladite séquence promotrice. Un ARN fortement exprimé aura un promoteur fort, et inversement.

Les séquences promotrices sont asymétriques alors que l'ADN est une molécule double brin, cette asymétrie a d'importantes conséquences concernant la transcription. En effet, en principe deux molécules d'ARN pourraient être produites à partir d'un gène, en utilisant chacune un brin comme support. Néanmoins, un gène ne possède qu'un seul promoteur. De plus, son asymétrie fait que l'ARN polymérase ne pourra se lier que dans un sens et par la suite produire la molécule d'ARN dans le sens unique 5'-3'.

Les promoteurs présentent deux modes de fonctionnement. Un mode de régulation positif, auquel cas l'interaction entre le promoteur et une molécule appelée facteur de transcription permettra l'initiation de la transcription ; ou une régulation négative, c'est-à-dire que le gène est par défaut transcrit sauf si une molécule vient empêcher la fixation de l'ARN polymérase sur le promoteur.

Les promoteurs ne sont pas l'unique source de régulation de l'expression génétique et nous allons voir des systèmes de régulation classiques qui sont aujourd'hui utilisés en routine dans les laboratoires (Chevalet et al., 2000)(Demolli et al., 2014).

### 1.1.1.1 Le répresseur tryptophane

Le répresseur tryptophane contrôle l'ensemble des cinq gènes responsables du métabolisme du tryptophane (W) chez *E. coli*. Dans ce cas, il s'agit d'une répression mise en place en présence de W, celui-ci interagit avec la protéine répresseur qui s'en trouve activée. Suite à son activation, la protéine viendra se fixer sur une séquence spécifique au sein du promoteur empêchant par la même occasion l'ARN polymérase d'accéder à la séquence promoteur (Salazar-Cavazos and Santillán, 2014).

### 1.1.1.2 L'opéron *lac* : Activateur et répresseur

L'opéron *lac* d'*E. coli* (Jacob and Monod, 1961) est un interrupteur génétique plus complexe puisqu'il peut être sous contrôle négatif ou positif. Chez *E. coli*, la protéine responsable de la répression de l'opéron lactose est constitutivement exprimée. Lorsqu'elle

n'est pas liée au lactose ou à l'Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), la protéine empêche la production des enzymes responsable du métabolisme du lactose. Néanmoins, la présence de lactose n'est pas une condition nécessaire et suffisante à l'activation de l'opéron, il faut aussi une absence de glucose. En effet, en présence de glucose, la protéine activatrice des catabolites (CAP) n'est pas produite, or elle active les voies métaboliques alternatives, telles que l'opéron lactose. Pour résumer, en absence de glucose la CAP sera activée. De plus, le lactose se liera avec la protéine répresseur pour l'empêcher de se lier à l'opérateur (Becker et al., 2013).

### 1.1.1.3 Le système Tet-Off, Tet-On

Le système Tet-Off et Tet-On (Gossen and Bujard, 1992) permet une régulation fine de l'expression d'un gène. Le système est basé sur des éléments régulateurs de l'opéron Tn10 spécifique de la résistance à la tétracycline présent chez *E. coli* (Hillen et Wissmann, 1989).

Le système Ter-Off utilise la protéine tétracycline trans-activatrice (tTA), qui est le produit de fusion entre la protéine TetR (Répresseur tétracycline) trouvée dans *E. coli* et le domaine d'activation de la protéine VP16 provenant du virus de l'herpès, *Herpes simplex virus* (HSV). La protéine de fusion résultante tTA est capable de se lier à une séquence spécifique de l'ADN, la séquence opératrice TetO. Plusieurs séquences TetO sont généralement placées en amont d'un promoteur type CMV (cytomégalovirus), l'ensemble de ces séquences incluant le promoteur sont appelées l'élément de réponse à la tétracycline (TRE). Dans le système Tet-Off, les gènes sous le TRE sont réprimés par la tétracycline et ses dérivés comme la doxycycline, qui se lient à tTA l'empêchant ainsi de se lier à la séquence TRE.

Le système Tet-On fonctionne de manière similaire. Alors que pour Tet-Off, tTA est capable de se lier à l'opérateur uniquement s'il n'est pas lié par la tétracycline ou un de ses dérivés, dans le Tet-On, la protéine rtTA est capable de se lier à l'opérateur uniquement si elle est liée à la tétracycline. Dans le cas présent, l'ajout d'une de ces molécules antibiotiques initiera la transcription des gènes en avant de la séquence TRE.

Il existe évidemment d'autres systèmes de régulation transcriptionnelle, chez les eucaryotes par exemple, qui ne seront pas discutés ici. La régulation de la production de protéine ne se limite pas non plus au contrôle de la production d'ARNm. En effet, nous allons voir qu'il existe des contrôles de la traduction liés aux ARNm.

### 1.1.2 Exemple de régulation traductionnelle : la séquence Shine-Dalgarno

Après la production d'un ARNm, celui-ci est pris en charge par la machinerie de traduction afin de produire la protéine pour laquelle il code. Une manière d'affecter le niveau de production de la protéine est de contrôler les étapes d'initiation de la traduction.

Dans les ARNm bactériens, une séquence de six nucléotides est toujours conservée, il s'agit de la séquence Shine-Dalgarno (SD) (Shine et Dalgarno, 1974). Celle-ci se trouve toujours quelques nucléotides en amont du codon de démarrage de la traduction et forme un appariement complémentaire de bases avec l'ARNr 16S de la petite sous-unité du ribosome permettant ainsi le positionnement correct du ribosome par rapport au codon AUG. Cette interaction contribue de manière significative à l'efficacité avec laquelle une protéine sera produite à partir d'un ARNm. Cela constitue donc un moyen robuste d'établir un contrôle négatif de la traduction. En effet, les bactéries possèdent un ensemble de protéines répresseurs de la traduction, celles-ci ont comme propriété de se lier à la séquence SD ou à proximité de celle-ci et ainsi d'empêcher l'interaction entre l'ARN 16S et la séquence SD.

Un autre mode de régulation consiste à faire varier la composition de la séquence SD afin de moduler l'affinité de la séquence SD vis-à-vis de l'ARN 16S mais aussi d'inclure cette séquence dans une séquence permettant à l'ARNm de former des structures d'épingle à cheveux (Ringquist et al., 1992). L'intégration, en cis du gène transcrit, de séquences permettant la formation de structures tridimensionnelles de l'ARNm, permet une régulation négative de la traduction de la protéine. En parallèle, si une séquence complémentaire à l'ARNm [Figure 2.1] est produite en trans, la structure 3D ne peut alors pas se former et la traduction de la protéine est possible (Isaacs et al., 2004).

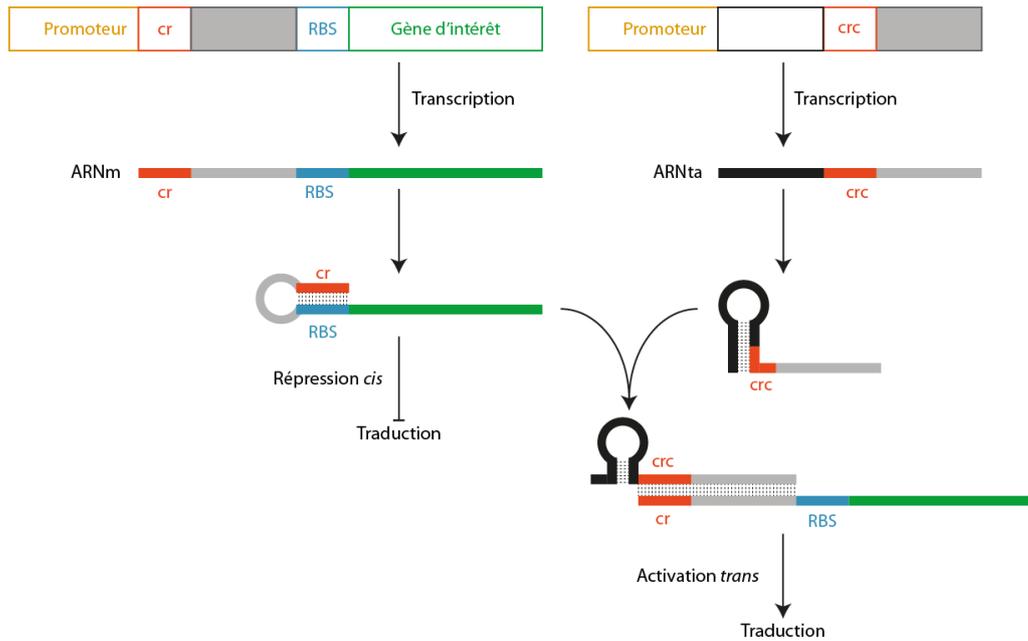


Figure 2.1 : Représentation schématique du fonctionnement d'un riborégulateur à composant *cis* et *trans*. Un élément de séquence complémentaire au RBS est intégré (*cr*) entre le promoteur et celui-ci. Après transcription les deux séquences (RBS/*cr*) s'apparient et forment une épingle à cheveux, empêchant l'initiation de la traduction (répression *cis*). Un deuxième promoteur permet l'expression d'un petit ARN non codant *trans*-activateur (ARNtA) ayant une grande affinité pour la séquence *cr* (*crc*) et la séquence grise qui forme la boucle dans le premier cas. En présence de l'ARNtA, l'ARNm perd sa boucle et expose son RBS, permettant la reprise de la traduction (activation *trans*) (adapté de Isaacs et al., 2004).

### 1.1.3 Créations de circuits génétiques avec des protéines de régulation

Depuis leur découverte il y a plus de soixante ans, les systèmes d'opéron *lac* ont servi dans de nombreuses applications biotechnologiques comme la production de protéines recombinantes dans *E. coli*. De plus, nous disposons aujourd'hui de banques de séquences de promoteurs procaryotiques et eucaryotiques, chacun comportant des spécificités propres comme le type de contrôle, la force et l'aptitude à être inhibé ou activé par une ou plusieurs molécules (Rajkumar et al., 2013).

Avec l'avènement de la biologie synthétique et de la biologie des systèmes, d'autres applications ont vu le jour. L'ingénierie des circuits génétiques est notamment un point d'intérêt en cours de développement, car ceci représente un moyen de mieux comprendre les systèmes biologiques afin de les utiliser pour des applications biotechnologiques et biomédicales. La biologie synthétique vise à créer par exemple des microorganismes de synthèse, sortes de châssis vivants de comportement connu, et donc modélisables et

modifiables à façon pour exécuter des tâches recherchées. On peut citer l'exemple des bactéries possédant des voies métaboliques alternatives pour la production de molécules spécifiques intéressantes pour l'industrie chimique, il y a l'exemple typique de la lignocellulose qui est un « déchet » complexe de l'industrie papetière, qui pour le moment n'est valorisé que par la production d'énergie à travers la combustion des déchets. Or ce composé complexe pourrait être réduit en molécules plus simples dont la valeur ajoutée serait nettement supérieure à la simple combustion pour la production d'énergie (Brown and Chang, 2014).

De même, des circuits ont été développés permettant de mettre en place une oscillation périodique de la production de protéines dans un organisme tel que *E. coli* (Elowitz and Leibler, 2000), mais aussi des interrupteurs à bascule (toggle-switch) (Gardner et al., 2000).

Les modèles *in vivo* ont montré qu'ils pouvaient être employés dans certains cas dans le but d'utiliser des circuits génétiques afin de contrôler l'expression d'une ou plusieurs protéines d'intérêt. L'étude des éléments qui permettent un contrôle de l'expression génétique pose un problème majeur dès lors que l'étude se fait sur un modèle *in vivo*. En effet, l'activité de ces éléments est souvent dépendante du contexte, cela va du châssis utilisé pour l'étude aux interactions entre le circuit génétique et le génome du châssis.

Ces systèmes restent limités par le fait qu'il faut satisfaire à la condition *sine qua non* de la viabilité cellulaire. C'est dans les conditions citées précédemment que les systèmes « cell-free » prennent tout leur sens. Comme ces systèmes ne sont pas soumis à la condition de la viabilité, à contrario des modèles vivants, ils permettent de tester des circuits ou des molécules qui seraient toxiques pour des organismes vivants. Les systèmes CFRPS permettent notamment un criblage rapide de constructions sans passer par des étapes préalables de construction de vecteurs et de transformation comme présentées au cours du chapitre 1.

Enfin, il existe un nombre assez varié de système CFPS et CFRPS. Cette variété permet de tester les circuits construits sur des extraits issus de différents châssis. Ces systèmes étant dénués de génome, il n'y aura donc pas d'interférence avec ou provenant du système CFPS ou CRFPS (Noireaux et al., 2003). Enfin, il est intéressant de noter que ces milieux d'expression peuvent être inclus dans des systèmes microfluidiques, afin de réaliser des applications qui ne seraient pas réalisables avec des cellules eucaryotes ou procaryotes (Karzbrun et al., 2014).

### 1.2 Régulation de l'expression par des modifications chimiques et biochimiques en milieu « Cell-free »

Comme nous avons pu le voir précédemment, il existe au sein des organismes vivants plusieurs niveaux de régulation de l'expression génétique. Un système qui peut de prime abord sembler primitif est paradoxalement un des systèmes de régulation les plus sophistiqués, celui-ci n'est pas lié comme nous l'avons vu à des séquences mais s'appuie sur les propriétés physico-chimique de l'ADN pour permettre la compaction du génome. Ce phénomène de compaction, à savoir le passage d'une molécule d'ADN allongée à une phase dense, a fait l'objet de nombreuses études pour conduire à une meilleure compréhension (Dillon et Dorman, 2010) et permettre son imitation en développant des stratégies efficaces de compaction-décompaction. Dans le cadre de la production de protéines en milieux « cell-free » cette stratégie de compaction-décompactions permet une régulation de type « on/off ». En effet, l'état de compaction de cette molécule va moduler son action biologique. Un ADN compact ne conduira pas à la production de protéines alors que dans un état relâché la machinerie de production pourra accéder au code et ainsi produire les protéines correspondantes.

#### 1.2.1 Régulation conformationnelle de l'ADN comme moyen de régulation

L'ADN chez les eucaryotes est lié à des protéines histones, pour former des unités ADN-protéines appelées nucléosomes. Le nucléosome est un ensemble octamérique de protéines autour duquel la double hélice d'ADN s'enroule. Les nucléosomes sont ensuite arrangés les uns par rapport aux autres par la protéine histone H1 pour former des fibres de 30 nm. Cette organisation a la propriété de fournir à la chromatine un haut degré de compaction, spécialement lors de la mitose et de la méiose, néanmoins cette structure doit aussi être hautement dynamique afin de permettre à la machinerie cellulaire d'accéder à l'ADN (Cutter and Hayes, 2015).

Afin de copier ce phénomène de compaction *in vitro*, les chercheurs ont employé les propriétés physico-chimiques de l'ADN qui sont, entre autres, sa flexibilité et sa charge globale négative. Deux grandes stratégies physico-chimiques sont développées, à savoir l'effet de confinement par des polymères neutres hydrosolubles, et la diminution des répulsions entre segments d'ADN (Schiessel et al., 2012). Cette deuxième stratégie peut

passer par l'introduction d'agents de compaction cationiques, avec augmentation de Z (polycations, nanoparticules cationiques) ou par l'introduction d'agents de compaction cationiques hydrophobes (tensioactifs) pour rapprocher les segments d'ADN de façon coopérative (González-Pérez, 2014).

Ceci a été mis en place *in vitro* sur le génome du bactériophage T4 [Figure 2.2] (Yoshikawa et al., 2013), et dans des cas plus pratiques à la photorégulation de la production de protéines en milieu « cell-free » (Venancio-Marques et al., 2012).

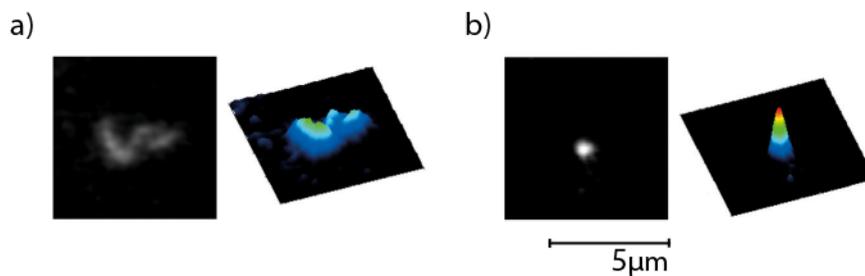


Figure 2.2 : Allure représentative d'une molécule d'ADN T4 étudiée par microscopie de fluorescence, avec en (a) une molécule relâchée et en (b) une molécule compacte (Yoshikawa et al., 2013). L'image de fluorescence, dont la barre d'échelle vaut 5  $\mu\text{m}$ , est donnée à gauche tandis qu'un profil de fluorescence 3D correspondant est présent à droite. [ADN] = 0,1  $\mu\text{M}$  en groupes phosphate, a) [Analogue de la spermine] = 0  $\mu\text{M}$  b) [Analogue de la spermine] = 5  $\mu\text{M}$ .

Un exemple de système lié à la structure de l'ADN est l'utilisation d'aptamères de la thrombine en amont du gène à exprimer. Une séquence aptamère de la thrombine est ainsi placée entre le gène codant pour une Green Fluorescent Protein (GFP) et le promoteur T7. En présence de thrombine, les aptamères prennent une structure de boucle en s'organisant autour de celle-ci [Figure 2.3]. Ce changement de structure empêche l'ARN polymérase de dérouler la double hélice et d'avancer sur l'ADN, inhibant ainsi l'expression du gène. Cette méthode permet une régulation concentration-dépendante de l'expression du gène en aval. Il est possible d'obtenir six niveaux d'expression différents (Iyer et Doktycz, 2013).

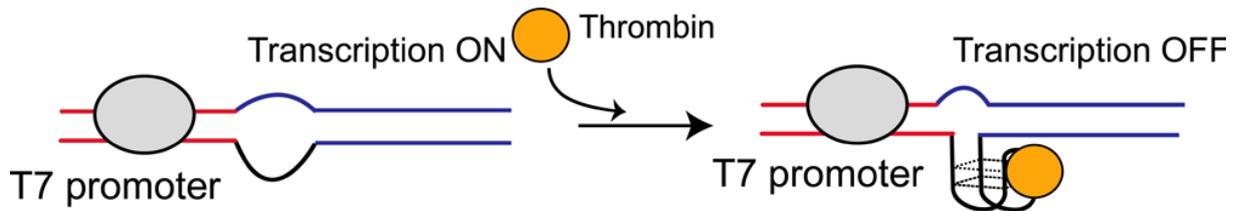


Figure 2.3 : Design de la séquence ADN afin de réguler la transcription par un aptamère de la thrombine. Un aptamère d'ADN simple brin de la thrombine est placé en aval du promoteur T7. Le support de transcription contient une région non-complémentaire d'ADN simple brin en face de la séquence de l'aptamère. En absence de thrombine, l'ARN polymérase transcrit le brin support. Lorsque la thrombine se lie à l'aptamère d'ADN, la transcription est réprimée. (Iyer and Doktycz, 2013)

### 1.2.2 Applications d'agents de compaction photosensibles en « Cell-free »

Comme souligné précédemment, il est souvent impossible d'implémenter un système synthétique *in vivo*. Ceci est particulièrement vrai lorsqu'il est question par exemple de compaction non spécifique de l'ADN, car cela affectera la viabilité cellulaire. L'utilisation de systèmes CFPS libère l'expérimentateur de la limitation liée à la viabilité cellulaire. De plus, les réactions lancées sont accessibles *in situ* permettant ainsi de réaliser des modifications en temps réel sur les réactions. Ces deux paramètres font des systèmes CFPS des candidats idéaux pour étudier les réseaux de régulation et le contrôle de l'expression génétique par des molécules non compatibles avec le vivant comme les surfactants photosensibles.

Il a ainsi été montré qu'en fixant deux polyamines photosensibles sur des sites spécifiques du promoteur T7, il est possible de contrôler l'expression du gène en aval de ce promoteur. Dans le cas présent, il s'agit de motifs azobenzène photoisomérisables, cette caractéristique leur permettant de changer de conformation sous l'influence d'une impulsion lumineuse. En fonction de la longueur d'onde utilisée, les molécules prendront soit une conformation *cis* ( $\lambda < 400$  nm) engendrant un encombrement stérique qui déstabilise le duplex d'ADN (Robertson, 1939), soit une conformation *trans* ( $\lambda = 450$  nm) permettant l'intercalation des molécules *trans* entre les paires de bases et ainsi de stabiliser la double hélice d'ADN (Asanuma et al., 1999). La déstabilisation permettra à la transcription d'avoir lieu alors que la stabilisation empêchera l'ARN polymérase d'initier la transcription [Figure 2.4] (Kamiya et al., 2015).

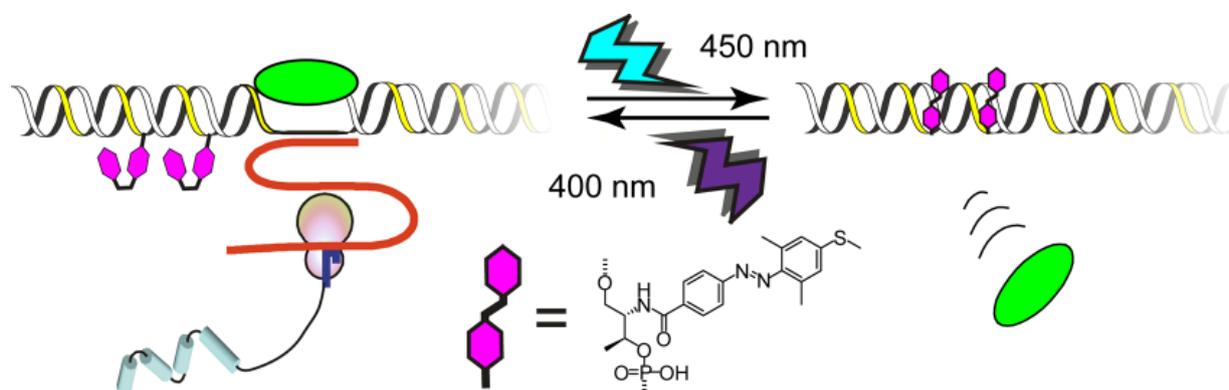


Figure 2.4 : Illustration de la photorégulation réversible de la transcription grâce à l'utilisation d'un promoteur modifié par deux azobenzènes. Dans ce système, les azobenzènes *trans* s'intercalent entre les paires de bases et stabilisent la double hélice. Dans leur conformation *cis* (molécule coudée), les molécules déstabilisent le duplex d'ADN (Kamiya et al., 2015).

Au laboratoire nous avons cherché à placer le contrôle de la transcription et de la traduction d'une protéine sous un photocontrôle efficace. En effet, les protéines recouvrent une large gamme de fonctions permettant d'agir sur leur environnement. Il est donc intéressant d'être en mesure de proposer des modes de régulation spatio-temporelle pour celles-ci. Habituellement, les modes de photocontrôle proposés impliquent l'introduction de biomolécules (ARN, ADN, Protéines...) modifiées chimiquement afin de pouvoir établir ce contrôle. Dans le cas présent, l'équipe a développé des molécules photosensibles dans le but de pouvoir contrôler la compaction de l'ADN par la lumière, sans avoir à introduire des modifications chimiques sur les éléments biologiques présents dans le système (Estévez-Torres et al., 2009).

La stratégie repose sur une compaction de l'ADN photo-régulée grâce à l'ajout dans le milieu d'expression reconstitué (CFRPS) de l'AzoTAB, un tensioactif cationique photosensible [Figure 2.5].

En effet, les propriétés de l'AzoTAB à l'échelle moléculaire, à savoir l'isomérisation *trans-cis* provoquée par une exposition UV et l'isomérisation inverse *cis-trans* due soit à une relaxation thermique, soit à une exposition à la lumière bleue, se traduisent par une modulation de la conformation de l'ADN [Figure 2.5].

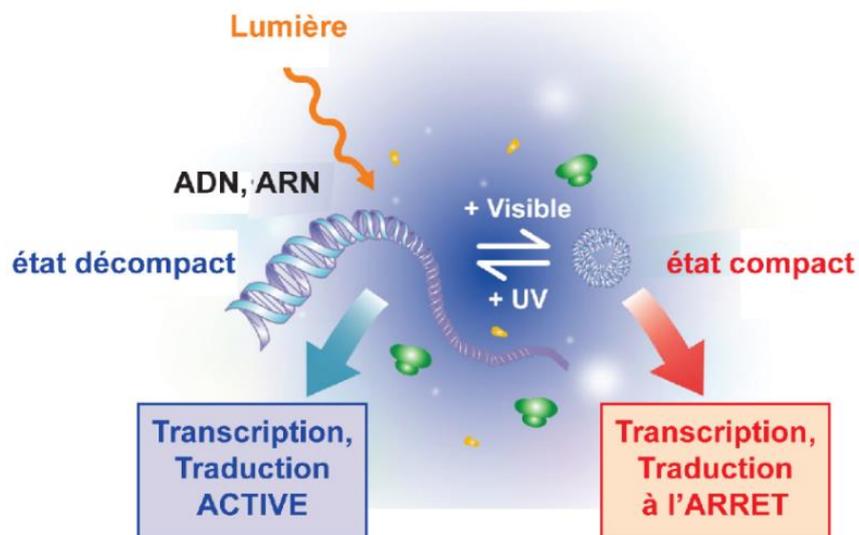


Figure 2.5 : Stratégie mise au point au sein de l'équipe, permettant le contrôle de l'expression génétique par la lumière et basée sur le photocontrôle de la compaction de l'ADN (Estévez-Torres et al., 2009). L'exposition du système à un stimulus lumineux permet de passer d'un état de compaction à l'autre. L'état décompact permet de réaliser les étapes de transcription et de traduction, alors que l'état compact de l'ADN ne le permet pas.

Dans sa conformation *trans*, l'AzoTAB induira la compaction de l'ADN dans le milieu d'expression rendant la séquence du gène d'intérêt présent sur le plasmide inaccessible à la machinerie de transcription. De cette façon, son expression est inhibée et la protéine codée par ce gène n'est donc pas produite. Dans sa conformation *cis*, l'AzoTAB n'entraînera pas de compaction de l'ADN, permettant ainsi à la machinerie de transcription d'accéder au promoteur T7 et de commencer à produire des ARNm correspondants à la protéine codée par le gène présent sur le plasmide [Figure 2.6].

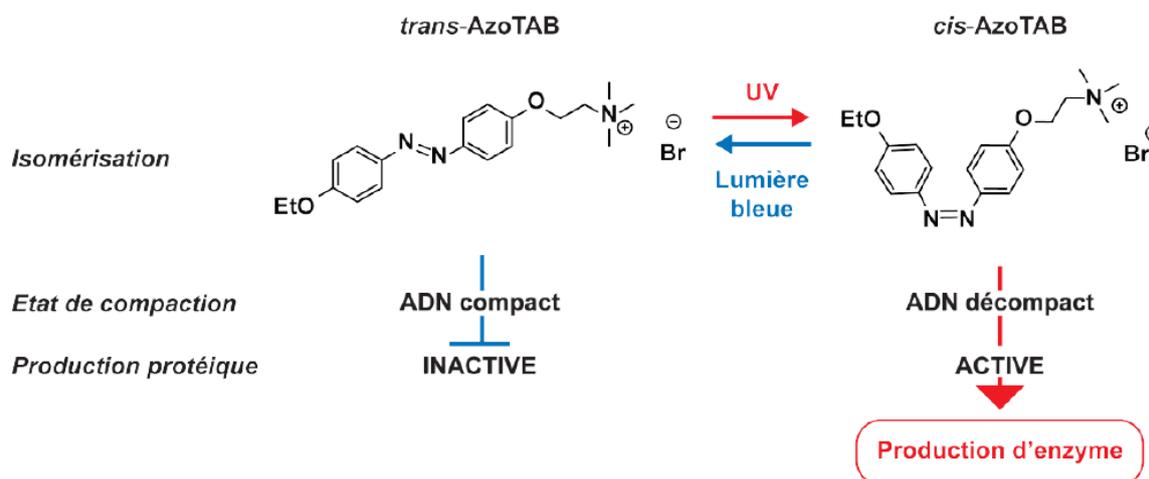


Figure 2.6 : Isomérisation de l'agent de compaction AzoTAB. Une solution composée majoritairement d'isomères *trans* interagit fortement avec les molécules d'ADN. L'ADN et l'ARN sont alors dans un état compact et les étapes de transcription-traduction n'ont pas lieu. L'isomère *cis* a une faible affinité pour l'ADN. Une solution riche en isomères *cis* permet ainsi aux molécules d'ADN d'être sous forme relâchée permettant ainsi aux machineries de production de protéines d'accéder à la séquence d'ADN.

Au laboratoire, il a été décidé de travailler sur la  $\beta$ -lactamase, une enzyme présente chez les bactéries résistantes aux antibiotiques de la catégorie des  $\beta$ -lactamines. L'idée initiale derrière le choix de cette enzyme était la possibilité d'utiliser la  $\beta$ -lactamase pour convertir des prodrogues non toxiques, tels que le Protax et/ou Prodox, en molécules anticancéreuses fortement cytotoxiques, respectivement le Taxol (Rodrigues et al., 1995) et la Doxorubicine.

Ce choix n'était pas anodin car nous travaillons avec un système CRFPS dérivé du PURE system<sup>®</sup> qui est issu d'*E. Coli*. Il y avait donc de très grandes probabilités pour que le système produise une enzyme fonctionnelle. De plus, l'utilisation de la  $\beta$ -lactamase permet d'utiliser un rapporteur chromogénique bien connu des biologistes pour détecter la présence et l'activité de cette catégorie d'enzymes [Figure 2.7] (Venancio-Marques et al., 2012).

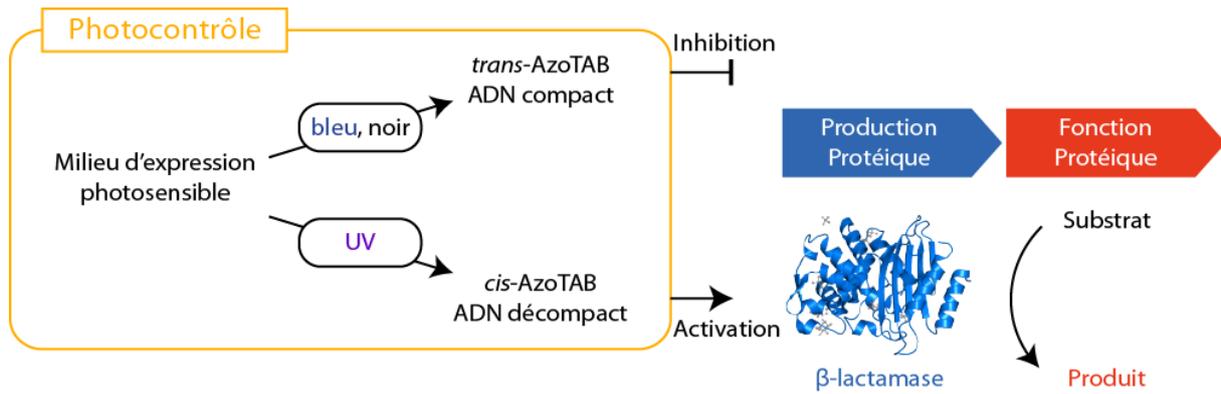


Figure 2.7 : L'assemblage du milieu d'expression photosensible avec un plasmide codant pour la  $\beta$ -lactamase permet de contrôler la production de celle-ci et ainsi de pouvoir déclencher la conversion de son substrat grâce à une source d'énergie lumineuse.

Il a ainsi pu être démontré au laboratoire dans un premier temps la possibilité de réguler l'activité du milieu d'expression et donc de la production de la protéine par l'exposition des échantillons à des lumières de différentes longueurs d'ondes. Grâce à la fonction protéique de la  $\beta$ -lactamase et à la nitrocéfine, l'activité de l'enzyme a pu être mise en évidence et étudiée en fonction de la concentration en AzoTAB, et des conditions d'éclairage. Il a pu être démontré qu'il était possible de mettre en place une photorégulation de la conversion du substrat de la  $\beta$ -lactamase. La flexibilité de la méthode permet un contrôle dynamique de l'expression de la protéine en se basant sur la réversibilité de l'isomérisation et l'état de compaction concomitant de l'ADN. Finalement, la précision spatiale du signal lumineux utilisé se traduit par une grande précision spatiale dans le déclenchement des réactions enzymatiques (Venancio-Marques et al., 2012).

## 2. Régulation par voie métabolique ou antibiotique de l'expression en « Cell-free »

Comme nous avons pu le voir précédemment, le contrôle de l'expression de protéine en système « cell-free » peut être intéressant pour divers développements et études. Néanmoins, la régulation génétique en système « cell-free » repose généralement sur l'utilisation de promoteurs et/ou de séquences présents sur les plasmides en amont du gène à exprimer. Dans le cadre de la thèse nous avons cherché à explorer une stratégie alternative se basant sur la régulation métabolique et l'utilisation d'un antibiotique au sein d'un système CFRPS afin de contrôler la production de protéines.

### 2.1 Utilisation du PURExpress®

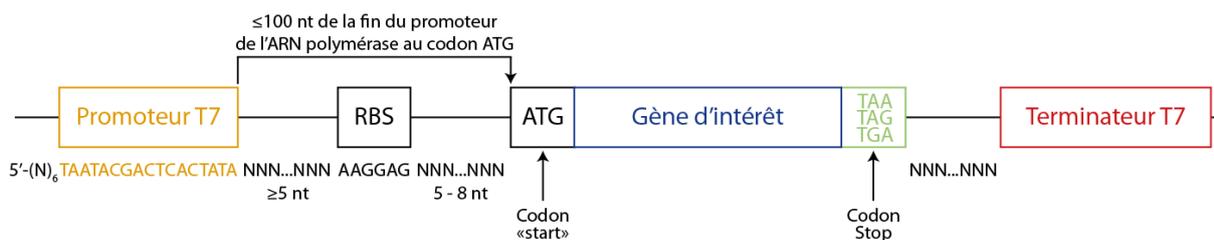
L'utilisation de systèmes CFRPS tel que le PURExpress® offre un accès à une grande reproductibilité entre les lots de matériel. En effet, à l'inverse du PURExpress®, les systèmes CFPS sont plus facilement disponibles et moins onéreux, mais constituent une boîte noire dans la mesure où leur contenu n'est pas clairement défini (Noireaux and Libchaber, 2004). Il peut y avoir en effet des variations dans la composition et les concentrations des composants des systèmes CFPS, ce qui peut nuire à la reproductibilité des résultats.

Pour les travaux de ma thèse, nous avons donc fait le choix d'utiliser un système standardisé, intégralement reconstitué à partir d'éléments purifiés pour la biosynthèse de protéines *in vitro*. Le choix s'est porté sur le PURExpress®, un système dérivé du « PURE system » (Protein synthesis Using Recombinant Elements)(Shimizu et al., 2001) que nous avons pu voir au chapitre 1.

Comme pour le « PURE system », le PURExpress® qui est commercialisé par *New England BioLabs (NEB)*, les éléments biologiques sont purifiés individuellement à partir d'*E. Coli*, puis le système minimal d'expression est reconstitué, pour inclure des facteurs de transcription, des enzymes telles que des synthétases, transformylases et polymérases, des ribosomes ainsi que les vingt acides aminés des ARN transférases, tous ces éléments étant présents dans des concentrations connues (tableau chapitre 1). De plus, les protéines de ce kit

sont étiquetées par une chaîne de six histidines, offrant ainsi la possibilité de purifier les protéines produites en retirant la machinerie de production.

Pour réaliser les études de régulation de l'expression, nous avons travaillé sur une construction standard permettant l'utilisation du PURExpress®. Afin d'obtenir une bonne compatibilité avec le système d'expression, nous avons construit la séquence du gène en suivant les recommandations du modèle donné par le fabricant [Figure 2.8]. Le PURExpress® se basant sur un système de transcription issu du Bactériophage T7, la séquence du gène est construite avec un promoteur T7 en début de séquence (TAATACGACTCACTATAG), suivi d'un site de fixation des ribosomes (GAAGGAGAT), et un codon d'initiation de démarrage (ATG). La séquence du gène d'intérêt peut alors être introduite, puis terminée par un codon stop (TAA) et une séquence terminatrice du T7 (TAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG). Cette séquence peut ensuite être insérée dans un plasmide ou être utilisée en tant que telle après une amplification par PCR.



Termineur T7: 5'-TAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG-3'

Figure 2.8 : Plan de construction d'une séquence d'expression compatible avec les ARN polymérases T7, permettant d'utiliser le système CFRPS PURExpress® pour la production *in vitro* d'une protéine d'intérêt.

## 2.2 Etude de la régulation de l'expression par le métabolisme

J'ai exploré dans un premier temps les effets de l'adjonction de métabolites énergétiques sur le rendement de production de protéine. Cette régulation est caractérisée à l'aide de protéines fluorescentes, facilement détectables. Avec le même suivi de fluorescence, nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence d'une enzyme phosphorylante, la MAPK Erk1/2.

### 2.1.1 Influence de l'ATP et du GTP sur la production de eGFP

L'ATP ou Adénosine-5'-Triphosphate est la molécule qui fournit par hydrolyse l'énergie nécessaire aux différentes réactions chimiques du métabolisme des différents organismes vivants connus. Elle est entre autre impliquée dans la transcription comme nucléotide et dans la traduction, pour la formation de la liaison aminoacyl-ARNt.

Le GTP ou Guanosine-5'-Triphosphate est un nucléoside triphosphate appartenant aux purines. Par hydrolyse d'une liaison phosphodiester, le GTP peut fournir l'énergie nécessaire à différentes réactions chimiques du métabolisme des différents organismes vivants connus. Le GTP est impliqué dans la réplication et la transcription de l'ADN (en tant que nucléotide), ainsi que dans la traduction, où il est engagé dans la phase d'élongation, puisque le GTP permet la reconnaissance entre le site A du ribosome et un Aminoacyl-ARNt (cf. chapitre 1). De plus, il sert de source d'énergie pour la translocation du ribosome vers la partie 3' de l'ARNm.

Nous avons utilisé la enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) comme protéine rapporteur du rendement d'activité du milieu d'expression, que ce soit dans le cadre des expériences sur l'influence des métabolites sur la production de protéines en milieux « cell-free », dans le cas simple d'une supplémentation du milieu ou suite à un blocage/déblocage. Pour l'expression, je me base toujours sur la construction type vu précédemment [Figure 2.8].

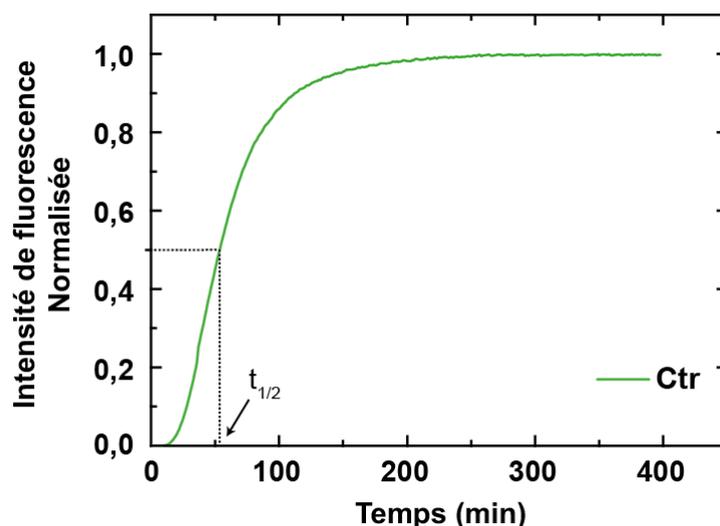
Les échantillons de 25  $\mu\text{L}$  sont assemblés sur glace en ajoutant dans l'ordre indiqué les composants suivants [Tableau 2.1].

	+ ADN	+ ATP	+ GTP	+ ATP + GTP
A	10	10	10	10
ADN	2	2	2	2
ATP		2		2
GTP			2	2
Eau	6	4	4	2
B	7	7	7	7
Total	25	25	25	25

Tableau 2.1 : Mélanges permettant de tester l'influence des métabolites énergétiques sur la production d'une protéine fluorescente. Les volumes indiqués (cases bleues) sont en microlitre. Les solutions A et B sont respectivement à 2X et 5X. La solution d'ADN est à  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , les solutions d'ATP et de GTP sont à 20 mM. La solution d'eau ne contient pas d'ARNases.

Les échantillons sont placés dans des puits de microplaque 384 puits et recouverts par 25  $\mu\text{L}$  d'huile minérale (Sigma) afin d'éviter l'évaporation qui est due à l'incubation à 37 °C. Lorsque l'on souhaite obtenir plusieurs échantillons de la même composition, on assemble un plus grand volume, puis on forme des parties aliquotes de 25  $\mu\text{L}$ .

Un suivi de l'évolution de la production d'une protéine fluorescente en PURExpress® prendra typiquement la forme d'une courbe sigmoïdale croissante au cours du temps, avec un plateau d'intensité de fluorescence atteint au temps de fin d'expérience correspondant à la fin de la production de la protéine [Figure 2.9]. En réalité, nous verrons que la fin de la production se produit avant l'arrivée du plateau et correspond à la maturation des dernières protéines produites.



---

Figure 2.9 : Courbe d'évolution de fluorescence au cours de l'expression protéique en PURExpress®. [ADN]= 8  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , incubation à 37 °C.

La Figure 2.10 montre que l'expression de l'eGFP se trouve affectée dans un milieu d'expression supplémenté en ATP et/ou GTP. En effet, on peut observer une fluorescence absolue très fortement diminuée en comparaison avec l'expérience contrôle (échantillon standard sans ATP et/ou GTP). La diminution est encore plus forte si les deux substrats énergétiques sont ajoutés ensemble.

On peut observer sur la Figure 2.11 que dans le cas où l'addition d'ATP et/ou de GTP est/sont réalisé(s) une fois le plateau de fin d'expression atteint, ceux-ci ne démontrent aucun effet notable sur la fluorescence. Ce résultat est en soi tout à fait normal si le système comporte une quantité d'énergie suffisante ou plus importante permettant l'utilisation complète des AA afin de produire des protéines.

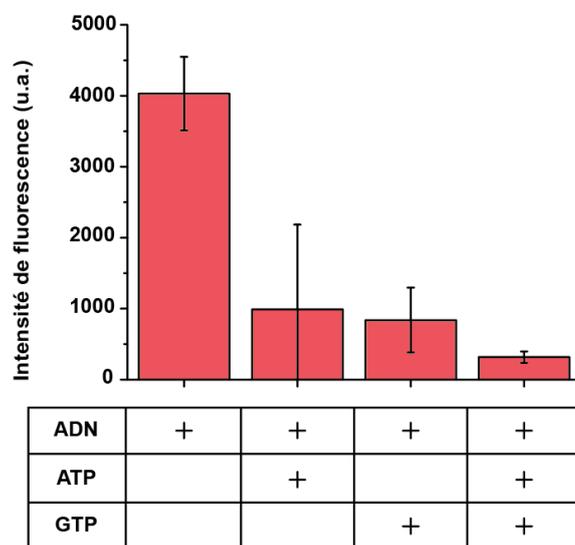


Figure 2.10 : Intensité de fluorescence en fin d'expression en fonction de la composition initiale (Tableau 2.1) du système d'expression. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard établie sur deux expériences. Concentrations finales [ADN]= 8 ng.μL<sup>-1</sup>, [ATP]= 1,6 mM,[GTP]= 1,6 mM, incubation à 37 °C.

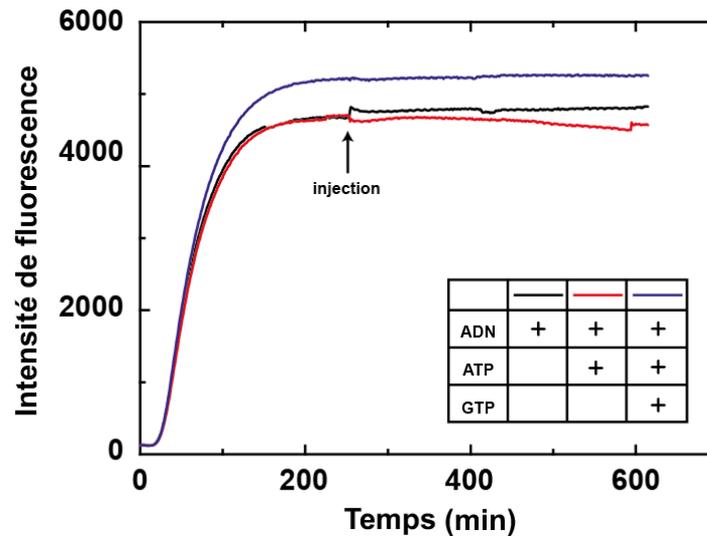


Figure 2.11 : Graphique présentant la variation d'intensité de fluorescence lors d'une expression de protéine fluorescente avec ajout de substrats énergétiques en fin d'expression. Concentrations finales [ADN]= 8 ng.μL<sup>-1</sup>, [ATP]= 1,6 mM, [GTP]= 1,6 mM, incubation à 37 °C.

Beaucoup plus étonnant, l'ATP ou le GTP pris séparément ou ensemble, ne restaurent pas l'expression suite à un déblocage intervenant tardivement (résultats non présentés). Or dans ce cas la traduction étant bloquée, il devrait rester des AA disponibles pour reprendre la traduction lors du déblocage. L'inhibition et le déblocage de l'expression seront abordés à la section 0.

Le milieu ne manque donc ni d'ATP, ni de GTP, au contraire il semblerait qu'un excès d'ATP ou de GTP aient des effets défavorables sur la production de protéines.

### 2.1.2 Influence de la MAPK sur l'expression de l'eGFP

Dans le cadre d'expériences sur la reconstitution et la régulation de la fonction de protéines membranaires dans des liposomes, que nous verrons dans la deuxième partie de la thèse, j'ai utilisé une MAPK afin de phosphoryler la protéine membranaire reconstituée.

La MAPK utilisée, aussi connue sous le nom de Erk 2 (Extracellular signal-regulated kinase 2) est une des deux isoformes de la famille des MAPK. Il s'agit d'une protéine kinase à Sérine/thréonine, qui participe chez les mammifères à la transduction du signal due aux hormones, aux facteurs de croissance et de différenciations, vers des réseaux de contrôle intracellulaire.

Les échantillons de 25  $\mu\text{L}$  sont assemblés sur glace en ajoutant dans l'ordre les éléments détaillés dans le Tableau 2.2.

	+ ADN	+ MAPK/ ATP	+ MAPK/ GTP	+ MAPK/ ATP/GTP
A	10	10	10	10
ADN	2	2	2	2
ATP		2		2
GTP			2	2
MAPK		2	2	2
Eau	6	2	2	
B	7	7	7	7
Total	25	25	25	25

Tableau 2.2 : Mélanges permettant de tester l'influence de la MAPK et des métabolites énergétiques sur la production d'une protéine fluorescente. Les volumes indiqués (cases bleues) sont en microlitre. Les solutions A et B sont respectivement à 2X et 5X. La solution d'ADN est à  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , la solution d'ATP et de GTP sont à 20 mM, la solution contenant la MAPK est à  $1 \text{ unité} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ .

C'est durant les expériences sur l'influence de la MAPK que j'ai pu constater une augmentation de la fluorescence finale [Figure 2.12]. En effet, si l'on supplémente le milieu d'expression avec de la MAPK Erk2 et de l'ATP, la fluorescence finale se trouve être supérieure à l'expérience contrôle. Ce résultat était assez inattendu car l'ajout seul de l'ATP diminue l'expression finale. De plus, la consommation d'ATP par la MAPK produit de l'ADP et du phosphate inorganique, ce dernier étant un inhibiteur de l'expression lorsque sa concentration augmente (Caschera et Noireaux, 2015). L'ajout de GTP en présence de MAPK diminue notablement la fluorescence finale. Celle-ci est d'autant plus diminuée, même en présence de MAPK, si on couple l'ajout de GTP à celui de l'ATP [Figure 2.12].

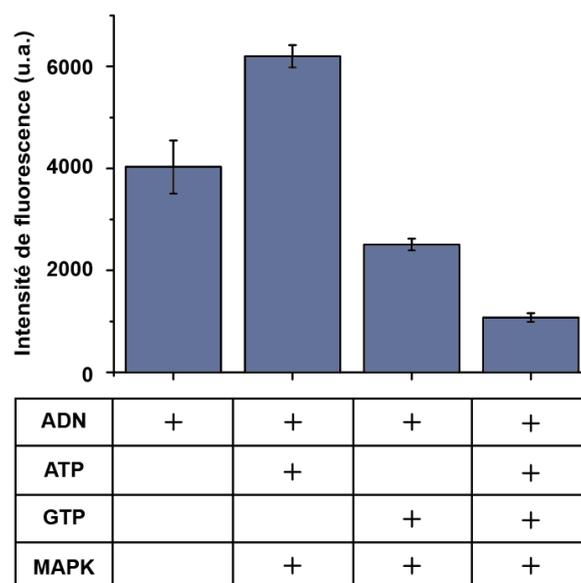


Figure 2.12 : Effet de la MAPK sur l'intensité de fluorescence en fin d'expression en fonction de la composition initiale (Tableau 2.2) du milieu d'expression. Concentrations finales  $[ADN]= 8 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $[ATP]= 1,6 \text{ mM}$ ,  $[GTP]= 1,6 \text{ mM}$ ,  $[MAPK]= 2 \text{ unités} \cdot 25\mu\text{L}^{-1}$ , incubation à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

La supplémentation du milieu d'expression par des substrats énergétiques seuls a au contraire de toute attente un effet négatif sur celui-ci. La présence d'ATP et de MAPK Erk2 semble améliorer le rendement d'expression du système.

### 2.3 Régulation de l'expression par un antibiotique

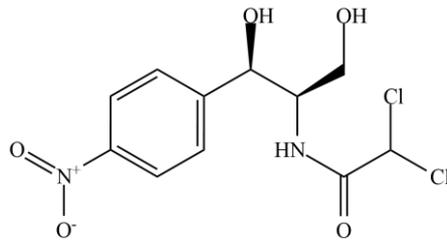
Dans le cadre des recherches sur le contrôle de l'expression de protéines, nous avons développé une technique permettant un contrôle réversible de la production de protéine. Contrairement à d'autres systèmes de régulation, comme les promoteurs présentés précédemment, nous avons cherché à programmer la synthèse protéique en contrôlant le bon déroulement de la traduction. Notre stratégie repose sur la mise en place d'une inhibition robuste de la traduction. La molécule utilisée induira un verrouillage complet de la production de protéine, ne permettant ainsi aucun phénomène de fuite, comme ceux pouvant être observés dans le cas des promoteurs (Hadeler, 2013).

Dans un premier temps nous avons cherché à caractériser l'efficacité de la molécule antibiotique sur la production d'une protéine fluorescente. Dans un second temps, nous avons développé un système enzyme-substrat injectable, permettant un recouvrement partiel de

l'inhibition. Enfin, nous avons étudié ce recouvrement partiel afin de mieux en appréhender les causes.

### 2.3.1 Inhibition de l'expression protéique

Cette inhibition de l'expression s'appuie sur une molécule bien décrite et connue depuis le siècle précédent, le chloramphénicol [Figure 2.13]. Cette molécule isolée pour la première fois à partir de *Streptomyces venezuelae*, par David Gottlieb (Gottlieb et al., 1948), fut le prototype de l'antibiotique à large spectre. Aussi connu sous son nom commercial Chlornitromycin®, il s'agit d'un antibiotique bactériostatique de la famille des phénicolés, qui est efficace contre un large ensemble de bactéries Gram-positives et Gram-négatives, et entre autre contre *E. Coli*.



---

Figure 2.13 : Le chloramphénicol sous sa forme active, extrait de *Streptomyces venezuelae* en 1948 par David Gottlieb

L'utilisation du Chloramphénicol comme inhibiteur de la synthèse de protéines est rendu possible du fait de l'utilisation d'un système CFRPS issu d'*E. Coli* sur lequel l'antibiotique bloque cette production (Wolfe and Hahn, 1965).

Le Chloramphénicol agit sur la formation de la liaison peptidique lors de la traduction de l'ARNm. Il se lie spécifiquement aux résidus Alanine 2451 et 2452 (Schifano et al., 2013) du centre peptidyltransférase de l'ARNr 23S de la sous-unité 50S du ribosome [Figure 2.14] (Gale et al., 1981).

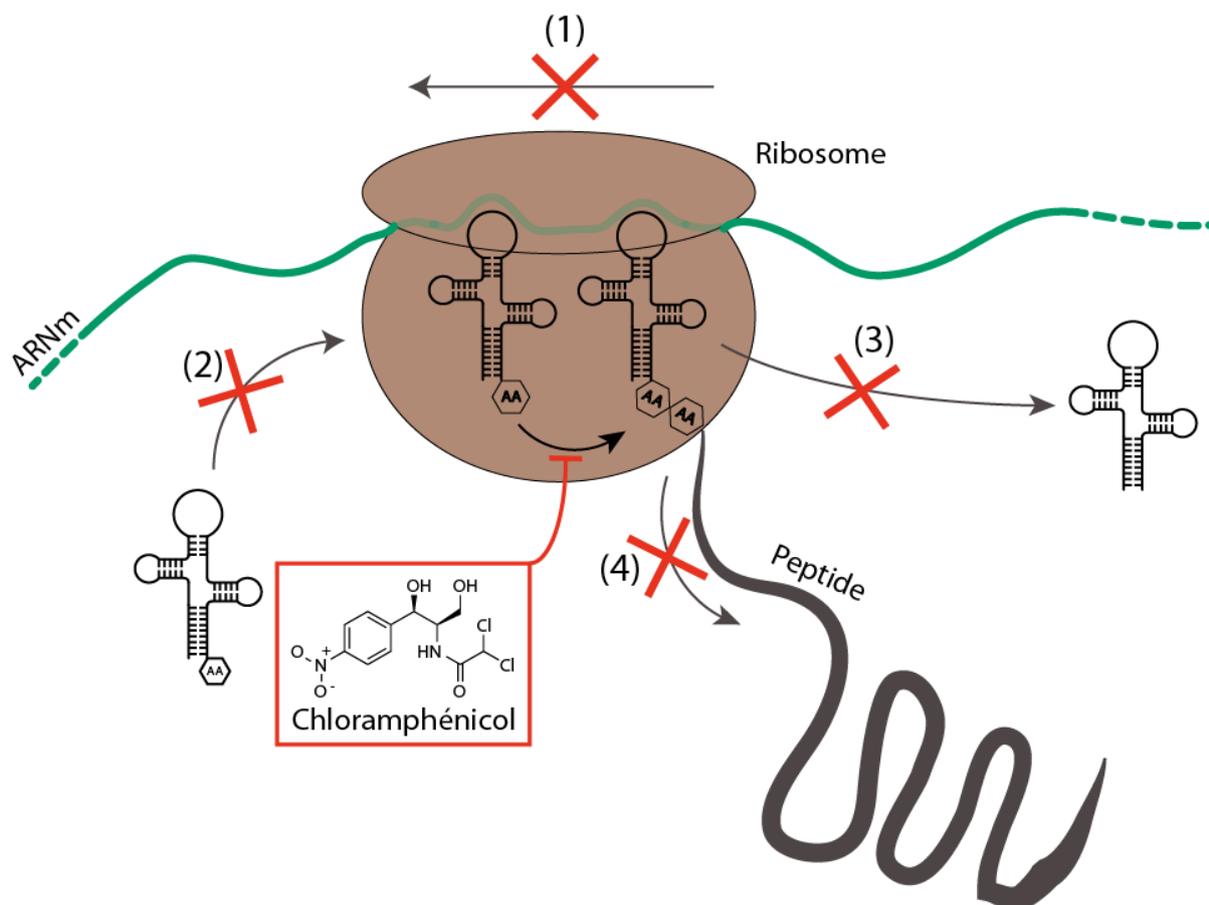


Figure 2.14 : Fixation du chloramphénicol sur la sous-unité 50S du ribosome. Le Chloramphénicol empêche la formation de la liaison peptidique, ce qui engendre un blocage du système de traduction : (1) Le ribosome ne se déplace plus sur l'ARNm, (2) Le site A étant occupé, l'ARNt-aminoacylé ne peut se lier à l'ARNm, (3) L'ARNt « porteur » du peptide ne peut pas le transférer car la peptidyl transférase est inhibé, il se retrouve donc bloqué et enfin (4) l'élongation du peptide est bloquée.

Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser l'efficacité de la molécule antibiotique sur la production d'une protéine fluorescente (YFP, Yellow Fluorescent Protein) à partir d'un plasmide ADN contenant le gène codant pour la YFP. L'expression génétique est assurée par des kits de PURExpress® (*In vitro* Protein Synthesis Kit, NEB) utilisés en tandem avec le plasmide ADN adapté. La caractérisation de la production protéique nécessite de faire appel à un outil classique de biochimie, le lecteur de microplaque (Biotek). Le signal de fluorescence de la YFP et de ses variantes donne en effet accès à la concentration de la protéine dans le milieu pour suivre son niveau d'expression.

Nous avons vérifié sur quelle gamme de concentration d'antibiotique nous pouvions observer un effet sur la production de protéines. Pour réaliser cela, nous sommes partis d'une solution 1X (2040 ng.μL<sup>-1</sup>) d'antibiotique et nous avons étudié l'effet de l'ajout de celui-ci à différentes dilutions. Nous avons fait varier cette concentration de 1X à 1/500X.

On peut observer sur la Figure 2.15 l'évolution de l'intensité de la fluorescence au cours du temps en fonction de la quantité initiale de chloramphénicol. Tout d'abord, on peut constater qu'il y a une grande variabilité sur le triplicat de cette expérience, notamment pour l'expérience contrôle et pour l'expérience avec une dilution au centième. Les autres résultats présentent une variabilité beaucoup plus réduite. Dans le cas des courbes d'expression avec 1X et 1/5 d'antibiotique, il n'y pas de variation de cette intensité. Pour les dilutions suivantes, les intensités de fluorescences augmentent avec le temps, celles-ci augmentent d'autant plus que la concentration d'antibiotique de départ est faible. Les courbes tendent donc à se rapprocher de la courbe de l'expérience contrôle.

Nous pouvons ainsi constater que pour 1X et 1/5 d'antibiotiques, l'expression est complètement bloquée alors que l'expression n'est que partiellement bloquée pour les dilutions [Figure 2.15]. Néanmoins, nous avons pu constater que les niveaux finaux de fluorescence n'atteignaient jamais celui de l'échantillon contrôle, même après un temps d'incubation très long. Il semblerait donc que le système arrive à un état final différent lorsqu'il est en présence d'antibiotique. Ce constat et les résultats d'autres expériences seront discutés dans la partie suivante qui porte notamment sur l'inhibition réversible de l'expression.

D'après les résultats, nous utiliserons donc par la suite une concentration d'antibiotique égale au 1/5, soit  $0,4\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ .

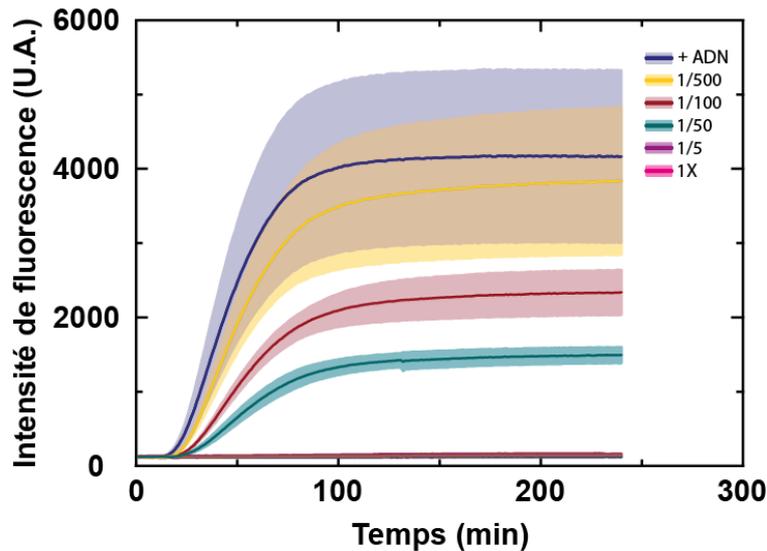


Figure 2.15 : Effet de la concentration en antibiotique présent au lancement de l'expression sur la production de protéines fluorescentes (YFP). Les tracés du graphique représentent les moyennes de triplicats avec une enveloppe ayant pour largeur la déviation standard.  $[ADN_{finale}] = 8 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $[ChlO_{initiale}] = 2040 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , incubation à  $37^\circ\text{C}$ .

### Protocole 1

Des échantillons de  $25 \mu\text{L}$  sont préparés en assemblant  $7 \mu\text{L}$  d'une eau sans ARNase (Sigma),  $10 \mu\text{L}$  d'une solution A,  $1 \mu\text{L}$  d'ADN à  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  et finalement  $7 \mu\text{L}$  d'une solution B. Les solutions A et B proviennent du kit commercial PURExpress®. Les échantillons sont placés dans des puits de microplaque 384 puits et recouvert par  $25 \mu\text{L}$  d'huile minérale (Sigma) afin d'éviter l'évaporation des échantillons pendant l'incubation à  $37^\circ\text{C}$ . Afin d'arrêter la traduction,  $2 \mu\text{L}$  à  $408 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  de Chloramphénicol sont ajoutés au cours de l'incubation.

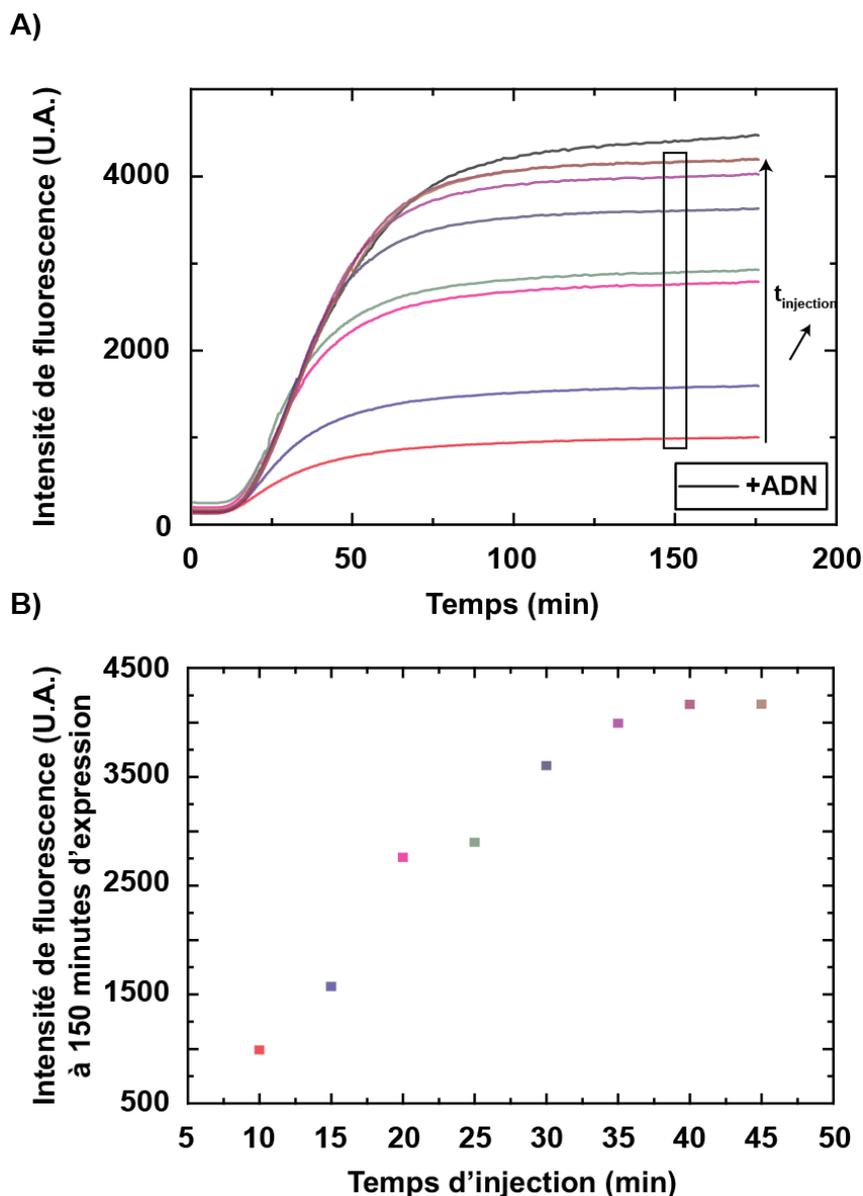


Figure 2.16 : Effet du chloramphénicol sur l'expression en fonction du temps d'injection. (A) Variation de l'intensité de fluorescence en fonction du temps pour des échantillons dans lesquels sont ajoutés du chloramphénicol à des temps d'injection ( $t_{\text{injection}}$ ) allant de 5 minutes (courbe rouge) à 45 minutes (courbe marron). + ADN correspond à l'échantillon référence. (B) Intensité de fluorescence à 150 minutes d'incubation pour des temps d'injection d'antibiotique allant de 5 à 45 minutes. L'intervalle entre chaque injection est de 5 minutes.  $[\text{ADN}_{\text{finale}}] = 8 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $[\text{Chlo}_{\text{finale}}] = 33 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , incubation à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Les courbes d'évolution de l'intensité de la fluorescence de la Figure 2.16 A présentent bien le tracé caractéristique des courbes vues précédemment : les courbes suivent le même tracé, superposées les unes sur les autres, et se séparent suite à l'ajout de l'antibiotique pour évoluer vers un plateau d'intensité de fluorescence différent en fonction du temps d'ajout de la molécule inhibitrice. Lors de l'ajout du chloramphénicol, nous pouvons

constater que l'augmentation de la fluorescence s'arrête après un certain délai. Plus l'antibiotique est ajouté tardivement, plus le plateau de fluorescence se rapproche de celui obtenu avec l'expérience contrôle ne contenant pas de chloramphénicol [Figure 2.16 A courbe +ADN]. Cette caractéristique concorde avec le phénomène de plateau que l'on peut observer sur la Figure 2.16 B. Le niveau de fluorescence étant lié à la quantité de protéines présentes. Nous pouvons donc contrôler la quantité de protéines produites en fonction du temps d'introduction de la molécule inhibitrice.

### 2.3.2 Un mode d'inhibition réversible

Le contrôle réversible s'appuie sur deux propriétés du chloramphénicol : la première est liée à l'interaction réversible qu'il entretient avec le ribosome (Wolfe and Hahn, 1965), et la deuxième est liée aux mécanismes de résistance que les bactéries ont développés pour contrer les antibiotiques. Parmi l'ensemble des différents systèmes mis en place par les bactéries, tels que la diminution de la perméabilité membranaire au chloramphénicol, les mutations de la sous-unité 50S, et la production de la chloramphénicol acétyltransférase (CAT) modifiant le chloramphénicol, seul le dernier système nous intéresse dans le contexte présent (Leslie, 1990).

La CAT catalyse l'addition d'un groupement acétyle sur le groupement hydroxyle du carbone C-3, à partir de l'acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA) [Figure 2.17], pour former le 3-acétyl chloramphénicol.

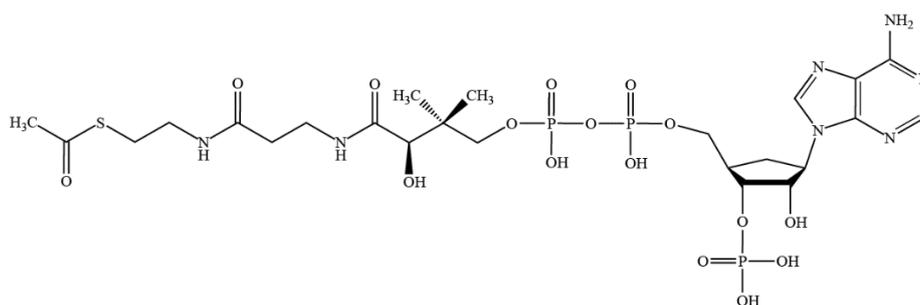


Figure 2.17 : Formule chimique de l'Acétyl-Coenzyme A

Dans un second temps, le 3-acétyl chloramphénicol subit une réaction non-enzymatique pour former, par réarrangement, le 1-acétyl chloramphénicol, celui-ci peut être acétylé une seconde fois pour former le 1,3-acétyl-chloramphénicol [Figure 2.18]. La seconde acétylation est beaucoup plus lente que la première mais n'est pas nécessaire pour inactiver

l'antibiotique, puisque la molécule mono-acétylée est déjà dépourvue d'activité antibiotique (Lovering et al., 1986) [Figure 2.18].

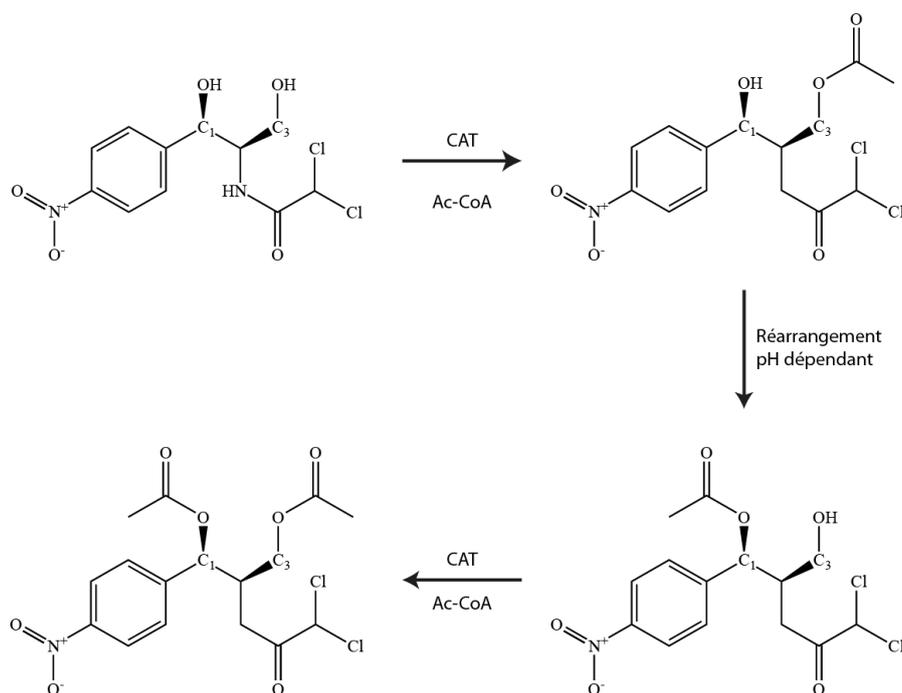


Figure 2.18 : Modifications chimiques du Chloramphénicol par la chloramphénicol acétyltransférase (CAT) et de son substrat l'acétyl-Coenzyme A (Ac-CoA).

### Protocole 2

Les échantillons sont préparés comme précisé dans le point précédent. Néanmoins, afin de reprendre la production de protéines, 1  $\mu\text{L}$  de CAT à 2,5 unités. $\mu\text{L}^{-1}$  et 1,6  $\mu\text{L}$  d'acétyl-CoA à 6,2 mM sont ajoutés au cours de l'incubation.

Les échantillons sont placés dans des puits de microplaque 380 puits et recouverts par 25  $\mu\text{L}$  d'huile minérale (Sigma) afin d'éviter leur évaporation pendant l'incubation à 37 °C.

Lorsque l'on souhaite obtenir plusieurs échantillons de la même composition, on assemble un plus grand volume, puis on forme des parties aliquotes de 25  $\mu\text{L}$ . La CAT se trouve à une concentration finale de 2,5 unités. $25\mu\text{L}^{-1}$  dans le milieu d'expression, or une unité d'enzyme modifie 1 nmol de chloramphénicol.acétyle-CoA.minute<sup>-1</sup>. Sachant que la quantité finale de chloramphénicol dans le système d'expression est de 2,52 nmol, on peut estimer qu'il faudra à l'enzyme environ 3 minutes pour désactiver toutes les molécules d'antibiotique.

La Figure 2.19 montre qu'en ajoutant au système l'enzyme modifiant le chloramphénicol (+CAT) lors du blocage de l'expression (+Chlo), l'intensité de fluorescence augmente au cours du temps en suivant le profil caractéristique de la production de protéine vu à la Figure 2.9. Ce résultat démontre que le Chloramphénicol a donc bien été modifié par la CAT et qu'il a donc perdu son action inhibitrice.

Nous montrons ainsi que l'action inhibitrice de l'antibiotique est réversible et que la réaction de production de protéine peut être relancée par addition d'Acétyl-CoA et de CAT. Néanmoins, comme le montrent les graphiques [Figure 2.19 et Figure 2.20], les niveaux de fluorescence atteints après le déblocage du système sont différents de l'expérience contrôle. Notamment, on peut constater sur la Figure 2.20, que plus l'injection est éloignée du début d'incubation, plus la fluorescence finale est faible.

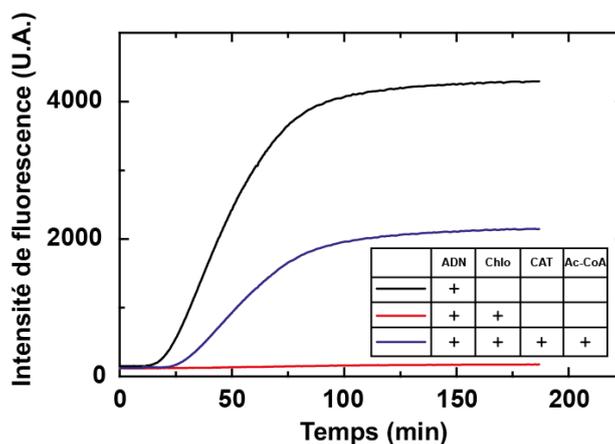


Figure 2.19 : Démonstration de la réversibilité partielle de l'inhibition par l'addition de la CAT et de l'Acétyl-CoA. Sur ce graphique, on peut suivre l'expression de la protéine dans deux échantillons contrôles (courbe noire et courbe rouge), ainsi qu'un échantillon débloqué, contenant la CAT et son substrat (courbe bleue).  $[ADN_{finale}] = 8 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $[Chlo_{finale}] = 33 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $[CAT_{finale}] = 0,1 \text{ unité} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $[Ac-CoA_{finale}] = 0,4 \text{ mM}$ , incubation à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

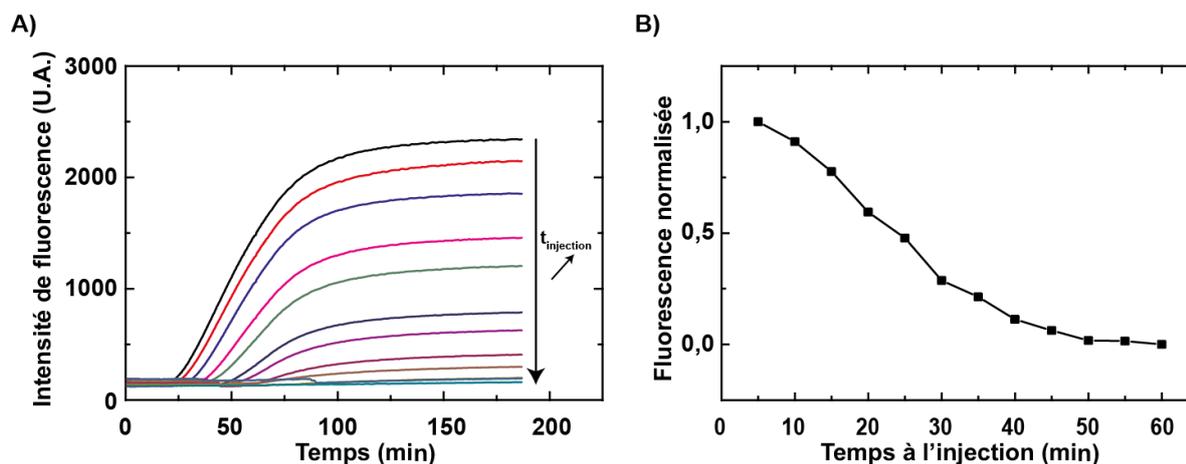


Figure 2.20 : Graphiques présentant l'évolution de la fluorescence au cours du temps en fonction du temps auquel la CAT et son substrat ont été ajoutés ( $t_{\text{injection}}$  augmente dans le sens de la flèche). (A) Graphique de la dynamique d'évolution. (B) Intensité de fluorescence normalisée sur la fluorescence maximale atteinte au plateau pour différents temps d'injection.  $[\text{ADN}_{\text{finale}}] = 8 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $[\text{Chlo}_{\text{finale}}] = 33 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $[\text{CAT}_{\text{finale}}] = 0,1 \text{ unité} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $[\text{Ac-CoA}_{\text{finale}}] = 0,4 \text{ mM}$ , incubation à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Comme nous avons pu le constater précédemment, l'évolution de la fluorescence est stoppée lors de l'ajout de l'antibiotique. Suite à l'ajout de l'enzyme et de son substrat, on peut observer une relance du système de production. Les niveaux de fluorescence étant plus faibles dans le cas de l'utilisation de l'antibiotique, on peut conclure que cette méthode offre un contrôle réversible, mais a néanmoins pour effet de diminuer le rendement global de production de protéines.

Dans le but de mieux comprendre ce phénomène, j'ai réalisé une série d'expériences permettant d'éliminer les acteurs de cette diminution de rendement. Dans un premier temps, j'ai vérifié que les ajouts de CAT, d'Ac-CoA ou de traces de chloramphénicol n'étaient pas responsables de cet effet (Tableau 2.3).

	Ctr +	Ctr -	E	(E+S) 1	(E+S) 2	(E+S) 3	(E+S) 4
A	10	10	10	10	10	10	10
ADN	1	1	1	1	1	1	1
Chlo	0	2	2	2	2	2	2
CAT	0	0	1	1	1	2	2
Ac-CoA	0	0	0	0,5	1,6	2	3
Eau	7	5	4	3,5	2,4	1	0
B	7	7	7	7	7	7	7
Totale	25	25	25	25	25	25	25

Tableau 2.3 : Mélanges permettant de tester l'influence de la CAT et de l'Ac-CoA sur l'expression de la YFP. Les solutions A et B sont respectivement à 2X et 5X. La solution d'ADN est à  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , la solution de CAT est à  $2,5 \text{ unités} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  tandis que la solution d'Ac-CoA est à  $5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . La solution d'eau ne contient pas d'ARNases.

En faisant varier les concentrations de CAT et de son substrat lors d'expériences de déblocage à  $t = 0$  minutes, on peut observer que les niveaux de fluorescence finaux présentés sur l'histogramme de la Figure 2.21, sont sensiblement identiques à l'expérience contrôle excepté dans deux configurations, lorsqu'il n'y a pas d'enzyme et/ou son substrat pour lever l'inhibition.

Les résultats nous font donc constater que ni le chloramphénicol, ni la CAT ou son substrat ne sont responsables de cette diminution, car les résultats obtenus sont comparables à celui de l'expérience contrôle, sauf pour les deux configurations où les résultats négatifs attendus sont bien présents.

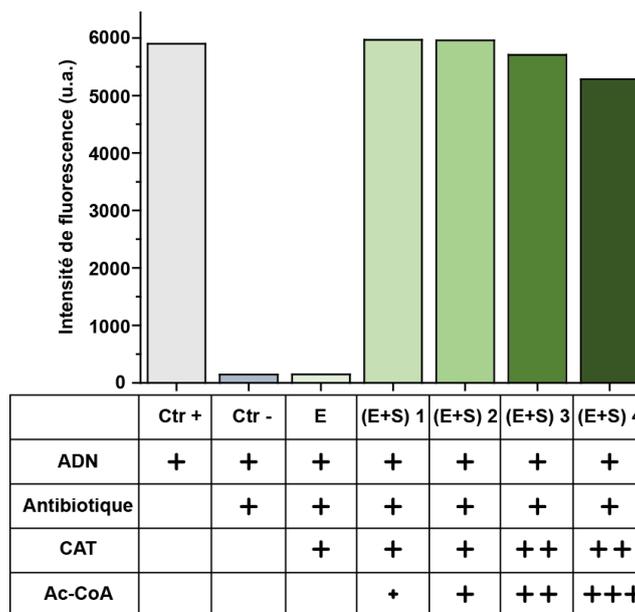


Figure 2.21 : Graphique présentant la fluorescence finale de la YFP en fonction du mélange initial. Les mélanges correspondants sont indiqués dans le Tableau 2.3 ci-dessus.  $[ADN_{finale}] = 8 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $[Chlo_{finale}] = 33 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $[CAT_{initiale}] = 2,5 \text{ unité} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $[Ac-CoA] = 6,2 \text{ mM}$ , incubation à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Dans un second temps, j'ai quantifier le vieillissement du système d'expression en ajoutant l'ADN codant pour la protéine fluorescente à différents temps suivant la mise en incubation à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

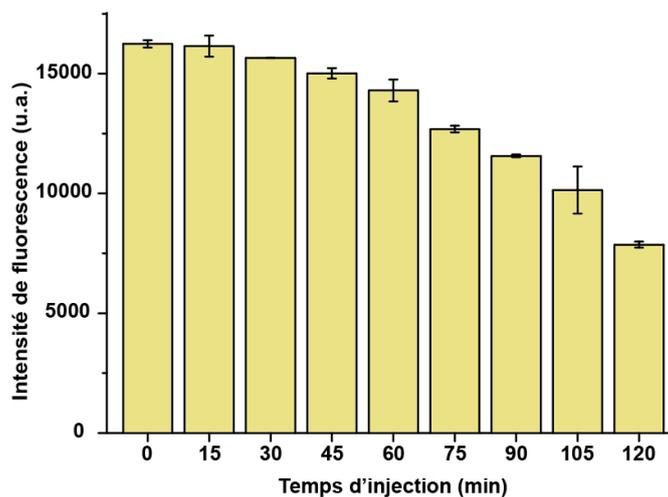


Figure 2.22 : Graphique présentant l'intensité de fluorescence finale de la YFP lorsque l'ajout d'ADN est différé pendant l'incubation à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . L'ajout de l'ADN codant pour la YFP ( $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) est différent par rapport au temps  $t = 0$  minute temps auquel le milieu est mis à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .  $[ADN_{finale}] = 8 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , incubation à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Les niveaux de fluorescence restent équivalents jusqu'à l'ajout d'ADN à 60 minutes, inclus après le début d'incubation. Ensuite les niveaux de fluorescence diminuent de manière significative jusqu'à 50% de la valeur pouvant être obtenue pour l'injection d'ADN à  $t = 0$  minutes [Figure 2.22]. J'ai pu ainsi constater que sur les échelles de temps sur lesquelles j'ai travaillé, le système ne subissait pas de vieillissement permettant d'expliquer les niveaux de fluorescences obtenus après une levée d'inhibition.

Les niveaux de fluorescence obtenus après la reprise de l'expression ne sont pas dus à la présence résiduelle d'antibiotique, à l'ajout de l'enzyme et/ou de son substrat. De plus, le vieillissement du système lors de l'incubation à 37 °C sur nos gammes de temps n'est pas significatif, il faut donc envisager une autre piste. L'antibiotique a pour caractéristique de stopper la traduction. Néanmoins, comme nous avons pu le voir au premier chapitre, l'expression des protéines passe par deux étapes majeures qui sont la traduction et la transcription. Lors du blocage par l'antibiotique, il reste donc une étape qui n'est pas bloquée, la transcription. La transcription est une étape énergivore puisqu'elle utilise les nucléotides triphosphates afin de créer l'ARNm. Une première hypothèse en mesure d'expliquer nos résultats, serait que la transcription ayant lieu pendant que la traduction est bloquée, appauvrit le système en énergie, une énergie qui se trouve par conséquent déficiente lors de la reprise de la traduction. Une autre hypothèse envisageable, toujours en lien avec la transcription, pourrait être la production de phosphate inorganique à des niveaux déclenchant une inhibition de la traduction. En effet, il est connu que les « déchets » de l'expression, comme les phosphates inorganiques, ont un effet inhibiteur sur la production de protéines.

### 3. Bilan et perspectives : Régulation de l'expression par voie métabolique et par un antibiotique

Au cours de ce chapitre, nous avons pu vérifier l'expression de l'eGFP par un suivi de l'évolution de la fluorescence en microplaque. Nous avons vu que la complémentation du système PURExpress® avec des substrats énergétiques tels que l'ATP et le GTP inhibe l'expression de protéines lorsqu'ils sont ajoutés en début de réaction. Cependant, ajoutés en fin de réaction, ils ne changent rien à l'état final. Dans le cas où l'on ajoute une kinase telle que la MAPK Erk2 dans le système supplémenté avec de l'ATP, on obtient un niveau d'expression très supérieur à l'expérience contrôle. L'un comme l'autre, ces résultats sont difficilement explicables, l'ATP pourrait en effet avoir un effet inhibiteur par l'excès de production de Pi. Or, dans le cas présent les résultats en présence de kinase indiquent que cette inhibition n'est pas liée à la production de Pi. Il ne s'agit pas non plus du contre ion sodium présent dans le sel d'ATP.

Nous avons montré que le PURExpress® pouvait être inhibé au niveau de l'étape de traduction par l'ajout d'un antibiotique, le chloramphénicol. De plus, ce blocage se révèle être pseudo-réversible, car les niveaux d'expression finaux sont inférieurs aux intensités de fluorescence des expériences contrôle. Nous avons pu montrer que cette diminution n'est pas due aux molécules ajoutées ni au vieillissement du système. La transcription n'étant pas stoppée pendant l'intervalle de temps où la traduction est inhibée, il est fortement possible que cette étape continue de ponctionner le milieu pour produire des ARNm, vidant le système d'une énergie nécessaire à la reprise de la traduction lorsque l'inhibition est levée. Nous avons aussi formulé l'hypothèse selon laquelle la production de produit secondaire de la traduction pourrait engendrer une inhibition de la traduction. Quoi qu'il en soit, le système d'inhibition peut trouver son utilité dans des techniques telles que nous l'aborderons dans le chapitre 2 de la deuxième partie de ma thèse. De plus, il peut être intéressant dans le cadre d'autres méthodes de pouvoir mettre en place une inhibition réversible quitte à diminuer les rendements de production. J'ai déjà envisagé des expérimentations qui me permettraient de définir l'origine de cette réduction de production, afin d'y remédier lors de l'utilisation de cette méthode d'inhibition.

Enfin nous avons noté lors de l'exposé des résultats qu'il y avait un délai fixe entre l'ajout de l'antibiotique et l'arrêt de l'évolution de la fluorescence. Ceci n'est en réalité pas dû à une latence de l'effet de l'antibiotique mais au temps de maturation des protéines fluorescentes. En effet, les protéines fluorescentes présentent un temps de maturation pendant lequel elles ne produiront pas de fluorescence, même si elles sont correctement repliées.

Au cours du chapitre 3, nous aborderons l'utilisation de l'antibiotique et du PURExpress® avec des protéines fluorescentes afin d'étudier les phénomènes de maturation. Enfin dans le chapitre 5, nous étudierons l'utilisation de l'antibiotique comme moyen de régulation de l'expression afin de réaliser des modifications post-traductionnelles *in situ* de protéines membranaires.

Non mécontent des résultats obtenus, j'ai commencé à étudier l'influence du type de support utilisé sur les performances de l'expression, comme les fragments de PCR ou les plasmides dont la provenance (Miniprep ou Midiprep) peut influencer la qualité de l'expression. J'ai aussi commencé à étudier l'influence des contraintes stériques dues à une organisation des fragments d'ADN selon une géométrie spécifique, dite en « étoile ».



## Chapitre 3 : Etude cinétique de la maturation des protéines en milieu « Cell-free »

Les protéines fluorescentes sont devenues un outil incontournable de la biologie et des biotechnologies actuelles puisqu'elles permettent de visualiser la plupart des événements biologiques. Il se révèle essentiel de connaître la cinétique de maturation de ces protéines (c'est-à-dire le temps nécessaire à la protéine formée pour devenir fluorescente), dans de nombreuses applications comme, par exemple, dans le cadre de l'étude de l'expression génique afin de mieux appréhender les dynamiques d'expression. Pourtant, l'étude de ces mécanismes en milieu « cell-free » reste très limitée. L'objet de ce chapitre est ainsi l'élaboration d'une technique robuste permettant de caractériser la cinétique d'expression de protéines fluorescentes produites au sein du CFRPS PURExpress®.

Nous avons montré au chapitre précédent que le chloramphénicol permet de stopper l'expression des protéines lorsqu'il est ajouté au PURExpress®. Nous avons aussi constaté que la fluorescence augmentait pendant un délai fixe suivant son addition, ce qui correspond à la portion de protéines exprimées avant l'ajout de l'antibiotique et qui sont donc en cours de maturation. Dans ce chapitre, nous étudions tout d'abord comment exploiter cette propriété afin de quantifier les temps de maturation des protéines synthétisées. Nous appliquons ensuite cette méthode à différentes protéines fluorescentes et discutons l'intérêt et les limites de cette approche.



# Sommaire

<b>Introduction .....</b>	<b>113</b>
<b>1. Etude cinétique de la maturation des protéines : Etat de l'Art.....</b>	<b>115</b>
1.1 Les protéines fluorescentes.....	115
1.2 Etude de la maturation de la GFP .....	119
1.2.1 Etude de la maturation du chromophore de la GFP en bactérie.....	119
1.2.2 Etude de la maturation de la GFP par deux approches <i>in vitro</i> .....	121
1.2.2.1 Etude de la maturation de protéines recombinantes après purification .....	122
1.2.2.2 Etude de la maturation du chromophore de la GFP en milieu « Cell-free ».....	125
<b>2. Etude de la maturation de protéines fluorescentes en milieu CFRPS</b>	<b>128</b>
2.1 Démarche expérimentale : exemple de la PhiYFPm .....	128
2.2 Application de la méthode à des variantes de la GFP et à la mcherry.....	138
<b>3. Conclusion et limitations.....</b>	<b>143</b>



## **Introduction**

Les protéines sont des macromolécules possédant différents rôles dans les systèmes biologiques. Elles sont notamment responsables de toutes les fonctions physiologiques de nos cellules, allant de la réplication de l'ADN à l'adhésion cellulaire en passant par la communication cellulaire. Un fort intérêt est ainsi porté à la compréhension des propriétés physico-chimiques des protéines, en particulier les phénomènes de maturation qui régissent la mise en place de la fonctionnalité de la protéine suite à sa production. En plus de l'amélioration des connaissances à un niveau fondamental, des motivations plus pratiques comme la connaissance précise des voies de maturation, poussent à mieux comprendre ces phénomènes de maturation, que ces modifications soient dépendantes ou non de l'environnement de la protéine. En effet, l'activité d'une protéine dépend non seulement de son repliement mais aussi des modifications qu'elle doit subir pour être active.

Dans le cadre des développements biotechnologiques basés sur l'utilisation de protéines, comme l'étude de la dynamique de l'expression d'un gène, la compréhension des modifications et de leur résultante peut se révéler capitale dans la recherche de la démarche expérimentale optimale permettant d'obtenir non seulement les résultats escomptés mais aussi plus précis et plus robustes.

Avec l'avènement de la biologie cellulaire et des biotechnologies, l'utilisation de protéines recombinantes est de plus en plus marquée. Une classe de protéines fluorescentes particulières qui sert aujourd'hui de base fondamentale dans les études de biologie cellulaire et dans les développements des biotechnologies modernes, n'a lors de sa découverte pas suscité un grand intérêt de la part de la communauté scientifique. En effet, c'est dans les années 50, qu'il sera décrit que sous l'influence de la lumière ultraviolette, l'hydrozoaire *Aequorea victoria* émet de la fluorescence. Ce n'est que 40 ans après la découverte que *A. victoria* pouvait émettre de la fluorescence que la séquence de la protéine responsable de ce phénomène a été déterminée (Prasher et al., 1992). En 1994 commence la « vie active » de cette protéine, après la démonstration de sa fonctionnalité lorsqu'elle a été exprimée pour la première fois en tant que protéine exogène (Chalfie et al., 1994). En 20 ans, la GFP est passée du statut d'inconnue au statut d'outil communément utilisé en biologie moléculaire (Ashikawa et al., 2011), médecine (Hoffman, 2015), biologie cellulaire (Schudt et al., 2015) et biotechnologie (Wu et al., 2015).

Nous présenterons dans un premier temps les protéines fluorescentes, leur structure ainsi que les modifications chimiques qui permettent la création et la maturation de leur chromophore. Puis nous ferons l'état de l'art des méthodes développées ces dernières années concernant l'étude de la maturation des protéines fluorescentes. Enfin nous aborderons la méthode que nous avons développée au laboratoire. Cette technique a été développée à la suite des travaux sur l'inhibition par le chloramphénicol. En effet, nous avons pu constater que lorsque l'expression était inhibée par l'antibiotique à un moment donné, l'intensité de fluorescence au cours du temps évoluait encore après l'inhibition, avant d'atteindre un plateau final. Nous verrons, à partir de ces mesures de fluorescence, comment j'ai développé un processus simple et efficace pour déterminer les cinétiques de maturation du site chromophorique de ces protéines. Les résultats et la méthode développée font actuellement l'objet d'une publication en cours de préparation.

# 1. Etude cinétique de la maturation des protéines :

## Etat de l'Art

Les protéines constituent la majorité de la masse sèche des cellules. Ainsi, elles ne sont pas uniquement des éléments de construction de la cellule mais exécutent la quasi-totalité des fonctions cellulaires. Afin de mieux comprendre les processus qui régulent les organismes vivants, nous devons développer une compréhension exhaustive des réactions qui contrôlent l'activité des protéines. Ces processus incluent non seulement les étapes de repliement tridimensionnel qui aboutissent à une structure finale active et les co-facteurs impliqués dans la modification et/ou la fonction des protéines mais aussi les paramètres environnementaux qui peuvent entrer en jeu comme le pH et la température.

D'un point de vue chimique, les protéines sont de loin les molécules structurellement et fonctionnellement les plus complexes connues. Cela n'est en réalité pas étonnant puisqu'elles sont le résultat de milliards d'années de processus évolutifs hautement sélectifs. Leur étude nécessite donc de développer des outils et des stratégies toujours plus complexes afin de comprendre chaque étape affectant l'existence et la fonction d'une protéine.

### 1.1 Les protéines fluorescentes

Comme nous avons pu le voir au chapitre 1, les protéines sont des assemblages des 20 AA différents existant à l'état naturel. Cet assemblage correspond à la structure primaire du polypeptide. En fonction de cette structure primaire qui impose des contraintes dues aux propriétés hydrophobes/hydrophiles, polaires/non polaires des chaînes latérales des AA au châssis de la protéine, celle-ci va se replier pour adopter la conformation où l'énergie libre sera minimisée. Certaines modifications post-traductionnelles promeuvent ce processus de repliement. De même, des protéines dites chaperonnes permettent un repliement correct de certaines protéines. Finalement, une fois leur structure secondaire et leur structure tertiaire acquises, certaines protéines comme les protéines fluorescentes, nécessitent une étape supplémentaire dite de maturation, afin d'obtenir leur fonction finale : émettre des photons sous l'influence d'un signal lumineux d'excitation (Heim et al., 1994).

C'est en 1962 qu'une protéine bioluminescente fut isolée et purifiée pour la première fois de son organisme originel, l'hydrozoaire *Aequorea victoria*. Cette protéine, couplée à

l'Aequorin, fut nommée Green Fluorescent Protein (GFP), de par sa propriété de bioluminescence (Shimomura et al., 1962).

C'est dans les années 90 que tout le potentiel de la GFP sera révélé. En effet, il a été montré que la protéine peut être exprimée à partir de son gène lorsqu'il est inséré en cellule procaryote ou eucaryote et que sa maturation ne nécessite pas l'addition de cofacteurs ou de substrats exogènes (Chalfie et al., 1994). Ce fut la première démonstration de suivi d'expression d'un gène et de localisation de protéines dans des organismes vivants qui se trouve aujourd'hui être couramment utilisé en laboratoire. Dans le cadre de la collaboration que j'ai mise en place avec l'équipe du Dr. Martinez de l'université de Copenhague, j'ai pu d'ailleurs réaliser un suivi de la localisation, au sein de cellules eucaryotes, d'un récepteur couplé à une protéine G (GPCR) marqué par une protéine fluorescente [Figure 3.1 A]. De plus, je montrerai au chapitre 5 de la thèse que cette technique ne s'applique pas uniquement à la localisation des protéines dans les organismes vivants mais peut aussi être utilisée dans des objets tels que les liposomes (Carvalho et al., 2013).

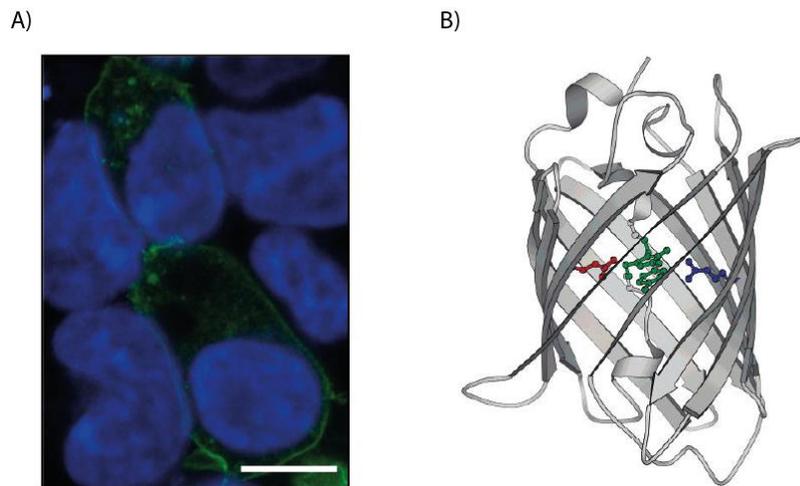


Figure 3.1 : (A) Image de microscopie confocale de marquages fluorescents de cellules eucaryotes transfectées. Les cellules expriment une GPCR fusionnée à une protéine fluorescente (récepteur kappa-opioïde-GFP), en vert. Nous pouvons aussi observer leur noyau en bleu, par marquage au 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Barre d'échelle : 10 µm. Image réalisée au Nanoscience center, Copenhague, Danemark en 2013 dans l'équipe du Dr. Martinez. (B) Schéma de la GFP repliée (identification Protein Data Bank 1EMA (Ormö et al., 1996)). Le chromophore, en vert, l'Arg96 (catalyseur électrostatique) en bleu et le Glu222 (catalyseur) en rouge sont présentés en modèle boules et batons. Deux feuilletts beta sont représentés en fins rubbans afin de mieux visualiser le © de la protéine (adapté de Wachter, 2007).

Le repliement de la GFP en un tonneau  $\beta$  composé de 11 feuilletts [Figure 3.1 B] est crucial pour la formation du chromophore et sa fluorescence. Les premières recherches sur la GFP et sur sa structure, obtenue par cristallographie, ont montré que le chromophore est

formé par la cyclisation intramoléculaire de la Ser65-Tyr66-Gly67 (Chalfie et al., 1994) en 4-(*p*-hydroxybenzylidene)-5-imidazolinone. La cyclisation se fait par une attaque nucléophile de Gly67-N $\alpha$  sur le groupement carbonyle de la Ser65, suivie d'une déshydratation et d'une oxydation de la liaison  $\alpha$ - $\beta$  de la Tyr66 [Figure 3.2].

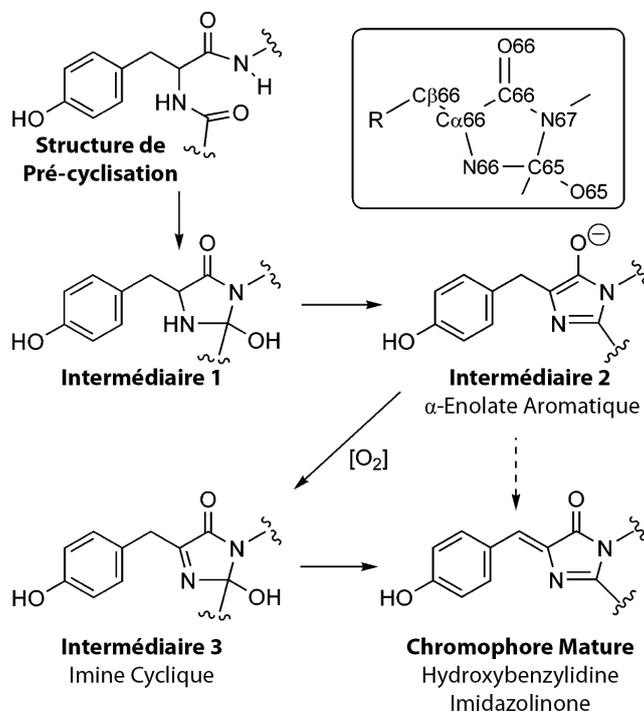


Figure 3.2 : Schéma de la réaction de formation du chromophore mature de la GFP. L'encart présente la numérotation des atomes telle qu'elle est utilisée dans le corps du texte (adapté de Wachter, 2007).

Cette réaction de cyclisation est autocatalytique, et seule la présence d'oxygène est nécessaire à sa réalisation. Il est donc raisonnable de penser que la séquence en AA et la structure tridimensionnelle sont responsables de la mise en place de cette cyclisation entre les résidus 65 et 67. Cette hypothèse a pu être vérifiée par la synthèse chimique complète d'une molécule précurseur de la GFP. Une fois ses groupements de protection retirés, le précurseur de la GFP est soumis à des conditions de repliement et forme une « GFP » comportant les propriétés spectroscopiques de la GFP naturelle (Nishiuchi et al., 1998). La fluorescence est totalement abolie si la GFP est dénaturée, mais elle est restaurée si le tonneau  $\beta$  est reformé. Même si la fluorescence peut être utilisée comme un indicateur de la formation du tonneau  $\beta$ , il faut prendre en compte que la fluorescence de la GFP wild-type (GFP wt) est observée dans un intervalle de 90 minutes à 4 heures après la synthèse car la formation et l'oxydation du chromophore sont lentes (Reid and Flynn, 1997). Il est à noter que cette gamme de durée doit

être prise avec précaution puisqu'elle est le résultat d'études réalisées sur différents modèles tels qu'*E. coli*, ou des organismes eucaryotes.

La simple modification des AA impliqués dans la formation du chromophore peut entraîner diverses modifications quant au comportement de la protéine fluorescente, tels que des changements de rendement quantique (Goedhart et al., 2012), de brillance (Baffour-Awuah et al., 2005) et de photostabilité, comme le blanchiment et la photoconversion (Mérola et al., 2014). L'utilisation d'AA possédant des groupements aromatiques et/ou éthyléniques permet, lorsqu'il y a conjugaison, d'étendre la délocalisation des liaisons du chromophore. L'extension physique de la conjugaison du chromophore, par l'intermédiaire de cette conjugaison, permet de produire des variations de longueur d'onde d'excitation et d'émission du chromophore, offrant ainsi la possibilité d'obtenir des « GFP » présentant des couleurs allant du bleu au rouge lointain (Aliye et al., 2015).

L'ensemble des variantes connues de la GFP peuvent être réparties en sept classes distinctes en fonction de la composition de leur chromophore. La première classe comprenant la GFP wt contient des chromophores phénols neutres et phénolates anioniques ; la classe 2, des anions phénolates ; la classe 3 des phénols neutres ; la classe 4, des anions phénolates comportant un système de «  $\pi$ -stacking » électronique ; la classe 5, avec des indoles ; la classe 6, avec des imidazoles ; et enfin la classe 7, avec des phényles. Les classes 1 à 4 sont des dérivés polypeptidiques avec une Tyr66, alors que les classes 5 à 7 ont à la même position des Trp, His et Phe.

Parce qu'il est possible de les fusionner à d'autres protéines sans altérer les fonctions de ces dernières, la GFP et ses « cousines » sont aujourd'hui des outils fondamentaux de la biologie cellulaire (Deponte, 2012) pour des marquages dans le cadre des technologies d'imagerie (Wiedenmann et al., 2009)(Walther et al., 2011)(Hoffman, 2015). Ces marquages ne se limitent pas au suivi d'un ensemble de molécules mais offrent aussi la possibilité de faire de l'imagerie à l'échelle de la molécule unique (Platonova et al., 2015). Ces développements ont été réalisés grâce à la compréhension de la maturation, de la photochimie et de la photophysique des protéines fluorescentes (Zimmer, 2002).

Dans le cadre du suivi de l'expression de gènes que nous souhaiterions observer grâce à la GFP, il est nécessaire d'appréhender les concepts de résolution temporelle ainsi que de demie-vie de la fluorescence de cette protéine. En effet, la vitesse de maturation et/ou de

dégradation de la protéine de marquage est primordiale dans le suivi de processus biologiques *in vivo* ou *in vitro* tels que l'activation d'un promoteur. Dans l'optique d'études de la différenciation des cellules souches, la disponibilité d'un panel de protéines fluorescentes présentant une acquisition rapide de leur propriété chromophorique serait un avantage par exemple pour suivre les changements d'expression de gènes, par « l'allumage de différents gènes », suite à une stimulation biochimique (Hong et al., 2005).

### **1.2 Etude de la maturation de la GFP**

Un nombre conséquent d'études a fait progresser la compréhension de la formation du chromophore. Comme nous avons pu voir, les détails de la création du chromophore par la cyclisation du tripeptide sont maintenant bien connus et la recherche a poussé le développement de variantes de la GFP qui forment leur chromophore plus efficacement et plus rapidement.

Bien qu'étudiée, la cinétique de maturation du chromophore, correspondant au passage de l'état réduit de celui-ci à un état oxydé, reste « floue ». En effet, les résultats sont très variables d'une étude à l'autre, ceci est particulièrement vrai par exemple pour la cinétique de maturation des variantes de la GFP développées plus récemment. Quelques études ont été menées, dans un premier temps pour déterminer les mécanismes de repliement et de formation du chromophore (Heim et al., 1994) et dans un second temps pour déterminer les constantes de temps de maturation des chromophores des variantes de la GFP.

#### **1.2.1 Etude de la maturation du chromophore de la GFP en bactérie**

Dans l'étude *in vivo* (Heim et al., 1995), des cultures d'*E. coli* exprimant la GFP wt et la variante S65T, où la Sérine 65 est remplacée par une Thréonine, sont mise en croissance. Sachant que la maturation du chromophore est dépendante de la présence d'oxygène, les cultures sont réalisées en milieu anaérobique afin d'inhiber cette étape de maturation durant la croissance des bactéries. Cette méthode permet d'obtenir un pool de protéines auxquelles il ne manque qu'une étape oxydation afin de devenir fluorescentes.

La maturation du chromophore est suivie par fluorescence lorsque la culture est exposée à l'air, par dilution de celle-ci dans un tampon phosphate salin (PBS) contenant 8

mM d'Azoture de Sodium ( $\text{NaN}_3$ ) afin d'inhiber le métabolisme des bactéries en bloquant la production d'ATP. Grâce à cette méthode, l'évolution de la fluorescence est représentative de l'étape finale d'oxydation au cours de la formation du chromophore de la protéine. Les courbes de la Figure 3.3 sont des ajustements de courbes exponentielles concordant avec une cinétique de pseudo premier ordre, c'est-à-dire correspondant à une réaction où un des réactifs est considéré comme constant (catalyseur ou réactif en grand excès). Sa concentration peut alors être intégrée dans la constante de vitesse.

Équation 1 : 
$$I(t) = I(\infty)[1 - \exp(-k \cdot t)]$$

Où  $I(t)$  et  $I(\infty)$  sont les intensités de fluorescence respectivement à un temps  $t$  et à l'infini et où  $k$  est la constante de formation du chromophore.

Les résultats de l'ajustement de courbes ont permis d'obtenir des constantes de temps de 7200 et 1620 secondes respectivement pour la wtGFP et la S65T-GFP.

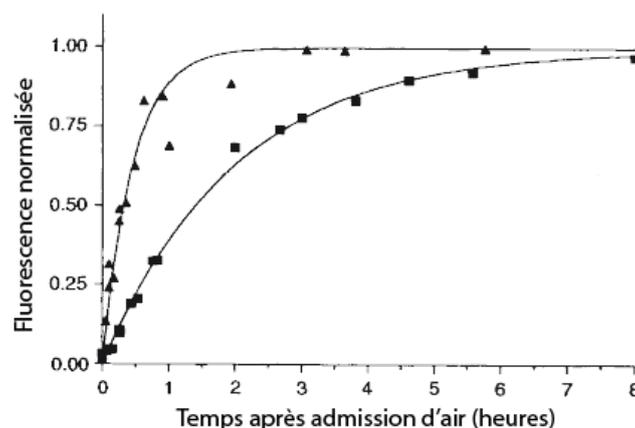


Figure 3.3 : Comparaison entre la protéine fluorescente recombinante wt et un mutant GFP. Evolution de la fluorescence normalisée en fonction du temps après admission d'air dans le milieu de culture dilué. La courbe comportant les carrés noirs correspond à la version wt, celle présentant les triangles noirs à la version mutée S65T GFP. Elles sont normalisées sur leur fluorescence asymptotique respective. Les courbes représentent l'ajustement exponentiel.

Dans cette étude, les auteurs veulent étudier la constante de vitesse de maturation du chromophore. La maturation du chromophore des protéines étant dépendante de la présence d'oxygène dans le milieu de maturation, il est possible d'inhiber celle-ci en supprimant la présence d'oxygène dans la solution. Les auteurs voulant uniquement étudier l'étape de

maturation du chromophore, ils produisent donc la GFP (wt et S65T) dans des cultures en anaérobiose. Néanmoins, un défaut majeur de leur technique réside dans le fait qu'ils n'arrêtent pas le métabolisme de la protéine avant l'admission à l'air mais en parallèle. La synthèse de protéines se poursuit au moment  $t$  de l'admission d'air par dilution dans le tampon d'étude comportant l'inhibiteur métabolique. Les courbes obtenues correspondent à un composite d'augmentation de l'intensité de fluorescence liée à la maturation du chromophore. En effet, deux populations de protéines coexistent, certaines en cours de formation et d'autres en cours de maturation, à différents avancements, au moment de l'injection. Ainsi, les constantes de vitesses sont une « moyenne » entre des constantes de vitesses correspondant à la maturation de protéines comprises entre le stade de repliement tridimensionnel et la maturation finale par oxydation du chromophore.

L'approche *in vivo*, bien que proche des conditions physiologiques, comporte un certain nombre de difficultés comme le travail sur des organismes vivants, dont il faut satisfaire les conditions de viabilité ainsi qu'un accès indirect aux protéines produites.

#### **1.2.2 Etude de la maturation de la GFP par deux approches *in vitro***

L'étude *in vivo* présentée a apporté des informations concernant les constantes de maturation de la variante la plus utilisée de la GFP à l'époque de sa publication. Néanmoins, les méthodes basées sur l'étude de la maturation *in vivo* par suivi de la fluorescence restent contraintes bien que simples à mettre en œuvre. En effet, les contraintes de culture empêchent pas de modifier le milieu de culture facilement (pH, composition, *etc.*). De plus, l'étude *in vivo* reste assez lente dans le cadre d'études de criblages, pénalisant l'acquisition d'informations concernant les caractéristiques de maturation des protéines fluorescentes. C'est pourquoi il est intéressant de se tourner vers des études *in vitro* qui peuvent pallier cela.

La production de protéines recombinantes purifiées permet ainsi d'étudier séparément les phénomènes de repliement et de maturation. De plus, cela permet de facilement faire varier les paramètres d'étude (pH, température, additif(s), cofacteur(s), oxygénation). Cette méthode a permis d'avoir accès à la cinétique des différentes étapes de repliement et de maturation de protéines fluorescentes comme la S65T-GFP (Reid and Flynn, 1997).

Dans le cadre de criblage sur un grand nombre de mutants et afin d'identifier des candidats présentant des caractéristiques photophysiques particulières, la purification de milliers voire de millions de variantes est difficilement réalisable. L'utilisation de systèmes « cell-free » (CFPS et/ou CFRPS) permettrait de réaliser l'étape de production et l'analyse de la maturation dans le même tube.

Les solutions *in vitro*, telles que la production de grandes quantités de protéines recombinantes purifiées mais surtout l'utilisation des systèmes CFPS ou CFRPS, permettent souvent de réaliser les mêmes études dans un temps beaucoup plus restreint et de faire varier les conditions expérimentales sans se soucier des contraintes liées à l'*in vivo*.

#### 1.2.2.1 Etude de la maturation de protéines recombinantes après purification

La première étude de la formation du chromophore *in vitro* est réalisée en 1997 (Reid and Flynn, 1997). Celle-ci se base sur l'utilisation des corps d'inclusion. En effet lorsque la GFP est surexprimée dans *E. coli*, elle a tendance à former des agrégats (Heim et al., 1994). Les agrégats insolubles ou corps d'inclusions, sont le résultat d'un repliement inadéquat de la protéine dans la cellule (King et al., 1996).

Dans cette étude, les auteurs partent du principe que les réactions intramoléculaires responsables de la formation du chromophore ne se produisent qu'une fois la protéine correctement repliée, or le matériel trouvé dans les corps d'inclusion n'est pas correctement replié, donc le tripeptide responsable de la formation du chromophore devrait se trouver « intact ». Les protéines solubilisées issues de ces corps d'inclusion sont donc utilisées pour étudier la formation *de novo* du chromophore.

Les auteurs décrivent trois étapes permettant la formation de la protéine fluorescente active. La première étape correspond au repliement de la protéine dans sa conformation active, ils obtiennent la valeur ( $k_{ren_o} = 2,4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) en effectuant une dénaturation d'un échantillon actif suivie d'une renaturation de la protéine. En effet, la dénaturation par l'urée n'affecte pas le tripeptide Thr-Tyr-Gly. L'apparition de la fluorescence correspond donc au repliement exclusif de la protéine lors de la renaturation.

La deuxième étape correspond à la formation du tripeptide Thr-Tyr-Gly par l'enfouissement du chromophore tripeptidique dans le cœur de la S65T-GFP (Yang et al.,

1996). Une fois la structure tridimensionnelle mise en place, celle-ci promeut très certainement l'étape suivante de la maturation de la GFP : le réarrangement menant à la cyclisation du tripeptide chromophorique. Dans l'étude de Reid et Flynn, la méthode employée ne permet pas d'obtenir une résolution temporelle suffisante. La constante de temps déterminée à partir des résultats ( $k_c = 3,8 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  soit  $\tau \approx 263 \text{ s}$ ) est donc une estimation de la vitesse réelle et ne représente certainement que la limite basse de la vitesse de cyclisation.

La troisième et dernière étape, qui nécessite la cyclisation préalable du tripeptide, correspond à l'oxydation du chromophore cyclisé. Il s'agit de loin de l'étape la plus lente. Dans l'étude, cette étape est mise en évidence par la comparaison des constantes de temps de la renaturation de la S65T-GFP et de la drS65T-GFP (chromophore réduit). Les deux expériences de renaturation diffèrent par le potentiel oxydatif de la solution dénaturante utilisée.

Ainsi, les auteurs (Reid et Flynn, 1997)(Miyawaki et al., 2003) ont pu mettre en évidence les constantes pour les différentes étapes de la formation du chromophore. Dans le cas de la dS65T-GFP dénaturée mais non réduite, une constante de renaturation depuis un état oxydé  $k_{\text{ren}_o} = 2,4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  est déterminée. La mise en renaturation « contrôlée » de la drS65T-GFP, dénaturée et réduite, a permis de mettre en avant une constante de renaturation à partir d'un état réduit  $k_{\text{ren}_r} = 2,7 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , celle-ci prouve que la renaturation de la protéine est indépendante de son état d'oxydation. Enfin, la deuxième partie de cette renaturation échantillonnée met en évidence la constante d'oxydation  $k_{\text{oxd}} = 1,51 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  du chromophore [Figure 3.4].

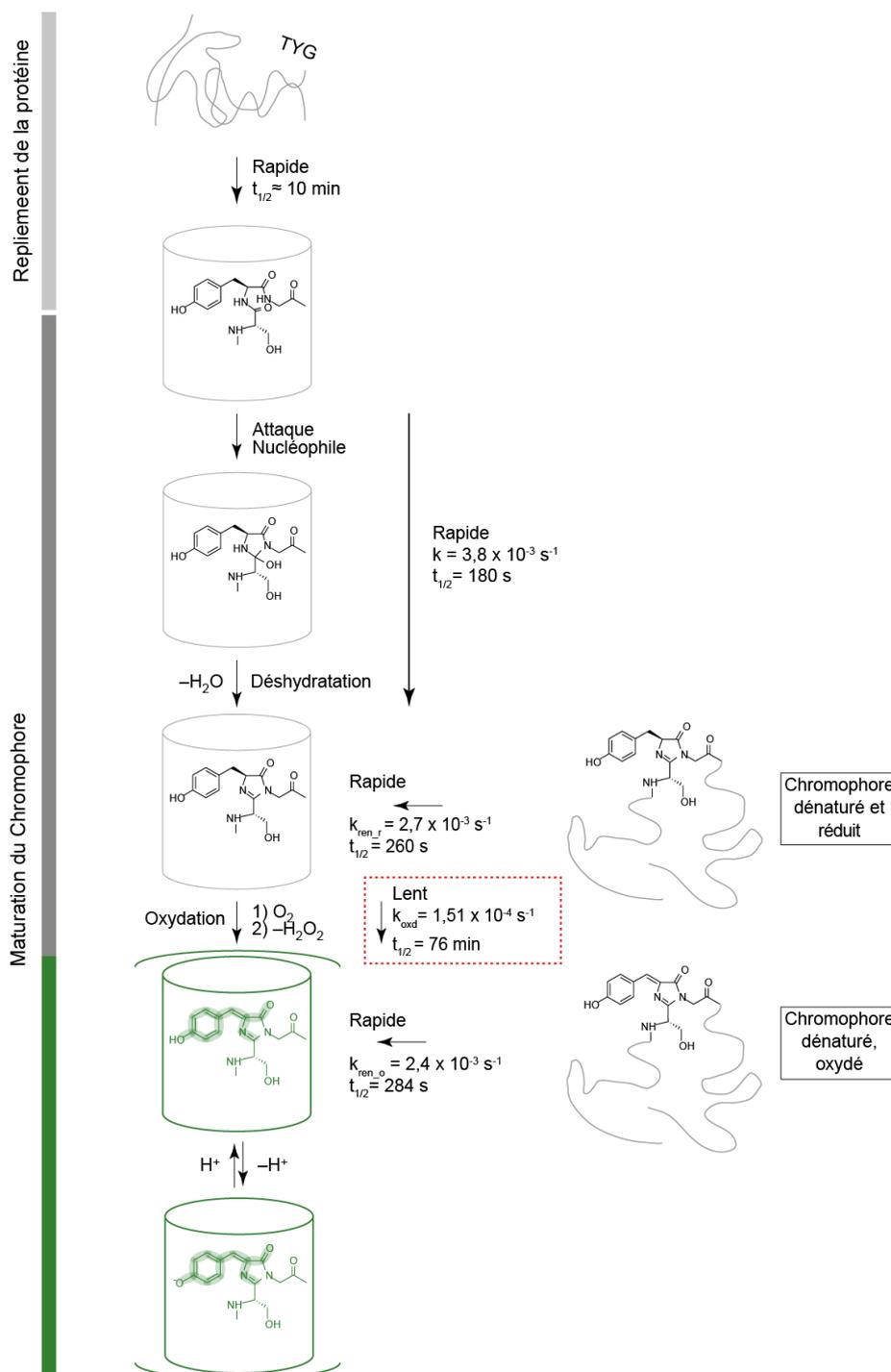


Figure 3.4 : Diagramme représentant le repliement et la maturation du chromophore de S65T-GFP. La structure de tonneau  $\beta$  est représentée sous forme de cylindre alors que la protéine dénaturée est représentée par une chaîne irrégulière. L'encart en pointillé rouge met en exergue la réaction de vitesse limitante de la formation du chromophore mature, l'oxydation. La conjugaison des liaisons  $\pi$  permettant l'absorption de la lumière visible est indiquée par les enveloppes vertes. La cinétique de renaturation à partir de la protéine dénaturée avec un chromophore oxydé est représentée par la constante  $k_{\text{ren}_o}$ . La protéine dénaturée comportant un chromophore réduit présente des cinétiques de renaturation/oxydation avec deux constantes,  $k_{\text{ren}_r}$  et  $k_{\text{oxd}}$  (adapté de Reid et Flynn, 1997 et Miyawaki et al., 2003).

### 1.2.2.2 Etude de la maturation du chromophore de la GFP en milieu « Cell-free »

Comme nous avons pu le voir au chapitre 1, l'expression « cell-free » de protéine est un moyen simple et rapide de synthétiser des protéines repliées. Ces systèmes représentent une alternative attractive pour la production de protéines difficiles à produire, comme les protéines membranaires, que nous aurons l'occasion de traiter dans la deuxième partie de ma thèse, ou qui posent des problèmes de cytotoxicité. La nature même des systèmes « cell-free » permet une modification et une manipulation directe du système biologique, ce qui n'est pas toujours possible en cellules. De plus, nous pouvons aisément paralléliser l'expérimentation en faisant varier la séquence ADN des protéines et ainsi rapidement cribler différentes séquences.

Dans une étude récente, la maturation de chromophore de variantes de la GFP est étudiée. Pour cela les auteurs utilisent une approche cell-free (PURE system) anaérobie ( $\approx 0,1 \text{ mg.L}^{-1} \text{ O}_2$  dissous) afin de produire une protéine correctement repliée où la maturation du chromophore est inhibée par l'absence d'oxygène. En effet, comme nous avons pu le voir précédemment, l'oxygène moléculaire est le réactif nécessaire et suffisant à la réalisation de la réaction d'oxydation. L'utilisation d'un système CFRPS tel que le PURE system permet de supprimer les protéines qui pourraient interférer avec l'expérience mais aussi d'implémenter des modules supplémentaires. Dans le cas présent, les auteurs ont ajouté un module de « récupération » de l' $\text{O}_2$  basé sur la réaction du glucose avec la glucose oxydase et la catalase, afin de supprimer l'oxygène dissout dans le milieu d'expression [Figure 3.5].

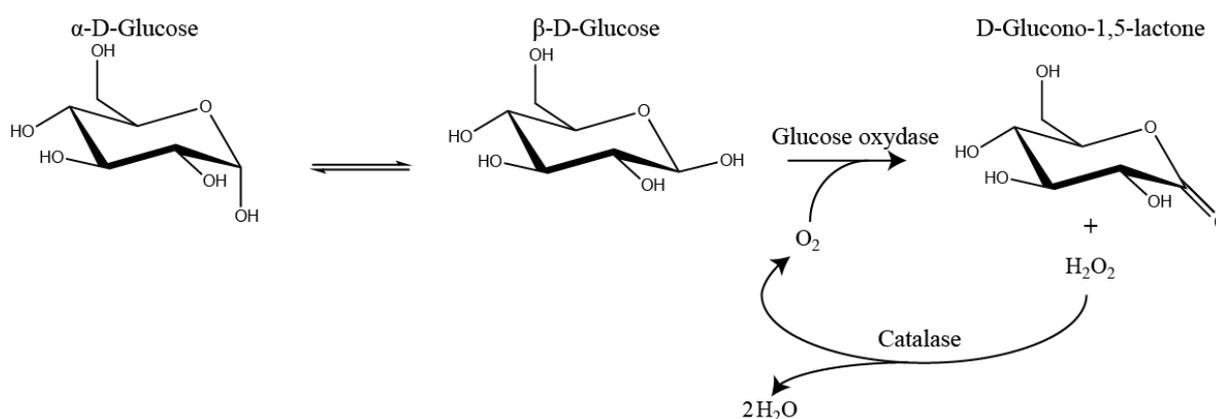


Figure 3.5 : Schéma des réactions enzymatiques catalysées par la glucose oxydase et la catalase afin de réduire l'oxygène moléculaire du milieu d'expression

Une fois la synthèse de la protéine terminée, l'échantillon est dilué dans un tampon saturé en air ( $\approx 6,3 \text{ mg.L}^{-1} \text{ d'O}_2$  dissous) permettant la réaction d'oxydation du chromophore.

L'évolution de la fluorescence de chaque échantillon est suivie en temps réel avec un spectrofluorimètre [Figure 3.6] et concorde avec une cinétique de maturation décrite par une exponentielle simple.

Équation 2 : 
$$I(t) = I(\infty)[1 - \exp(-k.t)]$$

Où  $I(t)$  et  $I(\infty)$  sont les intensités de fluorescence respectives à un temps  $t$  et à l'infini et où  $k$  est la constante de formation du chromophore. Sur la Figure 3.4, la même constante est représentée par  $k_{oxd}$ .

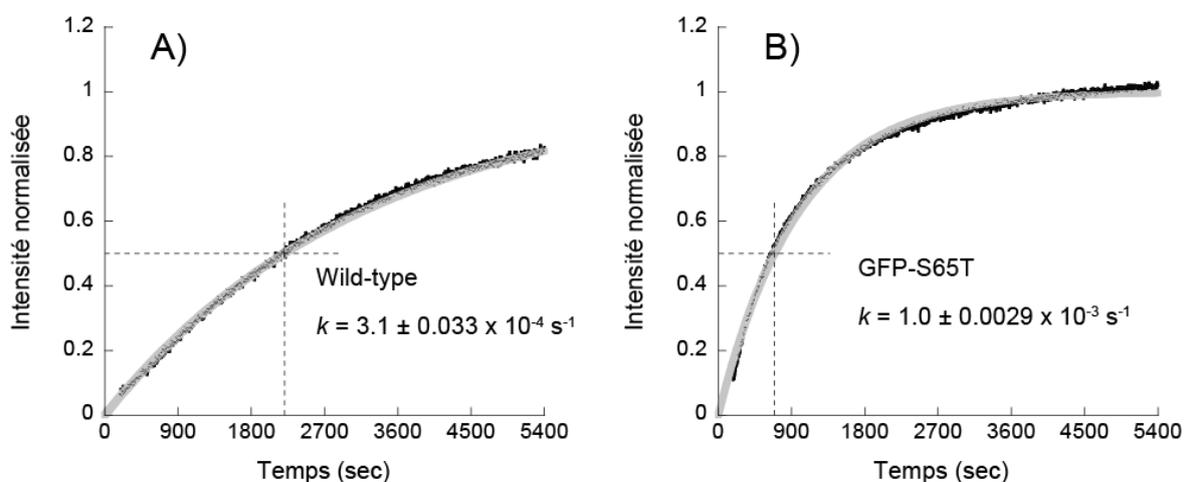


Figure 3.6 : Vitesses de formation des chromophores formés *de novo* chez la wtGFP et un variant S65T-GFP. A  $t = 0$  sec, un échantillon de GFP comportant un chromophore immature est dilué 120 fois dans le tampon de maturation. L'augmentation de la fluorescence liée à la GFP est suivie de manière continue à 37 °C à l'aide d'un spectrofluorimètre (tracé noir sur les courbes). Les ajustements exponentiels correspondants sont tracés en gris clair. Les lignes en pointillés indiquent le demi-temps de maturation ( $t_{1/2}$ ). Les résultats sont représentatifs de trois ou quatre expériences indépendantes. Les constantes  $k$  en sont des moyennes  $\pm$  les erreurs standards. (A) wtGFP et (B) S65T-GFP (Iizuka et al., 2011).

La méthode développée ici a été appliquée à différentes variantes de la GFP, dont certaines comportant une ou plusieurs mutations pouvant améliorer la vitesse de maturation du chromophore. Certaines de ces mutations déjà connues (Cubitt et al., 1995) sont directement impliquée dans les liaisons hydrogènes aboutissant à la formation du chromophore mature. Certaines mutations distales favoriseraient l'interaction entre la Tyr66 et l'Arg96 (Baffour-Awuah et al., 2005). Les auteurs ont profité de la modularité du système « cell-free » et ont ainsi pu démontrer que cet outil est fonctionnel et permet de déterminer les constantes de formation ( $k$ ) des chromophores. De plus, ils ont pu étudier en parallèle 16

### **Chapitre 3 : Etude cinétique de la maturation des protéines en milieu « Cell-free »**

---

variantes de la GFP et de la YFP, démontrant ainsi les possibilités offertes par les approches « cell-free » pour le criblage à partir de séquences ADN variées.

## 2. Etude de la maturation de protéines fluorescentes en milieu CFRPS

Comme nous avons pu le voir précédemment, les systèmes CFRPS offrent des avantages non négligeables sur l'étude des protéines. En effet, ils permettent très simplement d'adapter le milieu réactionnel, de paralléliser et d'automatiser des réactions, offrant ainsi des possibilités de criblage accrues.

Lors du précédent chapitre, nous avons pu observer que les résultats d'inhibition de la production de protéines à différents temps présentaient un délai entre l'injection de l'antibiotique, qui bloque la production de protéines, et l'arrivée de la fluorescence à son plateau. Cet intervalle ne correspond pas au temps d'action du chloramphénicol qui est instantané (voir chapitre 2). Celui-ci doit donc correspondre à la maturation des protéines nouvellement formées mais non-matures au moment du blocage de l'expression.

C'est en partant de cette hypothèse que nous avons développé l'idée d'extraire les cinétiques de maturation des courbes de fluorescence post-injection, en particulier la constante de vitesse de l'étape limitante d'oxydation du chromophore. En effet, cette portion de la courbe contient des informations concernant la cinétique de maturation des protéines fluorescentes.

Dans un premiers temps, je discuterai de la démarche expérimentale mise en place pour l'analyse de la PhiYFPm, et les résultats obtenus pour celle-ci. Dans un second temps, j'étudierai la maturation de diverses protéines fluorescentes qui sont connues pour être plus rapides ou plus lentes que la PhiYFPm.

### 2.1 Démarche expérimentale : exemple de la PhiYFPm

Afin d'étudier la maturation de différentes variantes de la GFP, nous avons développé cette technique dérivée de l'inhibition par le chloramphénicol décrite au chapitre précédent. Comme pour les études précédentes et celles dont nous discuterons dans le chapitre 5 de la deuxième partie de ma thèse, nous avons cloné les différents gènes correspond aux protéines fluorescentes dans le vecteur d'expression présenté au chapitre précédent section 2.1.

Les protéines fluorescentes, que sont la PhiYFPm, la GFPmut2, l'EmGFP, la DeGFP et la mcherry ont été sous-clonées, par une méthode « d'assemblage de Gibson » (Gibson et

al., 2008), dans le même vecteur permettant l'expression par la polymérase T7 [Figure 3.7]. Nous avons conservé le même vecteur afin de maintenir des niveaux d'expression similaires entre les protéines. De plus, nous utilisons ce vecteur au sein d'un système CFRPS (PURExpress®), ce dernier nous permettant de retirer l'influence du châssis et d'obtenir des expériences très reproductibles lorsque le même échantillon d'ADN est utilisé.

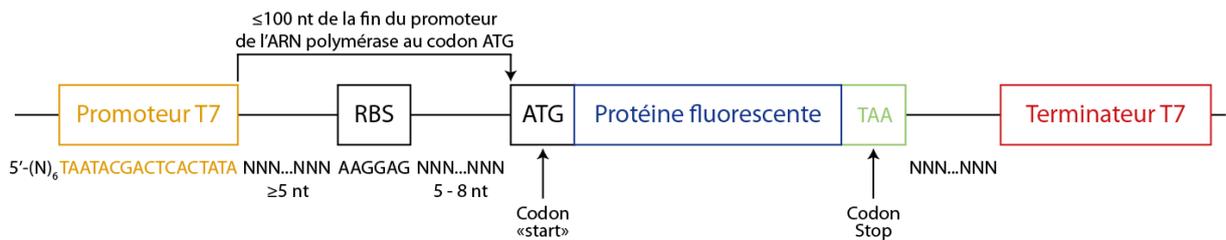


Figure 3.7 : Schéma d'une construction type utilisée pour l'expression de protéines en PURExpress®. Dans notre cas le gène d'intérêt sera le gène codant pour une protéine fluorescente.

### **Protocole 1**

Des échantillons de 25  $\mu\text{L}$  sont préparés sur glace en assemblant 7  $\mu\text{L}$  d'une eau sans ARNase (Sigma), 10  $\mu\text{L}$  d'une solution A, 1  $\mu\text{L}$  de vecteur d'expression T7 contenant la séquence ADN d'une protéine fluorescente (dans le premier cas d'étude une PhiYFPm) à 100  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  et finalement 7  $\mu\text{L}$  d'une solution B. Les solutions A et B proviennent du kit commercial PURExpress®. Les échantillons sont placés dans les puits d'une microplaque 384 puits et recouverts par 25  $\mu\text{L}$  d'huile minérale (Sigma) afin d'éviter l'évaporation des échantillons pendant l'incubation à 37 °C. Dans le but d'arrêter la traduction, 2  $\mu\text{L}$  de Chloramphénicol à 0,4  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  sont ajoutés au cours de l'incubation. Le suivi de fluorescence est réalisé toutes les 10 secondes, pendant la période pré- et post-injection d'antibiotique, grâce à un lecteur de microplaques BioTek Synergy HT (YFP, GFP : Ex : 485/20 nm, Em : 528/20 nm ; mcherry : Ex : 590/20 nm, Em : 645/40 nm).

Dans l'expérience suivante, chaque échantillon de 25  $\mu\text{L}$  est injecté dans un puit d'une microplaque. Cette division des échantillons permet d'ajouter l'inhibiteur à différents temps et d'étudier indépendamment l'évolution de la fluorescence dans chaque puit.

Comme nous avons pu le voir précédemment, l'ajout d'antibiotique stoppe la production de protéines dans le PURExpress®. A la suite de l'inhibition, la fluorescence continue d'évoluer jusqu'à un plateau d'intensité finale.

Les courbes de la Figure 3.8 A présentent les traits caractéristiques d'une production de protéines fluorescentes en PURExpress®, avec dans un premier temps, la mise en évidence d'un délai avant l'apparition de la fluorescence liée à la production des protéines fluorescentes. Dans un second temps, le profil d'expression présente un régime permanent où la vitesse d'apparition de la fluorescence est maximale. Enfin, nous pouvons observer un ralentissement suivi d'un plateau d'intensité de fluorescence après l'injection de chloramphénicol, qui stoppe l'expression de la protéine [Figure 3.8 A flèches]. L'antibiotique nous permet de bloquer la traduction des protéines à un temps désiré. L'augmentation de la fluorescence observée à partir de ce temps correspond donc à la maturation du pool de protéines déjà présentes dans le milieu au temps de l'injection.

Afin d'analyser la maturation de la protéine, nous coupons les courbes au temps de blocage. Celles-ci sont placées suivant le référentiel de temps  $t = 0$  secondes correspondant au temps d'injection de l'antibiotique dans les puits, nous permettant ainsi d'observer la variation d'intensité de fluorescence entre l'injection de l'inhibiteur et la fin de l'expérience [Figure 3.8 B].

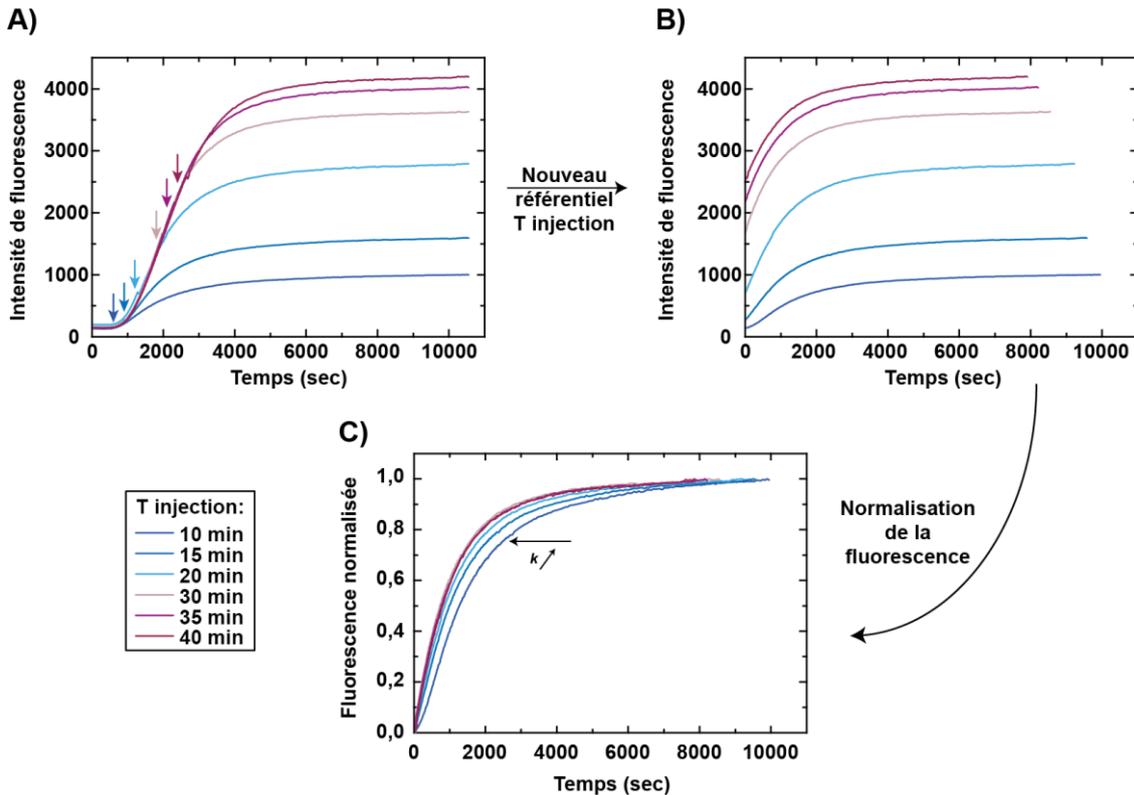


Figure 3.8 : Graphiques présentant le traitement des données expérimentales. (A) Graphique présentant l'évolution de la fluorescence de la PhiYFPm au cours du temps avant et après injection d'antibiotique à différents temps. (B) Evolution de la fluorescence à partir de l'injection d'antibiotique. (C) Normalisation entre 0 et 1 de l'intensité de fluorescence des différents puits.

Les intensités de fluorescence sont ensuite normalisées entre leurs maxima et leurs minima, ce qui permet de comparer et donner un aperçu de la vitesse relative de la maturation pour chaque courbe [Figure 3.8 C]. On peut d'ailleurs en conclure que les vitesses de maturation changent en fonction du temps d'injection du chloramphénicol.

Au vue de la forme des courbes, l'apparition de la fluorescence de cette protéine correspond à un modèle de cinétique de maturation du premier ordre avec une constante de temps Tau ( $\tau = 1/k$ ) ce qui est cohérent avec la bibliographie, qui présente une étape limitante d'ordre 1.

L'ajustement des courbes sera donc réalisé à l'aide de l'équation exponentielle simple suivante :

$$\text{Équation 3 : } I(t) = I(\infty) \left[ 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right] + A$$

Avec  $\tau$  la constante de temps ( $\tau = 1/k$ ) de maturation, avec  $I(t)$  et  $I(\infty)$ , les intensités de fluorescence respectivement à un temps  $t$  après l'addition de l'antibiotique et à la fin de la réaction et  $A$  une constante permettant d'ajuster les courbes sans forcer un début  $I(t=0) = 0$ .

Dans un premier temps, nous avons pu extraire à partir des courbes non-normalisées [Figure 3.8 B] l'amplitude de la fluorescence entre le temps d'injection de l'inhibiteur et le plateau final de fin d'expérience. Ce traitement nous permet de retranscrire sur un graphique la variation de l'amplitude en fonction du temps d'injection du chloramphénicol [Figure 3.9].

Les courbes de la Figure 3.9, représentent les relevés d'amplitude pour les différents temps d'injection. On peut ainsi observer que les temps courts d'injection présentent une faible amplitude, celle-ci augmente ensuite progressivement pour atteindre une valeur plateau vers 35 minutes de temps d'injection ( $t_{sat}$ ). Enfin, cette amplitude reste stable avant de diminuer à partir de 55 minutes.

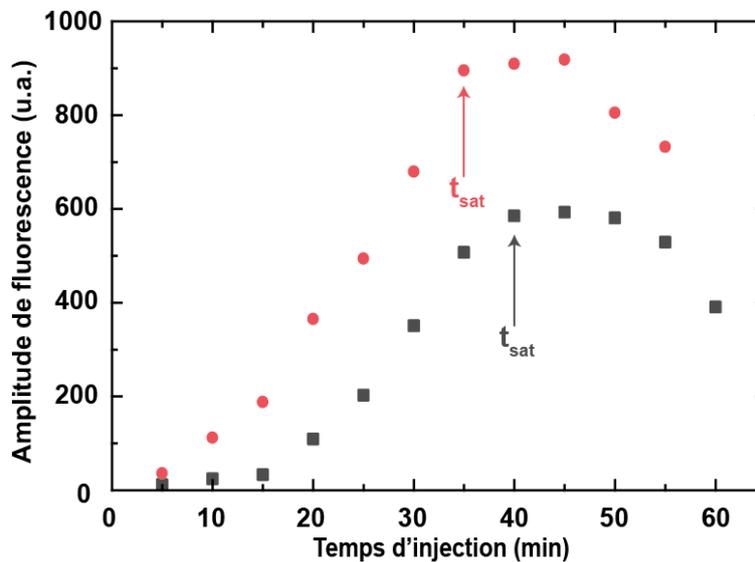


Figure 3.9 : Graphique présentant les amplitudes de fluorescence de PhiYFPm entre le temps d'injection de l'antibiotique et le plateau de fin de réaction en fonction du temps auquel l'injection a été réalisée. On peut constater que l'amplitude de variation de la fluorescence entre le temps  $T$  d'arrêt et le plateau final de fluorescence est dépendant du temps auquel l'expression est arrêtée. Barres d'erreurs : Déviation standard.

Afin d'expliquer les résultats de la Figure 3.9, nous devons considérer les processus d'expression « cell-free » qui se cachent derrière les courbes expérimentales.

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre 1, la transcription et la traduction font appel à deux machineries distinctes, dans le cadre d'un système CFRPS comme le PURExpress®, l'ARN polymérase T7 et les Ribosomes. Dans le PURExpress®, il n'y a pas de système de régulation de la production d'ARNm et des protéines, l'ARN polymérase T7 et

les ribosomes vont donc produire des ARNm et des protéines jusqu'à épuisement des substrats présents dans le système.

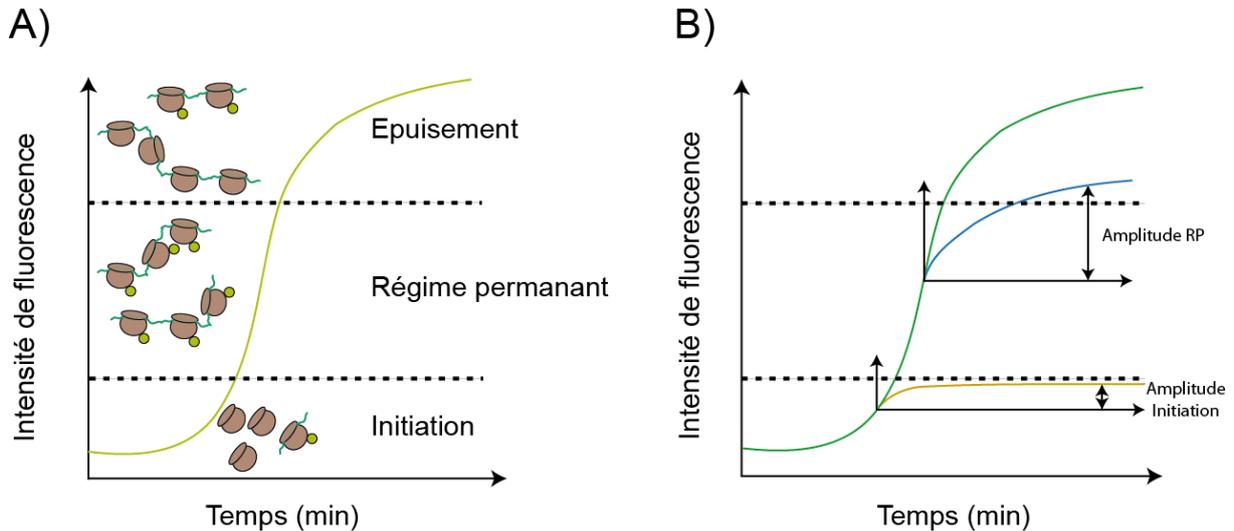


Figure 3.10 : Aspect théorique et pratique de l'expression de protéines fluorescentes en PURExpress® (A) Schéma d'explication des trois phases d'expression dans le PURExpress® avec la variation d'intensité de fluorescence au cours du temps. (B) Amplitude post-injection en fonction du temps d'injection. L'injection en début de réaction bloque la production de protéines alors qu'il y a peu d'ARNm dans le système. La synthèse protéique est donc plus lente et moins de protéines *de novo* formées. L'amplitude d'intensité de fluorescence à l'initiation est donc plus faible (courbe jaune) que lors d'une injection où la machinerie de traduction est en régime permanent (RP) (injection dans l'intervalle de temps entre les pointillés) comme pour la courbe bleue.

Nous avons en réalité trois phases dans les mécanismes d'expression de nos protéines fluorescentes. En début de réaction il n'y a pas encore d'ARNm donc pas de production de protéines. Avec l'apparition des premiers brins d'ARNm commence la synthèse protéique par les ribosomes, ceci correspond à la phase d'initiation. La quantité d'ARNm augmentant avec le temps, les ribosomes sont petit à petit tous « occupés ». Il arrive un moment dans la réaction où la machinerie ribosomale est saturée en ARNm, c'est-à-dire que chaque ribosome est lié à un ARNm et produit une protéine, c'est la phase de régime permanent [Figure 3.10 A]. Enfin, une dernière phase dite d'épuisement du système intervient et présente une production de protéines décroissante jusqu'à l'arrêt du système.

Dans le cas de notre étude, si l'antibiotique est ajouté en début de réaction, la variation de l'intensité de fluorescence est faible car il y a peu de protéines produites au début, cette

amplitude augmente avec le temps d'injection jusqu'à un plateau pour ensuite diminuer de nouveau [Figure 3.9 et Figure 3.10 B]. Le plateau d'amplitude correspond très certainement à la phase de régime permanent d'expression [Figure 3.10 A et B].

Il faut environ 12 secondes pour synthétiser une protéine de 238 AA comme la GFP wt. En effet, un ribosome assemble une chaîne polypeptidique à 20 AA par seconde. Les temps de maturation, présentés dans la littérature, pour une protéine fluorescente sont très grands devant leur temps de production, de la dizaine de secondes pour la synthèse aux 30 minutes pour la maturation. Nous faisons donc l'hypothèse que le temps de production de la protéine est négligeable devant le temps de maturation lors du traitement des données expérimentales.

Cette approximation nous permet de traduire le temps entre le début de l'incubation et l'entrée dans la phase de régime permanent comme étant équivalent au temps de maturation de la protéine [Figure 3.9]. Dans le cas de cette protéine et avec la résolution temporelle de l'expérience, on peut conclure que le temps de maturation de la protéine est compris entre 30 et 35 minutes. L'étude de l'amplitude représente donc un moyen d'estimer le temps de maturation d'une protéine, évidemment cette méthode est très contrainte par l'intervalle de temps entre les injections qui donnent la résolution temporelle de l'expérience. Si nous voulions obtenir une meilleure résolution, il faudrait envisager de développer des systèmes microfluidiques tels que des systèmes encapsulés en gouttes que nous pourrions faire fusionner à des intervalles très courts et dont nous pourrions suivre indépendamment la variation de fluorescence au cours du temps. Des méthodes d'encapsulation de systèmes « cell-free » existent déjà (Noireaux and Libchaber, 2004), dont une à laquelle j'ai eu recours pendant ma thèse (Saito et al., 2009).

L'extraction du temps  $\tau$  par ajustement des courbes représente une méthode beaucoup plus robuste pour extraire les paramètres de maturation de protéines fluorescentes.

L'ajustement des courbes traitées [Figure 3.11 A], comme le précise la Figure 3.8 C, nous permet d'obtenir des constantes de temps de maturation  $\tau$  pour différents temps d'injection. Ainsi nous avons pu tracer à la Figure 3.11 B la constante de temps  $\tau$  moyenne de maturation en fonction du temps d'injection.

On peut constater sur la Figure 3.11 B que la valeur moyenne du temps de maturation  $\tau$  diminue lorsque le temps d'injection augmente. Pour des temps courts,  $\tau$  diminue fortement,

de 3000 à ~ 1000 secondes, avant de se stabiliser autour d'une valeur de 600 secondes, pour des temps d'injection compris entre 30-35 minutes d'incubation.

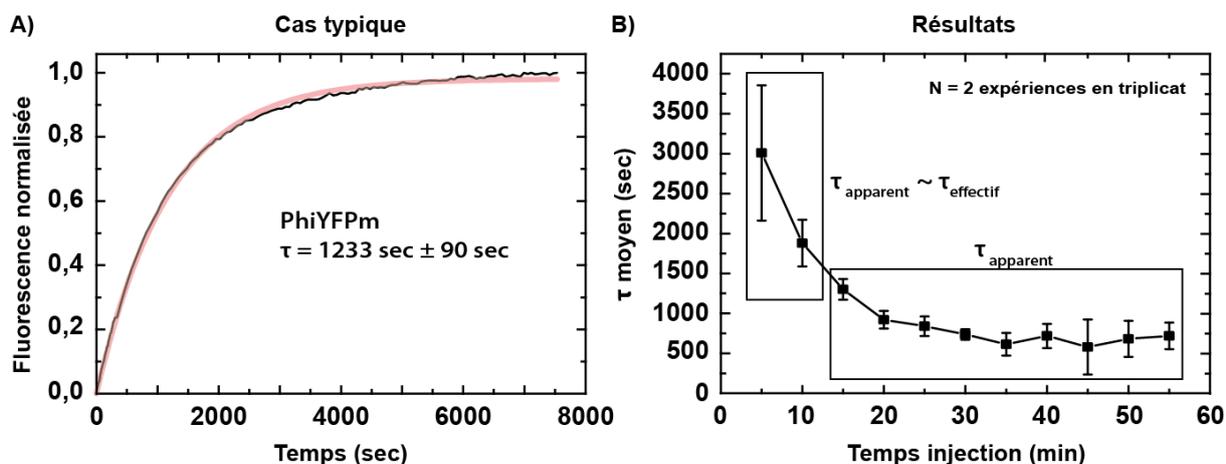


Figure 3.11 : (A) Ajustement d'une courbe expérimentale de PhiYFPm normalisée nous permettant d'obtenir la constante de temps  $\tau$ . Le tracé noir correspond aux données expérimentales. Le tracé rouge correspond à l'ajustement selon l'Equation 3. (B) Graphique présentant l'évolution de la constante de temps  $\tau$  moyen (apparent et effectif) de maturation de la PhiYFPm en fonction du temps d'injection de l'antibiotique au cours de la production de protéines. Barres d'erreurs : Déviation standard (n = 6, 2 expériences indépendantes).

Encore une fois, il faut bien comprendre les mécanismes de l'expression et de la maturation afin de ne pas être induit en erreur dans le traitement des données expérimentales. En fonction du temps auquel l'antibiotique est injecté, deux populations de protéines seront présentes mais dans des proportions différentes : Les protéines nouvellement formées et les protéines en cours de maturation. La proportion de protéines en cours de maturation au moment de l'injection va influencer les résultats.

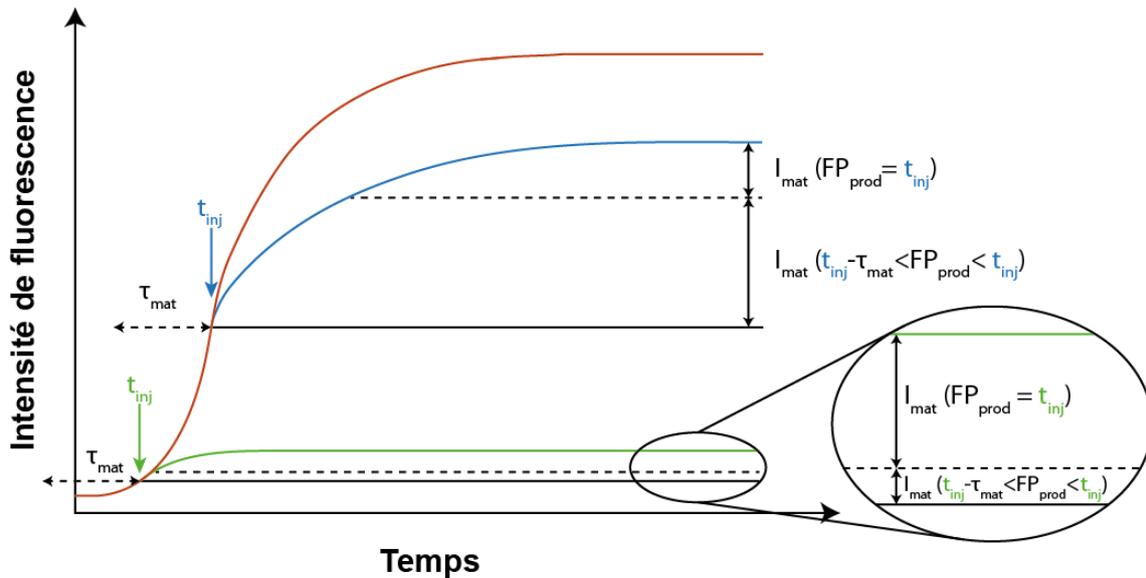


Figure 3.12 : Schéma d'explication de l'influence du temps d'injection sur les variations d'amplitude et de proportion de protéine en cours de maturation à un temps donné.  $I_{mat}(\tau_{mat}-t_{inj}<FP_{prod}<t_{inj})$  correspond à la variation d'intensité de fluorescence due à l'arrivée à maturité d'une proportion de protéines produites avant l'injection.  $I_{mat}(FP_{prod} = t_{inj})$  correspond à la proportion de protéines nouvellement formées qui n'étaient pas encore en maturation au moment de l'injection.  $t_{mat}$  correspond au temps de maturation d'une protéine.

En début de réaction, l'intensité de fluorescence liée à la proportion de protéines, produites avant injection et déjà en cours de maturation (soit  $I_{mat}$  pour  $\tau_{mat}-t_{inj}<FP_{prod}<t_{inj}$ ) sera faible par rapport au nombre de protéines qui commencent leur maturation à l'injection (soit  $I_{mat}$  pour  $FP_{prod} = t_{inj}$ ). Cette quantité va augmenter au cours du temps pour atteindre un maximum une fois que le système aura atteint le régime permanent.

Ici  $\tau_{mat}$  est le temps de maturation d'une protéine. Il est indiqué sur la Figure 3.12 afin d'illustrer le fait qu'une protéine participera à la fluorescence globale du système non pas directement suite à sa production, mais après un temps, inhérent à chaque protéine, représenté par la ligne en pointillés terminée par deux flèches.

Au moment de l'injection au temps  $t$ , les protéines produites à  $t-\tau_{mat}$  vont apparaître comme fluorescentes. Ces protéines en cours de maturation au moment de l'injection agissent donc comme un biais dans la détermination de la constante de temps de maturation, puisqu'elles vont être fluorescentes plus tôt que les protéines tout juste produites, diminuant ainsi virtuellement les constantes de temps de maturation [Figure 3.11 B].

Ceci explique pourquoi dans la Figure 3.11 B les  $\tau$  moyens diminuent avec l'augmentation du temps d'injection. Les  $\tau$  apparents ne correspondent donc pas au  $\tau$  de maturation de la protéine fluorescente. Afin d'estimer la véritable durée de maturation, il faut

réaliser l'ajustement des courbes pour des temps courts d'injection, car ils permettent de limiter le nombre de protéines dont la maturation est bien avancée au moment de l'injection.

L'évaluation de la valeur de  $\tau$  aux temps courts présente néanmoins un inconvénient, car comme nous pouvons le constater sur la Figure 3.11 B, les valeurs de déviation standard pour les  $\tau$  sont assez élevées.

La déviation standard montre un comportement similaire à la courbe des valeurs moyennes puisqu'elle est très élevée au début et tend à diminuer et à se stabiliser avec l'augmentation du temps auquel est réalisée l'injection de l'antibiotique.

Aux temps courts d'inhibition, il y a un faible nombre de protéines fluorescentes. Du fait de ce faible nombre de protéines, la sensibilité de la détection peut s'en trouver affectée. De plus, la variabilité puit à puit, telle que la quantité de milieu d'expression, le  $t = 0$  de début d'expression, c'est-à-dire le temps entre la préparation des échantillons, la répartition de ceux-ci et le début de l'incubation, peuvent ajouter un biais dans le suivi de l'expression [Figure 3.11 B].

L'approche que j'ai utilisée a été de bloquer la production de protéines à différents temps. Nous avons alors remarqué qu'il existait « deux régimes de  $\tau$  » : un régime variable et décroissant suivi d'une phase où la constante de temps de maturation n'évoluait plus. Suite aux réflexions sur l'analyse des résultats, je me suis rendu compte de l'influence que pouvaient avoir les protéines en cours de maturation avant l'injection de l'inhibiteur et qu'il faut absolument prendre ce facteur en compte lors de l'étude de la maturation de nos protéines fluorescentes. Ainsi, le premier régime de  $\tau$ , aux temps courts, représente l'estimation la plus fiable du temps réel de maturation de la PhiYFPm, avec une valeur de  $\tau = 1880$  secondes pour  $t = 10$  minutes. Néanmoins, comme je le faisais remarquer, il serait de bon ton de réaliser plus d'expériences et cela dans un cadre plus automatisé, permettant ainsi de limiter la variabilité expérimentale. En effet, notre approche est ici limitée en partie par la vitesse d'exécution de l'expérimentateur. Il serait donc très intéressant de développer un système permettant de paralléliser des expériences tout en augmentant le nombre de temps d'injection et en réduisant l'intervalle de temps entre celles-ci. Une approche robotisée comme il est possible de trouver dans le cadre d'essais parallélisés de cristallisation de protéines, ou bien une approche microfluidique en gouttes pourraient être des solutions envisageables.

## **2.2 Application de la méthode à des variantes de la GFP et à la mcherry**

Dans le cas de la PhiYFPm nous avons pu obtenir des résultats avec un modèle simple d'exponentielle afin de réaliser l'ajustement des courbes. Nous avons aussi travaillé avec d'autres variantes de protéines fluorescentes vertes comme la GFPmut 2 qui comporte quatre mutations par rapport à la wtGFP (S65A, V68L, S72A et H231L), une « Emerald » GFP (EmGFP) (F64L, S65T, S72A, N149K, M153T, I167T et H231L) et une « Destabilized » GFP (DeGFP) qui comporte deux délétions (N-term-Del-6 et Del-9-C-term) ainsi que deux mutations par rapport à la GFP wt (F64L et S65T). De plus nous avons aussi travaillé sur une protéine fluorescente rouge, mcherry, dont le mécanisme de maturation est plus complexe et notoirement plus long (Verkhusha et al., 2001).

Dans le premier cas, la simple exponentielle sous-entend qu'il n'y a qu'une seule étape présente dans la maturation de la protéine ou que les étapes se produisent à la même vitesse. Dans le cas des variantes de la GFP on n'obtient pas le même comportement de la variation de la fluorescence tout au long de l'expérience. On peut observer sur la Figure 3.14 que les tracés issus de données expérimentales correspondent bien à un modèle de simple exponentielle. Néanmoins, au cours de la variation de la fluorescence sur l'ensemble de l'expérience, nous pouvons observer que les tracés s'écartent du modèle précédent (partie grisée des courbes) [Figure 3.13].

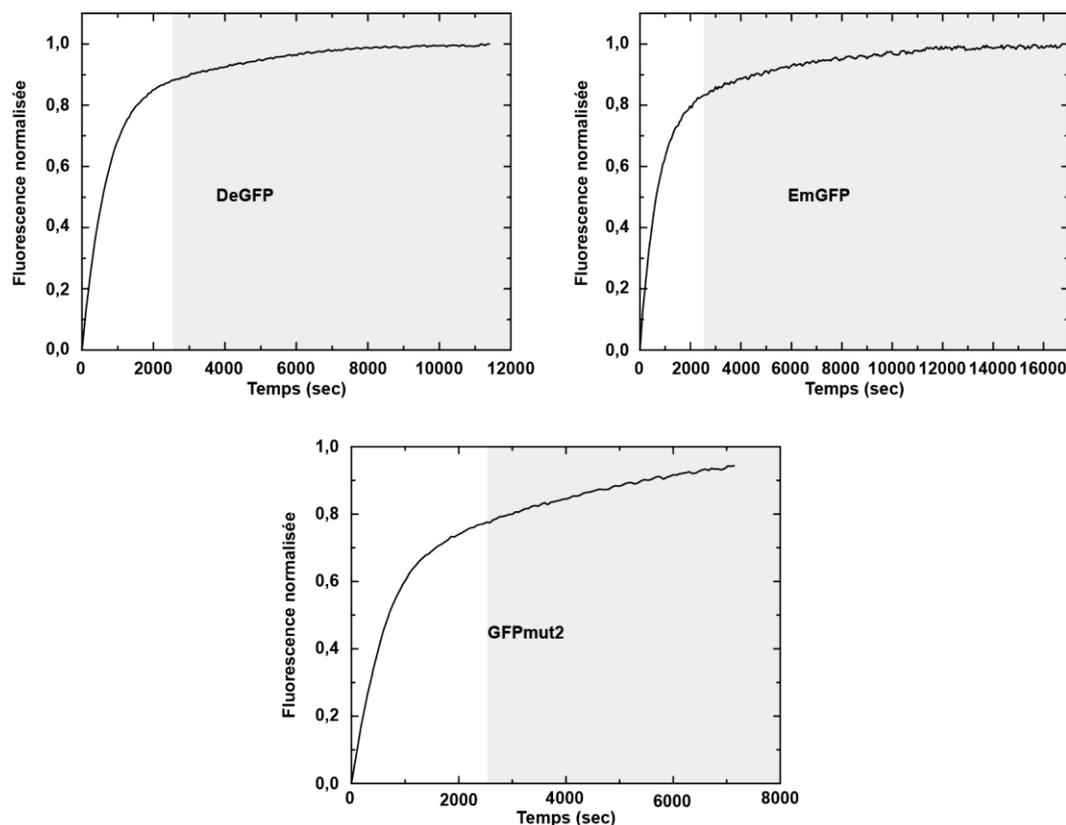


Figure 3.13 : Courbes expérimentales de variantes de la GFP normalisées présentant un double comportement : Simple exponentiel (partie blanche), bi-exponentiel (partie grise)

On observe typiquement le ralentissement de la réaction et tout porte à croire que la réaction d'oxydation est plus lente. En effet, l'oxydation nécessitant la présence d'oxygène moléculaire, il est possible que l'herméticité du système, due à la couche d'huile minérale, engendre un appauvrissement en oxygène disponible pour la réaction d'oxydation.

Une étude a d'ailleurs montré dans un système comparable de très faible volume mais non hermétique, que les cinétiques sont bien mono-exponentielles (Macdonald et al., 2012). Ceci est permis par le rapport surface sur volume permettant une meilleure diffusion des gaz.

Pour les résultats, nous ne nous basons donc que sur la première partie de la courbe qui répond au modèle d'une simple exponentielle, ce qui nous permet également d'extraire des constantes  $\tau$  pour chacun des mutants de la wtGFP [Figure 3.14].

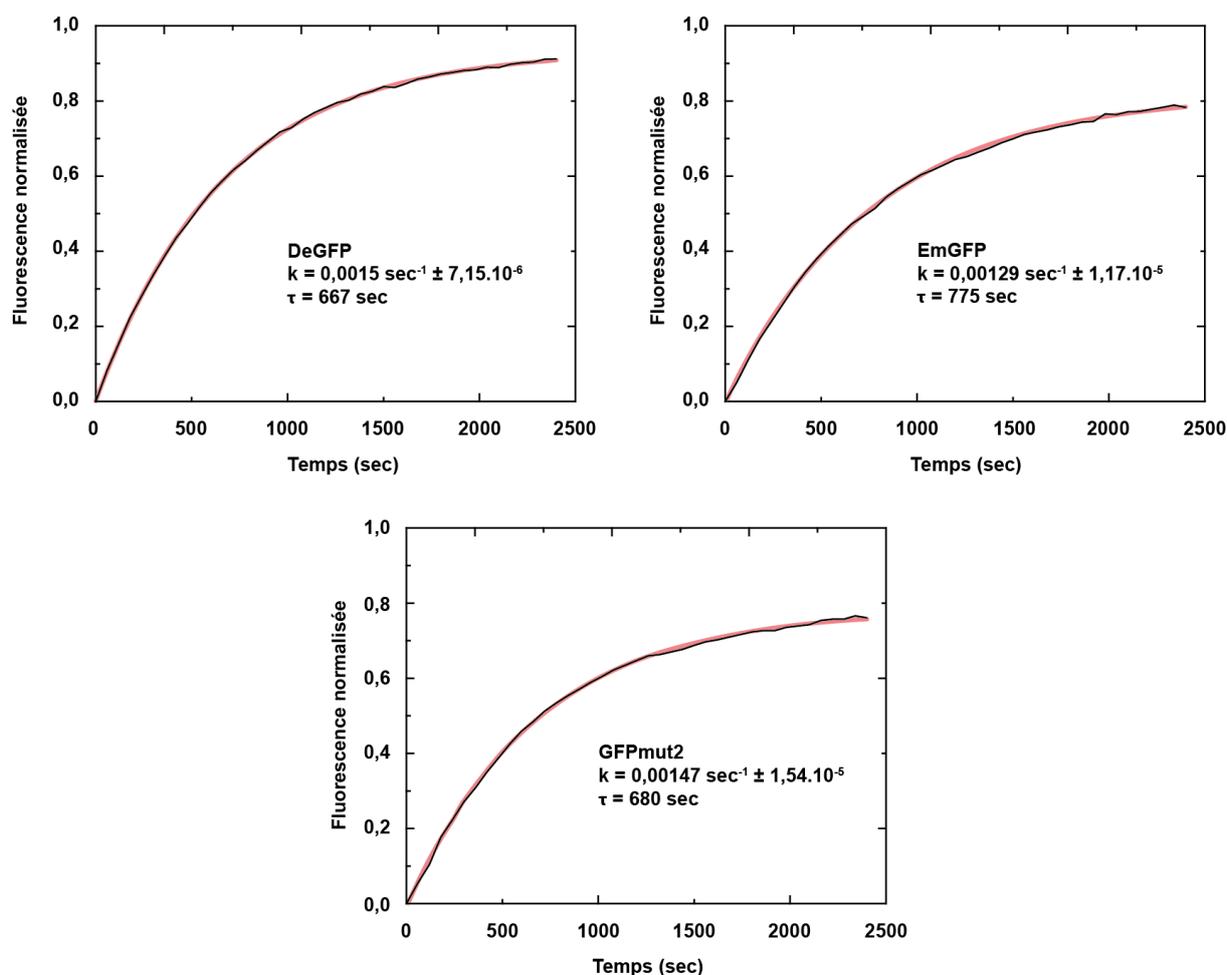


Figure 3.14 : Ajustement de courbes expérimentales de variantes de la GFP normalisées permettant d'obtenir la constante de temps  $\tau$ . Le tracé noir correspond aux données expérimentales. Le tracé rouge correspond à l'ajustement selon l'Equation 3.

Dans le cas de la mcherry, l'augmentation de l'intensité de fluorescence s'accroît après un délai initial [Figure 3.15]. On peut trouver un point d'inflexion sur la courbe suivi d'une décélération de l'augmentation et enfin un plateau de saturation final. Le processus de maturation de la mcherry peut en théorie se présenter en trois étapes (Verkhusha et al., 2001), car après le repliement et la cyclisation du chromophore, celui-ci doit subir deux oxydations successives (Shu et al., 2006). La première oxydation permet de former un intermédiaire fluorescent vert, tandis que la seconde augmente la conjugaison de la double liaison, engendrant par la même occasion un déplacement du spectre d'absorption et d'émission vers des longueurs d'ondes plus longues (Matz et al., 1999).

La mcherry est connue pour avoir des temps de maturation plus longs (Hebisch et al., 2013) que les autres variantes fluorescentes. Au regard des données expérimentales [Figure 3.15] nous avons choisi de faire un ajustement par une courbe sigmoïdale, en lieu et place de l'équation utilisée pour les cas précédents. Modéliser la variation d'intensité de fluorescence

par cette équation permet d'avoir accès à des constantes de temps liées à une maturation.

Équation 4 
$$I(t) = I_{max} \left( \frac{t^n}{\tau^n + t^n} \right)$$

Où  $\tau$  est le temps à la demi-amplitude.

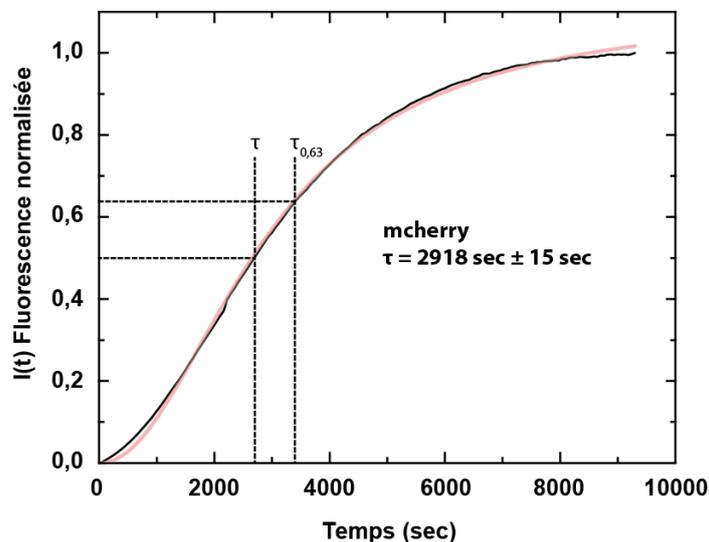


Figure 3.15 : Ajustement d'une courbe expérimentale de mcherry normalisée nous permettant d'obtenir la constante de temps  $\tau$ . Le tracé noir correspond aux données expérimentales traitées comme pour la Figure 3.8. Le tracé rouge correspond à l'ajustement selon l'Equation 4.

La méthode développée dans ce chapitre est une application directe du système d'arrêt de la traduction vue au chapitre 2. Dans le cadre de l'étude de la maturation de protéines fluorescentes, notre méthode se révèle efficace et simple à mettre en place, si l'on prête attention aux mécanismes moléculaires relatifs à la maturation des protéines.

Dans le cas présent l'étude des tracés des variations d'amplitude de fluorescence n'est pas une méthode en soi mais offre un bon aperçu du temps de maturation des protéines fluorescentes. *A contrario*, l'ajustement des courbes selon un modèle mathématique donne une valeur précise de la cinétique de maturation des protéines fluorescentes [Tableau 3.1]. Comme je le mentionnais précédemment, il faut toutefois être très attentif aux mécanismes qui régissent l'expression des protéines afin de ne pas biaiser l'étude. De plus, chaque protéine étant différente, il est évident qu'il faut réaliser des ajustements, tels que l'utilisation d'un modèle exponentiel ou sigmoïdal, en fonction de la protéine fluorescente.

Au fil des différentes études réalisées par différents groupes, des valeurs très différentes ont pu être mises en évidence. Nous pouvons aussi comparer nos valeurs à celles des autres groupes et constater qu'elles diffèrent souvent du simple au double [Tableau 3.1].

### Chapitre 3 : Etude cinétique de la maturation des protéines en milieu « Cell-free »

Ces différences sont notamment dues aux systèmes utilisés. De plus, certaines études n'ont pas tenu compte de l'influence des protéines produites avant le blocage du système et sous-estiment probablement le temps de maturation.

Protéines		WtGFP	GFP mut2	EmGFP	DeGFP <sup>b</sup>	PhiYFPm	mCherry
<b>Mutations</b>		-	S65A V68L S72A H231L	F64L S65T S72A N149K M153T I167T H231L	N-term del 6 F64L S65T C-term del 9		
<b>Études précédentes</b>	$\tau$ (sec)	3200 <sup>a</sup> 7200 <sup>c</sup>	450 <sup>a</sup>	710 <sup>a</sup>	480-510 <sup>b</sup>	-	4662 $\pm$ 510 <sup>c</sup>
<b>Notre étude</b>	$\tau$ (sec)	-	1049 $\pm$ 120	1314 $\pm$ 245	1018 $\pm$ 129	1880 $\pm$ 292	2313 $\pm$ 175

Tableau 3.1 : Ensemble de  $\tau$  de maturations de GFP et de ses variantes. (<sup>a</sup>) valeurs provenant de Iizuka et al., 2011, (<sup>b</sup>) valeur provenant de Shin et Noireaux, 2010, (<sup>c</sup>) valeur provenant de Hebisch et al., 2013.

### 3. Conclusion et limitations

Au cours de ce chapitre, nous avons pu constater que la technique que nous avons développée est très simple à mettre en œuvre et permet une étude versatile de la cinétique de maturation des protéines fluorescentes. Il est à noter que dans le cadre de cette étude, les protéines n'ont pas toujours un comportement mono-exponentiel. Le cas des variantes de la GFP nécessite, au contraire de la PhiYFPm, de réaliser l'ajustement des courbes sur des parties réduites de celles-ci, où le modèle correspond aux résultats expérimentaux. Ceci s'explique assez aisément par le fait que la maturation des protéines se fait en plusieurs étapes dont la dernière est considérée comme limitante. De plus, il est très probable que le système s'appauvrisse en oxygène au cours du temps entraînant par la même occasion un ralentissement de l'oxydation des protéines et donc de l'apparition de la fluorescence. Notre étude se faisant sur un système aérobie, les étapes ont lieu de manière confondue au sein du système, à l'inverse de la méthode présentée précédemment [1.2.2.2] où seule l'oxydation du chromophore est suivie.

Le cas de la mcherry est un peu particulier puisque son processus de maturation comporte une étape supplémentaire d'oxydation qui n'est pas présente chez les variantes de la GFP, lui octroyant un temps de maturation beaucoup plus long. Cette protéine suit une maturation dont l'évolution de la fluorescence suit un tracé de type sigmoïdale dont nous avons déterminé la constante de temps de maturation.

Dans la littérature, il est possible de trouver différentes études de la maturation de protéines fluorescentes et les valeurs obtenues pour les constantes de temps de maturation sont très variables, en fonction du système employé, *in vivo* chez *E. coli* (Khmelinskii et al., 2012) ou *S. cerevisiae* (Gordon et al., 2007), *in vitro* (Iizuka et al., 2011), mais aussi en fonction de la température ou du volume de solution de réaction ainsi que du tampon.

La méthode que j'ai développée au cours de mes travaux de thèse représente une alternative robuste à l'utilisation de l'ARNase afin de bloquer la traduction (Shin et Noireaux, 2010). Comme nous avons pu le montrer au chapitre précédent, cette méthode nous permet de conserver un système dynamique puisqu'il est possible de relancer la synthèse de protéines. De plus, du fait qu'il s'agisse d'un système CFRPS, il est possible de modifier sa composition en ajoutant par exemple un système enzymes-substrats qui permet de supprimer l'oxygène présent dans le milieu d'expression afin de bloquer la maturation des chromophores (Iizuka et

al., 2011). Il s'agit donc d'une technique efficace dans le but de travailler sur des systèmes de complémentation fonctionnelle (Kerppola, 2008) ou de faire du criblage de protéines fluorescentes afin, de développer des protéines comportant un temps de maturation toujours plus rapide, la vitesse de maturation des protéines fluorescentes étant un aspect primordial dans l'étude de processus biologiques tels que l'expression génique.

## Chapitre 4 : Liposomes et protéoliposomes : préparation et applications

Les liposomes sont des entités sphériques délimitées par une membrane constituée de molécules amphiphiles formant une bicouche lipidique. Ils sont nommés protéoliposomes lorsque leur membrane contient des protéines.

Dans ce chapitre, nous décrivons tout d'abord les principaux types de liposomes, les propriétés et les principales applications qui y sont associées. Nous présentons ensuite les grandes classes de méthodes permettant de les préparer (hydratation, électroformation, méthodes de transfert et approches microfluidiques). Puis, nous discutons les avantages et les inconvénients de celles-ci en termes de caractéristiques des liposomes formés (lamellarité, taille, encapsulation) et de performances techniques (robustesse, rendement, mise en œuvre). Nous nous intéressons enfin plus spécifiquement aux protéoliposomes, en montrant tout particulièrement l'intérêt des systèmes « cell-free » aussi bien pour leur préparation que pour les applications qui en découlent.



## Sommaire

<b>Introduction .....</b>	<b>149</b>
<b>1. Les vésicules artificielles : le cas du liposome .....</b>	<b>151</b>
1.1 Définition.....	151
1.1.1 Les vésicules.....	151
1.1.2 Les liposomes, une catégorie de vésicules à part entière .....	151
1.1.2.1 Classification morphologique des liposomes .....	152
1.1.2.2 Les lipides : unités de base des liposomes.....	153
1.2 Principales applications des liposomes.....	156
1.2.1 Small Unilamellar Vesicles (SUVs) et Large Unilamellar Vesicles (LUVs).....	156
1.2.2 Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) .....	158
<b>2. Techniques de production des vésicules unilamellaires géantes.....</b>	<b>163</b>
2.1 Hydratation d'un film de lipides.....	163
2.2 Electroformation .....	165
2.3 Transfert de gouttes .....	166
2.3.1 Transfert spontané.....	166
2.3.2 Centrifugation .....	168
2.3.3 cDICE .....	169
2.4 Approches microfluidiques.....	169
2.4.1 Le « jetting » .....	170
2.4.2 La jonction en T .....	171
2.5 Bilan des techniques de production .....	172
<b>3. Les protéoliposomes : préparation et applications .....</b>	<b>175</b>
3.1 Méthode historique de production de protéoliposomes.....	175
3.2 Une variante de la méthode historique .....	176
3.3 Approche « Cell-free » .....	179
3.3.1 Solubilisation post-expression par des détergents.....	179
3.3.2 Stabilisation co-traductionnelle par des détergents.....	179
3.3.3 Insertion co-traductionnelle des protéines dans une membrane.....	180
3.3.4 Exemples de mise en application : la production de protéoliposomes .....	182
<b>4. Des liposomes aux protéoliposomes : bilan et perspectives.....</b>	<b>185</b>



# Introduction

Les membranes lipidiques sont des éléments primordiaux impliqués dans la physiologie des bactéries et des cellules eucaryotes. En particulier, les vésicules comportant une bicouche lipidique interviennent dans des processus allant du trafic inter-organelles (Golgi, réticulum endoplasmique) et intracellulaire, aux phénomènes de sécrétion.

L'étude de la biophysique des membranes, de la lipidomique et des protéines membranaires présente un intérêt considérable pour mieux comprendre, non seulement les mécanismes physiologiques de division cellulaire, de signalisation extra-intracellulaire. Mais aussi pour développer des technologies en lien avec les domaines de la médecine en vue de réaliser des solutions vaccinales (Gregoriadis et al., 2002) ou du ciblage cellulaire dans le but de délivrer des traitements thérapeutiques (Lao et al., 2013) ; ou encore, et pour ne citer qu'eux, de réaliser de l'imagerie (Dasa et al., 2015).

L'étude des membranes natives de cellules étant très complexe du fait du grand nombre de molécules impliquées dans leur composition, il y a un enjeu très important à la préparation de vésicules unilamellaires, à l'échelle de la taille d'une cellule. Ces objets représentent un modèle simplifié très proche de la membrane plasmique d'une cellule.

Ainsi depuis une quarantaine d'années, les liposomes sont étudiés et plusieurs livres ont été rédigés, sur leurs méthodes de préparation, leurs propriétés et leurs applications (Walde et al., 2010) (Fenz and Sengupta, 2012).

Dans ce chapitre, nous évoquerons les concepts de vésicules artificielles. Nous constaterons qu'il existe plusieurs catégories de vésicules artificielles en fonction de leurs constituants et de leurs tailles et que leurs utilisations dépendent de ces paramètres. Dans le cadre de la thèse, nous nous sommes intéressés à une catégorie de vésicules nous permettant de réaliser un suivi par microscopie optique de notre système et qui présente des caractéristiques similaires à une membrane cellulaire. C'est donc tout naturellement que nous nous sommes orientés vers les liposomes géants, des vésicules de taille et de composition pouvant être assimilables à un système cellulaire simplifié. Je limiterai donc l'exposé à la production de ce type de vésicules, ceux-ci étant, comme nous le montrerons, de très bons candidats pour l'étude des protéines membranaires dans un environnement proche de celui de la membrane cellulaire.



# **1. Les vésicules artificielles : le cas du liposome**

## **1.1 Définition**

L'existence de différents types de vésicules implique l'utilisation d'une terminologie spécifique. La terminologie utilisée dépendra de leur composition ou leur origine. Le terme de vésicules artificielles est souvent employé pour distinguer les vésicules préparées *in vitro* des vésicules existantes *in vivo*, comme les vésicules de trafic intracellulaire ou les organelles présentes dans le cytoplasme des cellules eucaryotes.

### **1.1.1 Les vésicules**

Les vésicules artificielles correspondent à un type de compartiment spécifique formé *in vitro*, généralement en milieu aqueux. Le compartiment formé par une vésicule est constitué d'un faible volume aqueux délimité par une ou plusieurs couches très fines, composées de molécules amphiphiles, aussi appelées membranes. Il s'agit souvent de molécules de faible poids moléculaire comme les lipides naturels ou synthétiques (lipides cationiques, biotinilés, *etc.*), les surfactants synthétiques et les blocs copolymères amphiphiles, dont les propriétés amphiphiles permettent de former des bicouches. Ainsi les vésicules artificielles peuvent être de composition très différente. Les vésicules constituées par exemple de polymères seront qualifiées de polymersomes. Cette catégorie de vésicules présente des caractéristiques très différentes en fonction des polymères constituant la membrane, de plus il est très aisé de faire varier la nature chimique des polymères. Néanmoins, dans le cadre de recherches biomimétiques, les vésicules composées de lipides représentent un meilleur modèle, je limiterai donc mon exposé à la présentation des caractéristiques de ce modèle.

### **1.1.2 Les liposomes, une catégorie de vésicules à part entière**

La communauté scientifique qualifie de liposomes les vésicules dont la composition membranaire sera constituée de lipides comme ceux présents dans les membranes biologiques (eucaryote ou procaryote) tels que la Phosphatidylcholine (PC), palmitoyl-oleyl-sn-phosphatidylcholine, ou bien synthétiques.

Les lipides, tels que les phospholipides qui peuvent constituer la membrane d'un liposome, sont constitués d'une partie hydrophile ainsi que d'une partie hydrophobe (c'est-à-dire lipophile). C'est pourquoi dans un milieu aqueux, ils s'agrègent, soit dans leur état cristallin, soit en structures organisées comportant une symétrie cristalline liquide lyotropique typique en résultat de l'effet hydrophobique induit par l'eau qui les solvate (Gennes and Prost, 1995). A haute concentration dans l'eau, les lipides forment des structures sphériques ou ovoïdes refermées, dans lesquelles une ou plusieurs bicouches encapsulent le solvant (Bangham and Horne, 1964).

### **1.1.2.1 Classification morphologique des liposomes**

D'un point de vue morphologique, les liposomes sont classifiés en fonction de leur taille et du nombre de bicouches dont ils sont composés (lamellarité) [Figure 4.1]. Les vésicules unilamellaires présentent un intérêt tout particulier pour la recherche, du fait de leurs caractéristiques membranaires définies et de préparation simple. Elles sont divisées en trois catégories en fonction de leur taille : Small Unilamellar Vesicle (SUV), Large Unilamellar Vesicle (LUV) et enfin les Giant Unilamellar Vesicle (GUV). Comme pour les micro- et nanotechnologies, plus l'objet sera petit plus le rapport surface sur volume sera grand et inversement, conférant à ces objets des propriétés très différentes et donc des applications en conséquence. Les vésicules multilamellaires (MLV) présentent des propriétés physiques et un comportement très différent des espèces unilamellaires, celle-ci sont couramment utilisées dans les applications industrielles comme le ciblage thérapeutique.

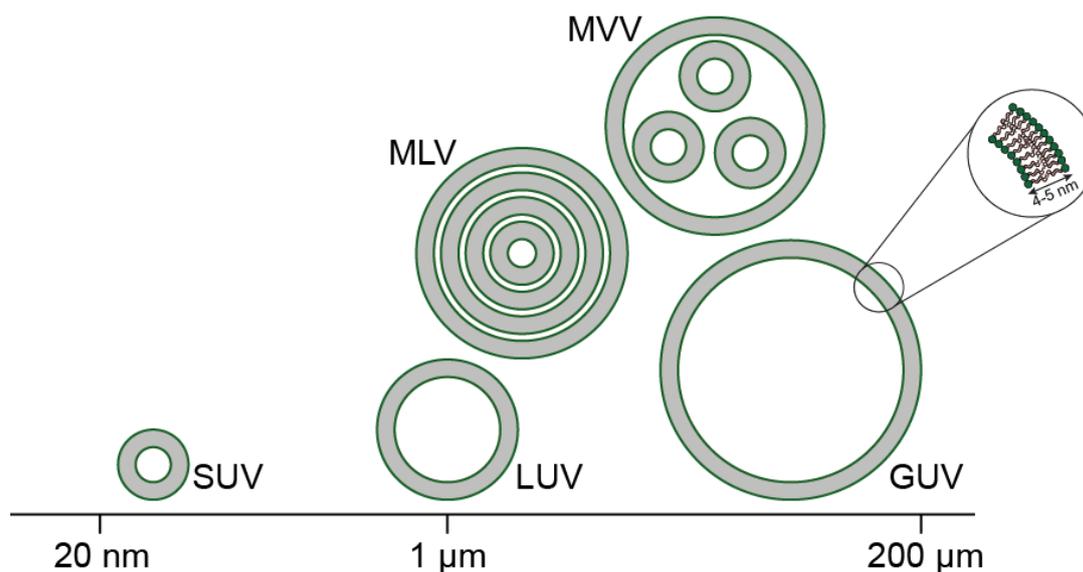


Figure 4.1 : Représentation schématique de la classification des liposomes. Ils sont subdivisés en trois catégories en fonction de leur diamètre : de l'échelle nanométrique (environ 20 – 90 nm) pour les SUVs et les LUVs (environ 100 – 1 µm), au micromètre pour les vésicules unilamellaires géantes (GUVs > 5 µm). Les vésicules multivésiculaires (MVV) sont des GUVs.

### 1.1.2.2 Les lipides : unités de base des liposomes

Les lipides sont l'unité de base de construction des membranes des liposomes. Ils ont une tête hydrophile et une queue hydrophobe [Figure 4.2]. En solution aqueuse, les lipides se réarrangent spontanément afin que leurs chaînes hydrophobes ne soient plus en contact avec l'eau ; soit en monocouches (cas des micelles) soit en bicouches comme pour les membranes et les vésicules. Au sein d'une membrane ou bicouche, les lipides sont arrangés en deux feuillets de telle sorte que leur tête hydrophile est en contact avec le milieu aqueux, alors que leur partie hydrophobe s'associe pour former la partie interne de la bicouche. La même situation est retrouvée dans le cas d'une vésicule unilamellaire. La membrane de la vésicule est construite à partir d'une seule bicouche de lipides membranaires exposant leurs têtes hydrophiles au volume aqueux interne lorsqu'il s'agit des lipides de la face interne de la bicouche et respectivement les groupements hydrophiles de la face externe de la bicouche au milieu aqueux externe [Figure 4.2]. Les lipides peuvent se décomposer en plusieurs sous familles dont trois sont représentatives des lipides présents dans les membranes biologiques : les phospholipides, les sphingolipides et les stérols. A l'instar des membranes biologiques, ces catégories de lipides sont retrouvées dans les liposomes dans des proportions variables.

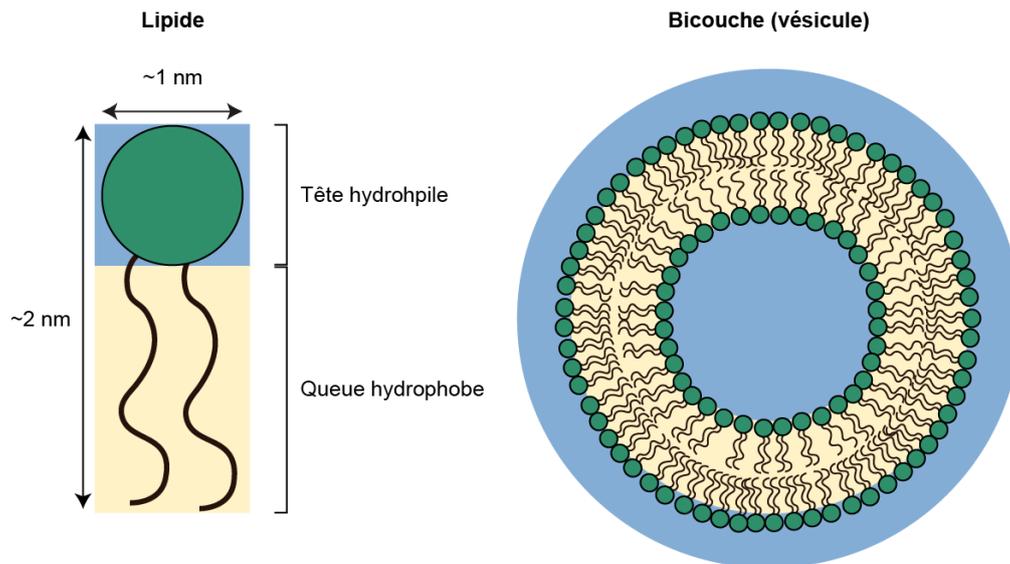


Figure 4.2 : Représentation schématique de la réorganisation des lipides. A gauche, un schéma typique d'un lipide dont la tête est hydrophile et la queue est hydrophobe. A droite, un schéma d'une bicouche de lipides refermée sur elle-même pour former une vésicule.

Les phospholipides sont caractérisés au niveau de leur tête hydrophile par un groupement phosphate [Figure 4.3], un glycérol et un groupement de nature variable (X) chargé, anionique (Sulfates, carboxylates, sulfonates), cationique (ammoniums), polaire non-chargeé (fonction alcool) ou plus complexe (Alcynes) [Figure 4.3 A]. Le glycérol est estérifié par deux acides gras qui constituent la queue hydrophobe du lipide, ici R1 et R2 sont les chaînes hydrophobes de type  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$  comportant 14 à 24 atomes de carbone. Des doubles liaisons (qualifiées d'insaturations) peuvent être présentes au niveau de la chaîne de carbone. La fluidité de la membrane dépendra de la longueur des chaînes carbonées et du nombre d'insaturations des chaînes de lipides. Une insaturation entraînant un coude de la chaîne carbonée favorisera un plus grand désordre dans la bicouche et par conséquent une augmentation de la fluidité. L'effet inverse se produit en présence de longues chaînes saturées. Enfin, les phospholipides peuvent présenter une structure tridimensionnelle occupant un espace cylindrique ou conique [Figure 4.3 B] (Lee et al., 1993). Cette différence peut avoir des conséquences sur la courbure de la membrane du liposome, en particulier lorsque la composition lipidique des deux feuilletts est asymétrique.

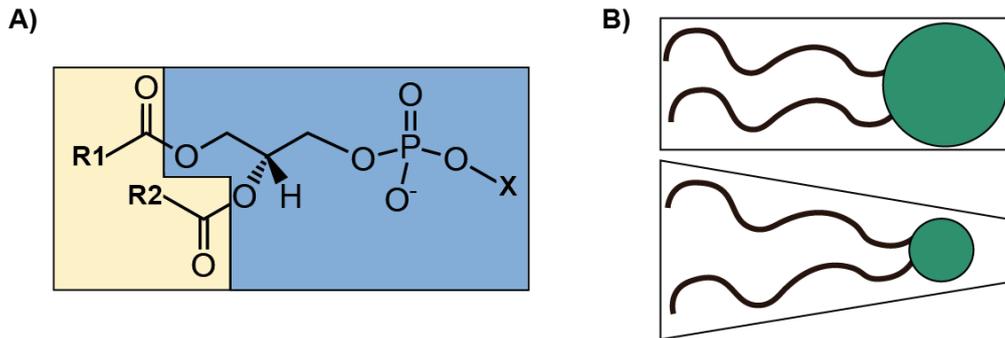


Figure 4.3 : Formule et structure d'un lipide. (A) Formule d'un phospholipide type. (B) Représentation schématique de l'espace occupé par un lipide

Les sphingolipides sont des lipides complexes, dérivés de la molécule de sphingosine, présents entre autres dans les membranes plasmiques. Ils résultent de l'amidification d'un acide gras sur une sphingosine. Ils se différencient des phospholipides par la présence d'un groupement céramide à la place du groupement glycérol. De plus, leurs chaînes carbonées sont en général plus longues et plus saturées. En fonction de la nature du substituant (R sur la Figure 4.4), on distingue notamment les céramides, les phosphosphingolipides et les glycosphingolipides.

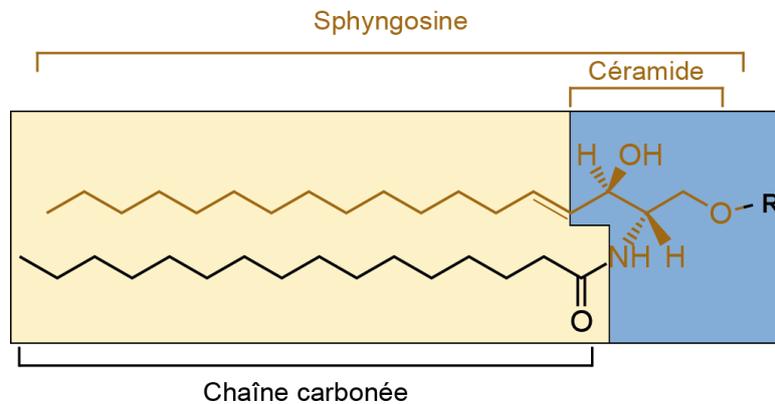


Figure 4.4 : Structure chimique générique d'un sphingolipide. Le groupe R peut être un atome d'hydrogène pour un céramide, la phosphocholine pour une sphingomyéline ou un ose pour un glycosphingolipide.

Enfin, les lipides de la famille des stérols ont une structure très différente des précédentes. Un des membres de cette famille, le plus répandu dans les membranes biologiques, est le cholestérol. Il est constitué d'une très petite tête hydrophile et d'une queue hydrophobe unique très rigide. Dans les bicouches, il s'intercale entre les phospholipides.

### 1.2 Principales applications des liposomes

La taille des vésicules a des conséquences importantes sur leurs propriétés physico-chimiques et biologiques, incluant par exemple le volume encapsulé en fonction de la quantité de lipides et leur devenir dans l'organisme.

Si nous considérons les vésicules comme de simples objets géométriques sphériques, les caractéristiques qui pourront varier sont le diamètre, ainsi que l'épaisseur de leur membrane. Une vésicule unilamellaire aura typiquement une épaisseur de membrane d'environ 4-5 nm (Tahara and Fujiyoshi, 1994). Mais au-delà de la considération de l'épaisseur de la membrane, c'est surtout la lamellarité et le diamètre de la vésicule qui vont jouer un rôle prépondérant dans l'établissement des propriétés de la vésicule, par exemple, le volume d'un objet sphérique évolue avec la puissance 3 du rayon dudit objet. Ainsi, pour une augmentation de rayon d'un facteur 10, le volume interne d'une vésicule augmentera d'un facteur 1000. Les applications des vésicules vont ainsi grandement dépendre de leur taille, en effet dans le cadre d'applications nécessitant de la microscopie optique par exemple, les SUVs et les LUVs de par leur petite taille ne pourront pas être utilisées alors que les GUVs entrent tout à fait dans les limites de la microscopie optique.

#### 1.2.1 Small Unilamellar Vesicles (SUVs) et Large Unilamellar Vesicles (LUVs)

Dans le cas des SUVs qui possèdent un diamètre inférieur à 100 nm, l'épaisseur de la membrane n'est plus négligeable par rapport à la taille de la vésicule, ainsi le feuillet interne de la bicouche aura potentiellement un comportement différent du feuillet externe. En conséquence de quoi les caractéristiques de la membrane et les propriétés mécaniques de la bicouche peuvent varier de manière significative en fonction de la taille de la vésicule (Lin et al., 2012).

Du fait de la simplicité de leur préparation, de leur biocompatibilité et de leur faible toxicité, les SUVs produites à partir de phospholipides ont généré de grands intérêts dans les domaines de l'adressage de molécules thérapeutiques (Guo and Szoka, 2003), des bioréacteurs et des biocapteurs (Xu and Cheng, 2002). En effet une des principales applications des SUV est la vectorisation d'ADN pour des applications vaccinales (Perrie et Gregoriadis, 2000)(Gregoriadis et al., 2002)(Perrie et al., 2004).

Les SUVs ont aussi été abondamment utilisées dans un nombre important d'études biophysiques et font maintenant partie des modèles standard pour l'analyse de processus biologiques impliquant des membranes comme des membranes synthétiques (Finer et al., 1971)(Tortorella et London, 1994)(Mouret et al., 2014).

Une des propriétés importantes exploitées, du fait de leur taille, est leur haute vitesse de « tumbling » (culbute) qui, couplée aux mouvements indépendants des phospholipides, permet une bonne détection du signal RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) des lipides. Cette propriété rend possibles des études d'interactions entre des peptides ou des protéines avec les phospholipides de la membrane (Da Costa et al., 2006).

Dans une étude de Bolinger et al., 2004, l'équipe a développé un système de nanoconteneurs (SUVs) encapsulés à l'intérieur de LUVs, permettant un contrôle non-invasif du mélange des réactifs. Le système repose sur la propriété thermotropique du changement de perméabilité d'une bicouche lipidique pour des solutés polaires. Lorsque la température permet d'avoir une bicouche lipidique dans une phase fluide-organisée, les SUVs sont imperméables (Figure 4.5 A), alors que lorsque la température passe au-dessus d'un seuil, dépendant de la nature des lipides utilisés, la bicouche passe dans une phase fluide-désorganisée où les vésicules sont perméables (Figure 4.5 B).

Tout comme pour les GUVs que nous étudierons par la suite, les SUVs ont été utilisées pour la reconstitution de protéines membranaires, comme la stéaryle-CoA Désaturase et l' $\alpha$ -Hémolysine, respectivement des protéines eucaryotes et procaryotes (Goren and Fox, 2008)(Chalmeau et al., 2011).

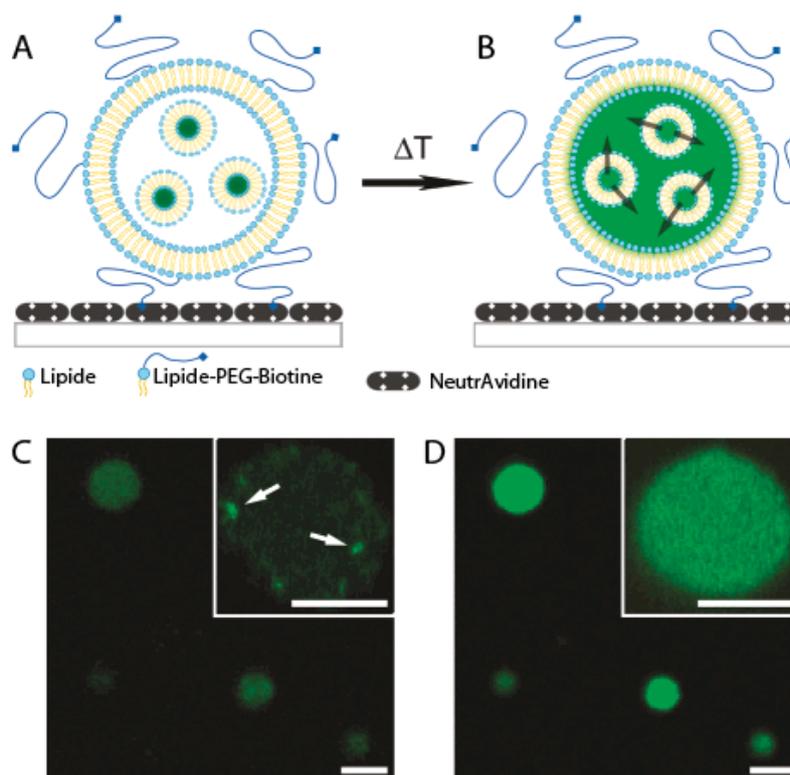


Figure 4.5 : Schéma récapitulatif du mécanisme de libération et du mélange de molécules hydrosolubles dans une vésicule immobilisée, induit par la température. (A) Une LUV contient des SUVs contenant un réactif soluble (Haute concentration de Carboxyfluorescéine, CF Fluorescence auto-quenchée = vert foncé). La LUV est immobilisée sur surface de verre grâce à l'interaction entre des lipides-PEG-Biotine et la neutravidine présente sur le verre. (B) L'augmentation de la température ( $\Delta T$ ) au-delà de la température à laquelle la bicouche lipidique est dans une phase fluide-organisée, entraîne la libération de la CF du confinement des SUVs. La dilution de la CF dans la LUV entraîne une augmentation de la fluorescence (abolition de l'auto-quenching). (C) Image de fluorescence en microscopie confocale de LUVs immobilisées sur du verre. Encart : Un grossissement supérieur permet d'observer les SUVs diffusantes (flèches blanches) dans une LUV. (D) Une augmentation de la température de 25 à 45 °C entraîne la libération du marqueur qui, sous l'influence de la dilution, récupère une intensité de fluorescence supérieure. Encart : L'augmentation de la fluorescence est uniforme au sein de la LUV accrochée à la surface. Barres d'échelles 5  $\mu\text{m}$ . (Bolinger et al., 2004)

### 1.2.2 Giant Unilamellar Vesicles (GUVs)

De par leur taille (5-200  $\mu\text{m}$ ) et composition membranaire, les vésicules géantes unilamellaires ressemblent grandement à des cellules ou à leurs compartiments subcellulaires que l'on peut trouver dans les différents types cellulaires.

Grâce à leurs caractéristiques membranaires mimant celles des cellules, les GUVs sont actuellement intensivement étudiées dans différents domaines de la chimie biomimétique et

de la biophysique des membranes. La Figure 4.6 est très représentative des possibilités que peuvent offrir les GUVs. Il est ainsi possible d'étudier leur membrane comportant des compositions variables ou asymétriques, d'utiliser des lipides permettant de fonctionnaliser la membrane ou d'insérer des protéines membranaires comme nous le verrons à la section 3. Enfin il est aussi possible d'encapsuler des solutions de compositions variées.

La taille des GUVs fait qu'elles permettent d'encapsuler des volumes de solution beaucoup plus importants que dans les SUVs, du femtolitre au picolitre. Les liposomes peuvent de manière très stable contenir des molécules alors qu'ils sont suspendus dans une solution aqueuse, permettant ainsi un contrôle de l'environnement interne du liposome. De par leur taille, ils peuvent servir de conteneur « déplaçable » et permettent de réaliser des réactions de manière contrôlée (Kulin et al., 2003). Elles ont donc été extensivement utilisées comme microréacteur permettant la réalisation de réactions en milieu confiné, où des phénomènes oscillatoires d'activité ou de stabilité accrue des enzymes peuvent être observés (Wang et Yau, 2007). Les réactions ont pu être contrôlées en ajoutant les réactifs au départ, comme avec l'encapsulation d'un système d'expression de protéine (Saito et al., 2009), par diffusion sélective de réactifs à travers la membrane depuis la solution extérieure, par fusion de liposomes ou encore grâce à la création d'un réseau de nanotubes lipidiques entre plusieurs vésicules (Karlsson et al., 2001).

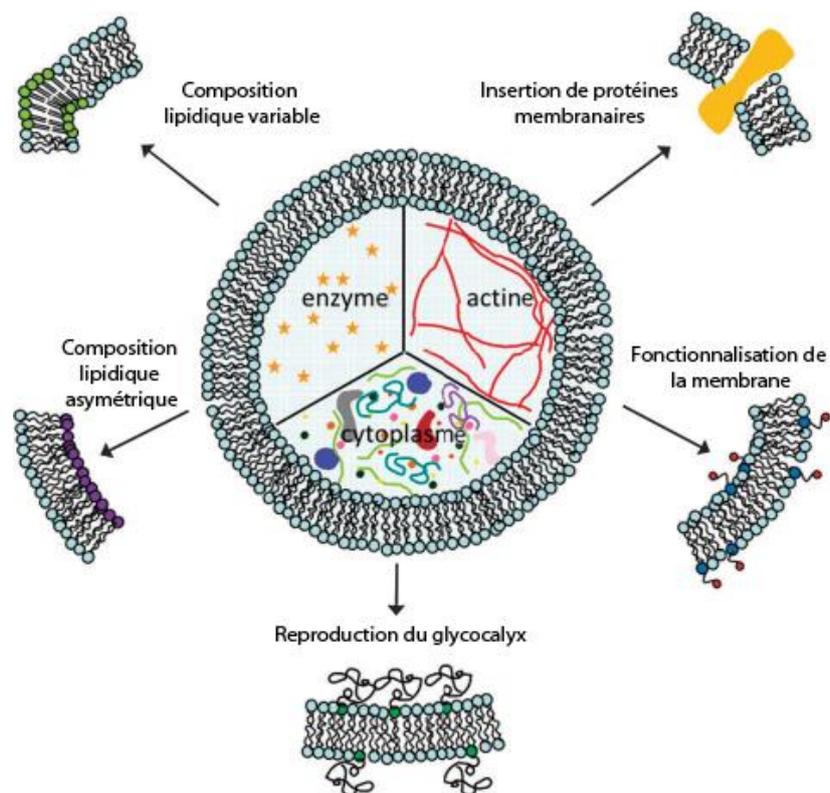


Figure 4.6 : Représentation schématique des différents types de modifications qui ont pu être apportées à des GUVs. Au centre de la GUV se trouvent les différents éléments issus de cellules qui ont pu être encapsulés pour réaliser des études. A la périphérie se trouvent les différents types de modification qui ont pu être apportées à la membrane (Fenz et Sengupta, 2012).

Une des applications les plus évidentes des GUVs est l'étude des propriétés physico-chimiques des membranes biologiques. Ces applications incluent l'étude des propriétés mécaniques des vésicules entières (Svetina et Žekš, 2002), comme l'étude de l'élasticité, la force et la perméabilité à l'eau de la bicouche contenant des lipides formant des micro-domaines (Rawicz et al., 2008), l'étude des propriétés mécaniques de la membrane (Portet et Dimova, 2010) en fonction de sa composition lipidique (Rawicz et al., 2008), de la formation de domaine lipidique [Figure 4.7] (Veatch et Keller, 2005)(Wesołowska et al., 2009), de la dynamique des lipides, ainsi que des phénomènes physiologiques comme la croissance membranaire, le bourgeonnement, la fusion et la fission des membranes [Figure 4.8].

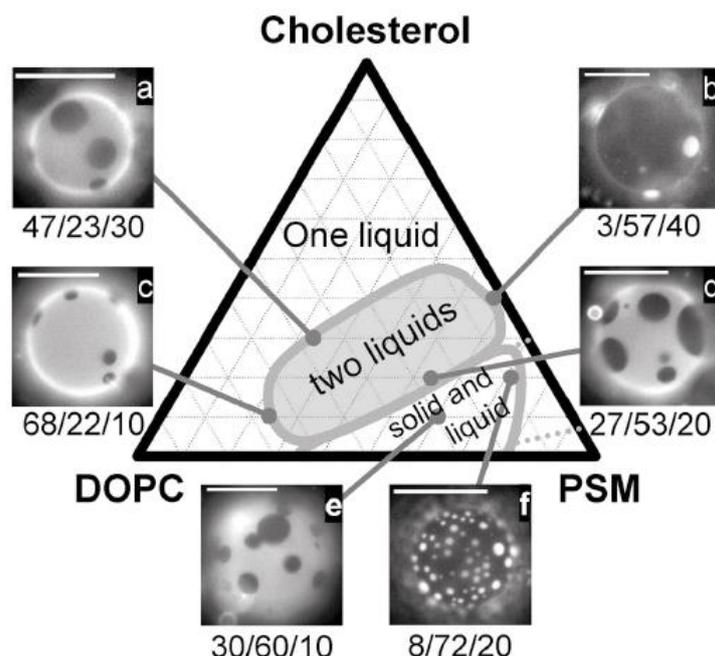


Figure 4.7 : Vésicules géantes de 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), Palmitoyl Sphingomyéline (PSM) et Cholestérol à 25 °C. Les vésicules sont imagées avant la coalescence complète des domaines. A l'examen des fractions de phases claires et sombres sur les vesicules, il peut être estimé que la phase sombre est riche en PSM et Chol alors que la phase claire est riche en DOPC. Les barres d'échelles de ces images en microscopie optique sont de 20  $\mu\text{m}$ . (Veatch and Keller, 2005)

Dans leur étude, Tanaka et al., se proposent d'étudier l'insertion d'un lipide à longues chaînes carbonées, la lysophosphatidylcholine (Lyso-PC), dans la membrane de GUVs et l'influence que cela peut avoir sur la déformation de celles-ci [Figure 4.8].

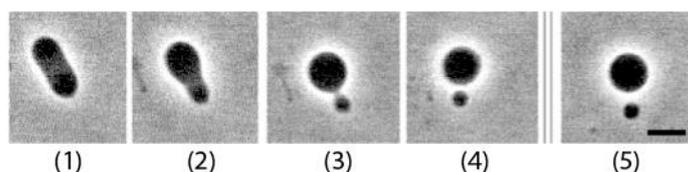


Figure 4.8 : Changement de forme d'une GUV (DPPC/40% cholestérol) grâce à l'addition de lyso-PC 1  $\mu\text{M}$  à 20 °C. L'ovoïde change de forme pour prendre une forme de poire puis la forme de deux sphères asymétriques reliées par un pont. (1) 0s, (2) 17s, (3) 18s, (4) 40s correspondent au temps d'acquisition des images après injection de la solution de 1  $\mu\text{M}$  de lyso-PC. Après l'arrêt d'addition de lyso-PC, (5) 240s, la distance entre les deux sphères a augmenté avec le temps. Images de microscopie optique, barre d'échelle : 10 $\mu\text{m}$  (Tanaka et al., 2004)

L'étude des membranes des GUVs ne se limite pas à l'influence de la composition lipidique mais aussi aux interactions potentielles avec des protéines présentes dans le milieu (Roux et al., 2010) ou incluse dans la membrane (Boulbitch et al., 2001)(Aimon et al., 2011).

Une tendance récente liée à l'utilisation des GUVs est la recherche de la reconstitution de cellules artificielles. En effet, avec l'avènement de la biologie synthétique et le développement toujours plus poussé des outils de biologie moléculaire, des équipes ont réussi par exemple à synthétiser des génomes complets pour les injecter dans leur cellule hôte dénuée de génome (Gibson et al., 2008)(Lartigue et al., 2009)(Gibson et al., 2010). Au-delà de ces prouesses, c'est surtout la notion de cellule minimale ou de proto-cellule qui s'applique directement aux GUVs. Plusieurs équipes à travers le monde cherchent à fabriquer une cellule minimale capable de répliquer son « génome » (Kita et al., 2008) ou même de se multiplier de façon indépendante (Kurihara et al., 2011). Le couplage de ces systèmes avec des milieux d'expression « cell-free » pourrait permettre de produire des systèmes réplicatifs, si toutefois un génome minimal est mis au point.

Quelle que soit l'étude visée, il est souvent requis de préparer des vésicules géantes unilamellaires de taille et de forme bien définies. C'est pourquoi, diverses techniques ont été développées depuis la première production de vésicules *in vitro*.

Les contraintes techniques et expérimentales de mes travaux de thèse, en plus de l'expertise que possède le laboratoire dans la production de vésicules, nous ont orientés vers l'utilisation des vésicules unilamellaires géantes (GUVs). Aussi, je me limiterai au cours de cette deuxième partie, consacrée à la production des vésicules, à la description des techniques permettant la production des GUVs.

## **2. Techniques de production des vésicules unilamellaires géantes**

La méthode de production des liposomes choisie dépendra grandement de l'utilisation qu'il en sera fait par la suite. Les milieux de production (pression osmotique, ionicité) influencent grandement les rendements de production de certaines techniques. De plus certaines techniques ne sont pas adaptées à l'encapsulation de macromolécules dans les GUVs.

Les GUVs aussi bien que les SUVs sont des assemblages qui ne sont généralement pas des structures à l'équilibre thermodynamique, mais plutôt des objets cinétiquement coincés. La barrière énergétique est souvent tellement élevée que le système ne peut pas atteindre l'équilibre thermodynamique. Une fois formées, les vésicules peuvent rester dans un état cinétique stable sur une échelle de temps allant de quelques heures à plusieurs semaines. La stabilité dépend grandement de la technique employée pour former les vésicules et ne dépend pas seulement de la molécule amphiphile utilisée (Israelachvili et al., 1977).

### **2.1 Hydratation d'un film de lipides**

La première méthode de préparation de GUVs fut décrite dans la littérature en 1969. Le principe de cette technique réside dans une hydratation contrôlée d'un film (anhydre) de lipides déposé sur une surface solide, généralement en verre (Reeves and Dowben, 1969) [Figure 4.9].

Cette méthode est connue sous différents noms, tels que gonflement naturel ou gonflement spontané, et est particulièrement efficace pour la production de GUVs avec des lipides chargés.

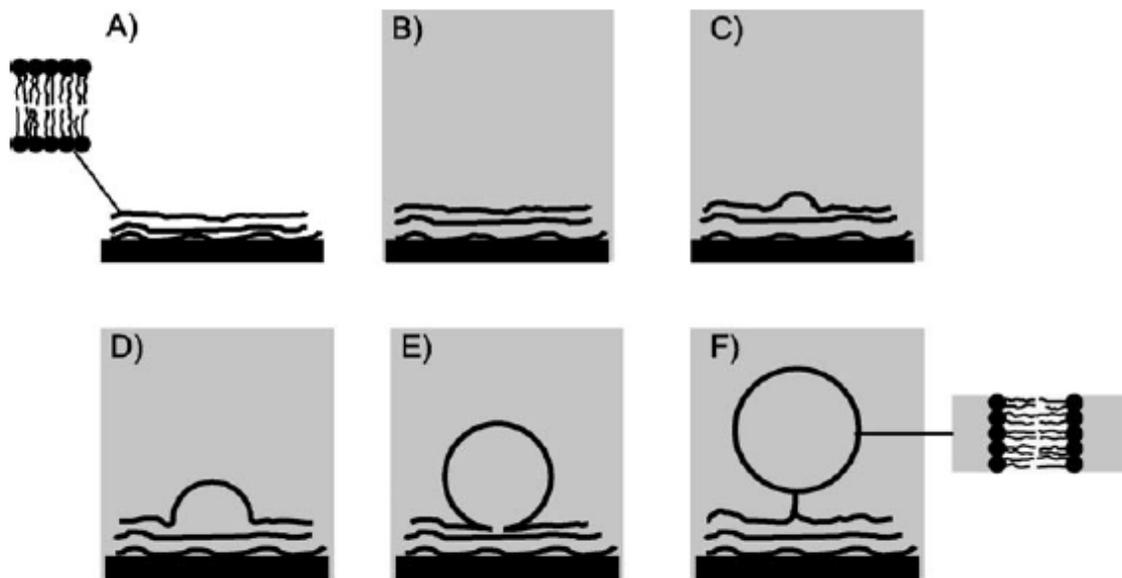


Figure 4.9 : Représentation du mécanisme de formation de GUVs par la méthode d'hydratation contrôlée d'un film de lipides anhydres déposés sur une surface solide. (A-F) Représente l'ordre chronologique lors de la formation des vésicules (Walde et al., 2010).

Au cours des quarante dernières années, plusieurs modifications et améliorations ont été apportées à la méthode originale, permettant ainsi la formation de GUVs avec non seulement des mélanges de lipides chargés mais aussi d'espèces zwitterioniques, telles que la phosphatidylcholine (DOPC), lorsque le film de lipides anhydres contient des monosaccharides non-chargés (glucose, mannose, etc...). Il a aussi été montré qu'il était possible de former des GUVs dans des tampons physiologiques (Akashi et al., 1996).

La technique peut très facilement être mise en œuvre puisqu'elle ne demande pas de matériel spécifique et peut être réalisée dans une large gamme de conditions. Elle présente l'inconvénient d'être peu reproductible en termes de contrôle de formation des vésicules, du fait qu'elle est très sensible aux paramètres environnementaux pendant l'hydratation (vibrations, flux etc...) et à l'épaisseur du film de lipides. Plusieurs équipes ont d'ailleurs travaillé à développer des méthodes permettant l'obtention d'un film lipidique homogène (Le Berre et al., 2009). Avec cette méthode les vésicules formées sont polymorphes (sphères, tubes) et le plus souvent multilamellaires, le rendement de production est par ailleurs généralement faible. De plus, si l'encapsulation de solutions d'une large gamme est très simple, il n'en est pas de même lorsqu'il s'agit de macromolécules. En effet, les GUVs se

forment par le passage de la solution par les défauts du film lipidique. Cet aspect limite grandement le passage des macromolécules, l'encapsulation de celles-ci ne donne pas de résultats probants, excepté sous l'action d'un agent de « crowding » qui permet d'augmenter le rendement d'encapsulation (Dominak and Keating, 2008).

### 2.2 Electroformation

Un développement majeur pour la technique d'hydratation d'un film de lipides est l'application d'un champ électrique au cours de la formation de ceux-ci en déposant les lipides sur du verre conducteur (couche d'oxyde indium-étain) [Figure 4.10]. C'est ainsi que fût créée la technique dite d'électroformation en 1986 par Angelova et Dimitrov (Shimanouchi et al., 2009). Ces derniers suggéraient qu'il fallait séparer les bicouches et les plier pour former les vésicules ; le champ électrique ainsi impliqué répond à ces deux problématiques puisqu'il diminue l'attraction entre les bicouches tout autant qu'il les déstabilise. Cette technique permet ainsi d'obtenir des GUVs avec une polydispersité beaucoup plus restreinte, en fonction de la composition et de la quantité des lipides, du voltage et de la fréquence du champ électrique et du tampon d'hydratation.

L'électroformation permet ainsi de palier un grand nombre de limitations inhérentes au gonflement spontané : les vésicules obtenues sont sphériques et unilamellaires et le rendement de production est élevé. Deux limites doivent cependant être notées, les GUVs obtenues par électroformation sont généralement polydisperses et on obtient le plus souvent une population comportant un diamètre variant entre 5 et 200  $\mu\text{m}$  [Figure 4.10]. De plus, la méthode de Angelova et Dimitrov est incompatible avec l'utilisation de solutions comportant des forces ioniques élevées, la limite se situant à 10 mM en sels, ce qui constitue un réel problème pour l'encapsulation de solutions correspondant à des conditions physiologiques. Pour les mêmes raisons que le gonflement spontané, l'électroformation n'offre pas de bons résultats pour l'encapsulation de macromolécules *in situ*. Cette technique permet par contre l'encapsulation par microinjection (post-production) de par le fait que les vésicules formées ne sont pas libres en solution mais rattachées à la surface par des protrusions.

Il est possible de contrôler la dimension des GUVs formées lorsque cette technique est réalisée à partir d'une surface d'oxyde de silicone comportant des micro-motifs d'une dimension précise.

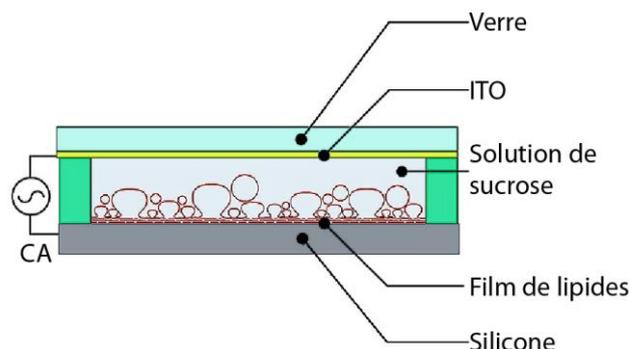


Figure 4.10 : Montage expérimental pour la production de GUVs par électroformation (Le Berre et al., 2008)

L'électroformation reste néanmoins une des techniques les plus utilisées pour la production de GUVs dans le cadre d'études de la diffusion de lipides dans une membrane, et notamment les domaines lipidiques (Sarmiento et al., 2012)(Hassan-Zadeh et al., 2014). De plus, des méthodes visant à améliorer la technique ont été proposées, comme par exemple la microstructuration du substrat (Le Berre et al., 2008), le dépôt des lipides selon des motifs précis (Diguët et al., 2009) et la variation du champ électrique et des fréquences afin de produire des liposomes en conditions physiologiques (Méléard et al., 2009).

### 2.3 Transfert de gouttes

Afin d'améliorer l'encapsulation de macromolécules et/ou de milieux physiologiques, plusieurs protocoles, basés sur l'utilisation de microgouttes d'eau dispersées dans l'huile (émulsion) comme précurseur aux liposomes, ont été développés. L'un d'entre eux, le transfert de gouttes ou la double émulsion, implique l'assemblage de deux monocouches de phospholipides produites indépendamment pour former des vésicules unilamellaires (Pautot et al., 2003).

#### 2.3.1 Transfert spontané

La méthode de transfert peut être utilisée dans le cas où une émulsion eau/huile stable peut être réalisée à partir d'un mélange d'huile et de lipides pouvant former une bicouche. Cette émulsion sert de point de départ pour la formation de GUVs [Figure 4.11 A]. Celle-ci

est ajoutée sur un système comportant deux phases : une phase inférieure aqueuse et une phase supérieure huileuse contenant un lipide capable de former une bicouche (Yamada et al., 2007).

Le système diphasique va former, à l'interface entre la phase aqueuse et la phase huileuse, une couche de lipides, dont les têtes hydrophiles seront orientées dans la partie inférieure alors que les chaînes hydrophobes dépasseront dans la phase supérieure [Figure 4.11 B]. L'eau étant plus lourde que l'huile utilisée, les gouttelettes de l'émulsion préparée, vont avoir tendance à se déplacer de la partie supérieure (huileuse) vers la partie inférieure (aqueuse) lorsqu'elles sont ajoutées au système diphasique. Lorsqu'elles traverseront l'interface lipidique, les gouttelettes seront recouvertes par les lipides de l'interface, créant ainsi des GUVs [Figure 4.11 C].

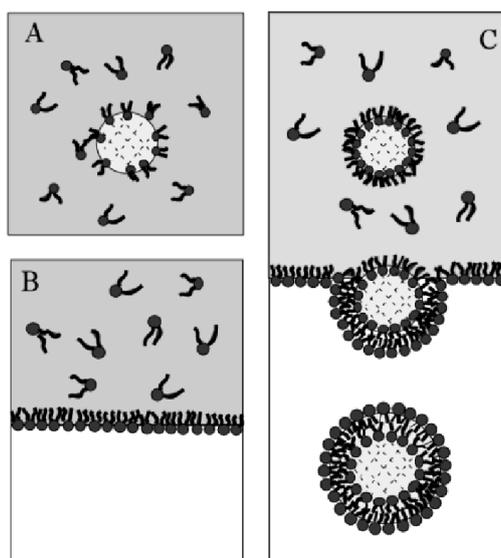


Figure 4.11 : Illustration schématique de la production de vésicules à partir d'une émulsion inversée. (A) la Phase aqueuse est émulsifiée dans une huile contenant des lipides comme surfactant, afin de former une émulsion inversée stable. (B) La phase aqueuse du système diphasique qui contiendra les vésicules est placée dans le contenant, et une solution d'huile saturée de lipides est ajoutée dessus. Une monocouche de lipides se forme à l'interface huile-eau (avec l'huile en haut et l'eau en bas). (C) La préparation réalisée en (A) est doucement ajoutée par-dessus la préparation (B). L'émulsion étant plus lourde, elle sédimente dans la phase inférieure. Au passage de l'interface, où la monocouche de lipide s'est formée, la bicouche est complétée et les vésicules finales sont formées (Pautot et al., 2003).

Afin d'augmenter les rendements de production de vésicules, il est aussi possible d'utiliser le sucre pour augmenter la densité des gouttelettes. Cela permet de « pousser » la

formation des vésicules. Il faut en retour faire une solution aqueuse équi-osmotique sous peine de causer la rupture des vésicules *de novo* formées.

Le transfert spontané offre des rendements élevés de production de liposomes et permet d'encapsuler des milieux présentant de larges possibilités de composition (force ionique, macromolécules). *A contrario* du gonflement spontané ou de l'électroformation, la solution contenue dans les liposomes peut-être différente de la solution extérieure sans avoir à passer par des étapes fastidieuses d'échange de solutions. L'inconvénient de cette technique réside majoritairement dans le fait que les liposomes ont tendance à rester à l'interface, de plus leur membrane peut contenir des traces d'huiles de la phase hydrophobe.

### 2.3.2 Centrifugation

Dans le cas où la migration spontanée à travers l'interface ne se ferait pas, il est possible d'utiliser la force centrifuge pour forcer le passage des gouttes d'une phase à l'autre (Noireaux et Libchaber, 2004). La sédimentation peut ainsi se faire en l'espace de quelques minutes au lieu de plusieurs heures (Pautot et al., 2003). Cette technique présente l'inconvénient d'avoir de faibles rendements de production et une forte contamination de la membrane des liposomes par l'huile présente dans l'émulsion.

Une approche couplant le transfert et la centrifugation a été développée afin d'augmenter le rendement du transfert spontané en favorisant le décrochage des liposomes de l'interface (Pontani et al., 2009).

Dans toutes les techniques liées au transfert de gouttes citées précédemment, la taille des gouttes de l'émulsion initiale déterminera la taille des vésicules géantes car la taille des gouttes n'évolue pas pendant leur migration. Cela implique généralement une polydispersité importante de la taille des vésicules formées à l'aide de cette technique. Il est de plus possible de créer des vésicules avec des compositions lipidiques asymétriques en utilisant un lipide pour réaliser l'émulsion et un autre pour créer l'interface (Hamada et al., 2008).

### 2.3.3 cDICE

Une variante de la technique de transfert couplée à une centrifugation en temps réel (cDICE, continuous Droplet Interface Crossing Encapsulation)(Abkarian et al., 2011), permet d'obtenir une population monodisperse de vésicules de par le fait que leur taille est contrôlée par le diamètre de l'apex du capillaire [Figure 4.12]. Dans cette méthode, une solution aqueuse de dispersion (SAD, le tampon final extérieur) et une solution de lipides dissous dans de l'huile (SLH) sont centrifugés dans une boîte de Pétri. La solution aqueuse (SA), contenant les macromolécules, est injectée dans la solution SLH à l'aide d'un capillaire, pendant que la boîte réalise des rotations. Les solutions SAD et SLH n'étant pas miscibles, elles forment une interface perpendiculaire à la direction de la force centrifuge, ce qui favorise la formation des vésicules unilamellaires lorsque les gouttes de SA sont poussées à traverser l'interface lipidique. Tout comme pour le transfert de gouttes standard, la solution encapsulée doit être d'une densité supérieure à la solution de dispersion, qui elle-même doit être supérieure à la solution SLH.

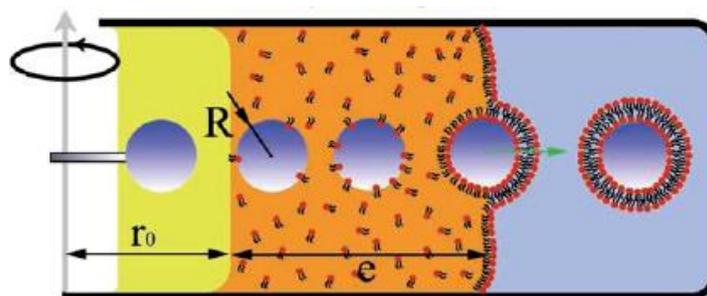


Figure 4.12 : Principe de la technique de « cDICE ». Le capillaire est fixé et la chambre fait des rotations. La solution aqueuse (SA, violet dégradé) sort au goutte à goutte du capillaire dans la couche de décane (solution jaune). La force centrifuge pousse les gouttes à travers la solution SLH (solution orange) où leur interface sont saturées par les lipides. Puis elles traversent l'interface SLH/SAD (orange/bleu) où les lipides à l'interface viennent compléter la bicouche, sur le même principe que la technique de transfert, pour former les vésicules unilamellaires (Abkarian et al., 2011).

## 2.4 Approches microfluidiques

Les plateformes microfluidiques permettent de contrôler et de manipuler les fluides à l'échelle micrométrique. Les systèmes microfluidiques peuvent être classés selon deux catégories de manipulation des flux : la microfluidique en flux continu et la microfluidique digitale. Dans la première, les flux traversent des canaux alors que la deuxième se base sur le

contrôle de compartimentalisation de réactions dans un système de gouttes discrètes. Ces deux types de systèmes ont été employés pour préparer des vésicules géantes.

Les approches basées sur la microfluidique sont en principe bien adaptées pour produire rapidement une population monodisperse de vésicules géantes avec un très bon rendement d'encapsulation de macromolécules (Ota et al., 2009).

### 2.4.1 Le « jetting »

Le « jetting » microfluidique se base sur la propulsion à l'aide d'un dispositif piézoélectrique pulsatile, d'un jet d'une solution d'intérêt vers une bicouche lipidique plane préformée entre deux gouttes de solution aqueuse dans une chambre à deux puits. Le flux permet de créer des vésicules encapsulant la solution d'intérêt, à la manière d'un enfant qui souffle pour faire des bulles de savon. La formation des vésicules dépendra de la façon dont elles sont « soufflées » par le jet de solution aqueuse [Figure 4.13].

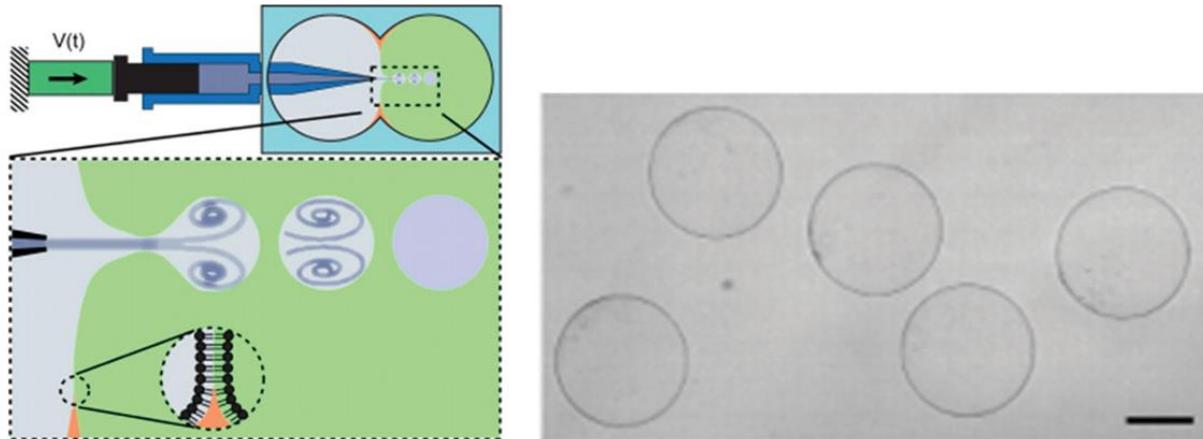


Figure 4.13 : Dans un système de « jetting » microfluidique, un piézoélectrique pulsatile produit un jet de liquide en direction d'une bicouche plane, d'où sont soufflées des vésicules unilamellaires (à gauche). Image de microscopie optique d'une population monodisperse de vésicules unilamellaires (à droite). Barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$  (Richmond et al., 2011).

Cette technique permet d'obtenir rapidement une population importante, monodisperse de vésicules de grande taille (réglable de 50 à 150  $\mu\text{m}$ ). Cette méthode présente les inconvénients d'une approche microfluidique nécessitant un équipement spécifique. De plus,

des traces d'huile peuvent être présentes dans la membrane des GUVs. Enfin, il est à noter que malgré ses performances, cette technique n'a pratiquement jamais été exploitée en dehors du laboratoire où elle a été développée.

### 2.4.2 La jonction en T

Un système de microfluidique basé sur flux continu a été développé pour la production à haut-débit de vésicules géantes. Dans ce cas, la bicouche lipidique plane est d'abord formée à une jonction en T, en amenant une solution aqueuse au contact d'une huile (cétane) contenant des lipides capables de former des bicouches. On retire par la suite l'huile en faisant passer une solution aqueuse, ce qui permet de former la bicouche qui sera utilisée par la suite pour former les vésicules géantes unilamellaires.

La formation des vésicules est induite par deux forces, 1) le flux de solution aqueuse sur la bicouche lipidique au niveau de la jonction T, et 2) la force de cisaillement induite par la géométrie de la construction au niveau du carrefour des flux [Figure 4.14].

Cette méthode permet d'utiliser des volumes d'échantillons à encapsuler de moins de 5  $\mu\text{L}$ , ce qui est significativement inférieur à la technique de « jetting » et peut s'avérer rentable dans le cadre d'utilisation de milieux d'expression génique (Ota et al., 2009). De plus, le contrôle du flux permet d'obtenir rapidement une population importante et monodisperse de vésicules de grandes tailles.

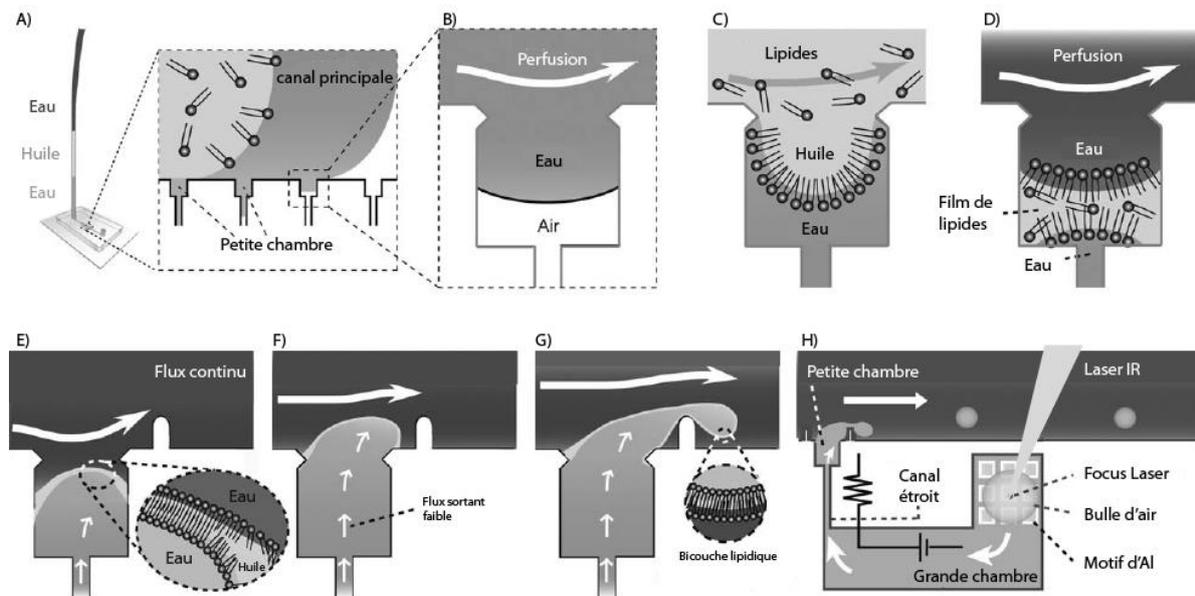


Figure 4.14 : Principe de fonctionnement de la technique de jonction en T. Processus microfluidique pour la génération d'une population monodisperse de vésicules. (A) De l'eau, de l'huile contenant des lipides dissous et de l'eau sont séquentiellement perfusées dans le dispositif microfluidique. (B) L'eau remplit le dispositif, forçant la sortie de l'air à travers le polydiméthylsiloxane (PDMS). (C) L'huile pousse l'eau dans le canal, tout en confinant l'eau restante dans la chambre. (D) L'eau pousse l'huile, et l'huile résiduelle forme un film où les lipides amphiphiles forment deux monocouches à l'interface eau/huile et huile/eau (de l'intérieur de la chambre vers l'extérieur). (E)-(G) Schémas démontrant la formation des vésicules unilamellaires par un flux continu : (E) L'application d'un flux perpendiculaire à la jonction T induit un amincissement du film lipidique et permet la formation de la bicouche. (F) Le faible flux sortant permet le bourgeonnement de la bicouche. (G) La force de cisaillement due au flux continu dans le canal principal entraîne la fission de l'apex de la bicouche, ceci correspond à la génération d'une vésicule unilamellaire. (H) Le système comprend un dispositif permettant de générer les microbulles responsables du faible flux (Ota et al., 2009).

### 2.5 Bilan des techniques de production

Les techniques de production évoquées précédemment présentent toutes des avantages et des inconvénients [Tableau 4.1]. Il est facile de donner une réponse générale sur le choix de la technique pour la production de vésicules géantes, puisqu'il dépendra principalement de l'utilisation que l'on souhaite en faire.

De manière générale, les méthodes sont très dépendantes des conditions utilisées (type de lipides, type de tampon, et présence de (macro-) molécules). En pratique, chaque domaine d'étude a sa technique de prédilection. Pour réaliser des bioréacteurs biomimétiques, le gonflement spontané (Karlsson et al., 2001)(Nomura et al., 2003) ou le transfert de gouttes

## **Chapitre 4 : Liposomes et protéoliposomes : préparation et applications**

---

(Saito et al., 2009) seront privilégiés. La technique d'usage pour l'étude de la biophysique des membranes est l'électroformation (Pott et al., 2015) qui permet d'obtenir des vésicules unilamellaires et sans contamination par une huile. Les méthodes microfluidiques restent pour le moment cantonnées aux laboratoires qui les ont développées et restent très peu utilisées, malgré leur potentiel apparent.

## Chapitre 4 : Liposomes et protéoliposomes : préparation et applications

Technique	Rendement	Distribution des tailles	Rendement d'encapsulation	Avantages	Inconvénients
<b>Gonflement naturel</b>	Modéré	Polydisperse	Haute (toute solution sauf les macromolécules)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Simple et robuste</li> <li>- Peu d'équipement</li> <li>- Grande flexibilité de composition (lipides, encapsulation)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vésicules polymorphes et multi-lamellaires</li> <li>- Procédé lent et peu productif</li> </ul>
<b>Electroformation classique</b>	Haut	Polydisperse	Faible (appropriée uniquement par faible force ionique)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Simple</li> <li>- Peu d'équipement</li> <li>- Vésicules sphériques et parfaitement unilamellaires</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Oxydation possible pour les lipides polyinsaturés</li> <li>- Impossible avec trop de lipides chargés</li> </ul>
<b>Electroformation améliorée</b>	Haut	Monodisperse	Haut (possibilité de travailler avec des solutions physiologiques)		
<b>Transfert de gouttes</b>	Haut	Polydisperse	Haut	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Simple</li> <li>- Peu d'équipement</li> <li>- Vésicules avec membranes asymétriques</li> <li>- Encapsulation très performante</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Présence possible d'huile dans la membrane</li> <li>- L'émulsion eau/huile initiale peut être hétérogène (taille)</li> </ul>
<b>cDICE</b>	Haut	Monodisperse taille contrôlée	Haut	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Simple</li> <li>- Vésicules avec membranes asymétriques</li> </ul>	Présence possible d'huile dans la membrane
<b>Jonction en T</b>	Haut	Monodisperse taille contrôlée	Haut	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Haut-débit</li> <li>- Contrôle de la taille et de la composition</li> </ul>	Equipement de microfluidique spécifique
<b>Jetting</b>	Haut	Vésicules monodisperse de grande taille	Haut	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Haut-débit</li> <li>- Contrôle de la taille et de la composition</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Equipement de microfluidique spécifique</li> <li>- Présence possible d'huile dans la membrane</li> </ul>

Tableau 4.1 : Avantages et inconvénients des techniques de production de liposomes

### **3. Les protéoliposomes : préparation et applications**

Les protéoliposomes sont des liposomes (SUVs, LUVs ou GUVs) dans lesquels une ou plusieurs protéines ont été insérées. La reconstitution d'enzymes liées à la membrane, et de protéines transmembranaires dans des bicouches artificielles de phospholipides sont des techniques primordiales, à la fois pour l'étude fonctionnelle des protéines membranaires mais aussi pour l'étude des mécaniques de la membrane. En effet, la reconstitution de protéines fonctionnelles dans des protéoliposomes permet d'étudier les paramètres biochimiques, comme les conditions d'ouverture d'un canal voltage dépendant (Aimon et al., 2011), et les paramètres biophysiques tels que l'interaction lipide/protéine.

#### **3.1 Méthode historique de production de protéoliposomes**

Une étape importante vers l'utilisation des GUVs comme modèle de cellulaire simplifié, coïncide avec la première intégration d'une protéine fonctionnelle dans la membrane d'une vésicule. Cette étape cruciale fut réalisée par Rigaud et al. en 1988 lorsqu'ils ont réussi à insérer une protéine dans une LUV (Rigaud et al., 1988). Les LUVs ainsi fonctionnalisées sont utilisées comme intermédiaire afin d'intégrer leurs protéines membranaires dans les GUVs par fusion des vésicules.

Le fait que les GUVs soient à échelle cellulaire permet de suivre les modifications morphologiques, mais aussi de suivre la dynamique de fonctionnalisation de leur membrane et de quantifier celle-ci de manière individuelle (par microscopie optique à épifluorescence ou microscopie confocale).

Dans le cadre de cette méthode, les liposomes sont préparés par gonflement spontané (Szoka et al., 1980) avant d'être resuspendus dans leur tampon de préparation, afin d'obtenir la concentration en phospholipides désirée (2,5 à 10 mM). Du Triton X-100 est ajouté afin d'obtenir le ratio adéquat entre détergent et lipide. Après 5-10 minutes d'incubation, la bactériorhodopsine (BR) est ajoutée, sous forme monomérique solubilisée en présence de détergent, pour obtenir le bon ratio lipide/protéine. Après incubation, le détergent est retiré de manière efficace, non pas par dialyse à cause de sa faible concentration micellaire critique (CMC), mais via l'utilisation de billes de résine hydrophobe (Holloway, 1973). Dans cette étude présentant différents détergents permettant l'insertion de la protéine, les auteurs ont pu

montrer que le mécanisme par lequel la BR s'associe avec les phospholipides pour former des protéoliposomes influence grandement l'orientation finale de celle-ci dans la bicouche lipidique. Lorsque la BR est incorporée dans des liposomes préformés, la protéine se trouve orientée de manière unidirectionnelle alors que son orientation est plus aléatoire dans le cas où l'incorporation se fait simultanément à la formation des vésicules. Une explication avancée par les auteurs serait que les protéines sont toujours insérées à travers la partie hydrophobe de la bicouche par leur domaine le plus hydrophobe, or dans le cas de la BR il s'agit de la partie N-terminale qui se retrouve dans le protéoliposome aboutissant ainsi à une orientation « inside-out ».

Dans une autre étude de l'équipe de Rigaud (Lévy et al., 1992), la reconstitution de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase issue du réticulum sarcoplasmique est réalisée au travers de plusieurs étapes clés. En premier lieu, les auteurs extraient les membranes d'intérêt, s'en suit la solubilisation des protéines présentes dans cette membrane à l'aide de détergents (Triton X-100, octyl glucoside et  $\text{C}_{12}\text{E}_8$ ), de la séparation des différentes protéines par purification (chromatographie d'exclusion) et de la reconstitution de celles-ci dans les membranes par une diminution contrôlée de la concentration en détergent, grâce à l'utilisation de billes de résine poreuse affine pour les molécules hydrophobes (chaîne hydrophobe des détergents).

A partir de cette avancée technologique, deux techniques ont été développées pour permettre l'incorporation de protéines dans la membrane de GUVs.

### 3.2 Une variante de la méthode historique

Comme pour la méthode historique de Rigaud et al., la Bactériorhodopsine est dans un premier temps purifiée de sa membrane native par l'utilisation de détergents (Dencher and Heyn, 1978). Une solution de LUV est mise en présence du détergent utilisé pour la purification de la protéine, puis la protéine solubilisée est ajoutée au mélange. Enfin le mélange est dialysé selon une technique développée par Philippot (Philippot et al., 1983), permettant l'insertion de la Bactériorhodopsine dans la membrane des LUVs [Figure 4.15].

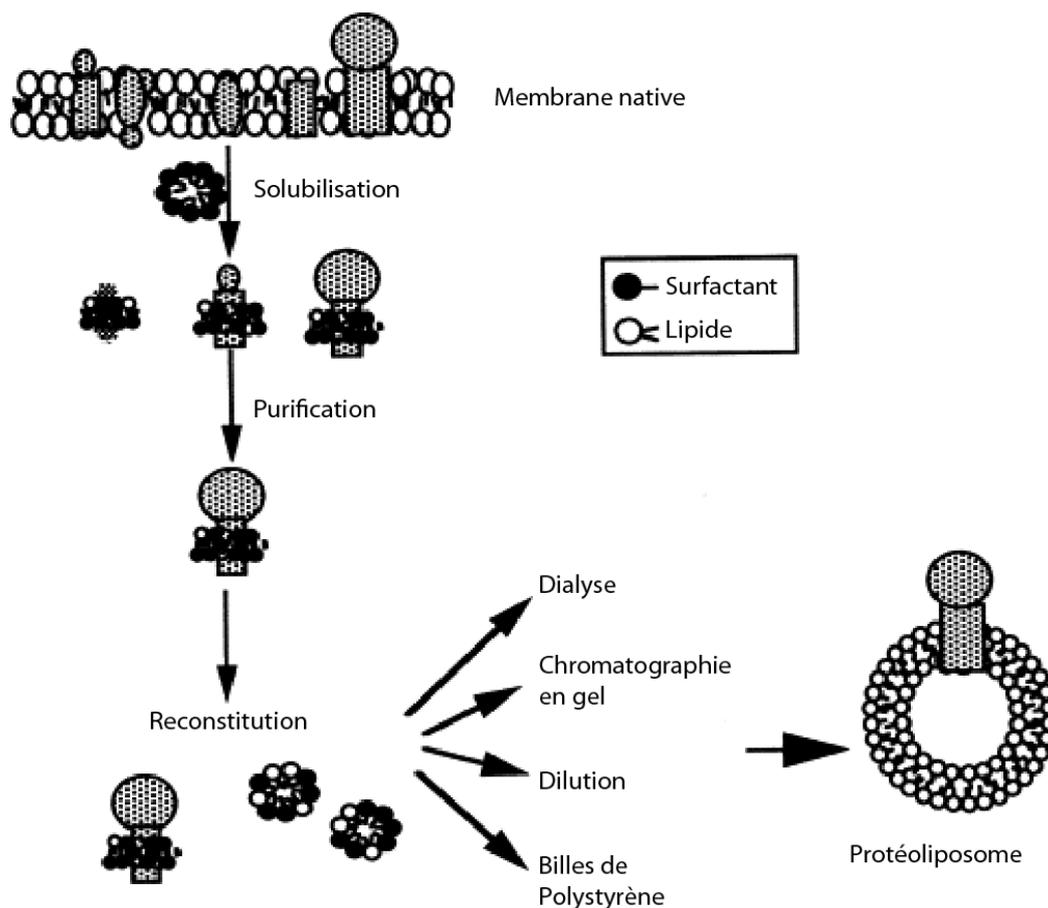


Figure 4.15 : Schéma du cheminement de reconstitution d'une protéine membranaire issue d'une membrane native dans un liposome. Dans le cas présent, la protéine est extraite de sa membrane d'origine par une solubilisation via un détergent. Elle est ensuite séparée des autres protéines par purification (chromatographie d'exclusion de taille, chromatographie d'affinité etc...). Elle est ensuite reconstituée dans des liposomes par diverses méthodes qui ont pour but de remplacer le surfactant par la membrane du liposome (adapté de Rigaud et Lévy, 2003).

Le cœur de la méthode réside dans la fonctionnalisation des LUVs par de petits peptides de fusion membranaire [Figure 4.16] (Pécheur et al., 1997)(Pécheur et al., 1999). Le greffage des peptides se fait grâce à la présence de lipides modifiés présentant des fonctions chimiques permettant la bio conjugaison entre leur tête hydrophile et une cystéine présente en position c-terminale du peptide (Kahya et al., 2001).

Les protéo-LUVs, présentant les peptides fusogènes et la protéine d'intérêt à leur surface, sont mis en présence de GUVs. Lors de l'interaction entre la membrane de la LUV exposant les peptides fusogènes et celle de la GUV, la fusion des membranes se produit et le contenu membranaire de la LUV va pouvoir diffuser latéralement dans la membrane de la GUV [Figure 4.16].

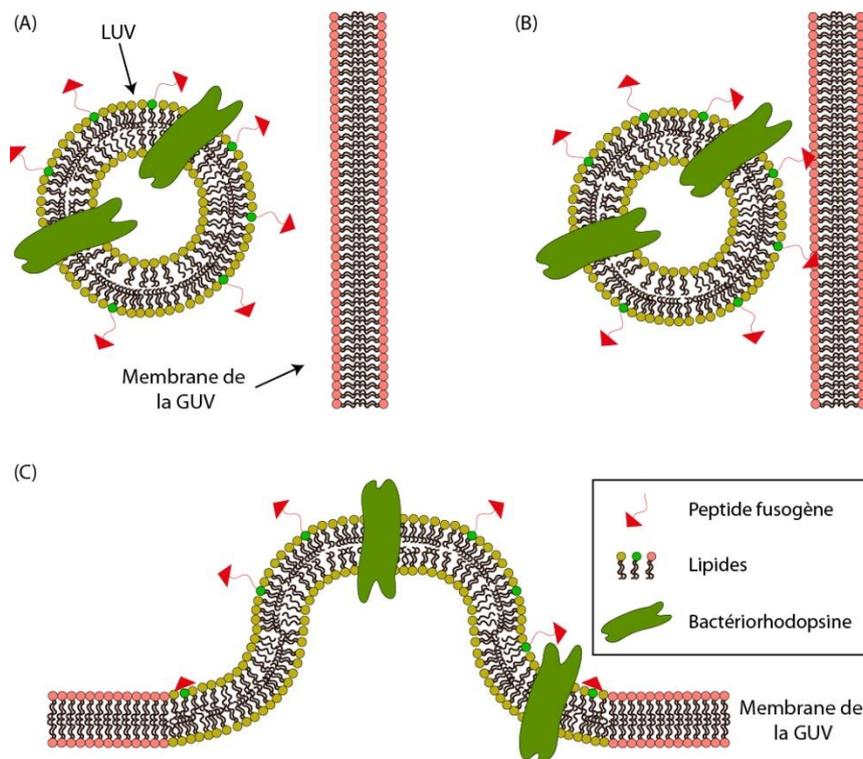


Figure 4.16 : Schéma du processus de fusion induit par des peptides fusogènes entre une LUV et une GUV

Cette technique a fait ses preuves pour un certain nombre de protéines membranaires. Néanmoins, un ensemble de caractéristiques intrinsèques aux protéines membranaires, tels que leur nature hydrophobe qui induit souvent de mauvais repliements et/ou l'agrégation, font que ces cibles sont problématiques dans le cadre d'études liées à leur expression. En particulier, le ciblage, la translocation et l'intégration de ces protéines dans des membranes cellulaires natives représentent souvent les limites des approches *in vivo*. En effet, elles peuvent non seulement induire une déstabilisation voire une désintégration de la membrane mais aussi avoir des effets délétères sur la physiologie de la cellule du fait de la surcharge du système cellulaire dans le cadre d'une surexpression. Au-delà de la simple considération de l'expression, les étapes de purification des protéines, permettant l'utilisation de cette technique peuvent aussi se révéler être laborieuses à optimiser.

### 3.3 Approche « Cell-free »

Comme nous avons pu le voir dans le premier chapitre de la thèse, les systèmes « cell-free » de par leurs caractéristiques, représentent une alternative robuste au système *in vivo*. Ils permettent notamment de se défaire de l'aspect d'hôte vivant en plus d'offrir un accès direct aux réactions, ce qui présente un nombre d'avantages non négligeables. Les aspects de toxicité ou d'interférence avec la physiologie cellulaire sont minimisés ou complètement abolis. Ils permettent aussi l'addition de molécules sans avoir besoin de prendre en compte le transport à travers une membrane ou ses effets sur le métabolisme. Il est ainsi possible d'ajouter les molécules nécessaires à la stabilisation des protéines membranaires nouvellement formées, comme des détergents ou même des structures lipidiques.

#### 3.3.1 Solubilisation post-expression par des détergents

Plusieurs approches ont été développées autour de l'utilisation des systèmes « cell-free » pour la production de protéines membranaires. La plus simple consiste à produire la protéine membranaire avec un système CFPS (Cell-Free Protein Synthesis) ou CFRPS (Cell-Free Reconstituted Protein Synthesis), sachant que ces milieux ne contiennent pas suffisamment d'agents stabilisants, tels que des lipides résiduels ou autre, permettant de créer un environnement hydrophobe stabilisant pour les protéines membranaires *de novo* formées. Il en résulte que ces protéines précipitent. A la différence des corps, d'inclusion les protéines précipitées peuvent être resolubilisées assez facilement avec des détergents dits « doux » en quelques heures, offrant dans certains cas des protéines présentant directement une fonctionnalité (Klammt et al., 2004)(Elbaz et al., 2004).

#### 3.3.2 Stabilisation co-traductionnelle par des détergents

Une deuxième approche est de produire les protéines en présence de détergents, fournissant ainsi un environnement hydrophobe permettant le repliement de celles-ci directement dans le milieu d'expression et évitant ainsi le résultat de la technique précédente [Figure 4.17]. Les protéines peuvent interagir avec les détergents par des interactions hydrophobes non-spécifiques pendant leur traduction. Cela ne nécessite pas la présence de machinerie cellulaire spécifique comme pour l'insertion dans une membrane cellulaire. Il est à

noter que l'utilisation de détergents reste tout de même limitée, les systèmes « cell-free » étant eux-mêmes composés de protéines et autres composants biologiques. Ils peuvent être sensibles à la concentration de ces détergents. Typiquement, l'utilisation de détergents avec des concentrations micellaires critiques (CMC) élevées comme le n-octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside ou le 3-((3-cholamidopropyl)diméthylammonio)-1-propanosulfonate (CHAPS), est préjudiciable à l'efficacité de l'expression même si leur concentration n'excède que de peu leur CMC. Néanmoins, la majorité des détergents utilisés en routine sont compatibles et bien tolérés par les systèmes « cell-free ». Les dérivés polyoxyéthylène-éther (dérivé de Brij) offrent par exemple de très bons résultats pour la solubilisation de protéines membranaires (Klammt et al., 2005).

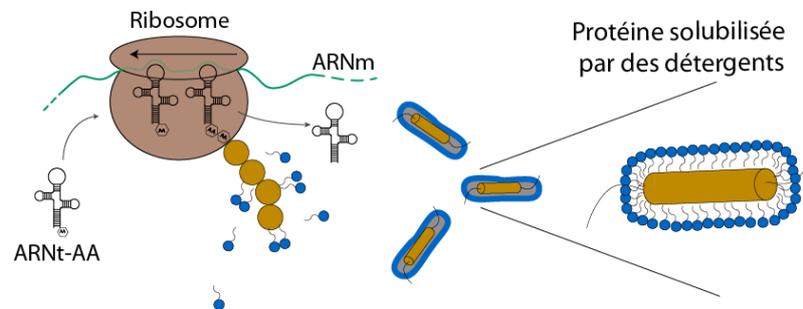


Figure 4.17 : Représentation schématique de la production d'une protéine membranaire en milieu « cell-free » en présence de détergents

### 3.3.3 Insertion co-translationnelle des protéines dans une membrane

Les études fonctionnelles des protéines membranaires doivent être réalisées, dans la plupart des cas, dans un environnement membranaire, obtenu à partir de membranes natives des cellules hôtes ou bien dans des protéoliposomes artificiels produits grâce à la reconstitution de protéines membranaires purifiées et solubilisées, par exemple à partir des deux techniques décrites précédemment (Sansuk et al., 2008).

Une alternative aux techniques précédentes est l'expression directe de protéines membranaires dans des liposomes. Cette technique peut être employée avec des microsomes issus de lysats cellulaires ou bien avec des liposomes artificiels dont la composition lipidique simple ou complexe est définie [Figure 4.18]. De plus, contrairement aux détergents les lipides ne sont pas du tout préjudiciables aux systèmes d'expression (Rosenberg and East, 1992)(Kuruma et al., 2005)(Liguori et al., 2007).

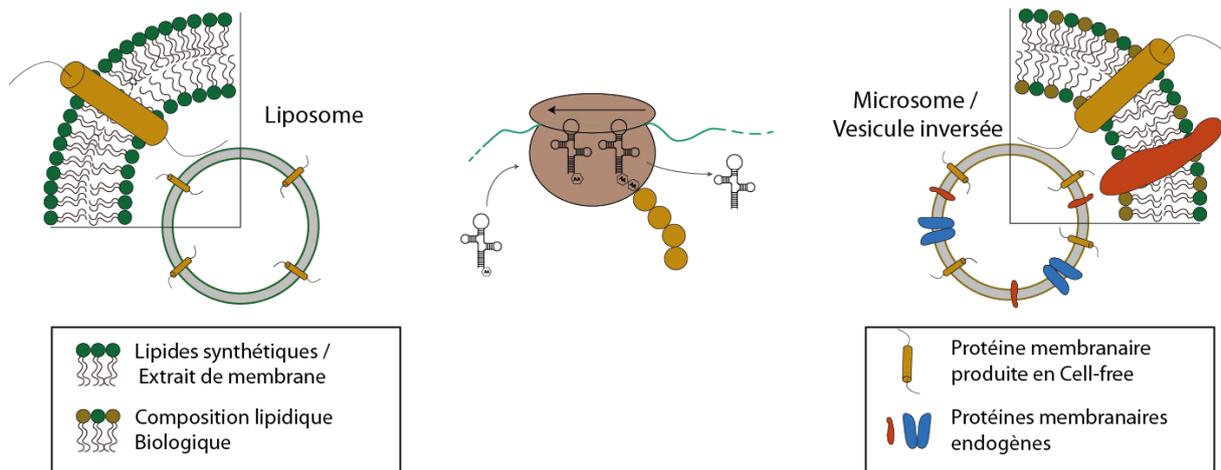


Figure 4.18 : Représentation schématique de la production d'une protéine membranaire en milieu « cell-free » en présence de liposomes artificiels, de microsomes ou de liposomes constitués de membranes natives

Cette technique a par exemple été utilisée avec des SUVs, afin de produire des protéo-SUVs en milieu « cell-free ». Les SUVs sont produites en parallèle via une technique classique d'électroformation. Dans cette méthode l'expression de la protéine membranaire en présence de SUVs se fait à l'aide d'un système basé sur un extrait d'*E. Coli* fonctionnant avec une ARN polymérase T7. Afin d'augmenter les rendements de production de la protéine, le système est placé dans un réacteur qui permet de réaliser une réaction en échanges continus. Une fois les SUVs produites, purifiées et concentrées, les protéo-SUVs sont ajoutés pour une incubation sans mélange pendant une nuit à 4 °C, ce qui permet à la fusion d'avoir lieu de manière spontanée.

Un des points faibles de cette technique réside dans l'utilisation d'un extrait cellulaire bactérien pour la production de la protéine membranaire, ce qui peut se montrer comme étant limitant au regard des modifications post-traductionnelles dont une protéine peut avoir besoin pour être fonctionnelle et avoir une conformation native (d'autant plus s'il s'agit d'une protéine eucaryote) (Varnier et al., 2010). Une autre équipe a pour cela utilisé un système d'expression eucaryote permettant ces modifications, et a montré que ces modifications post-traductionnelles ont bien lieu en utilisant une protéine nécessitant ces modifications (Shaklee et al., 2010).

### 3.3.4 Exemples de mise en application : la production de protéoliposomes

Une dernière alternative afin de produire des protéoliposomes sensibles à une phéromone sexuelle du *Bombyx mori* a été d'encapsuler le système d'expression, les ARNm codant pour les protéines formant le complexe hétéromérique (BmOR1 et BmOrco)(Sato et al., 2008) du canal ionique activé par un ligand (Bombykol). L'encapsulation permet de réaliser l'expression depuis l'intérieur des vésicules.

L'encapsulation a été réalisée grâce à une technique d'émulsion d'eau dans l'huile suivie d'une centrifugation au travers d'une interface préformée pour obtenir des GUVs [Figure 4.19], comme présenté à la section 2.3.2. Grâce à la technique de patch-clamp qui est facilement utilisable sur des objets de l'ordre de grandeur des GUVs, les auteurs ont ensuite montré que les protéoliposomes ainsi formés sont sensibles à la présence de bombykol : lors de son ajout, la phéromone déclenche un courant de l'extérieur vers l'intérieur des GUVs, si et seulement si celles-ci sont fonctionnalisées. Cependant, il est difficile de fonctionnaliser une membrane avec des protéines membranaires. Dans le cas présent, les auteurs ont dû inclure dans leur système d'expression des microsomes pancréatiques issus de lysat sans quoi la protéine BmOrco ne présentait pas la même propension à s'insérer de manière autonome dans la membrane.

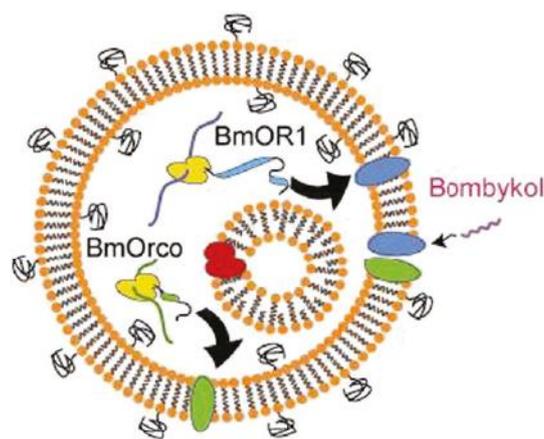


Figure 4.19 : Représentation schématique d'une GUV contenant le système d'expression « cell-free » ainsi que les microsomes pancréatiques canins, l'ARNm codant pour les protéines du complexe hétéromérique BmOR1 et BmOrco, qui forment le récepteur olfactif qui est activé par le bombykol. Les vésicules présentent une composition lipidique complexe comprenant du cholestérol, des phospholipides-PEG pour la stabilisation (Moghimi et al., 2001) et des lecithines (Hamada et al., 2014).

Devant la difficulté que peut présenter l'insertion d'une protéine dans une membrane, avec le problème de l'orientation uni- ou bidirectionnelle mais aussi le rendement d'insertion, une équipe japonaise a montré au cours d'une étude récente qu'il était possible de produire un système protéique fonctionnel, le Sec translocon d'*E. coli*, par sa synthèse en présence de liposome en milieu « cell-free » [Figure 4.20]. Le complexe de translocation, aussi appelé Sec translocon, est un complexe de protéines responsable de la translocation de polypeptides au travers des membranes biologiques. Le canal de translocation présent chez les bactéries est formé d'un complexe protéique trimérique appelé SecYEG. Il consiste en trois unités SecY, SecE et SecG qui une fois assemblées permettent l'intégration et l'exportation des protéines membranaires. Dans l'étude, les auteurs montrent qu'à la suite de l'intégration spontanée du Sec translocon, il est possible d'intégrer d'autres protéines membranaires (fonctionnelles) via l'utilisation du système de translocation (Matsubayashi et al., 2014).

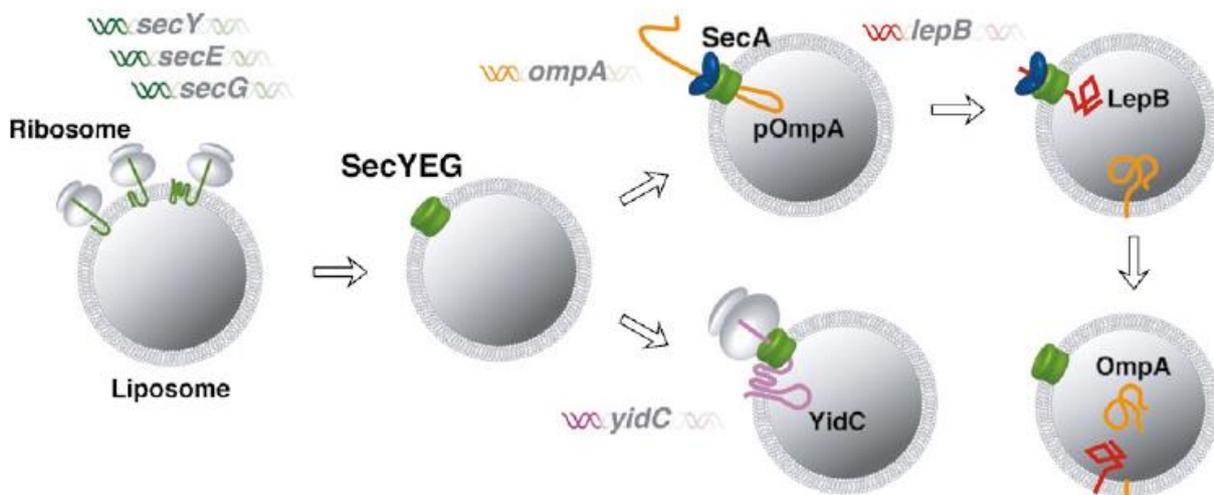


Figure 4.20 : Représentation schématique du système de translocation qui est produit par synthèse *in vitro* du translocon SecYEG à partir d'ADN. Les gènes codant pour le SecYEG sont exprimés avec le PURE system. Les protéines du SecYEG sont spontanément intégrées dans la membrane lipidique, produisant ainsi des vésicules possédant un système de translocation. D'autres protéines (pOmpA ou YidC) sont exprimées par la suite, leur intégration ou translocation est rendue possible par le système SecYEG déjà présent dans les membranes. La production de LepB à la suite de pOmpA entraîne la digestion de la séquence signal dans la lumière de la vésicule, détachant ainsi pOmpA de la membrane. SecA est une protéine servant de moteur pour la translocation des domaines hydrophiles de la protéine cible (Matsubayashi et al., 2014).

L'avantage majeur de cette méthode réside dans le fait qu'il est possible d'éviter un certain nombre d'étapes du modèle d'expression *in vivo*, qui se trouvent être le plus souvent

## **Chapitre 4 : Liposomes et protéoliposomes : préparation et applications**

---

problématique au regard de la fonctionnalité des protéines, et donc très chronophages en terme d'optimisation (comme nous avons pu le voir au chapitre 1).

## 4. Des liposomes aux protéoliposomes : bilan et perspectives

Comme nous avons pu le constater tout au long de ce chapitre, les liposomes (quelle que soit leur taille) représentent une technologie dont les ramifications touchent de nombreux domaines de la science, tels que la biophysique des membranes, la fabrication de nanoréacteurs, la vectorisation, l'étude des protéines membranaires et même la reconstitution par imitation du vivant avec le courant des cellules minimales (Kuruma et al., 2009).

Nous avons pu voir qu'en fonction des applications envisagées, la taille et la lamellarité des liposomes sont des paramètres primordiaux voire limitants dans certains cas. C'est ainsi qu'ont été développées différentes approches technologiques pour la production de ces édifices macromoléculaires : de la technique historique par hydratation d'un film en passant par les techniques se basant sur des émulsions, pour enfin s'orienter vers des techniques issues de développements microfluidiques pouvant nécessiter une expertise et un matériel dédié. Chacune de ces méthodes présente évidemment des avantages et des inconvénients, que nous avons pu voir précédemment au Tableau 4.1, et qui seront pris en compte en fonction de l'application envisagée (Walde et al., 2010).

Outre l'étude purement physique de l'élasticité des membranes composées exclusivement de lipides (Svetina and Žekš, 2002)(Portet and Dimova, 2010) ou la fabrication de nanoréacteurs (Xu and Cheng, 2002), les liposomes ont gagné en perspective avec les premières reconstitutions de protéines membranaires fonctionnelles. En effet, la production de protéoliposomes représente un développement clef dans l'histoire des liposomes, ouvrant de nouvelles portes dans les champs d'étude : de l'interaction protéines-lipides (Roux et al., 2010), de l'interaction protéines-ligand avec spécifiquement pour l'industrie pharmaceutique les récepteurs couplés aux protéines G (Proverbio et al., 2013), de l'adressage dans le cadre de la vectorisation (Perrie et al., 2004), de la biologie structurale avec l'utilisation de la RMN sur les protéo-SUVs (Da Costa et al., 2006). Les techniques permettant la production de ces édifices sont pour le moment en cours de développement et il existe plusieurs chemins possibles pour arriver à la création de ces constructions biologiques (Rigaud and Lévy, 2003), d'autant plus que l'utilisation en routine dans les laboratoires des systèmes d'expression « cell-free » offre de nouvelles possibilités par rapport aux précédentes techniques de

## **Chapitre 4 : Liposomes et protéoliposomes : préparation et applications**

---

production *in vivo* suivies d'étapes de purifications et de reconstitutions (Schwarz et al., 2008).

Dans le cadre de mes travaux de thèse j'ai saisi l'opportunité d'associer les milieux « cell-free », l'expression de protéines membranaires et les liposomes, afin de produire des protéoliposomes géants fonctionnels. Bien qu'il existe déjà de nombreuses techniques pour la production de GUVs qui se trouvent être robustes pour les applications que nous avons pu voir au cours du chapitre, ces techniques ne répondent pas entièrement à nos exigences expérimentales. Nous avons donc cherché à développer une technique nous permettant d'obtenir des GUVs dont la fonctionnalisation serait contrôlable, par exemple via le contrôle du déclenchement de l'expression par la température, et dont on pourrait suivre la fonctionnalisation en temps réel par microscopie optique.

## Chapitre 5 : Préparation « Cell-free » de protéoliposomes stimulables : exemple d'une connexine

Bien que les protéines membranaires soient essentielles aux fonctions élémentaires des cellules (transduction du signal, adhésion, transport, communication), notre connaissance de leurs propriétés structurales et mécanismes d'action reste très limitée due à la grande difficulté à les purifier, les extraire et les manipuler dans un état fonctionnel.

Les protéoliposomes géants, en fournissant aux protéines membranaires un environnement synthétique favorable, biomimétique et bien défini, constituent un système de choix pour la reconstitution des protéines membranaires. Contrairement aux techniques usuelles consistant à insérer, au sein des liposomes, une protéine membranaire extraite de cellules, nous explorons dans ce chapitre une stratégie alternative consistant en l'expression *in situ* de protéines membranaires par voie « cell-free » en présence de liposomes géants. Après un bilan des protéines déjà synthétisées par des voies de ce type, nous décrivons un protocole original permettant la reconstitution efficace d'une protéine membranaire eucaryote impliquée dans la formation de jonctions communicantes, la connexine Cx43. En transférant des gouttes de sucrose isotonique dans le CFRPS PURExpress® à travers une interface huile/eau, nous montrons l'obtention d'un grand nombre de liposomes géants dont la fonctionnalisation par Cx43 est déclenchable par un simple stimulus thermique. De manière intéressante, nous découvrons que le mécanisme d'insertion est co-translationnel. Nous montrons que la Cx43 est fonctionnelle, nous permettant ainsi de contrôler le relargage de molécules de manière taille-dépendante. Cette fonctionnalité est stimulable, soit par un contrôle au niveau de l'expression par stimulation thermique, soit par modification post-translationnelle au moyen d'une kinase.



## Sommaire

<b>Introduction .....</b>	<b>191</b>
<b>1. Les protéines produites en « Cell-free » .....</b>	<b>193</b>
1.1 Les molécules amphiphiles couplées aux CFPS.....	194
1.2 Développement d'un système versatile pour la production de liposomes.....	195
<b>2. Suivi de l'insertion des protéines dans les liposomes .....</b>	<b>201</b>
2.1 Les protéines membranaires .....	201
2.2 Les connexines.....	202
2.3 La connexine 43 : construction et caractérisation de l'expression .....	203
2.4 L'insertion de Cx43-eGFP : un phénomène passif co-traductionnel.....	209
<b>3. Tests de fonctionnalité des protéoliposomes .....</b>	<b>214</b>
3.1 Test de perméabilité.....	214
3.2 Test de perméabilité sélective.....	217
<b>4. Un système déclenchable et modulable .....</b>	<b>219</b>
4.1 Un système déclenchable sous contrôle de la température.....	219
4.2 Une perméabilité modulable.....	220
<b>5. Bilan et perspectives : Production et insertion versatiles d'une protéine membranaire dans des liposomes géants .....</b>	<b>225</b>



## **Introduction**

Les protéines assurent un grand nombre de fonctions au sein des organismes vivants. Certaines classes de protéines en particulier sont capables de modifier leur environnement de façon extrêmement efficace. On pense notamment aux protéines membranaires, qui sont responsables de la communication intra-/extracellulaire et peuvent mettre en place une régulation des concentrations (canaux ioniques, par exemple) et des signalisations permettant la régulation physiologique de la cellule (récepteurs couplés aux protéines G, par exemple). Il apparaît donc que le développement de méthodes de production, afin d'obtenir ces protéines dans un environnement se rapprochant de leur état physiologique, présente un intérêt tout particulier pour réaliser des caractérisations d'interactions entre protéine et ligand, de structure et de fonction.

De nombreuses méthodes d'expression des protéines ont été développées. Comme nous avons pu le voir au chapitre 1, chaque système apporte son lot d'avantages et d'inconvénients. Certains nécessitent de longues étapes d'optimisation pour obtenir des rendements optimaux. D'autres, comme les systèmes ouverts que sont les milieux d'expression « cell-free », permettent d'obtenir des protéines membranaires dans un environnement proche des conditions physiologiques tout en réduisant drastiquement les temps d'optimisation et de production (Liu et al., 2013) (Katzen et al., 2009) (Bazzacco et al., 2012).

J'ai développé au cours de ma thèse, une stratégie permettant la reconstitution de protéines membranaires dans des liposomes géants. Cette approche a pour but d'être versatile dans sa mise en application et d'être compatible avec une large gamme de cibles potentielles. La production de liposomes géants par une méthode de transfert peut être employée dans le but de générer des protéoliposomes, en couplant le transfert à un milieu d'expression « cell-free ».

Le projet au cœur du chapitre doit permettre de mettre à profit la robustesse de ce système de production, que nous avons adaptée à l'utilisation d'un milieu hypertonique comme le PURExpress®. Les travaux de thèse ont pour but de synthétiser des protéoliposomes géants comportant une protéine membranaire fonctionnelle.

Dans un premier temps je vais présenter la protéine cible de cette étude, puis je montrerai qu'il est possible de produire la protéine d'intérêt à l'aide du PURExpress®.

## **Chapitre 5 : Préparation « Cell-free » de protéoliposomes stimulables : exemple d'une connexine**

Dans un second temps, je présenterai la méthode développée pour produire des liposomes géants qui vont me permettre d'étudier le mécanisme d'insertion de la protéine dans leur membrane, sa fonctionnalité et la modulation de son activité. Une partie des résultats de cette étude a fait l'objet d'un article dans la revue *ChemBioChem* (Liu et al., 2013).

## **1. Les protéines produites en « Cell-free »**

Comme nous avons pu le constater au cours du premier chapitre de la thèse, les systèmes de synthèse de protéines « cell-free » (CFPS) dérivés d'extraits cellulaires sont utilisés depuis des décennies comme des outils de recherche en biologie fondamentale et appliquée. Un système CFPS ECE a joué un rôle tout particulier dans la découverte du code génétique lors des expériences pionnières de Nirenberg et Matthaei (Nirenberg and Matthaei, 1961).

Les avancements réalisés sur les performances et les coûts d'utilisation des systèmes CFPS et CFRPS font d'eux des candidats idéaux pour la production de protéines *in vitro*, à des fins académiques ou thérapeutiques spécifiques.

Il existe déjà un nombre conséquent de protéines solubles, en outre les protéines citées précédemment à titre d'exemple ou dans le cadre de mes travaux (YFP, GFP, mcherry et  $\beta$ -lactamase), qui ont été produites dans un système « cell-free » (Alexandrov et al., 2014) (Cai et al., 2015) tels que des fragments simple chaîne (scFv) d'immunoglobuline (Ig) (Stech et al., 2014), la chloramphénicol acétyltransférase (Kim et al., 2011), ou encore 13 enzymes issues du parasite *Plasmodium falciparum* (Mudeppa et Rathod, 2013). D'un autre côté, seule un faible nombre de protéines membranaires, qui pourtant représentent jusqu'à un tiers des gènes présents dans les génomes déjà séquencés, ont déjà été produites en systèmes CFPS ou CFRPS.

Il y a pourtant un très grand intérêt à étudier ces protéines. En effet, l'ensemble des protéines membranaires au sein de notre organisme représente environ 75% des cibles potentielles pour des traitements thérapeutiques (Ritter and Hall, 2009).

L'absence marquée de structures résolues dans les bases de données concernant des protéines membranaires est très représentatif des obstacles qu'il faut pouvoir contourner afin d'exprimer et préparer ces protéines. En effet, leurs structures complexes, la présence de domaines transmembranaires hydrophobes, leur éventuelle cytotoxicité, ainsi que les étapes de repliement en font des modèles de surexpression difficilement utilisables en systèmes cellulaires, car ces modèles de surexpression nécessitent des optimisations chronophages pour des rendements qui restent faibles.

## **1.1 Les molécules amphiphiles couplées aux CFPS**

L'utilisation des systèmes *in vitro* permet aujourd'hui de contourner les obstacles cités précédemment. Réaliser la production de protéines membranaires fonctionnelles en système CFPS, en présence de lipides naturels/synthétiques et/ou de détergents facilite la solubilisation de celles-ci. L'addition de surfactants ou de lipides purifiés peut prévenir l'agrégation de polypeptides membranaires (Klammt et al., 2005). Wu et Swartz ont développé une approche ne nécessitant pas l'utilisation de détergents ni d'étape de repliement afin d'obtenir une protéine intégrale fonctionnelle (Wu and Swartz, 2008). Ils se basent sur la formation de vésicules à partir de la membrane interne d'*E. coli* qu'ils mettent ensuite dans le système d'expression contenant le plasmide codant pour les protéines d'intérêt. En utilisant cette approche, deux protéines, *TetA* et *MtIA* (une pompe à tétracycline et une perméase à mannitol), ont été exprimées avec de hauts rendements en comparaison des méthodes utilisant des processus de repliement non-naturels conduits grâce à l'utilisation de détergents.

Néanmoins, dans le cas présent, il s'agit en premier lieu du couplage entre la préparation de liposomes et un système d'expression de protéines qui nous intéresse. Il s'agit là d'un domaine en rapide expansion, puisque des protéines membranaires telles que la stéaryle-CoA désaturase (Goren and Fox, 2008), la Bactériorhodopsine (Kalmbach et al., 2007), un canal anionique voltage dépendent (VDAC) (Aimon et al., 2011) et la protéine proapoptotique Bak (Liguori et al., 2008) ont été synthétisés en utilisant un système d'expression issu d'*Escherichia coli* (*E. Coli*) ou de germes de blés (WGE), et ont ensuite été insérées dans des SUVs.

Le rôle déterminant des protéines membranaires dans la fonction physiologique des membranes n'a fait qu'augmenter l'intérêt pour les liposomes et plus spécifiquement pour les protéoliposomes. Ceux-ci permettent une investigation *in vitro* biologique, biophysique ou biochimique des protéines présentes dans leur membrane, comme la sélectivité et le voltage opérationnel d'un VDAC (Varnier et al., 2010)(Aimon et al., 2011), la distribution, la mobilité latérale et la fonction de deux transporteurs et d'un canal mécano-sensible (Doeven et al., 2005), l'activité de la  $Ca^{2+}$ -ATPase (Girard et al., 2004), l'activité de la bactériorhodopsine (Kahya et al., 2001), l'adhésion protéine-dépendante et le mécanisme d'endocytose (Kamiya et al., 2011).

Bien qu'il soit relativement aisé de contrôler précisément la composition lipidique de la membrane des liposomes en ajustant la stœchiométrie et la nature des lipides utilisés, la fonctionnalisation par des protéines membranaires des membranes de liposomes reste une opération assez délicate. La principale technique de fonctionnalisation utilisée consiste à incuber les protéines purifiées avec des liposomes préformés. L'insertion des protéines est ensuite réalisée grâce à l'ajout de tensioactifs ou de petites vésicules (SUVs diamètre < 1 µm) qui vont permettre la fusion avec la membrane des GUVs (Aimon et al., 2011)(Rigaud et al., 1988)(Girard et al., 2004)(Berriep, 1992).

L'obtention d'échantillons convenables pour utiliser cette méthode se trouve être la faiblesse de cette technique, car il est très difficile de contrôler le processus d'insertion de protéines dans une membrane tout en conservant leurs fonctions physiologiques (Seddon et al., 2004).

Comme nous avons pu le constater, il existe déjà diverses méthodes pour la formation de protéoliposomes se basant sur l'ajout de protéines purifiées aux liposomes préformés ou, comme nous avons pu le voir au chapitre précédent, en couplant les systèmes CFPS et l'expression de protéines membranaires, aux liposomes. Néanmoins, ces techniques pourtant robustes dans le cadre de leur utilisation présentent un nombre de limitations dont j'ai souhaité m'affranchir durant les travaux de ma thèse. J'ai donc travaillé au développement d'une technique robuste et versatile pour la production de liposomes compatible avec l'expression de protéines membranaires par voie « cell-free » et donc, par extension, des protéoliposomes.

### **1.2 Développement d'un système versatile pour la production de liposomes**

Les liposomes géants sont de larges compartiments sphériques (5-200 µm) délimités par une bicouche lipidique qui forme leur membrane. Comme nous avons pu le voir précédemment, ils se révèlent être un modèle cellulaire et membranaire très utile (Fenz and Sengupta, 2012)(Rigaud et al., 1995).

Au cours des années, différentes méthodes pour la préparation de liposomes géants ont été développées afin d'acquérir des propriétés membranaires bien définies (Morales-Pennington et al., 2010) et la possibilité de fonctionnaliser le cœur des vésicules grâce à

l'encapsulation de systèmes d'expression (Noireaux and Libchaber, 2004)(Walde et al., 2010).

A notre connaissance, l'utilisation de synthèse *in vitro* et l'insertion de protéines membranaires dans des liposomes géants n'ont été, jusqu'à aujourd'hui, accomplies que dans très peu de cas. Même si les rendements globaux sont modestes, l'utilisation de ces outils de production de protéoliposomes présente des avantages indéniables en termes de temps, si l'on compare ces nouveaux outils aux méthodes habituelles *in vivo* [Figure 5.1]

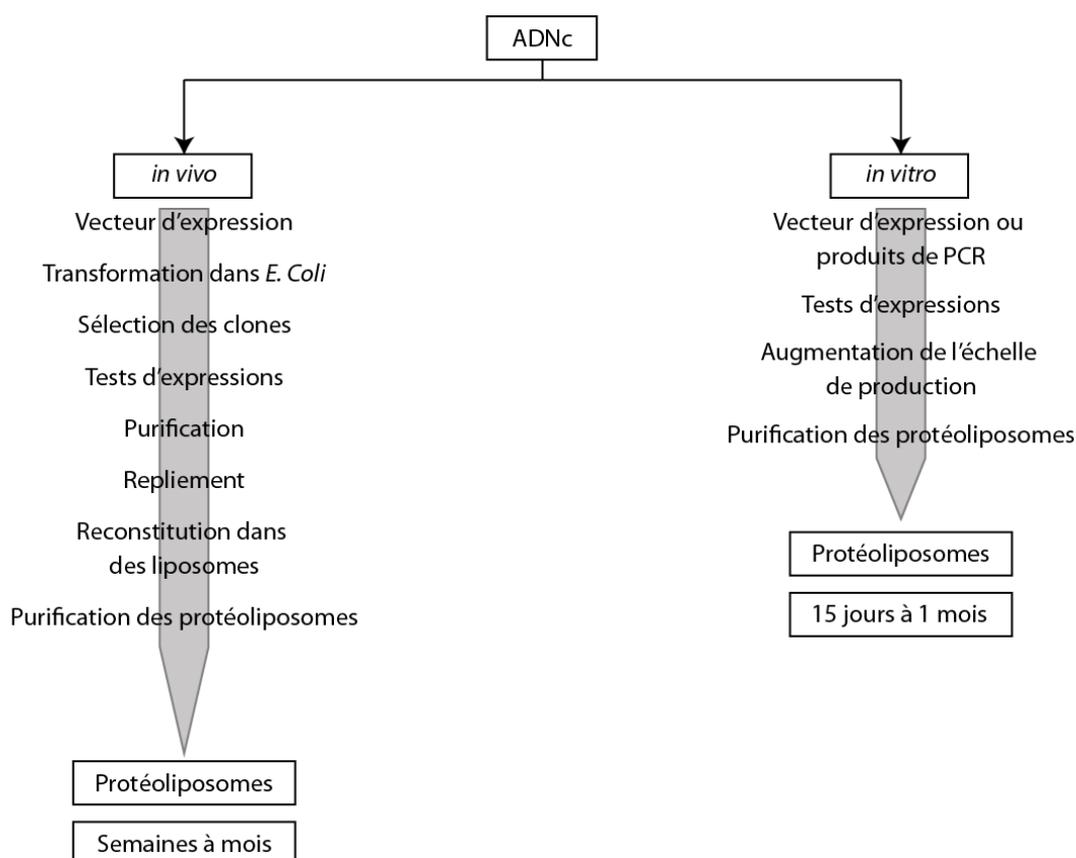


Figure 5.1 : Schéma comparatif du travail à fournir typiquement pour l'expression de protéines *in vivo* ou *in vitro* dans le cadre de la production de protéoliposomes

Des extraits cellulaires (*E. Coli*, WGE ou lysat de réticulocyte de lapins) ont été utilisés pour produire les canaux mécano-sensibles de petite (MscS) et grande (MscL) conductance présents chez *Escherichia Coli* (Battle et al., 2009), l'apo cytochrome B<sub>5</sub> (Nomura et al., 2008) et les connexines Cx32 et Cx43 (Kaneda et al., 2009) dans leurs formes fonctionnelles enchâssées dans la membrane des liposomes géants.

Dans les exemples cités précédemment, les liposomes géants utilisés étaient obtenus par gonflement spontané. Même si cette technique reste robuste et simple à mettre en place,

elle présente aussi des limitations, comme le rendement de production et la polydispersité. De plus les liposomes obtenus sont généralement multilamellaires. Or, l'étude des protéines membranaires requiert des liposomes unilamellaires.

Nous avons voulu développer un système plus versatile encore, permettant de générer, des GUVs dont la fonctionnalisation pourrait être suivie par microscopie confocale, le tout en une seule étape et dans un délai de quelques heures.

Dans un premier temps, nous avons commencé par produire les liposomes en utilisant l'électroformation. Cette technique permet en effet comme nous l'avons vu au chapitre précédent (chapitre 4 section 2.2) de produire des GUVs dont la forme sphérique est parfaitement définie et dont l'unilamellarité est certaine. L'inconvénient majeur de l'électroformation est qu'elle est très difficilement utilisable avec des systèmes comportant une force ionique élevée, bien qu'il existe des ajustements de champs électriques permettant la production de liposomes dans ces conditions (Pott et al., 2008)(Méléard et al., 2009). Compte tenu des volumes de réaction nécessaires à l'électroformation, nous avons préféré produire les liposomes dans une solution de sucrose. En post-production, nous nous retrouvons donc avec les liposomes baignant dans la solution de sucrose (chapitre 4 section 2.2 Figure 4.10). Le transfert des liposomes dans une solution assemblée de PURExpress®, engendrait également un transfert d'un volume non négligeable de la solution de sucrose, dans laquelle baignaient les liposomes. Bien qu'elle soit diluée dans la solution d'expression, nous avons remarqué que la présence de sucrose inhibait fortement l'expression des protéines.

Nous avons donc envisagé une autre approche. Pour réaliser cela, nous nous sommes basés sur le principe de la méthode de transfert décrite précédemment (chapitre 4 section 2.3.1) afin de produire les liposomes. L'avantage de cette technique par rapport à l'électroformation réside dans le fait que les liposomes sont introduits directement dans la solution d'expression dans laquelle nous produisons une protéine membranaire par l'intermédiaire du PURExpress® dans lequel des liposomes géants ont été transférés.

### **Protocole 3**

Des échantillons de 20  $\mu\text{L}$  sont préparés en assemblant 4  $\mu\text{L}$  d'une eau sans ARNase (Sigma), 10  $\mu\text{L}$  d'une solution A (5X), 2  $\mu\text{L}$  d'ADN à 100  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  et 4  $\mu\text{L}$  d'une solution B. Les solutions A et B proviennent du kit commercial PURExpress®. Les échantillons sont placés au fond des puits formés (5 mm de diamètre) à l'aide d'une lame de verre et d'un bloc de polydiméthylsiloxane (PDMS) poinçonné collé sur celle-ci. Le PDMS et le verre sont nettoyés à l'eau et à l'isopropanol, puis subissent un traitement au plasma d'oxygène pour finir de les nettoyer et d'activer leur surface afin de les coller. Le milieu d'expression est recouvert par 20  $\mu\text{L}$  du mélange d'huile minérale (Sigma) et de phospholipide (0,5 mM EPC (L- $\alpha$ -phosphatidylcholine)) afin de former l'interface de phospholipides entre le milieu d'expression et l'huile minérale. L'assemblage est suivi d'un temps d'incubation de 15 minutes permettant la formation de l'interface de phospholipides entre le milieu d'expression et la phase hydrophobe. Ces deux étapes sont réalisées à 4 °C. La génération des GUVs se fait grâce à l'ajout de gouttelettes de sucrose préparées dans le même mélange d'huile minérale et de phospholipides (0,5 mM EPC) [Figure 5.2]. La solution de sucrose est constituée de sucrose ( $\approx 0,69$  M dans un tampon phosphate salin (PBS) 1X pH = 7,4) et d'Azoture de sodium ( $\text{NaN}_3 = 4,6$  mM). La concentration de sucrose exacte est ajustée pour obtenir une solution isotonique au milieu d'expression cellulaire ( $\approx 990$  mOsm) mesurée à l'aide d'un osmomètre cryoscopique (Löser). 20  $\mu\text{L}$  de cette solution sont ajoutés et par différence de densité : les gouttelettes sont amenées à traverser l'interface et ainsi à former les GUVs.

Le montage est ensuite transféré dans une chambre d'incubation à 37 °C permettant ainsi l'expression de la protéine par le système CFRPS.

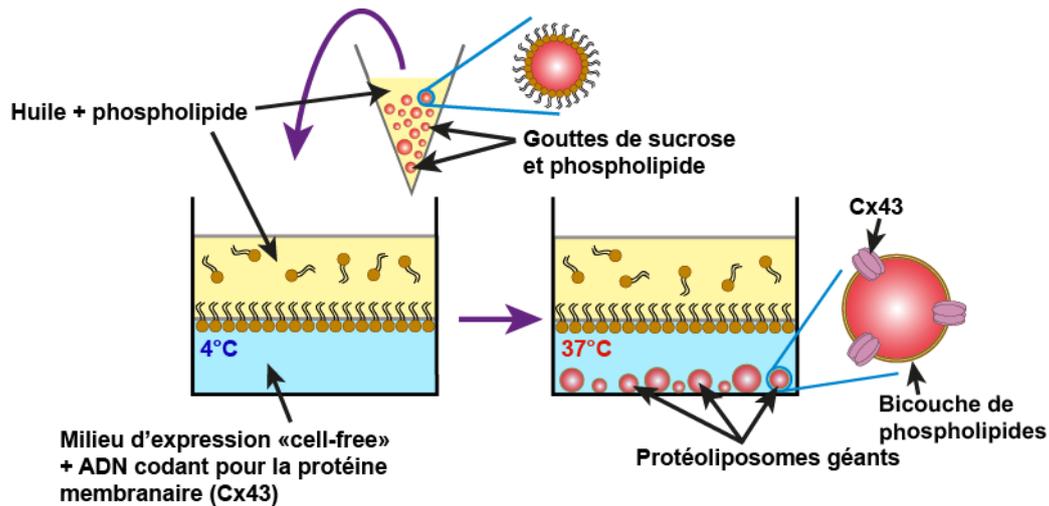


Figure 5.2 : Schéma de préparation des protéoliposomes géants. Les gouttelettes de sucre présentes dans l'huile contenant les phospholipides (0,5 mM EPC dans l'huile minérale) sont transférées par gravité pour générer des liposomes géants dans le milieu d'expression « cell-free » (PURExpress®) contenant l'ADN codant pour la Cx43-eGFP, une protéine membranaire connexin-43 fusionnée à une protéine eGFP permettant le suivi de l'expression et de l'insertion dans la membrane des liposomes géants par microscopie confocale.

La méthode de transfert a été adaptée de manière empirique par rapport à la méthode originellement décrite (cf chapitre 1 section 2.3.1). Nous avons utilisé le sucre dans le but de faciliter le transfert à travers l'interface pour la formation des GUVs, mais aussi pour leur stabilité. En effet, le PURExpress® est un milieu présentant une forte osmolarité ( $\approx 990$  mOsm dans nos conditions expérimentales), qui induit une rupture des liposomes si elle n'est pas contrebalancée, le sucre nous permet de mettre en place un équilibre isotonique entre le contenu des GUVs et le milieu extérieur.

Le suivi par microscopie optique [Figure 5. 3] du transfert de liposome nous montre que la technique développée nous permet d'obtenir une population de liposomes géants dont le diamètre varie entre 20 et 120  $\mu\text{m}$ , le tout dans un milieu d'expression « cell-free » (PURExpress®) présentant une haute osmolarité ( $\approx 990$  mOsm).

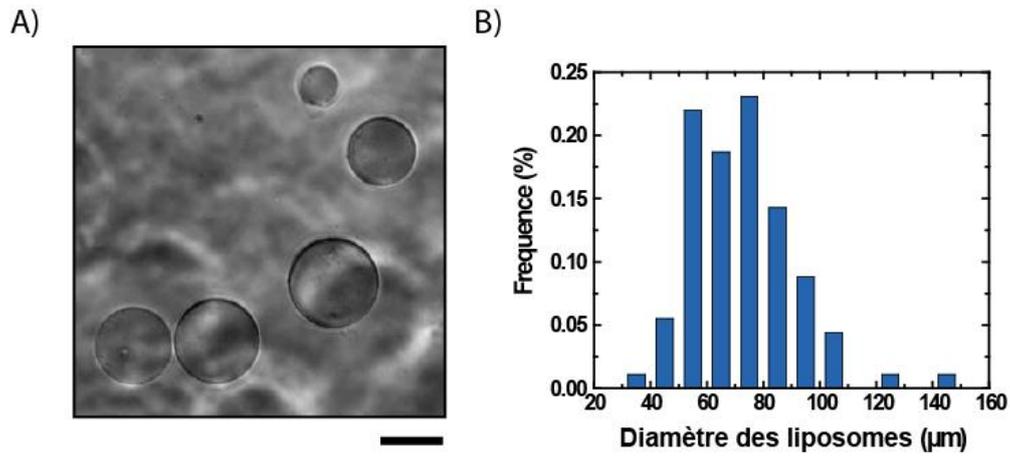


Figure 5.3 : Caractérisation de la population de liposomes obtenus par transfert dans un milieu d'expression. (A) Image de microscopie optique en contraste de phase et (B) distribution des diamètres des liposomes géants obtenus par transfert. Barres d'échelles : 50 µm

## **2. Suivi de l'insertion des protéines dans les liposomes**

Dans cette section j'exposerai comment j'ai mis en application le système de transfert présenté au cours de la section précédente pour le suivi de production et de fonctionnalisation de liposomes par des protéines membranaires.

### **2.1 Les protéines membranaires**

Comme nous avons pu le voir au chapitre 1, les protéines sont des enchaînements d'acides aminés (AA), aussi désignés sous le terme de résidus. L'enchaînement de la séquence de résidus constitue la structure primaire d'une protéine. La structure secondaire de la protéine correspond au repliement de la chaîne d'AA sur certains segments produisant ainsi des hélices  $\alpha$  et des feuilletts  $\beta$ . La structure tertiaire indique l'agencement des structures secondaires les unes par rapport aux autres et donc la structure globale tridimensionnelle de la protéine.

Certaines protéines produites par les cellules (eucaryotes et procaryotes) interagissent avec les membranes et s'y incorporent : ce sont les protéines membranaires. Ces protéines peuvent plus ou moins interagir avec les membranes (de la protéine intrinsèque à la protéine ancrée à la membrane). Une protéine intrinsèque comportera un ou plusieurs domaines transmembranaires dont les séquences en AA auront été optimisées pour interagir avec le feuillet hydrophobe de la bicouche.

De par leur localisation, les protéines membranaires sont des éléments clés des processus de régulation, puisqu'elles permettent entre autre l'adhérence et la communication cellulaire (procaryote et eucaryote). La communication joue un rôle important dans la survie des organismes uni- et pluricellulaires. Chaque type cellulaire doit pour cela maintenir son individualité, tout en partageant une synergie avec l'ensemble de l'organisme. Les organismes ont évolué afin de présenter de multiples stratégies permettant cette coordination cellulaire, incluant de la communication longue distance, médiée par des mécanismes neuronaux ou endocriniens, et courtes distances incluant les interactions cellule-cellule. Alors que la première solution n'implique que des interactions à distance, la deuxième comprend de la

transmission cellule à cellule de molécules par des structures spécifiques présentes à la membrane des cellules, appelées jonctions Gap (jonctions communicantes).

Les fonctions de ces protéines font d'elles des cibles d'étude d'intérêt majeur afin de mieux appréhender leurs fonctions physiologiques et pathologiques. Dans le cadre de mes travaux de thèse, j'ai décidé de travailler sur les protéines responsables de la formation des jonctions gap : les connexines.

## **2.2 Les connexines**

Les jonctions gap contiennent des canaux qui permettent de relier deux cellules voisines, ce qui permet des échanges intercellulaires passifs de petites molécules, incluant des ions, des acides aminés, des nucléotides et des messagers secondaires (Calcium, Adénosine MonoPhosphate cyclique (AMPc), Guanosine MonoPhosphate cyclique (GMPc) et l'Inositol triPhosphate (IP<sub>3</sub>)). Ces échanges affectent la physiologie des cellules, le contrôle de la croissance et du développement embryonnaire, aussi bien que la transmission de signaux électriques entre cellules (Simon et al., 1997)(Simon et al., 1998)(Temme et al., 1997).

Ces jonctions présentent une organisation hiérarchique d'assemblage dont le principal composant est la protéine membranaire connexine. La jonction est formée de deux connexons, eux-mêmes résultants de l'assemblage d'un hexamère de connexines.

Il existe au moins 21 familles de connexines chez les humains. Néanmoins, chaque connexine suit le modèle topologique général de la jonction Gap. Dans ce modèle, le polypeptide traverse la bicouche lipidique quatre fois, avec les parties N- et C-terminales du côté cytoplasmique de la membrane. La protéine présente deux boucles extracellulaires qui permettent la continuité entre les domaines M1-M2 et M3-M4 et une boucle cytoplasmique qui permet la liaison entre les domaines M2-M3 [Figure 5.4]. Une connexine possède quatre domaines transmembranaires en hélice  $\alpha$ . Un connexon est un hexamère de connexines et sera donc composé de 24 domaines transmembranaires.

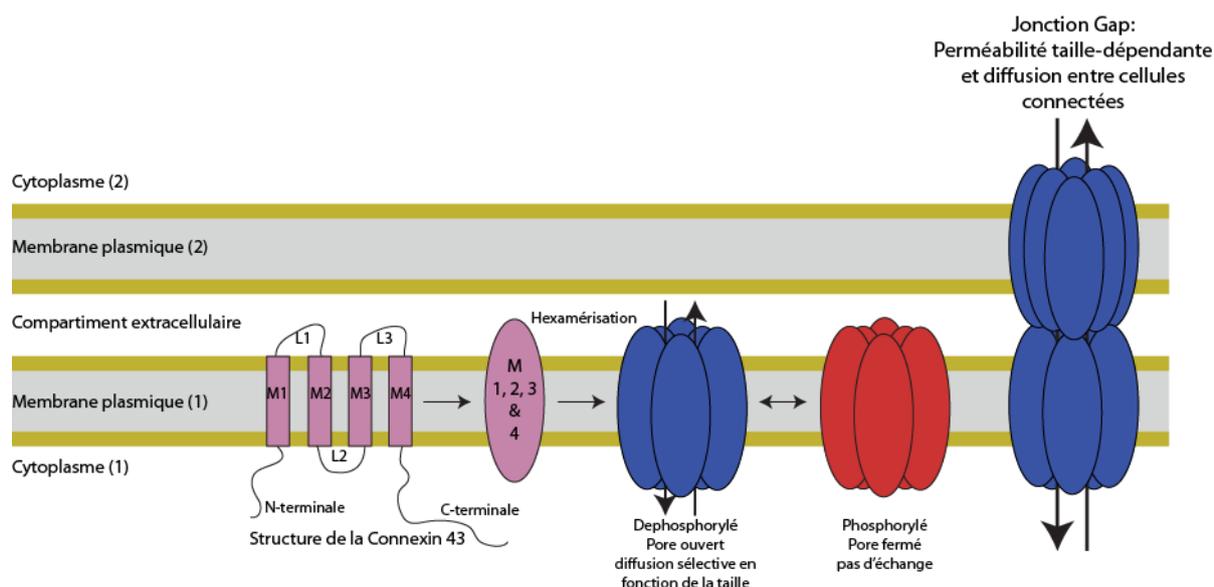


Figure 5.4 : Modèle moléculaire pour la topologie de la connexine dans une cellule eucaryote. Les domaines transmembranaires sont représentés par les rectangles M1 à M4. Les boucles L1 et L3 sont localisées dans le compartiment extracellulaire, L2 se trouve dans le cytoplasme. L'ovale rose représente une vue simplifiée de la structure de la connexine 43. L'oligomérisation de six connexines permet la création d'un espace hydrophobe (pore) qui est ouvert lorsque les connexines ne sont pas phosphorylées et fermé dans le cas contraire. L'ouverture et la fermeture du pore sont responsables de la diffusion passive de petites molécules.

### 2.3 La connexine 43 : construction et caractérisation de l'expression

Dans le but de réaliser les études sur la connexine 43 (Cx43), le gène d'intérêt de cette protéine a été conçu à partir d'un plasmide optimisé pour l'expression en PURExpress®, afin de pouvoir exprimer une fusion entre la Cx43 et la eGFP. Le gène d'intérêt, d'une taille de 1,3 kbp, a été réceptionné dans un plasmide commercial, un pMA-QA.

La structure du plasmide et la séquence utilisée sont données en Figure 5.5. La séquence du gène commence par un promoteur T7 (TAATACGACTCACTATAG, positions 50-67), suivie d'un site de fixation des ribosomes (GAAGGAGAT, positions 115-123), le T7 gène 10 leader (ATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA, positions 129-155) (séquence renforçant l'expression) et un codon de démarrage (ATG, positions 159-161). La séquence codant pour la Cx43-eGFP est ensuite insérée (positions 1320-2027) et terminée par un codon stop (TGA, positions 2025-2027). Au sein du gène d'intérêt se trouve une séquence dite « linker » entre la partie codant pour la Cx43 et la partie codant pour l'eGFP, afin de minimiser l'effet de repliement d'une « protéine » par rapport à l'autre pour obtenir un repliement optimal de celles-ci. Le terminateur T7 est inclus

(TAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTTG, positions 2109-2154) après une séquence lambda permettant d'éloigner le terminateur.

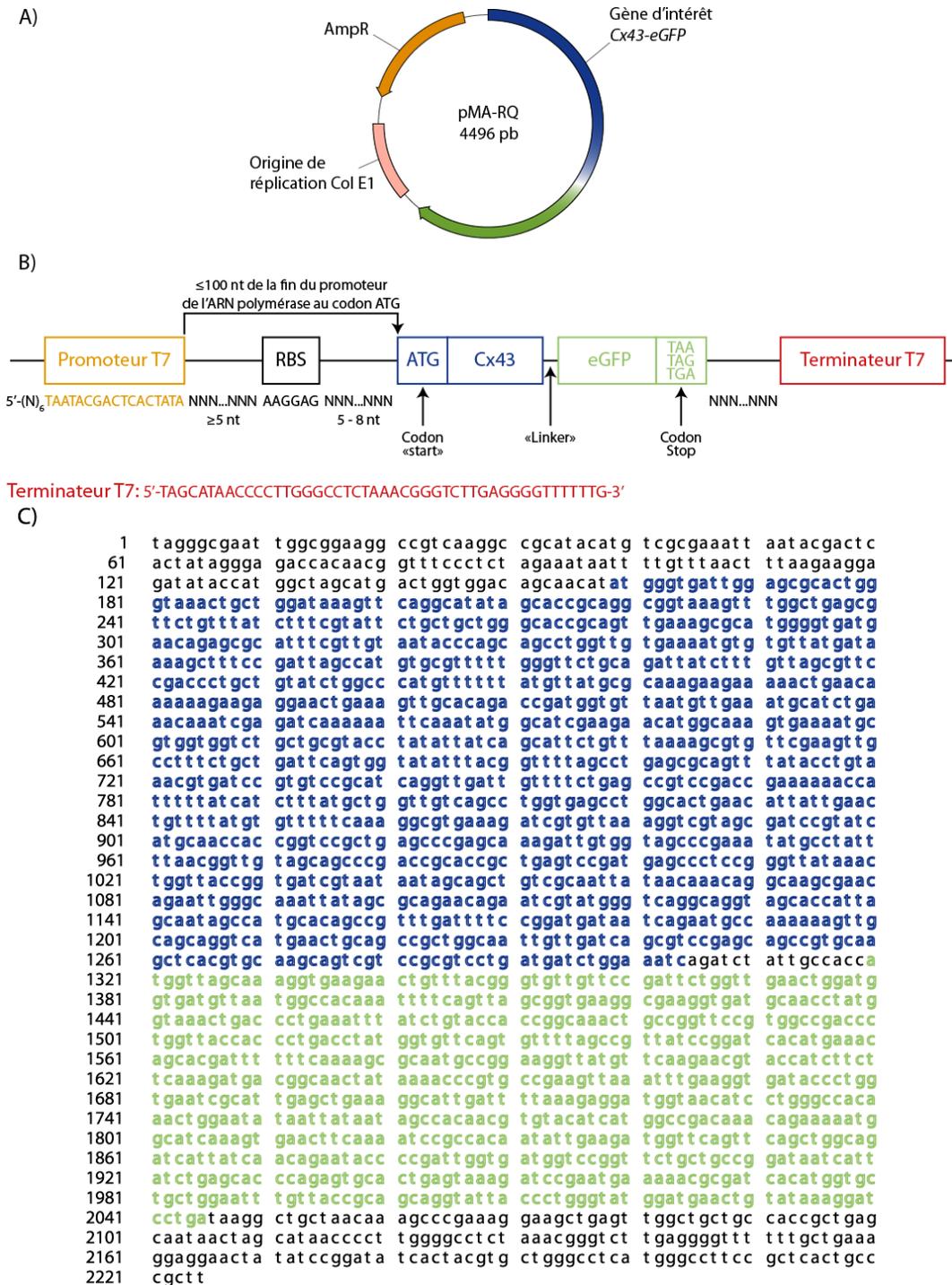


Figure 5.5 : (A) Plan du plasmide contenant le gène d'intérêt dans le vecteur pMA-RQ possédant un gène de résistance à l'ampicilline. (B) Plan de l'insert selon les spécifications de New England BioLabs, avec notamment un promoteur et un terminateur T7 encadrant le gène d'intérêt et une protéine rapporteur (eGFP). (C) Séquence du gène d'intérêt correspondant à la vue schématique (A).

Suivant la réception de notre construction génétique, nous avons cherché à caractériser la production de la Cx43 à partir d'un plasmide ADN contenant le gène codant pour la protéine. L'expression génétique est assurée par des kits de PURExpress® (*In vitro* Protein Synthesis Kit, NEB) utilisés en tandem avec le plasmide ADN adapté. La caractérisation de la production protéique nécessite de faire appel à deux outils classiques de biochimie, les gels de protéines et les Western Blots (immunoblotting).

### **Protocole 4**

Des échantillons de 20  $\mu\text{L}$  sont préparés en assemblant 4  $\mu\text{L}$  d'une eau sans ARNase (Sigma), 10  $\mu\text{L}$  d'une solution A (2X), 2  $\mu\text{L}$  d'ADN à  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  et finalement 4  $\mu\text{L}$  d'une solution B (5X). Les solutions A et B proviennent du kit commercial PURExpress®.

### **Protocole 5**

Dans un premier temps, on réalise une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide pour séparer les protéines selon leur poids moléculaire. Dans un second temps, on repère spécifiquement la position de la protéine d'intérêt par immunoblotting.

Des gels NuPAGE® précoulés avec un gradient de 4 à 12% de Bis-Tris, un tampon biologique fréquemment employé en biochimie, possédant 10 ou 15 puits, sont employés. Les échantillons à caractériser ont été obtenus par mélange du milieu d'expression avec ou sans le plasmide ADN codant pour la protéine d'intérêt et en présence ou en absence de liposomes pendant l'expression. Ils sont incubés pendant 120 minutes à 37 °C pour permettre la synthèse protéique. Un petit volume de chaque échantillon est prélevé afin de préparer des solutions adaptées à l'électrophorèse sur gel. Ces solutions sont assemblées en réunissant 2,5  $\mu\text{L}$  d'une solution NuPAGE® LDS tampon d'échantillon (4X), 1  $\mu\text{L}$  d'une solution NuPAGE® d'agent de réduction (10X), 4  $\mu\text{L}$  d'eau MilliQ et finalement 2,5  $\mu\text{L}$  du milieu d'expression incubé.

Les protéines sont alors chauffées à 72 °C pendant 15 à 20 minutes puis déposées sur le gel. On applique alors un champ électrique de 150 V à 110 mA, provoquant ainsi la migration des protéines par électrophorèse. Une fois la migration effectuée, les protéines peuvent être mises en évidence par une coloration spécifique basée sur l'utilisation d'un mélange de bleu de Coomassie, de 10 % d'éthanol et de 10 % d'acide acétique.

Le gel dit de Coomassie permet de visualiser différentes bandes bleues correspondant aux protéines contenues dans l'échantillon caractérisé. Dans le cas de l'utilisation du PURExpress®, un très grand nombre de bandes sont présentes, ce qui rend la détection de nouvelles bandes bien plus délicate [Figure 5.6].

Pour être en mesure d'identifier une bande correspondant à une protéine particulière parmi un grand nombre d'autres bandes, le gel obtenu après migration peut également être utilisé pour réaliser une technique dite d'immuno-blotting ou de Western Blot. Il faut tout d'abord effectuer le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose, par l'application de 30 V pendant une heure dans un dispositif adapté. La membrane est alors mise en présence de protéines de lait écrémé (solution à 5% dans un tampon TBS avec 1% de Tween 20 (Lait-TBST)) pour éviter toute absorption non spécifique au cours des étapes suivantes. Après lavage, on place la membrane dans un bain contenant un anticorps polyclonale anti-connexine 43 produit dans un lapin (provenant de Cell Signaling Technology) (dilution 1:1000 en tampon lait-TBST) pendant une nuit à 4 °C. Finalement, après trois lavages, on recouvre la membrane par une solution contenant une Immunoglobuline G (IgG) anti-lapin (dilution 1 :1000 en tampon lait-TBST) liée à une peroxydase de raifort, HRP (provenant de Cell Signaling Technology). Après plusieurs lavages, un kit de détection par chimiluminescence est utilisé pour obtenir un signal enregistré avec un lecteur Syngene G:box doté du programme GeneTools. De façon intéressante, il est possible de relier l'intensité des signaux de Western Blots et de gels de Coomassie à la quantité de protéine présente (dans la limite des techniques de détection du système). Pour l'étude de la production de la Cx43-eGFP à l'aide d'un kit de PURExpress® sans étape de purification, la technique d'immunoblotting est nécessaire, car le gel de Coomassie est difficile à lire du fait des multiples protéines de poids moléculaires proches de la protéine cible présentes dans le milieu. Sur la membrane de nitrocellulose traitée, les bandes les plus intenses, correspondant à la Cx43-eGFP, sont visibles au niveau des bandes de 70 kDa.

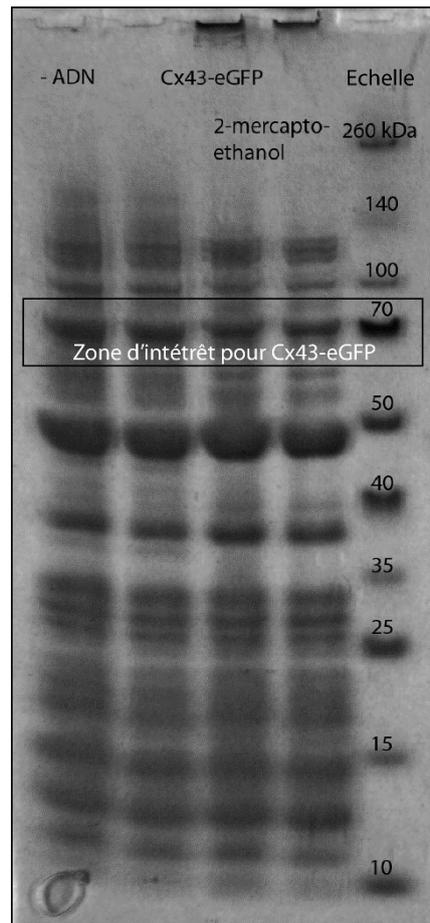


Figure 5.6 : Résultat du gel d'électrophorèse NuPAGE®. Les bandes correspondent à la présence d'une protéine.

Comme nous pouvons le constater sur la Figure 5.6, le gel de Coomassie nous permet de visualiser différentes bandes correspondant aux protéines contenues dans l'échantillon caractérisé. Malheureusement, le PURExpress® comprend déjà un grand nombre de protéines de tailles variées, d'où la présence d'un très grand nombre de bandes. Ceci rend la détection de nouvelles bandes bien plus délicate [Figure 5.6]. C'est pourquoi nous avons opté pour une technique de Western Blot afin de mettre en évidence la synthèse protéique. La Figure 5.7 consiste en un zoom du Western Blot au niveau des bandes de masses moléculaires de 70 kDa, car notre protéine de fusion Cx43-eGFP tel que nous l'avons conçue a un poids moléculaire de 70,6 kDa. En l'absence de la matrice ADN, il n'y a pas de signal (piste 1), tandis qu'en présence de l'ADN, on voit apparaître une bande (pistes 2 à 4). Il y a donc bien production de Cx43-eGFP. On observe une augmentation de l'intensité du signal après une augmentation du temps d'incubation du milieu d'expression, de 120 minutes à une nuit (pistes 3 et 4) [Figure 5.7], le milieu n'a donc pas terminé d'exprimer la protéine au bout de deux heures. De plus, nous pouvons noter que la présence de liposomes n'influence pas

l'expression de la protéine car l'intensité des bandes avec ou sans présence de liposomes ne met pas en avant de différence significative (pistes 2 et 3).

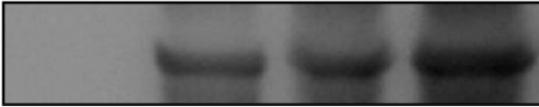
<b>Piste n°</b>	<b>(1)</b>	<b>(2)</b>	<b>(3)</b>	<b>(4)</b>
<b>ADN</b>	-	+	+	+
<b>Liposomes</b>	-	-	+	+
<b>Expression</b>	2h	2h	2h	12h
<b>Cx43-eGFP</b>				

Figure 5.7 : Résultats de l'étude par immunoblotting présentés avec une photographie obtenue par détection du signal de chimiluminescence, en fonction de l'absence/présence d'ADN, de liposomes et en fonction du temps d'expression.

Nous avons réalisé en parallèle un suivi confocal de l'expression de la protéine en présence de liposomes. La Figure 5.8 présente un accéléré permettant de suivre l'évolution des liposomes (contraste de phase) et de la fluorescence, liée à la Cx43-eGFP, en fonction du temps. Nous pouvons remarquer que la fluorescence du système augmente avec le temps d'incubation avec notamment une localisation très marquée au niveau de la membrane du liposome [Figure 5.8]. Nous en concluons qu'il y a une accumulation de la protéine de fusion au niveau de la membrane.

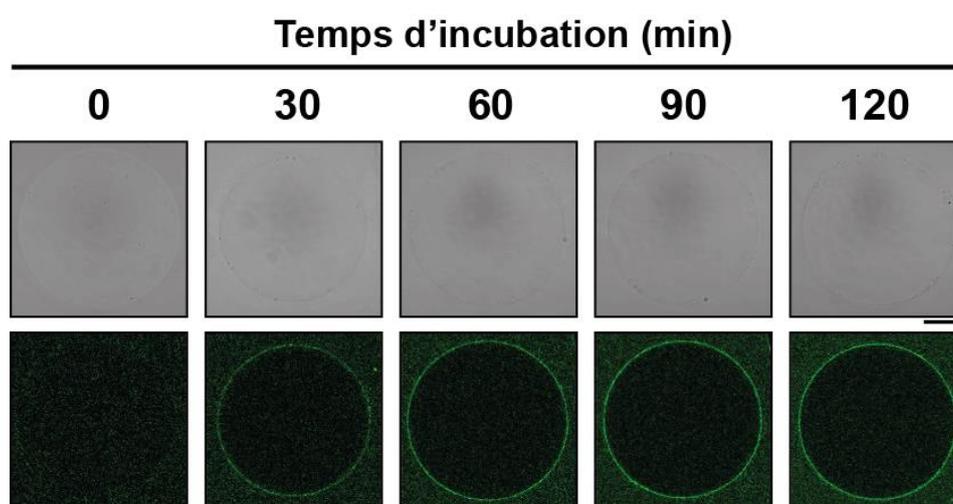


Figure 5.8 : Suivi par imagerie en microscopie optique de la localisation de la protéine membranaire au cours du temps. En haut : images de microscopie en contraste de phase. En bas : microscopie confocale. Barres d'échelles : 20  $\mu$ m.

Afin de mieux comprendre le phénomène, nous avons fait varier les conditions d'expression et observé les conséquences sur la co-localisation de la fluorescence et de la membrane des liposomes.

## **2.4 L'insertion de Cx43-eGFP : un phénomène passif co-translationnel**

Pour l'étude de l'insertion de la Cx43-eGFP dans des liposomes, j'ai utilisé le système précédemment décrit à la Figure 5.2Figure 5. de la section précédente.

Trois variantes de cette technique ont été utilisées pour permettre une étude plus approfondie des mécanismes d'insertion de la Cx43-eGFP. Ainsi le transfert des liposomes est réalisé avant ou à différents temps pendant l'expression, mais aussi après l'expression de la Cx43-eGFP [Figure 5.9].

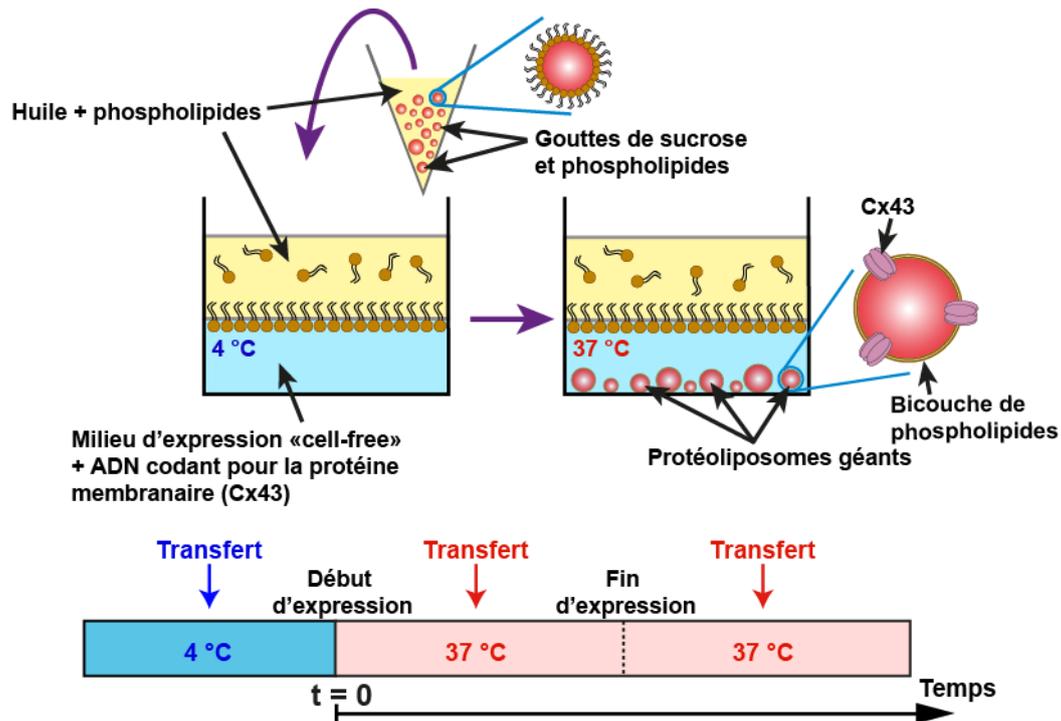


Figure 5.9 : Présentation du montage expérimental pour étudier l'influence des temps de transfert des liposomes sur l'insertion de la protéine dans les membranes. **Transfert avant l'expression** : L'émulsion (20  $\mu$ L) est ajoutée sur les deux premières couches alors que le système est conservé à 4 °C. Le montage est ensuite placé dans la chambre d'incubation du microscope confocal (LSM 710, Zeiss) où la température est de 37 °C permettant ainsi l'expression de la protéine. **Transfert pendant l'expression** : La chambre contenant les deux premières couches est d'abord placée dans la chambre du confocal, afin d'incuber à 37 °C pendant 1 ou 2 heures avant d'ajouter l'émulsion (20  $\mu$ L). **Transfert après une expression sur la nuit** : le transfert des liposomes est effectué (20  $\mu$ L d'émulsion) alors que le montage a incubé toute la nuit à 37 °C, dans la chambre du microscope confocal.

La microscopie confocale (LSM 710, Zeiss) est utilisée pour nous permettre de suivre la distribution spatiotemporelle de la Cx43-eGFP dans l'échantillon et pour confirmer l'insertion de la protéine dans la membrane des liposomes géants présents dans le milieu d'expression.

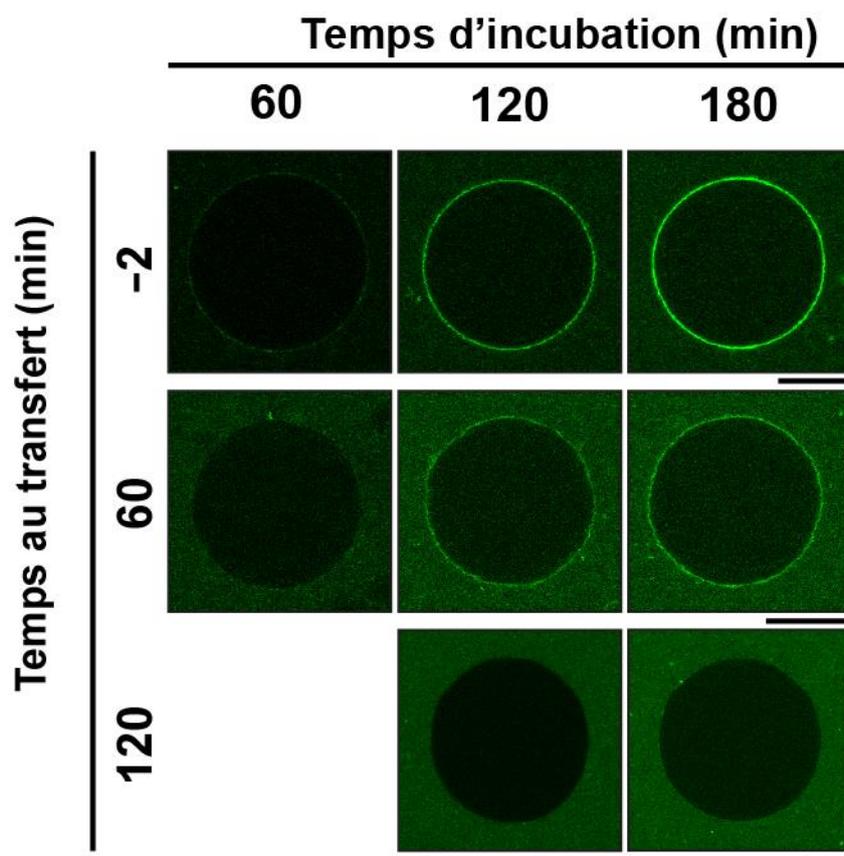


Figure 5.10 : Images de microscopie confocale (Fluorescence eGFP) du time-lapse de la production et de l'insertion de Cx43-eGFP en fonction du temps d'incubation et du temps auquel le transfert a été réalisé. Barres d'échelles : 20  $\mu$ m.

La Figure 5.10 montre bien qu'il y a une augmentation générale de la fluorescence dans le milieu d'expression à l'extérieur des liposomes, quel que soit le temps d'incubation au transfert. On peut observer que lorsque le transfert est réalisé avant le début de l'expression il y a une très forte localisation de la protéine de fusion à la membrane des liposomes. Dans le cas où les liposomes sont créés pendant l'expression, on peut constater que plus leur temps de production est différé, moins il y a de fluorescence à la membrane des liposomes. Pour un transfert à 120 minutes, nous ne pouvons pas observer de fluorescence localisée à la membrane. Néanmoins, la fluorescence du milieu d'expression semble similaire voire supérieure au cas où les liposomes sont créés avant le début de l'incubation. Il est intéressant d'observer que le phénomène d'insertion de la protéine dans la membrane d'un liposome est très dépendant du temps auquel le transfert a eu lieu et qu'on obtient de meilleurs rendements si les liposomes sont présents avant le début de l'expression.

L'analyse quantitative d'une population entière de liposomes géants, par analyse de la moyenne de leurs profils radiaux de fluorescence à la Figure 5.11 A, nous permet de confirmer l'aspect temps de transfert dépendant de la localisation de la protéine à la

membrane [Figure 5.11 B]. On observe des intensités de fluorescence comparables à l'intérieur des liposomes, pouvant être assimilés au bruit de fond du système, et une fluorescence similaire dans le milieu de production externe aux liposomes quel que soit le temps d'ajout des liposomes. Enfin, comme nous avons pu le constater sur la Figure 5.10, un pic systématique de fluorescence à la position de la membrane ( $r/R_0 = 1$ ) est présent. Celui-ci décroît lorsque les liposomes sont créés après le début d'incubation. Cette décroissance est d'autant plus marquée que les liposomes sont transférés tardivement.

Pour un suivi de population de liposomes transférés avant le début de l'incubation [Figure 5.11 C], on peut constater qu'à l'intérieur de ceux-ci il y a une augmentation de l'intensité de fluorescence attribuable à une augmentation du bruit de fond. On note également une augmentation de la fluorescence dans le milieu d'expression correspondant à la production de la protéine de fusion au cours du temps. Enfin on peut observer l'augmentation du pic de fluorescence correspondant à la position de la membrane. Lorsque le transfert a lieu avant l'incubation, il y a donc une forte corrélation entre l'augmentation de la fluorescence localisée à la membrane, avec la présence d'un pic systématique de fluorescence, et le temps d'incubation du système [Figure 5.11 C].

Lorsque le transfert intervient après le début de l'expression, la corrélation sera d'autant moins forte que celui-ci est tardif (corrélation à 60 minutes > corrélation à 120 minutes >> corrélation après une expression sur la nuit)). Ceci est particulièrement marqué dans l'expérience où le temps d'incubation avant le transfert a été drastiquement augmenté [Figure 5.11 D] et où nous pouvons constater qu'il y a une fluorescence comparable dans l'échantillon mais qu'il n'y a pas de pic de fluorescence à la membrane, en dépit du temps de contact entre les liposomes et le milieu d'expression contenant les protéines.

Le PURExpress® étant un système d'expression reconstitué à partir d'éléments purifiés définis, celui-ci ne contient donc aucune protéine permettant un transport actif de la protéine dans la membrane. Les résultats précédemment observés nous indiquent donc qu'il s'agit, comme dans le cas des SUVs (Moritani et al., 2010)(Long et al., 2012), d'un phénomène purement passif et co-translationnel, qui permet l'insertion de la Cx43-eGFP dans la membrane des liposomes géants.

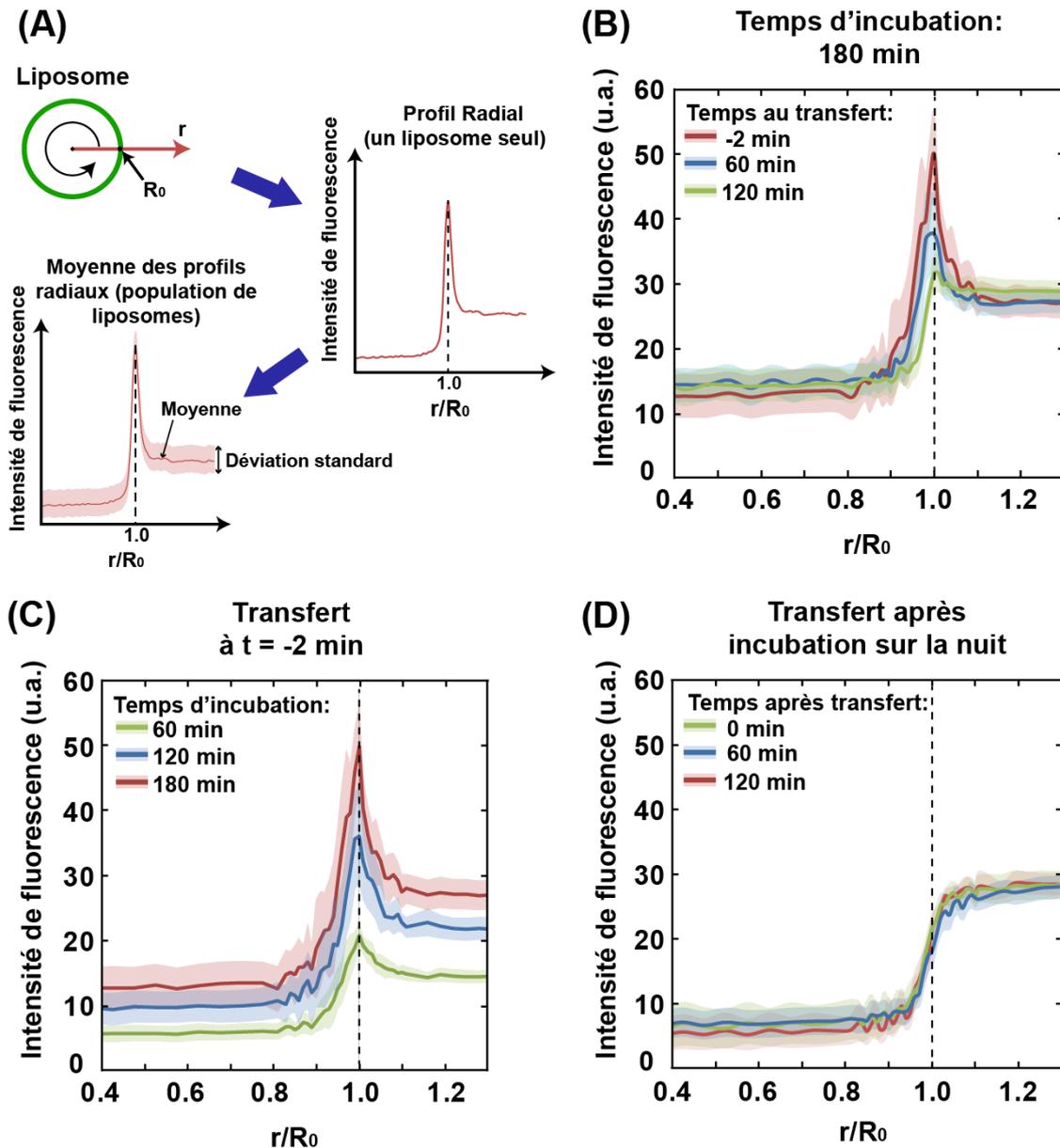


Figure 5.11 : Méthode de caractérisation de l'insertion efficace de la Cx43-eGFP dans la membrane des liposomes géants. Pour chaque analyse, une trentaine de liposomes ont été traités. (A) Un profil radial d'intensité de fluorescence est établi pour chaque liposome avant de moyenniser les profils sur une population d'une centaine de liposomes. (B) Profil radial moyen en fonction du temps auquel le transfert a été réalisé. Le même temps d'incubation (37 °C, 180 min) est appliqué aux échantillons. (C) Profil radial moyen en fonction du temps d'incubation à 37 °C pour des liposomes transférés avant le début d'expression. (D) Profil radial moyen en fonction du temps après transfert, pour des liposomes géants transférés après une incubation à 37 °C sur la nuit.

### **3. Tests de fonctionnalité des protéoliposomes**

Nous venons de montrer que la Cx43-eGFP s'insère de manière passive et co-translationnelle dans la membrane des liposomes géants que nous sommes capables de générer grâce à la méthode de transfert que nous avons adaptée.

Comme je l'ai présenté précédemment, les connexines sont des protéines qui permettent non seulement la formation des jonctions gap mais aussi de pores dans les membranes. Dans le cas où la connexine n'est pas impliquée dans une jonction gap au sein de leur organisme hôte, les pores sont fermés (la protéine est dans un état phosphorylé). En absence de phosphorylation, les pores sont ouverts.

Afin de déterminer le bon fonctionnement de la protéine dans les membranes des liposomes géants, j'ai réalisé dans un premier temps des expériences de perméabilité simple par l'ajout d'une petite molécule fluorescente dans la solution de sucrose encapsulée. Dans un second temps, j'ai utilisé des molécules de différentes tailles afin d'estimer le seuil de coupure (« molecular cut-off ») des pores ainsi obtenus.

#### **3.1 Test de perméabilité**

Dans le milieu d'expression qu'est le PURExpress®, la Cx43 est produite sous une forme déphosphorylée. Lors de la formation de l'hexamère de Cx43, le passage hydrophobe formant le pore doit donc être ouvert (Kim et al., 1999) et permettre le passage de petites molécules, telles que les ions inorganiques, l'AMPc et l'IP<sub>3</sub>. L'utilisation de peptides conjugués à des fluorochromes, a permis à des chercheurs de déterminer que le pore du canal d'une jonction gap est relativement peu sélectif pour des molécules hydrophiles présentant un diamètre de 1,5 nm ou moins (Loewenstein, 1981). Néanmoins, il n'a pour le moment pas été reporté dans la littérature de valeurs concernant la valeur seuil de la taille d'une molécule pour qu'elle puisse diffuser dans le canal d'un connexon de Cx43 qui ne serait pas phosphorylé.

**Protocole 6**

Les échantillons sont assemblés comme décrit précédemment. Néanmoins, la solution de sucrose se voit adjoindre un marqueur fluorescent (iodure de propidium à 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ou 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de dextrane tétraméthylrhodamine isothiocyanate (TRITC) pour la section 3.2). La concentration de sucrose exacte est ajustée pour obtenir une solution isotonique au milieu d'expression cellulaire ( $\approx 990$  mOsm) mesurée à l'aide d'un osmomètre cryoscopique (Löser). 20  $\mu\text{L}$  de cette solution sont ajoutés et par différence de densité les gouttelettes sont amenées à traverser l'interface et ainsi à former les GUVs.

Le montage est ensuite transféré dans une chambre d'incubation à 37 °C permettant ainsi l'expression de la protéine par le système CFRPS.

Afin de démontrer la fonctionnalité du canal de la protéine synthétisée, nous basons nos expériences sur les résultats obtenus par d'autres équipes concernant l'ouverture du pore et la diffusion passive et sélective dont celui-ci fait preuve vis-à-vis de petites molécules (Toyofuku et al., 1998)(Bruzzone et al., 1996). Nous avons réalisé un suivi par microscopie confocale de la distribution spatiotemporelle de la Cx43-eGFP ainsi que de l'iodure de propidium (PI). La Figure 5.12 A montre bien qu'en absence d'ADN, l'intensité de fluorescence de la solution encapsulée ne diminue que très légèrement, probablement à cause du photoblanchiment. Bien que le PI est un composé ne traversant pas les membranes naturelles (Moore et al., 1998), il est également possible que les GUVs présentent une certaine perméabilité, due par exemple, à une légère différence de pression osmotique. *A contrario*, lorsque les protéines membranaires sont exprimées après le transfert des liposomes [Figure 5.12 A panneau 2], une diminution significative de la fluorescence du PI est observée.

Lorsque les liposomes sont transférés après une incubation sur la nuit de l'échantillon [Figure 5.12 A panneau 3], la fluorescence du PI encapsulé dans les liposomes reste stable. Nous pouvons d'ailleurs noter que comme pour l'expérience précédente [Figure 5.11 D] la fluorescence de la Cx43-eGFP n'est détectée que dans l'échantillon mais pas dans les membranes. L'analyse quantitative [Figure 5.12 B] des moyennes des intensités de fluorescence du PI sur une population de liposomes montre la même tendance.

Ces résultats nous montrent que la protéine, lorsqu'elle est exprimée en présence de liposomes, se trouve sous une forme fonctionnelle dans la membrane de ceux-ci, puisqu'elle

déclenche une perméabilité de la membrane. Au contraire, lorsque la protéine est exprimée en l'absence de liposomes, elle ne s'insère pas dans les membranes (suite à leur addition), n'induisant alors aucune perméabilité.

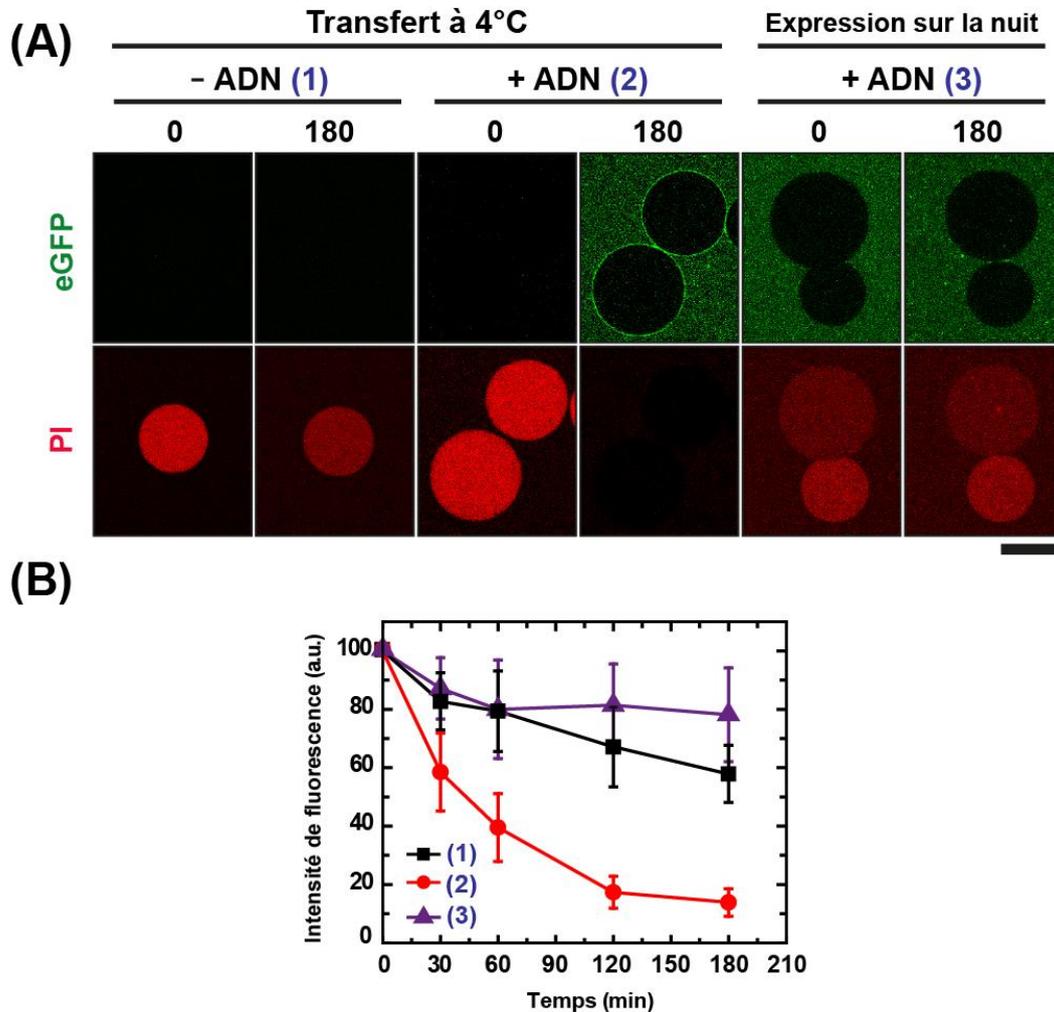


Figure 5.12 : Mise en évidence de la fonctionnalité de la protéine. (A) Time-lapse obtenu par microscopie confocale de liposomes géants encapsulant  $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$  d'iodure de propidium (PI) (en haut : fluorescence de l'eGFP, en bas : fluorescence du PI), en absence (- ADN) ou présence (+ ADN) de  $10 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$  d'ADN codant pour la Cx43-eGFP et produit par transfert à  $4^\circ\text{C}$  avant incubation à  $37^\circ\text{C}$  (panneaux 1 et 2), ou par transfert après une expression à  $37^\circ\text{C}$  sur la nuit (panneau 3). Pour chaque condition, les mêmes liposomes sont présentés à  $t = 0$  minutes et  $t = 180$  minutes. La barre d'échelle :  $50 \mu\text{m}$ . (B) Intensité de fluorescence du PI normalisée, tracée en fonction du temps, pour les trois conditions présentées en (A). L'intensité a été normalisée à 100 pour  $t = 0$  minutes pour chaque liposome. Les données sont présentées comme des moyennes  $\pm$  déviation standard.

### 3.2 Test de perméabilité sélective

Afin d'approfondir la compréhension de la perméabilité de la Cx43-eGFP produite en PURExpress®, nous avons réalisé des expériences similaires à la précédente mais en utilisant des molécules de dextrane TRITC fluorescentes de différentes tailles. En effet, selon la littérature, les connexines présentent une sélectivité vis-à-vis de la taille des molécules qu'elles laissent diffuser.

Il en est ressorti que les molécules de poids moléculaire supérieur à 4400 g.mol<sup>-1</sup> présentent un taux de fuite réduit. Comme le montre la Figure 5.13, l'intensité de fluorescence est stable en absence d'ADN codant pour la protéine connexine, quel que soit la masse moléculaire (MM) des fluorochromes. *A contrario*, lorsque la protéine est exprimée, la diminution de la fuite des molécules est fortement corrélée à l'augmentation de leur MM (Dextrane-TRITC : 4kDa, 20 kDa et 80 kDa).

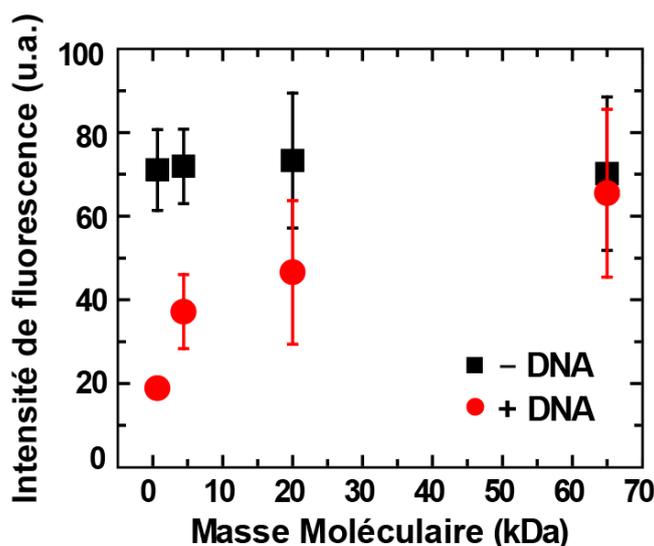


Figure 5.13 : Intensité de la fluorescence normalisée à l'intérieur des liposomes géants obtenus par transfert à 4 °C après incubation à 37 °C pour 120 minutes, en absence (-ADN, carrés noirs) ou en présence (+ADN, disques rouges) de 10 ng.μL<sup>-1</sup> d'ADN codant pour la Cx43-eGFP, en fonction de la MM des fluorochromes encapsulés. PI (40 μg.mL<sup>-1</sup>, MM = 668 g.mol<sup>-1</sup>) et dextrans-TRITC (200 μg.mL<sup>-1</sup>, MM ≈ 4800 g.mol<sup>-1</sup>, MM ≈ 20000 g.mol<sup>-1</sup>, MM ≈ 80000 g.mol<sup>-1</sup>). L'intensité est normalisée à 100 pour t = 0 minutes qui n'est pas représenté ici.

D'après nos résultats, nous pouvons conclure que la protéine présente dans les membranes des liposomes est bien fonctionnelle et qu'elle présente bien les caractéristiques de sélectivité attendue vis-à-vis de la taille des molécules pouvant diffuser dans le pore

qu'elle crée dans la membrane des GUVs. Suite à ce constat, nous avons voulu vérifier s'il était possible d'induire et de moduler cette perméabilité.

## 4. Un système déclenchable et modulable

### 4.1 Un système déclenchable sous contrôle de la température

Notre méthode de production des protéoliposomes repose sur la production de protéines *in situ* à partir d'un plasmide d'ADN. Il s'est donc avéré assez aisé de placer le contrôle de l'expression des protéines sous stimulus thermique. En effet, l'expression de protéine est inhibée tant que le système est conservé à 4 °C alors qu'il sera actif une fois à 37 °C. Nous avons donc utilisé cette propriété des systèmes d'expression afin de rendre nos liposomes déclenchables.

Les échantillons sont préparés selon les mêmes conditions présentées en section 3.1, ils sont ensuite placés à 4 °C pendant 2 heures avant de passer à 37 °C pour rétablir l'expression du système [Figure 5.14].

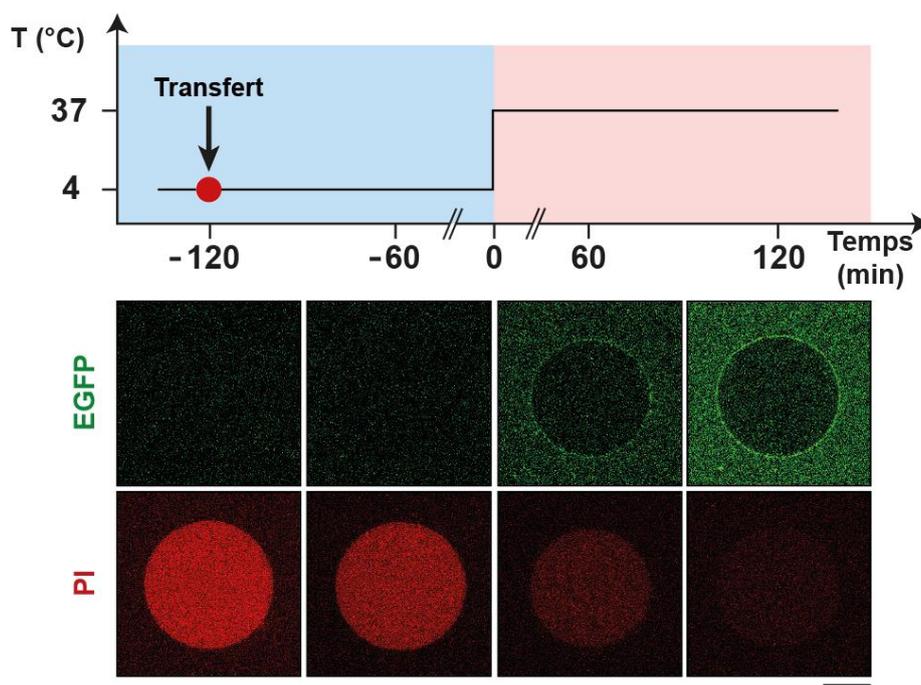


Figure 5.14 : Perméabilité de la membrane des liposomes géants déclenchée par la température. Les GUVs contenant  $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de PI sont transférées en présence d'ADN codant pour la Cx43-eGFP, l'ensemble est maintenu à 4 °C pendant 2 heures avant le début de l'incubation à 37 °C ( $t = 0$  minutes). Time-lapse d'image en microscopie confocale des liposomes (en haut : la fluorescence liée à l'eGFP, en bas : la fluorescence du PI). Barre d'échelle : 20  $\mu\text{m}$ .

Les images de microscopie confocale des liposomes [Figure 5.14] montrent bien que pendant la période d'incubation à 4 °C, il n'y a pas de production d'eGFP et que la

fluorescence liée au PI ne varie pas plus que dans le cas où les liposomes sont dans un milieu sans ADN [Figure 5.12 panneau A]. Lors du passage à l'incubation à 37 °C, on peut observer une augmentation de la fluorescence liée à l'eGFP, qui se trouve être corrélée à une diminution de la fluorescence en PI.

En suivant simultanément la fluorescence du PI et celle de la Cx43-eGFP sur une population de liposomes, nous pouvons constater que la perméabilité membranaire peut être déclenchée par le passage de 4 °C à 37 °C. De plus, il y a une corrélation très forte entre la fuite du PI et l'insertion de la Cx43-eGFP dans la membrane [Figure 5.14]. La température représente donc un moyen de contrôler le relargage d'une molécule non perméante dans le milieu extérieur.

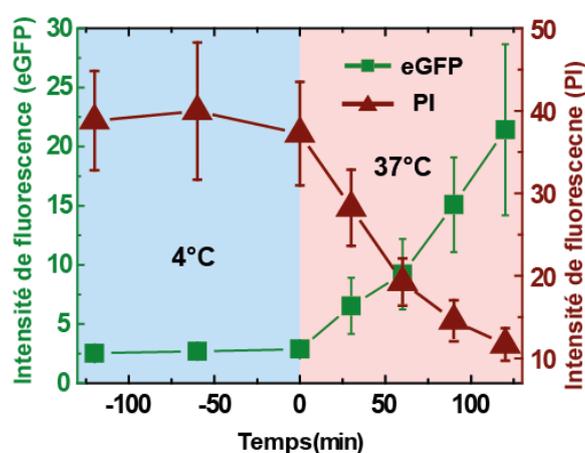


Figure 5.15 : Graphique présentant les évolutions croisées de fluorescence de la Cx43-eGFP (carrés verts) et du PI (triangles rouges) en fonction du temps, avant (4 °C) et après le début de l'incubation (37 °C) de l'échantillon. Les données sont présentées comme des moyennes  $\pm$  déviation standard.

### 4.2 Une perméabilité modulable

Comme nous avons pu le voir au chapitre 1, les protéines subissent des modifications co-/post-traductionnelles qui leur permettent d'acquérir ou de moduler leur fonction. Il a déjà été montré dans la littérature que la perméabilité des connexines est dépendante de leur état de phosphorylation. Comme je l'ai redémontré à la section 4.1, un hémicanal de connexine 43 sera perméable aux petites molécules lorsqu'il est dans un état déphosphorylé et sera moins perméable lorsqu'il sera phosphorylé, par exemple via l'action d'une Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) (Kim et al., 1999).

Afin d'étudier la modulation de la perméabilité et l'orientation dans la membrane du pore formé par les Cx43-eGFP dans les membranes des liposomes géants, j'ai ajouté au milieu d'expression la MAPK Erk2 qui a déjà été employée par Kim et al., pour démontrer l'effet régulateur de la phosphorylation sur la perméabilité du canal, lorsqu'il est purifié à partir du cerveau de rat pour être reconstitué dans des liposomes (Kim et al., 1999).

Cette enzyme phosphoryle les acides aminés sérines et thréonines lorsque le motif de reconnaissance de la protéine est satisfait. En effet, la MAPK phosphorylera une sérine (S) ou une thréonine (T), si elles sont suivies d'une proline (P) (motif SP ou TP). Plusieurs motifs de ce type sont présents dans la séquence de la connexine 43 et sont tous localisés dans la partie C-terminale cytosolique de la protéine (Figure 5.16). *In vivo* ces résidus se trouvent donc tous dans le cytoplasme. Cela permet à la cellule de contrôler l'ouverture du canal, via un ensemble de phosphorylation.

### **Protocole 7**

Les échantillons sont assemblés comme décrit précédemment. Néanmoins, la solution de sucrose se voit adjointe si besoin 2 $\mu$ L de MAPK Erk2 (à 1 unité. $\mu$ L<sup>-1</sup>) et 2 $\mu$ L d'ATP (à 20 mM).

Afin de réaliser l'étude dans des conditions reproductibles et dans des temps d'incubation raisonnables, j'utilise la technique développée au chapitre 2 afin de bloquer l'expression de la Cx43-eGFP au bout de 30 minutes d'incubation à 37 °C. Ainsi, 2  $\mu$ L de la solution de Chloramphénicol à 408 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup> sont ajoutés pour arrêter l'expression de la protéine. Si besoin, 2  $\mu$ L de solution de MAPK Erk2 à 1 unité. $\mu$ L<sup>-1</sup> et 2  $\mu$ L de solution d'ATP à 20 mM sont ajoutés en parallèle. Après une incubation de 3 heures à 37 °C, 2 $\mu$ L de marqueur fluorescent sont ajoutés à la solution (iodure de propidium à 40  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) (Figure 5. 5.17). La MAPK Erk2 est disposée selon plusieurs configurations : intérieure, extérieure et intérieure/extérieure afin de nous donner une idée de l'orientation de la protéine dans la membrane.



Figure 5.16 : Séquence en AA de la Cx43. Les flèches correspondent aux différents domaines de la protéine et aux sites de phosphorylation reconnus par la MAPK Erk2 (violet clair : cytoplasmique, bleu foncée : transmembranaire, bleu clair : extracellulaire).

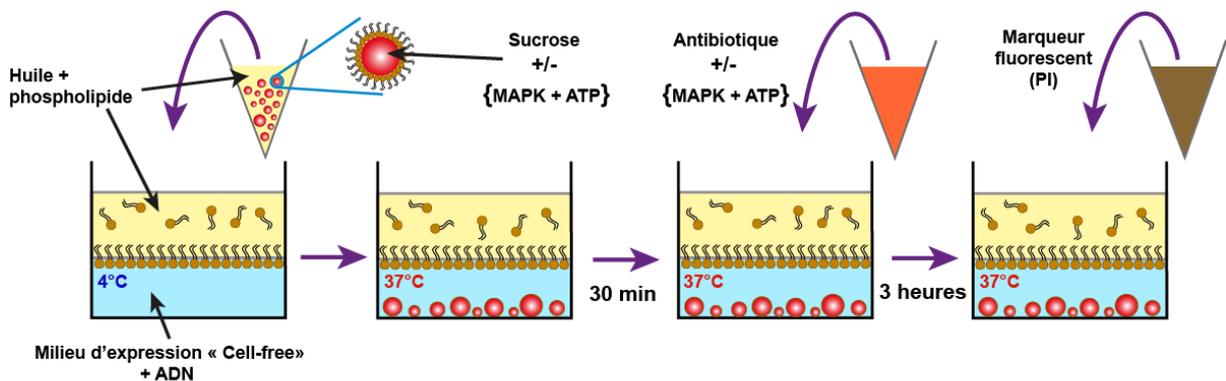


Figure 5.17 : Schéma de la démarche expérimentale pour obtenir des protéoliposomes dont les Cx43-eGFP sont phosphorylées. La formation des liposomes est réalisée avec l'émulsion eau/huile contenant du sucrose ainsi que de la MAPK ( $2 \mu\text{L}$  à  $1 \text{ unité} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) et ATP ( $2 \mu\text{L}$  à  $20 \text{ mM}$ ) si besoin. 30 minutes après le début d'incubation à  $37^\circ\text{C}$ , l'expression est arrêtée par l'ajout d'antibiotique (chloramphénicol) et si besoin de MAPK ( $2 \mu\text{L}$  à  $1 \text{ unité} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) et ATP ( $2 \mu\text{L}$  à  $20 \text{ mM}$ ) en parallèle. Après 3 heures d'incubation permettant la phosphorylation des protéines, nous ajoutons au milieu (extérieur au liposome) de l'iodure de propidium ( $2 \mu\text{L}$  à  $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

L'orientation de la protéine dans la membrane des liposomes ainsi que la perméabilité contrôlée par la phosphorylation sont deux aspects de la fonctionnalisation des protéoliposomes qui ont pu être testés en parallèle, puisque tous les sites de phosphorylation sont présents dans le même domaine (cytosolique en cellule). En observant l'influence de la présence de la MAPK et de son substrat sur la perméabilité en fonction de la localisation de ceux-ci (intra liposomal et/ou extra liposomal), nous pouvons en déduire l'orientation de la protéine dans la membrane.

Selon la Figure 5.18Figure 5., en absence d'ADN codant pour la Cx43-eGFP, l'intensité de fluorescence du PI reste faible dans les liposomes 60 minutes après son ajout. En présence d'ADN et en absence de MAPK, l'intensité de fluorescence est élevée. Si la MAPK est présente d'un seul côté de la membrane des liposomes, la fluorescence est alors partiellement réduite par rapport au contrôle avec ADN seul. Dans le cas où la MAPK est présente des deux côtés, la fluorescence du PI à l'intérieur des liposomes devient extrêmement faible. Il s'agit ici de résultats préliminaires qui demanderaient un approfondissement. Néanmoins, ces premiers résultats tendent à montrer que la perméabilité de la Cx43-eGFP est contrôlable *in situ* par la phosphorylation de ses résidus Sérines, via l'utilisation de la MAPK Erk2. De plus, le fait que la localisation de l'enzyme (intérieur ou extérieur) ne semble pas induire des résultats significativement différents, tend à montrer que la protéine est insérée suivant deux orientations dans la membrane. Le dernier résultat, présentant des enzymes des deux côtés de la membrane, nous conforte dans l'hypothèse que l'insertion passive de la protéine se fait dans deux sens : le sens conventionnel retrouvé chez les eucaryotes et le sens opposé où les boucles extracellulaires sont à l'intérieur des protéoliposomes géants.

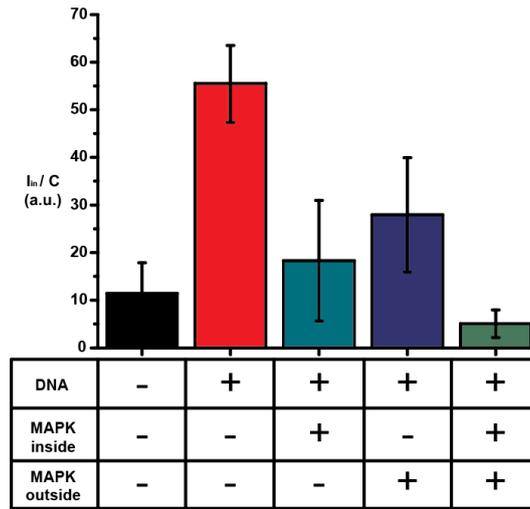


Figure 5.18 : Intensité de fluorescence normalisée à l'intérieur des liposomes géants. Ils sont obtenus par transfert à 4 °C après incubation à 37 °C pendant 30 minutes avant de bloquer l'expression de la Cx43-eGFP mais en conservant l'échantillon à 37 °C, en absence ou en présence d'ADN ( $[ADN_{final}] = 8 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) et en absence ou en présence de MAPK ( $2 \mu\text{L}$  à 1 unité  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) et ATP ( $2 \mu\text{L}$  à 20 mM) à l'intérieur et/ou à l'extérieur des liposomes [Figure 5.17].

## **5. Bilan et perspectives : Production et insertion versatiles d'une protéine membranaire dans des liposomes géants**

Dans un premier temps, la production de la protéine d'intérêt à partir d'un plasmide compatible avec le PURExpress® est établie à l'aide de techniques biochimiques (électrophorèse et immunoblotting). On a pu explorer l'effet de la présence des membranes de liposomes sur l'expression de la Cx43-eGFP et voir que cela n'influçait en rien son expression.

Dans un second temps nous avons mis au point une technique permettant d'obtenir des liposomes géants de manière versatile dans un milieu de forte pression osmotique tel que le PURExpress®. Cette méthode a permis d'étudier les aspects de fonctionnalisation de la membrane des liposomes géants. Nous avons ainsi démontré que l'insertion de la Cx43-eGFP dans la membrane des liposomes se produit de manière co-translationnelle. Cela montre bien l'aspect coopératif qu'il peut y avoir entre l'expression de la protéine dans ce système, son repliement et son insertion dans la membrane du liposome.

Nous avons pu démontrer, grâce à des expériences de fuites de marqueurs fluorescents de différentes masses moléculaires, que la protéine était bien intacte après l'insertion dans les liposomes géants et quelle présentait une perméabilité taille dépendante.

Enfin, les premiers résultats obtenus pour la modification post-translationnelle par phosphorylation *in situ* semblent indiquer que l'ouverture et la fermeture du pore peuvent être commandées par l'intermédiaire d'une enzyme (MAPK Erk2), ce qui à notre connaissance représente une première dans le cadre de l'utilisation de milieu d'expression « Cell-free » pour la reconstitution de protéines membranaires. De plus, ce système présente des perspectives intéressantes pour la modulation de l'activité des protéines dans les milieux CFRPS.

Par rapport aux autres méthodes utilisées à l'heure actuelle, la versatilité de notre technique couplée aux technologies d'expression « cell-free » offre des possibilités très intéressantes concernant la reconstitution des protéines membranaires, en particulier pour des protéines complexes comportant plus de domaines transmembranaires comme les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Ces protéines sont la cible de plus de 50 % des molécules

thérapeutiques (Ritter and Hall, 2009) sur le marché et pourtant seul un nombre restreint de mécanismes de régulation de ces protéines sont vraiment compris.

Au cours de ma thèse, j'ai mis en place une collaboration avec l'équipe du Dr. Martinez de l'université de Copenhague (Danemark), afin de pouvoir travailler sur un membre de cette famille de protéines, le récepteur  $\kappa$ -opioïde. De plus, j'ai participé à promouvoir la méthode que j'ai développée au sein d'une équipe du département de physique de l'Ecole normale supérieure (Equipe du Dr. Pincet), afin d'étudier la protéine membranaire Izumo, de la superfamille des immunoglobulines, vitale pour la fécondation d'un ovocyte par un spermatozoïde (Chalbi et al., 2014).

Durant ma thèse, j'ai étudié un contrôle versatile de l'expression par la température. Avec quelques développements, il serait tout à fait possible d'implémenter un contrôle de l'expression par la lumière en utilisant les molécules photosensibles développées au laboratoire pour le photocontrôle de l'expression en milieu « cell-free » (Venancio-Marques et al., 2012). Nous aurions alors à disposition des protéoliposomes géants dont la fonctionnalité (perméabilité, relargage) pourrait être contrôlée par la lumière.

## Conclusion générale

Au cours de cette thèse, j'ai étudié et élaboré des stratégies pour concevoir des méthodes d'étude et de production de protéines variées (protéines fluorescentes, protéines membranaires), à l'aide de la technologie « cell-free » offerte par le CFRPS PURExpress® dans des environnements reconstitués, allant d'un simple milieu aqueux pour des études mécanistiques aux membranes auto-assemblées des liposomes géants.

L'étude de l'influence de métabolites, d'une MAPK, ainsi que d'une triade enzyme-substrat-antibiotique sur les niveaux et la dynamique de l'expression sont au cœur du chapitre 2 de la première partie. Ce chapitre décrit entre autre l'impact de la supplémentation du système d'expression de protéines avec de l'ATP et/ou du GTP, deux substrats énergétiques impliqués dans les mécanismes de production de protéines ; ainsi que l'utilisation du chloramphénicol, de la CAT et de son substrat afin de mettre en place un système original de régulation réversible.

Il s'avère que l'ATP et le GTP ont un impact négatif sur les rendements de production protéique. Seule la configuration avec MAPK et ATP présente un rendement de production plus élevé que l'expérience contrôle. Enfin, j'ai pu démontrer qu'il était possible d'utiliser une triade enzyme-substrat-antibiotique afin de réguler l'expression de protéines dans le PURExpress®. Certes, cette régulation présente l'inconvénient de conduire à un changement d'état final mais elle se montre robuste pour atteindre, à un temps donné, un niveau d'expression désiré. De plus, l'utilisation de cet antibiotique comme inhibiteur de l'expression m'a permis de développer une technique simple et robuste pour étudier les cinétiques de maturation des protéines fluorescentes en système *in vitro* reconstitué (chapitre 3).

A une échelle supérieure, je me suis intéressé à la reconstitution de protéines membranaires au sein de liposomes géants pour former des édifices appelés protéoliposomes géants. J'ai été amené à mettre en place un protocole original combinant maîtrise physico-chimique (interfaces eau-huile, contrôle osmotique, auto-assemblage), caractérisation optique (microscopie confocale), stimulation biochimique (phosphorylation) et synthèse « cell-free » afin de préparer, de caractériser et de stimuler des protéoliposomes géants fonctionnels. Mon travail principal s'est limité à la reconstitution d'une connexine (Cx43) mais j'ai été également impliqué dans des collaborations avec des chercheurs souhaitant appliquer ma

## Conclusion générale

---

méthode à la reconstitution d'autres protéines, comme des récepteurs couplés à la protéine G (récepteur  $\kappa$ -opioïde, collaboration avec K. Martinez, University of Copenhagen) ou une protéine impliquée dans les mécanismes de fécondation de l'ovocyte (Izumo, collaboration avec F. Pincet, département de physique de l'École normale supérieure). Dans le cas de Cx43, j'ai découvert que le mécanisme d'insertion par voie « cell-free » était de nature co-translationnelle, ce qui est cohérent avec les mécanismes *in vivo* connus de production des protéines membranaires mais qui reste finalement assez surprenant dans un système membranaire artificiel *a priori* passif. Outre la reconstitution efficace de protéines membranaires, la méthode que j'ai développée me paraît intéressante pour son côté robuste (rendements élevés, reproductibilité), versatile (contrôle de la composition membranaire, programmation simple de la protéine à synthétiser) et simple à mettre en œuvre (approche « one-pot »). N'étant par contre pas adaptée, en l'état, pour des applications industrielles immédiates, elle me semble donc être une méthode de choix pour des études fondamentales sur les protéines impliquant les membranes.

Enfin, la possibilité de mettre sous contrôle la fonctionnalité d'une membrane synthétique par la régulation de l'activité d'une protéine reconstituée (porosité membranaire, transduction du signal, « sensing », communication, *etc.*) me paraît être une poursuite intéressante offerte par les méthodes que j'ai développées pendant cette thèse. J'ai montré que ce contrôle peut se faire à deux niveaux, soit au niveau de l'expression (stimulation thermique), soit au niveau de l'activité elle-même de la protéine reconstituée (modification post-translationnelle par une kinase). Il pourrait être envisageable, par exemple, d'explorer d'autres voies possibles pour chacun de ces types de contrôle, comme un photocontrôle de l'expression pour une stimulation à distance et sans changement de température, ou des systèmes de régulation plus complexes mettant en jeu des facteurs de transcription/traduction ou des cascades enzymatiques. Il paraîtrait alors possible de développer des machines génétiques stimulables intelligentes, composées d'une membrane encapsulant un ou plusieurs gènes codants pour des protéines d'intérêt (enzyme, protéine membranaire) au sein d'un milieu d'expression stimuable par voie exogène (stimulus lumineux, par exemple) ou endogène (biomarqueurs, hormones, présence d'une cellule, *etc.*). La machine, qui reste inerte en l'absence de signal, devient fonctionnelle (conversion d'une prodrogue en drogue, relargage d'une molécule) à l'endroit et au moment déterminé par la présence ou l'application du stimulus qui la contrôle.

## Bibliographie

Abkarian, M., Loiseau, E., and Massiera, G. (2011). Continuous droplet interface crossing encapsulation (cDICE) for high throughput monodisperse vesicle design. *Soft Matter* 7, 4610–4614.

Aimon, S., Manzi, J., Schmidt, D., Poveda Larrosa, J.A., Bassereau, P., and Toombes, G.E.S. (2011). Functional reconstitution of a voltage-gated potassium channel in giant unilamellar vesicles. *PloS One* 6, e25529.

Akashi, K., Miyata, H., Itoh, H., and Kinoshita, K. (1996). Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope. *Biophys. J.* 71, 3242–3250.

Albayrak, C., and Swartz, J.R. (2013). Cell-free co-production of an orthogonal transfer RNA activates efficient site-specific non-natural amino acid incorporation. *Nucleic Acids Res.* 41, 5949–5963.

Alexandrov, K., and Johnston, W.A. *The PURE System for Protein Production* - Springer. (Humana Press).

Aliye, N., Fabbretti, A., Lupidi, G., Tsekoa, T., and Spurio, R. (2015). Engineering color variants of green fluorescent protein (GFP) for thermostability, pH-sensitivity, and improved folding kinetics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1205–1216.

Asanuma, H., Ito, T., Yoshida, T., Liang, X., and Komiyama, M. (1999). Photoregulation of the Formation and Dissociation of a DNA Duplex by Using the cis–trans Isomerization of Azobenzene. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38, 2393–2395.

Ashikawa, Y., Ihara, M., Matsuura, N., Fukunaga, Y., Kusakabe, Y., and Yamashita, A. (2011). GFP-based evaluation system of recombinant expression through the secretory pathway in insect cells and its application to the extracellular domains of class C GPCRs. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 20, 1720–1734.

Baffour-Awuah, N.Y., Fedeles, F., and Zimmer, M. (2005). Structural features responsible for GFPuv and S147P-GFP's improved fluorescence. *Chem. Phys.* 310, 25–31.

Bangham, A.D., and Horne, R.W. (1964). Negative Staining of Phospholipids and their Structural Modification by Surface-Active Agents as Observed in the Electron Microscope. *J. Mol. Biol.* 8, 660–668.

Battle, A.R., Petrov, E., Pal, P., and Martinac, B. (2009). Rapid and improved reconstitution of bacterial mechanosensitive ion channel proteins MscS and MscL into liposomes using a modified sucrose method. *FEBS Lett.* 583, 407–412.

Bazzacco, P., Billon-Denis, E., Sharma, K.S., Catoire, L.J., Mary, S., Le Bon, C., Point, E., Banères, J.-L., Durand, G., Zito, F., et al. (2012). Nonionic Homopolymeric Amphipols:

- Application to Membrane Protein Folding, Cell-Free Synthesis, and Solution Nuclear Magnetic Resonance. *Biochemistry (Mosc.)* *51*, 1416–1430.
- Becker, N.A., Peters, J.P., Maher, L.J., and Lionberger, T.A. (2013). Mechanism of promoter repression by Lac repressor-DNA loops. *Nucleic Acids Res.* *41*, 156–166.
- Berriep, C. (1992). Fast and slow kinetics of porin channels from *Escherichia coli* reconstituted into giant liposomes and studied by patch-clamp. *306*, 251–256.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., et al. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* *277*, 1453–1462.
- Bolinger, P.-Y., Stamou, D., and Vogel, H. (2004). Integrated Nanoreactor Systems: Triggering the Release and Mixing of Compounds Inside Single Vesicles. *J. Am. Chem. Soc.* *126*, 8594–8595.
- Boulbitch, A., Guttenberg, Z., and Sackmann, E. (2001). Kinetics of membrane adhesion mediated by ligand-receptor interaction studied with a biomimetic system. *Biophys. J.* *81*, 2743–2751.
- Boyer, M.E., Stapleton, J.A., Kuchenreuther, J.M., Wang, C.-W., and Swartz, J.R. (2008). Cell-free synthesis and maturation of [FeFe] hydrogenases. *Biotechnol. Bioeng.* *99*, 59–67.
- Brown, M.E., and Chang, M.C.Y. (2014). Exploring bacterial lignin degradation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *19*, 1–7.
- Bruzzone, R., White, T.W., and Paul, D.L. (1996). Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem. FEBS* *238*, 1–27.
- Bundy, B.C., and Swartz, J.R. (2011). Efficient disulfide bond formation in virus-like particles. *J. Biotechnol.* *154*, 230–239.
- Bundy, B.C., Franciszkowicz, M.J., and Swartz, J.R. (2008). *Escherichia coli*-based cell-free synthesis of virus-like particles. *Biotechnol. Bioeng.* *100*, 28–37.
- Butler, M. (2006). Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by Mammalian cell systems. *Cytotechnology* *50*, 57–76.
- Cai, Q., Hanson, J.A., Steiner, A.R., Tran, C., Masikat, M.R., Chen, R., Zawada, J.F., Sato, A.K., Hallam, T.J., and Yin, G. (2015). A simplified and robust protocol for immunoglobulin expression in *Escherichia coli* cell-free protein synthesis systems. *Biotechnol. Prog.* n/a – n/a.
- Calhoun, K.A., and Swartz, J.R. (2005). Energizing cell-free protein synthesis with glucose metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* *90*, 606–613.
- Cappuccio, J.A., Hinz, A.K., Kuhn, E.A., Fletcher, J.E., Arroyo, E.S., Henderson, P.T., Blanchette, C.D., Walsworth, V.L., Corzett, M.H., Law, R.J., et al. (2009). Cell-free expression for nanolipoprotein particles: building a high-throughput membrane protein solubility platform. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *498*, 273–296.

## Bibliographie

---

Carvalho, K., Lemière, J., Faqir, F., Manzi, J., Blanchoin, L., Plastino, J., Betz, T., and Sykes, C. (2013). Actin polymerization or myosin contraction: two ways to build up cortical tension for symmetry breaking. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 368.

Caschera, F., and Noireaux, V. (2015). A cost-effective polyphosphate-based metabolism fuels an all *E. coli* cell-free expression system. *Metab. Eng.* 27, 29–37.

Chalbi, M., Barraud-Lange, V., Ravaux, B., Howan, K., Rodriguez, N., Soule, P., Ndzoudi, A., Boucheix, C., Rubinstein, E., Wolf, J.P., et al. (2014). Binding of sperm protein Izumo1 and its egg receptor Juno drives Cd9 accumulation in the intercellular contact area prior to fusion during mammalian fertilization. *Dev. Camb. Engl.* 141, 3732–3739.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802–805.

Chalmeau, J., Monina, N., Shin, J., Vieu, C., and Noireaux, V. (2011).  $\alpha$ -Hemolysin pore formation into a supported phospholipid bilayer using cell-free expression. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1808, 271–278.

Chang, H.-C., Kaiser, C.M., Hartl, F.U., and Barral, J.M. (2005). De novo Folding of GFP Fusion Proteins: High Efficiency in Eukaryotes but Not in Bacteria. *J. Mol. Biol.* 353, 397–409.

Chevalet, L., Robert, A., Gueneau, F., Bonnefoy, J.Y., and Nguyen, T. (2000). Recombinant protein production driven by the tryptophan promoter is tightly controlled in ICONE 200, a new genetically engineered *E. coli* mutant. *Biotechnol. Bioeng.* 69, 351–358.

Chou, C.P. (2007). Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 521–532.

Chudakov, D.M., Lukyanov, S., and Lukyanov, K.A. (2005). Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. *Trends Biotechnol.* 23, 605–613.

Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., and Tsien, R.Y. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.* 20, 448–455.

Cutter, A.R., and Hayes, J.J. (2015). A brief review of nucleosome structure. *FEBS Lett.*

Da Costa, G., Chevance, S., Le Rumeur, E., and Bondon, A. (2006). Proton NMR Detection of Porphyrins and Cytochrome c in Small Unilamellar Vesicles: Role of the Dissociation Kinetic Constant. *Biophys. J.* 90, L55–L57.

Dasa, S.S.K., Suzuki, R., Gutknecht, M., Brinton, L.T., Tian, Y., Michaelsson, E., Lindfors, L., Klibanov, A.L., French, B.A., and Kelly, K.A. (2015). Development of target-specific liposomes for delivering small molecule drugs after reperfused myocardial infarction. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*

Daube, S.S., Arad, T., and Bar-Ziv, R. (2007). Cell-Free Co-synthesis of Protein Nanoassemblies: Tubes, Rings, and Doughnuts. *Nano Lett.* 7, 638–641.

## Bibliographie

---

- Demolli, S., Geist, M.M., Weigand, J.E., Matschiavelli, N., Suess, B., and Rother, M. (2014). Development of  $\beta$ -lactamase as a tool for monitoring conditional gene expression by a tetracycline-riboswitch in *Methanosarcina acetivorans*. *Archaea Vanc. BC 2014*, 725610.
- Dencher, N.A., and Heyn, M.P. (1978). Formation and properties of bacteriorhodopsin monomers in the non-ionic detergents octyl- $\beta$ -D-glucoside and triton X-100. *FEBS Lett.* 96, 322–326.
- Deponte, M. (2012). GFP tagging sheds light on protein translocation: implications for key methods in cell biology. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 69, 1025–1033.
- Diguet, A., Le Berre, M., Chen, Y., and Baigl, D. (2009). Preparation of phospholipid multilayer patterns of controlled size and thickness by capillary assembly on a microstructured substrate. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* 5, 1661–1666.
- Dillon, S.C., and Dorman, C.J. (2010). Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 185–195.
- Dilsen, S., Paul, W., Sandgathe, A., Tippe, D., Freudl, R., Thömmes, J., Kula, M.R., Takors, R., Wandrey, C., and Weuster-Botz, D. (2000). Fed-batch production of recombinant human calcitonin precursor fusion protein using *Staphylococcus carnosus* as an expression-secretion system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 361–369.
- Doeven, M.K., Folgering, J.H. a, Krasnikov, V., Geertsma, E.R., van den Bogaart, G., and Poolman, B. (2005). Distribution, lateral mobility and function of membrane proteins incorporated into giant unilamellar vesicles. *Biophys. J.* 88, 1134–1142.
- Dominak, L.M., and Keating, C.D. (2008). Macromolecular Crowding Improves Polymer Encapsulation within Giant Lipid Vesicles. *Langmuir* 24, 13565–13571.
- Elbaz, Y., Steiner-Mordoch, S., Danieli, T., and Schuldiner, S. (2004). In vitro synthesis of fully functional EmrE, a multidrug transporter, and study of its oligomeric state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1519–1524.
- Elowitz, M.B., and Leibler, S. (2000). A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature* 403, 335–338.
- Endo, Y., and Sawasaki, T. (2003). High-throughput, genome-scale protein production method based on the wheat germ cell-free expression system. *Biotechnol. Adv.* 21, 695–713.
- Estévez-Torres, A., Crozatier, C., Diguet, A., Hara, T., Saito, H., Yoshikawa, K., and Baigl, D. (2009). Sequence-independent and reversible photocontrol of transcription/expression systems using a photosensitive nucleic acid binder. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 12219–12223.
- Ezure, T., Suzuki, T., Shikata, M., Ito, M., and Ando, E. (2010). A cell-free protein synthesis system from insect cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 607, 31–42.
- Felberbaum, R.S. (2015). The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnol. J.* 10, 702–714.
- Fenz, S.F., and Sengupta, K. (2012). Giant vesicles as cell models. *Integr. Biol.* 4, 982–995.

## Bibliographie

---

- Finer, E.G., Flook, A.G., and Hauser, H. (1971). The use of NMR spectra of sonicated phospholipid dispersions in studies of interactions with the bilayer. *FEBS Lett.* *18*, 331–334.
- Forster, A.C., Cornish, V.W., and Blacklow, S.C. (2004). Pure translation display. *Anal. Biochem.* *333*, 358–364.
- Fukuda, I., Kojoh, K., Tabata, N., Doi, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., and Yanagawa, H. (2006). In vitro evolution of single-chain antibodies using mRNA display. *Nucleic Acids Res.* *34*, e127.
- Gale, E.F., Cundliffe, E., Reynolds, P.E., Richmond, M.H., and Waring, M.J. (1981). *The Molecular Basis of Antibiotic Action* by Ernest Frederick Gale, E. Cundliffe, P.E. Reynolds, M.H. Richmond, M.J. Waring: John Wiley & Sons Ltd 9780471279150 2nd - Better World Books Ltd.
- Gardner, T.S., Cantor, C.R., and Collins, J.J. (2000). Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature* *403*, 339–342.
- Genes, P.G. de, and Prost, J. (1995). *The Physics of Liquid Crystals* (Clarendon Press | International Series of Monographs on Physics 83).
- Gervais, A., Hammel, Y.-A., Pelloux, S., Lepage, P., Baer, G., Carte, N., Sorokine, O., Strub, J.-M., Koerner, R., Leize, E., et al. (2003). Glycosylation of human recombinant gonadotrophins: characterization and batch-to-batch consistency. *Glycobiology* *13*, 179–189.
- Gibbs, P.E., Zouzias, D.C., and Freedberg, I.M. (1985). Differential post-translational modification of human type I keratins synthesized in a rabbit reticulocyte cell-free system. *Biochim. Biophys. Acta* *824*, 247–255.
- Gibson, D.G., Benders, G.A., Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E.A., Baden-Tillson, H., Zaveri, J., Stockwell, T.B., Brownley, A., Thomas, D.W., Algire, M.A., et al. (2008). Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science* *319*, 1215–1220.
- Gibson, D.G., Glass, J.I., Lartigue, C., Noskov, V.N., Chuang, R.-Y., Algire, M.A., Benders, G.A., Montague, M.G., Ma, L., Moodie, M.M., et al. (2010). Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* *329*, 52–56.
- Girard, P., Pécréaux, J., Lenoir, G., Falson, P., Rigaud, J.-L., and Bassereau, P. (2004). A new method for the reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles. *Biophys. J.* *87*, 419–429.
- Goedhart, J., von Stetten, D., Noirclerc-Savoye, M., Lelimosin, M., Joosen, L., Hink, M.A., van Weeren, L., Jr, T.W.J.G., and Royant, A. (2012). Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat. Commun.* *3*, 751.
- Goerke, A.R., and Swartz, J.R. (2008). Development of cell-free protein synthesis platforms for disulfide bonded proteins. *Biotechnol. Bioeng.* *99*, 351–367.
- González-Pérez, A. (2014). Reversible DNA compaction. *Curr. Top. Med. Chem.* *14*, 766–773.

## Bibliographie

---

- Gordon, A., Colman-Lerner, A., Chin, T.E., Benjamin, K.R., Yu, R.C., and Brent, R. (2007). Single-cell quantification of molecules and rates using open-source microscope-based cytometry. *Nat. Methods* 4, 175–181.
- Goren, M.A., and Fox, B.G. (2008). Wheat germ cell-free translation, purification, and assembly of a functional human stearoyl-CoA desaturase complex. *Protein Expr. Purif.* 62, 171–178.
- Goren, M.A., Nozawa, A., Makino, S., Wrobel, R.L., and Fox, B.G. (2009). Cell-free translation of integral membrane proteins into unilamellar liposomes. *Methods Enzymol.* 463, 647–673.
- Goshima, N., Kawamura, Y., Fukumoto, A., Miura, A., Honma, R., Satoh, R., Wakamatsu, A., Yamamoto, J., Kimura, K., Nishikawa, T., et al. (2008). Human protein factory for converting the transcriptome into an in vitro-expressed proteome. *Nat. Methods* 5, 1011–1017.
- Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 5547–5551.
- Gottlieb, D., Bhattacharyya, P.K., Anderson, H.W., and Carter, H.E. (1948). Some Properties of an Antibiotic Obtained from a Species of *Streptomyces*. *J. Bacteriol.* 55, 409–417.
- Gregoriadis, G., Bacon, A., Caparros-Wanderley, W., and McCormack, B. (2002). A role for liposomes in genetic vaccination. *Vaccine* 20, Supplement 5, B1–B9.
- Griffiths, A.D., and Tawfik, D.S. (2003). Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by in vitro compartmentalization. *EMBO J.* 22, 24–35.
- Guo, X., and Szoka, F.C. (2003). Chemical Approaches to Triggerable Lipid Vesicles for Drug and Gene Delivery. *Acc. Chem. Res.* 36, 335–341.
- Hadeler, K.P. (2013). Michaelis-Menten kinetics, the operator-repressor system, and least squares approaches. *Math. Biosci. Eng. MBE* 10, 1541–1560.
- Hamada, S., Tabuchi, M., Toyota, T., Sakurai, T., Hosoi, T., Nomoto, T., Nakatani, K., Fujinami, M., and Kanzaki, R. (2014). Giant vesicles functionally expressing membrane receptors for an insect pheromone. *Chem. Commun.* 50, 2958–2961.
- Hamada, T., Miura, Y., Komatsu, Y., Kishimoto, Y., Vestergaard, M., and Takagi, M. (2008). Construction of Asymmetric Cell-Sized Lipid Vesicles from Lipid-Coated Water-in-Oil Microdroplets. *J. Phys. Chem. B* 112, 14678–14681.
- Hancock, J.F. (1995). Reticulocyte lysate assay for in vitro translation and posttranslational modification of Ras proteins. *Methods Enzymol.* 255, 60–65.
- Hassan-Zadeh, E., Baykal-Caglar, E., Alwarawrah, M., and Huang, J. (2014). Complex Roles of Hybrid Lipids in the Composition, Order, and Size of Lipid Membrane Domains. *Langmuir* 30, 1361–1369.
- He, M., and Taussig, M.J. (2005). Ribosome display of antibodies: expression, specificity and recovery in a eukaryotic system. *J. Immunol. Methods* 297, 73–82.

## Bibliographie

---

- He, M., and Taussig, M.J. (2007). Rapid discovery of protein interactions by cell-free protein technologies. *Biochem. Soc. Trans.* *35*, 962–965.
- He, M., Stoevesandt, O., and Taussig, M.J. (2008). In situ synthesis of protein arrays. *Curr. Opin. Biotechnol.* *19*, 4–9.
- Hebisch, E., Knebel, J., Landsberg, J., Frey, E., and Leisner, M. (2013). High Variation of Fluorescence Protein Maturation Times in Closely Related *Escherichia coli* Strains. *PLoS ONE* *8*, e75991.
- Heim, R., Prasher, D.C., and Tsien, R.Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 12501–12504.
- Heim, R., Cubitt, A.B., and Tsien, R.Y. (1995). Improved green fluorescence. *Nature* *373*, 663–664.
- Hillen, W., and Wissmann, A. (1989). Topics in Molecular and Structural Biology, Protein–Nucleic Acid Interaction. *10*, 143–162.
- Hipolito, C.J., and Suga, H. (2012). Ribosomal production and in vitro selection of natural product-like peptidomimetics: the FIT and RaPID systems. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *16*, 196–203.
- Hoffman, R.M. (2015). Application of GFP imaging in cancer. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *95*, 432–452.
- Hollenberg, C.P., and Gellissen, G. (1997). Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Curr. Opin. Biotechnol.* *8*, 554–560.
- Holloway, P.W. (1973). A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. *Anal. Biochem.* *53*, 304–308.
- Hong, J.-H., Hwang, E.S., McManus, M.T., Amsterdam, A., Tian, Y., Kalmukova, R., Mueller, E., Benjamin, T., Spiegelman, B.M., Sharp, P.A., et al. (2005). TAZ, a Transcriptional Modulator of Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Science* *309*, 1074–1078.
- Ihara, H., Mie, M., Funabashi, H., Takahashi, F., Sawasaki, T., Endo, Y., and Kobatake, E. (2006). In vitro selection of zinc finger DNA-binding proteins through ribosome display. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *345*, 1149–1154.
- Iizuka, N., Najita, L., Franzusoff, A., and Sarnow, P. (1994). Cap-dependent and cap-independent translation by internal initiation of mRNAs in cell extracts prepared from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 7322–7330.
- Iizuka, R., Yamagishi-Shirasaki, M., and Funatsu, T. (2011). Kinetic study of de novo chromophore maturation of fluorescent proteins. *Anal. Biochem.* *414*, 173–178.
- Ikonomou, L., Schneider, Y.-J., and Agathos, S.N. (2003). Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *62*, 1–20.

## Bibliographie

---

- Isaacs, F.J., Dwyer, D.J., Ding, C., Pervouchine, D.D., Cantor, C.R., and Collins, J.J. (2004). Engineered riboregulators enable post-transcriptional control of gene expression. *Nat. Biotechnol.* *22*, 841–847.
- Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J., and Ninham, B.W. (1977). Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *470*, 185–201.
- Iyer, S., and Doktycz, M.J. (2013). Thrombin-Mediated Transcriptional Regulation Using DNA Aptamers in DNA-Based Cell-Free Protein Synthesis. *ACS Synth. Biol.*
- Jackson, R.J., and Hunt, T. (1983). Preparation and use of nuclease-treated rabbit reticulocyte lysates for the translation of eukaryotic messenger RNA. *Methods Enzymol.* *96*, 50–74.
- Jacob, F., and Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* *3*, 318–356.
- Jennings, G.T., and Bachmann, M.F. (2008). The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biol. Chem.* *389*, 521–536.
- Jewett, M.C., and Forster, A.C. (2010). Update on designing and building minimal cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* *21*, 697–703.
- Johnson, J.E., and Chiu, W. (2000). Structures of virus and virus-like particles. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *10*, 229–235.
- Kahya, N., Pécheur, E.I., de Boeij, W.P., Wiersma, D. a, and Hoekstra, D. (2001). Reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles via peptide-induced fusion. *Biophys. J.* *81*, 1464–1474.
- Kalmbach, R., Chizhov, I., Schumacher, M.C., Friedrich, T., Bamberg, E., and Engelhard, M. (2007). Functional cell-free synthesis of a seven helix membrane protein: in situ insertion of bacteriorhodopsin into liposomes. *J. Mol. Biol.* *371*, 639–648.
- Kamiya, K., Tsumoto, K., Arakawa, S., Shimizu, S., Morita, I., Yoshimura, T., and Akiyoshi, K. (2010). Preparation of connexin43-integrated giant Liposomes by a baculovirus expression-liposome fusion method. *Biotechnol. Bioeng.* *107*, 836–843.
- Kamiya, K., Tsumoto, K., Yoshimura, T., and Akiyoshi, K. (2011). Cadherin-integrated liposomes with potential application in a drug delivery system. *Biomaterials* *32*, 9899–9907.
- Kamiya, Y., Takagi, T., Ooi, H., Ito, H., Liang, X., and Asanuma, H. (2015). Synthetic Gene Involving Azobenzene-Tethered T7 Promoter for the Photocontrol of Gene Expression by Visible Light. *ACS Synth. Biol.* *4*, 365–370.
- Kaneda, M., Nomura, S.M., Ichinose, S., Kondo, S., Nakahama, K., Akiyoshi, K., and Morita, I. (2009). Direct formation of proteo-liposomes by in vitro synthesis and cellular cytosolic delivery with connexin-expressing liposomes. *Biomaterials* *30*, 3971–3977.
- Kanter, G., Yang, J., Voloshin, A., Levy, S., Swartz, J.R., and Levy, R. (2007). Cell-free production of scFv fusion proteins: an efficient approach for personalized lymphoma vaccines. *Blood* *109*, 3393–3399.

- Karlsson, A., Karlsson, R., Karlsson, M., Cans, A.-S., Strömberg, A., Ryttsén, F., and Orwar, O. (2001). Molecular engineering: Networks of nanotubes and containers. *Nature* *409*, 150–152.
- Karzbrun, E., Tayar, A.M., Noireaux, V., and Bar-Ziv, R.H. (2014). Programmable on-chip DNA compartments as artificial cells. *Science* *345*, 829–832.
- Katzen, F., Chang, G., and Kudlicki, W. (2005). The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol.* *23*, 150–156.
- Katzen, F., Peterson, T.C., and Kudlicki, W. (2009). Membrane protein expression: no cells required. *Trends Biotechnol.* *27*, 455–460.
- Kerppola, T.K. (2008). Biomolecular Fluorescence Complementation: Visualization of Molecular Interactions in Living Cells. *Methods Cell Biol.* *85*, 431–470.
- Khmelniskii, A., Keller, P.J., Bartosik, A., Meurer, M., Barry, J.D., Mardin, B.R., Kaufmann, A., Trautmann, S., Wachsmuth, M., Pereira, G., et al. (2012). Tandem fluorescent protein timers for in vivo analysis of protein dynamics. *Nat. Biotechnol.* *30*, 708–714.
- Kim, D.Y., Kam, Y., Koo, S.K., and Joe, C.O. (1999). Gating Connexin 43 Channels Reconstituted in Lipid Vesicles by Mitogen-activated Protein Kinase Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *274*, 5581–5587.
- Kim, H.-C., Kim, T.-W., and Kim, D.-M. (2011). Prolonged production of proteins in a cell-free protein synthesis system using polymeric carbohydrates as an energy source. *Process Biochem.* *46*, 1366–1369.
- King, J., Haase-Pettingell, C., Robinson, A.S., Speed, M., and Mitraki, A. (1996). Thermolabile folding intermediates: inclusion body precursors and chaperonin substrates. *FASEB J.* *10*, 57–66.
- Kita, H., Matsuura, T., Sunami, T., Hosoda, K., Ichihashi, N., Tsukada, K., Urabe, I., and Yomo, T. (2008). Replication of Genetic Information with Self-Encoded Replicase in Liposomes. *ChemBioChem* *9*, 2403–2410.
- Klammt, C., Löhr, F., Schäfer, B., Haase, W., Dötsch, V., Rüterjans, H., Glaubitz, C., and Bernhard, F. (2004). High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* *271*, 568–580.
- Klammt, C., Schwarz, D., Fendler, K., Haase, W., Dötsch, V., and Bernhard, F. (2005). Evaluation of detergents for the soluble expression of alpha-helical and beta-barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system. *FEBS J.* *272*, 6024–6038.
- Kulin, S., Kishore, R., Helmerson, K., and Locascio, L. (2003). Optical Manipulation and Fusion of Liposomes as Microreactors. *Langmuir* *19*, 8206–8210.
- Kurihara, K., Tamura, M., Shohda, K., Toyota, T., Suzuki, K., and Sugawara, T. (2011). Self-reproduction of supramolecular giant vesicles combined with the amplification of encapsulated DNA. *Nat. Chem.* *3*, 775–781.

## Bibliographie

---

- Kuruma, Y., Nishiyama, K.-I., Shimizu, Y., Müller, M., and Ueda, T. (2005). Development of a minimal cell-free translation system for the synthesis of presecretory and integral membrane proteins. *Biotechnol. Prog.* *21*, 1243–1251.
- Kuruma, Y., Stano, P., Ueda, T., and Luisi, P.L. (2009). A synthetic biology approach to the construction of membrane proteins in semi-synthetic minimal cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1788*, 567–574.
- Lao, J., Madani, J., Puértolas, T., Alvarez, M., Hernández, A., Pazo-Cid, R., Artal, A., and Antón Torres, A. (2013). Liposomal Doxorubicin in the treatment of breast cancer patients: a review. *J. Drug Deliv.* *2013*, 456409.
- Lartigue, C., Vashee, S., Algire, M.A., Chuang, R.-Y., Benders, G.A., Ma, L., Noskov, V.N., Denisova, E.A., Gibson, D.G., Assad-Garcia, N., et al. (2009). Creating bacterial strains from genomes that have been cloned and engineered in yeast. *Science* *325*, 1693–1696.
- Le Berre, M., Yamada, A., Reck, L., Chen, Y., and Baigl, D. (2008). Electroformation of Giant Phospholipid Vesicles on a Silicon Substrate: Advantages of Controllable Surface Properties. *Langmuir* *24*, 2643–2649.
- Le Berre, M., Chen, Y., and Baigl, D. (2009). From Convective Assembly to Landau–Levich Deposition of Multilayered Phospholipid Films of Controlled Thickness. *Langmuir* *25*, 2554–2557.
- Lee, Y.C., Taraschi, T.F., and Janes, N. (1993). Support for the shape concept of lipid structure based on a headgroup volume approach. *Biophys. J.* *65*, 1429–1432.
- Leslie, A.G.W. (1990). Refined crystal structure of type III chloramphenicol acetyltransferase at 1.75 Å resolution. *J. Mol. Biol.* *213*, 167–186.
- Lévy, D., Gulik, A., Bluzat, A., and Rigaud, J.-L. (1992). Reconstitution of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase: mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1107*, 283–298.
- Li, J., and Zhang, Y. (2014). Relationship between promoter sequence and its strength in gene expression. *Eur. Phys. J. E Soft Matter* *37*, 44.
- Liguori, L., Marques, B., Villegas-Méndez, A., Rothe, R., and Lenormand, J.-L. (2007). Production of membrane proteins using cell-free expression systems. *Expert Rev. Proteomics* *4*, 79–90.
- Liguori, L., Marques, B., Villegas-Mendez, A., Rothe, R., and Lenormand, J.-L. (2008). Liposomes-mediated delivery of pro-apoptotic therapeutic membrane proteins. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *126*, 217–227.
- Lin, C.-M., Li, C.-S., Sheng, Y.-J., Wu, D.T., and Tsao, H.-K. (2012). Size-Dependent Properties of Small Unilamellar Vesicles Formed by Model Lipids. *Langmuir* *28*, 689–700.
- Lipscomb, H.S., Bean, J., Dobson, H.L., and Greene, J.A. (1958). The determination of blood sugar; a rapid screening method utilizing glucose oxidase paper. *Diabetes* *7*, 486–489.

## Bibliographie

---

- Liu, Y.-J., Hansen, G.P.R., Venancio-Marques, A., and Baigl, D. (2013). Cell-Free Preparation of Functional and Triggerable Giant Proteoliposomes. *ChemBioChem* 14, 2243–2247.
- Loewenstein, W.R. (1981). Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol. Rev.* 61, 829–913.
- Long, A.R., O'Brien, C.C., and Alder, N.N. (2012). The Cell-Free Integration of a Polytopic Mitochondrial Membrane Protein into Liposomes Occurs Cotranslationally and in a Lipid-Dependent Manner. *PLoS ONE* 7.
- Lovering, A.M., White, L.O., and Reeves, D.S. (1986). The assay of chloramphenicol acetyltransferase activity by high performance liquid chromatography. *J. Antimicrob. Chemother.* 17, 821–825.
- Macdonald, P.J., Chen, Y., and Mueller, J.D. (2012). Chromophore maturation and fluorescence fluctuation spectroscopy of fluorescent proteins in a cell-free expression system. *Anal. Biochem.* 421, 291–298.
- Madin, K., Sawasaki, T., Ogasawara, T., and Endo, Y. (2000). A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 559–564.
- Martin, R.G., Matthaei, J.H., Jones, O.W., and Nirenberg, M.W. (1962). Ribonucleotide composition of the genetic code. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 6, 410–414.
- Matsubayashi, H., Kuruma, Y., and Ueda, T. (2014). In Vitro Synthesis of the E. coli Sec Translocon from DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 7535–7538.
- Mattheakis, L.C., Bhatt, R.R., and Dower, W.J. (1994). An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 9022–9026.
- Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L., and Lukyanov, S.A. (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* 17, 969–973.
- McCarroll, L., and King, L.A. (1997). Stable insect cell cultures for recombinant protein production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 590–594.
- Méléard, P., Bagatolli, L.A., and Pott, T. (2009). Chapter 9 - Giant Unilamellar Vesicle Electroformation: From Lipid Mixtures to Native Membranes Under Physiological Conditions. In *Methods in Enzymology*, N. Duzgunes, ed. (Academic Press), pp. 161–176.
- Mérola, F., Fredj, A., Betolngar, D.-B., Ziegler, C., Erard, M., and Pasquier, H. (2014). Newly engineered cyan fluorescent proteins with enhanced performances for live cell FRET imaging. *Biotechnol. J.* 9, 180–191.
- Miersch, S., and LaBaer, J. (2011). Nucleic Acid programmable protein arrays: versatile tools for array-based functional protein studies. *Curr. Protoc. Protein Sci.* Editor. Board John E Coligan A1 Chapter 27, Unit27.2.

## Bibliographie

---

- Mikami, S., Kobayashi, T., Yokoyama, S., and Imataka, H. (2006). A hybridoma-based in vitro translation system that efficiently synthesizes glycoproteins. *J. Biotechnol.* *127*, 65–78.
- Miller, O.L., and Beatty, B.R. (1969). Visualization of nucleolar genes. *Science* *164*, 955–957.
- Miyawaki, A., Nagai, T., and Mizuno, H. (2003). Mechanisms of protein fluorophore formation and engineering. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *7*, 557–562.
- Moghimi, S.M., Hunter, A.C., and Murray, J.C. (2001). Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles: Theory to Practice. *Pharmacol. Rev.* *53*, 283–318.
- Moore, A., Donahue, C.J., Bauer, K.D., and Mather, J.P. (1998). Chapter 15 Simultaneous Measurement of Cell Cycle and Apoptotic Cell Death. In *Methods in Cell Biology*, J.P.M. and D. Barnes, ed. (Academic Press), pp. 265–278.
- Morales-Pennington, N.F., Wu, J., Farkas, E.R., Goh, S.L., Konyakhina, T.M., Zheng, J.Y., Webb, W.W., and Feigenson, G.W. (2010). GUV Preparation and Imaging: Minimizing artifacts. *Biochim. Biophys. Acta* *1798*, 1324–1332.
- Morita, E.H., Sawasaki, T., Tanaka, R., Endo, Y., and Kohno, T. (2003). A wheat germ cell-free system is a novel way to screen protein folding and function. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *12*, 1216–1221.
- Moritani, Y., Nomura, S.M., Morita, I., and Akiyoshi, K. (2010). Direct integration of cell-free-synthesized connexin-43 into liposomes and hemichannel formation. *FEBS J.* *277*, 3343–3352.
- Mouret, L., Da Costa, G., and Bondon, A. (2014). Sterols associated with small unilamellar vesicles (SUVs): intrinsic mobility role for 1H NMR detection. *Magn. Reson. Chem. MRC* *52*, 339–344.
- Mudeppa, D.G., and Rathod, P.K. (2013). Expression of functional *Plasmodium falciparum* enzymes using a wheat germ cell-free system. *Eukaryot. Cell* *12*, 1653–1663.
- Nath, A., Atkins, W.M., and Sligar, S.G. (2007). Applications of Phospholipid Bilayer Nanodiscs in the Study of Membranes and Membrane Proteins†. *Biochemistry (Mosc.)* *46*, 2059–2069.
- Nirenberg, M.W., and Matthaei, J.H. (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *47*, 1588–1602.
- Nishiuchi, Y., Inui, T., Nishio, H., Bódi, J., Kimura, T., Tsuji, F.I., and Sakakibara, S. (1998). Chemical synthesis of the precursor molecule of the *Aequorea* green fluorescent protein, subsequent folding, and development of fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 13549–13554.
- Noireaux, V., and Libchaber, A. (2004). A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 17669–17674.

## Bibliographie

---

- Noireaux, V., Bar-Ziv, R., and Libchaber, A. (2003). Principles of cell-free genetic circuit assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 12672–12677.
- Nomura, S.M., Tsumoto, K., Hamada, T., Akiyoshi, K., Nakatani, Y., and Yoshikawa, K. (2003). Gene expression within cell-sized lipid vesicles. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* *4*, 1172–1175.
- Nomura, S.M., Kondoh, S., Asayama, W., Asada, A., Nishikawa, S., and Akiyoshi, K. (2008). Direct preparation of giant proteo-liposomes by in vitro membrane protein synthesis. *J. Biotechnol.* *133*, 190–195.
- Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J. (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* *273*, 1392–1395.
- Ota, S., Yoshizawa, S., and Takeuchi, S. (2009). Microfluidic Formation of Monodisperse, Cell-Sized, and Unilamellar Vesicles. *Angew. Chem. Int. Ed.* *48*, 6533–6537.
- Ozawa, K., Dixon, N.E., and Otting, G. (2005). Cell-free synthesis of <sup>15</sup>N-labeled proteins for NMR studies. *IUBMB Life* *57*, 615–622.
- Paradkar, A., Trefzer, A., Chakraborty, R., and Stassi, D. (2003). *Streptomyces* genetics: a genomic perspective. *Crit. Rev. Biotechnol.* *23*, 1–27.
- Patel, K.G., and Swartz, J.R. (2011). Surface Functionalization of Virus-Like Particles by Direct Conjugation Using Azide–Alkyne Click Chemistry. *Bioconjug. Chem.* *22*, 376–387.
- Pattenden, L.K., Middelberg, A.P.J., Niebert, M., and Lipin, D.I. (2005). Towards the preparative and large-scale precision manufacture of virus-like particles. *Trends Biotechnol.* *23*, 523–529.
- Pautot, S., Frisken, B.J., and Weitz, D.A. (2003). Production of Unilamellar Vesicles Using an Inverted Emulsion. *Langmuir* *19*, 2870–2879.
- Pécheur, E.-I., Hoekstra, D., Sainte-Marie, J., Maurin, L., Bienvenüe, A., and Philippot, J.R. (1997). Membrane Anchorage Brings About Fusogenic Properties in a Short Synthetic Peptide. *Biochemistry (Mosc.)* *36*, 3773–3781.
- Pécheur, E.-I., Sainte-Marie, J., Bienvenüe, A., and Hoekstra, D. (1999). Lipid Headgroup Spacing and Peptide Penetration, but Not Peptide Oligomerization, Modulate Peptide-Induced Fusion. *Biochemistry (Mosc.)* *38*, 364–373.
- Perrie, Y., and Gregoriadis, G. (2000). Liposome-entrapped plasmid DNA: characterisation studies. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1475*, 125–132.
- Perrie, Y., Barralet, J.E., McNeil, S., and Vangala, A. (2004). Surfactant vesicle-mediated delivery of DNA vaccines via the subcutaneous route. *Int. J. Pharm.* *284*, 31–41.
- Philippot, J., Mutaftschiev, S., and Liautard, J.P. (1983). A very mild method allowing the encapsulation of very high amounts of macromolecules into very large (1000 nm) unilamellar liposomes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *734*, 137–143.

## Bibliographie

---

- Platonova, E., Winterflood, C.M., and Ewers, H. (2015). A Simple Method for GFP- and RFP-based Dual Color Single-Molecule Localization Microscopy. *ACS Chem. Biol.* *10*, 1411–1416.
- Pontani, L.-L., van der Gucht, J., Salbreux, G., Heuvingh, J., Joanny, J.-F., and Sykes, C. (2009). Reconstitution of an Actin Cortex Inside a Liposome. *Biophys. J.* *96*, 192–198.
- Portet, T., and Dimova, R. (2010). A new method for measuring edge tensions and stability of lipid bilayers: effect of membrane composition. *Biophys. J.* *99*, 3264–3273.
- Pott, T., Bouvrais, H., and Méléard, P. (2008). Giant unilamellar vesicle formation under physiologically relevant conditions. *Chem. Phys. Lipids* *154*, 115–119.
- Pott, T., Gerbeaud, C., Barbier, N., and Méléard, P. (2015). Melittin modifies bending elasticity in an unexpected way. *Chem. Phys. Lipids* *185*, 99–108.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., and Cormier, M.J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* *111*, 229–233.
- Proverbio, D., Roos, C., Beyermann, M., Orbán, E., Dötsch, V., and Bernhard, F. (2013). Functional properties of cell-free expressed human endothelin A and endothelin B receptors in artificial membrane environments. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1828*, 2182–2192.
- Punt, P.J., van Biezen, N., Conesa, A., Albers, A., Mangnus, J., and van den Hondel, C. (2002). Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol.* *20*, 200–206.
- Rajkumar, A.S., Déneraud, N., and Maerkl, S.J. (2013). Mapping the fine structure of a eukaryotic promoter input-output function. *Nat. Genet.* *45*, 1207–1215.
- Rawicz, W., Smith, B.A., McIntosh, T.J., Simon, S.A., and Evans, E. (2008). Elasticity, Strength, and Water Permeability of Bilayers that Contain Raft Microdomain-Forming Lipids. *Biophys. J.* *94*, 4725–4736.
- Reeves, J.P., and Dowben, R.M. (1969). Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles. *J. Cell. Physiol.* *73*, 49–60.
- Reid, B.G., and Flynn, G.C. (1997). Chromophore Formation in Green Fluorescent Protein. *Biochemistry (Mosc.)* *36*, 6786–6791.
- Richmond, D.L., Schmid, E.M., Martens, S., Stachowiak, J.C., Liska, N., and Fletcher, D.A. (2011). Forming giant vesicles with controlled membrane composition, asymmetry, and contents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 9431–9436.
- Rigaud, J.-L., and Lévy, D. (2003). Reconstitution of Membrane Proteins into Liposomes. In *Methods in Enzymology*, N. Duzgunes, ed. (Academic Press), pp. 65–86.
- Rigaud, J.L., Paternostre, M.T., and Bluzat, a (1988). Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 2. Incorporation of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin. *Biochemistry (Mosc.)* *27*, 2677–2688.

- Rigaud, J.L., Pitard, B., and Levy, D. (1995). Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* *1231*, 223–246.
- Ringquist, S., Shinedling, S., Barrick, D., Green, L., Binkley, J., Stormo, G.D., and Gold, L. (1992). Translation initiation in *Escherichia coli*: sequences within the ribosome-binding site. *Mol. Microbiol.* *6*, 1219–1229.
- Ritter, S.L., and Hall, R.A. (2009). Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 819–830.
- Roberts, R.W., and Szostak, J.W. (1997). RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 12297–12302.
- Robertson, J.M. (1939). 47. Crystal structure and configuration of the isomeric azobenzenes. *J. Chem. Soc. Resumed* 232–236.
- Rodrigues, M.L., Carter, P., Wirth, C., Mullins, S., Lee, A., and Blackburn, B.K. (1995). Synthesis and  $\beta$ -lactamase-mediated activation of a cephalosporin-taxol prodrug. *Chem. Biol.* *2*, 223–227.
- Rosenberg, R.L., and East, J.E. (1992). Cell-free expression of functional Shaker potassium channels. *Nature* *360*, 166–169.
- Rothengass, B.E. (2007). Advocating for the quadravalent HPV vaccination, Gardasil, by Merck. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* *71*, 671–672; authors reply 673.
- Roux, A., Koster, G., Lenz, M., Sorre, B., Manneville, J.-B., Nassoy, P., and Bassereau, P. (2010). Membrane curvature controls dynamin polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 4141–4146.
- Rudiuk, S., Saito, H., Hara, T., Inoue, T., Yoshikawa, K., and Baigl, D. (2011). Light-Regulated mRNA Condensation by a Photosensitive Surfactant Works as a Series Photoswitch of Translation Activity in the Presence of Small RNAs. *Biomacromolecules* *12*, 3945–3951.
- Sachse, R., Dondapati, S.K., Fenz, S.F., Schmidt, T., and Kubick, S. (2014). Membrane protein synthesis in cell-free systems: From bio-mimetic systems to bio-membranes. *FEBS Lett.* *588*, 2774–2781.
- Safer, B., and Jagus, R. (1979). Control of eIF-2 phosphatase activity in rabbit reticulocyte lysate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *76*, 1094–1098.
- Saito, H., Kato, Y., Le Berre, M., Yamada, A., Inoue, T., Yoshikawa, K., and Baigl, D. (2009). Time-Resolved Tracking of a Minimum Gene Expression System Reconstituted in Giant Liposomes. *ChemBioChem* *10*, 1640–1643.
- Salazar-Cavazos, E., and Santillán, M. (2014). Optimal performance of the tryptophan operon of *E. coli*: a stochastic, dynamical, mathematical-modeling approach. *Bull. Math. Biol.* *76*, 314–334.

## Bibliographie

---

- Sansuk, K., Balog, C.I.A., van der Does, A.M., Booth, R., de Grip, W.J., Deelder, A.M., Bakker, R.A., Leurs, R., and Hensbergen, P.J. (2008). GPCR Proteomics: Mass Spectrometric and Functional Analysis of Histamine H 1 Receptor after Baculovirus-Driven and in Vitro Cell Free Expression. *J. Proteome Res.* 7, 621–629.
- Sarmiento, M.J., Prieto, M., and Fernandes, F. (2012). Reorganization of lipid domain distribution in giant unilamellar vesicles upon immobilization with different membrane tethers. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 2605–2615.
- Sato, K., Pellegrino, M., Nakagawa, T., Nakagawa, T., Vossell, L.B., and Touhara, K. (2008). Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature* 452, 1002–1006.
- Schiessel, H., Correa-Rodríguez, M.D., Rudiuk, S., Baigl, D., and Yoshikawa, K. (2012). Theory of DNA–cationic micelle complexation. *Soft Matter* 8, 9406–9411.
- Schifano, J.M., Edifor, R., Sharp, J.D., Ouyang, M., Konkimalla, A., Husson, R.N., and Woychik, N.A. (2013). Mycobacterial toxin MazF-mt6 inhibits translation through cleavage of 23S rRNA at the ribosomal A site. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 8501–8506.
- Schudt, G., Dolnik, O., Kolesnikova, L., Biedenkopf, N., Herwig, A., and Becker, S. (2015). Transport of Ebolavirus Nucleocapsids Is Dependent on Actin Polymerization: Live-Cell Imaging Analysis of Ebolavirus-Infected Cells. *J. Infect. Dis.*
- Schwarz, D., Dötsch, V., and Bernhard, F. (2008). Production of membrane proteins using cell-free expression systems. *PROTEOMICS* 8, 3933–3946.
- Seddon, A.M., Curnow, P., and Booth, P.J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim. Biophys. Acta* 1666, 105–117.
- Shaklee, P.M., Semrau, S., Malkus, M., Kubick, S., Dogterom, M., and Schmidt, T. (2010). Protein Incorporation in Giant Lipid Vesicles under Physiological Conditions. *ChemBioChem* 11, 175–179.
- Shaner, N.C., Steinbach, P.A., and Tsien, R.Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods* 2, 905–909.
- Shields, D., and Blobel, G. (1978). Efficient cleavage and segregation of nascent presecretory proteins in a reticulocyte lysate supplemented with microsomal membranes. *J. Biol. Chem.* 253, 3753–3756.
- Shimanouchi, T., Umakoshi, H., and Kuboi, R. (2009). Kinetic Study on Giant Vesicle Formation with Electroformation Method. *Langmuir* 25, 4835–4840.
- Shimizu, Y., and Ueda, T. (2010). PURE technology. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 607, 11–21.
- Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., and Ueda, T. (2001). Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat. Biotechnol.* 19, 751–755.

- Shimomura, O., Johnson, F.H., and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* *59*, 223–239.
- Shin, J., and Noireaux, V. (2010). Study of messenger RNA inactivation and protein degradation in an *Escherichia coli* cell-free expression system. *J. Biol. Eng.* *4*, 9.
- Shin, J., Jardine, P., and Noireaux, V. (2012). Genome Replication, Synthesis, and Assembly of the Bacteriophage T7 in a Single Cell-Free Reaction. *ACS Synth. Biol.* *1*, 408–413.
- Shine, J., and Dalgarno, L. (1974). The 3'-Terminal Sequence of *Escherichia coli* 16S Ribosomal RNA: Complementarity to Nonsense Triplets and Ribosome Binding Sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *71*, 1342–1346.
- Shu, X., Shaner, N.C., Yarbrough, C.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J. (2006). Novel chromophores and buried charges control color in mFruits. *Biochemistry (Mosc.)* *45*, 9639–9647.
- Simon, A.M., Goodenough, D.A., Li, E., and Paul, D.L. (1997). Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* *385*, 525–529.
- Simon, A.M., Goodenough, D.A., and Paul, D.L. (1998). Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block. *Curr. Biol.* *8*, 295–298.
- Singer, M., and Berg, P. (1976). Recombinant DNA: NIH Guidelines. *Science* *193*, 186–188.
- Spirin, A.S., Baranov, V.I., Ryabova, L.A., Ovodov, S.Y., and Alakhov, Y.B. (1988). A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science* *242*, 1162–1164.
- Stapleton, J.A., and Swartz, J.R. (2010). Development of an in vitro compartmentalization screen for high-throughput directed evolution of [FeFe] hydrogenases. *PLoS One* *5*, e15275.
- Stech, M., Hust, M., Schulze, C., Dübel, S., and Kubick, S. (2014). Cell-free eukaryotic systems for the production, engineering, and modification of scFv antibody fragments. *Eng. Life Sci.* *14*, 387–398.
- Sun, Z.Z., Yeung, E., Hayes, C.A., Noireaux, V., and Murray, R.M. (2014). Linear DNA for Rapid Prototyping of Synthetic Biological Circuits in an *Escherichia coli* Based TX-TL Cell-Free System. *ACS Synth. Biol.* *3*, 387–397.
- Suzuki, T., Ito, M., Ezure, T., Shikata, M., Ando, E., Utsumi, T., Tsunasawa, S., and Nishimura, O. (2006). N-Terminal protein modifications in an insect cell-free protein synthesis system and their identification by mass spectrometry. *Proteomics* *6*, 4486–4495.
- Suzuki, T., Ito, M., Ezure, T., Shikata, M., Ando, E., Utsumi, T., Tsunasawa, S., and Nishimura, O. (2007). Protein prenylation in an insect cell-free protein synthesis system and identification of products by mass spectrometry. *Proteomics* *7*, 1942–1950.
- Svetina, S., and Žekš, B. (2002). Shape behavior of lipid vesicles as the basis of some cellular processes. *Anat. Rec.* *268*, 215–225.

## Bibliographie

---

- Swartz, J. (2006). Developing cell-free biology for industrial applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* *33*, 476–485.
- Szoka, F., Olson, F., Heath, T., Vail, W., Mayhew, E., and Papahadjopoulos, D. (1980). Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1–0.2  $\mu\text{m}$ ) by a combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *601*, 559–571.
- Tahara, Y., and Fujiyoshi, Y. (1994). A new method to measure bilayer thickness: cryo-electron microscopy of frozen hydrated liposomes and image simulation. *Micron Oxf. Engl.* *1993 25*, 141–149.
- Takai, K., Sawasaki, T., and Endo, Y. (2008). Development of Key Technologies for High-Throughput Cell-Free Protein Production with the Extract from Wheat Embryos. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, A. Joachimiak, ed. (Academic Press), pp. 53–84.
- Takai, K., Sawasaki, T., and Endo, Y. (2010). Practical cell-free protein synthesis system using purified wheat embryos. *Nat. Protoc.* *5*, 227–238.
- Tanaka, T., Sano, R., Yamashita, Y., and Yamazaki, M. (2004). Shape Changes and Vesicle Fission of Giant Unilamellar Vesicles of Liquid-Ordered Phase Membrane Induced by Lysophosphatidylcholine. *Langmuir* *20*, 9526–9534.
- Tarui, H., Murata, M., Tani, I., Imanishi, S., Nishikawa, S., and Hara, T. (2001). Establishment and characterization of cell-free translation/glycosylation in insect cell (*Spodoptera frugiperda* 21) extract prepared with high pressure treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *55*, 446–453.
- Tawfik, D.S., and Griffiths, A.D. (1998). Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nat. Biotechnol.* *16*, 652–656.
- Temme, A., Buchmann, A., Gabriel, H.-D., Nelles, E., Schwarz, M., and Willecke, K. (1997). High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Curr. Biol.* *7*, 713–716.
- Tortorella, D., and London, E. (1994). Method for efficient pelleting of small unilamellar model membrane vesicles. *Anal. Biochem.* *217*, 176–180.
- Toyofuku, T., Yabuki, M., Otsu, K., Kuzuya, T., Hori, M., and Tada, M. (1998). Intercellular Calcium Signaling via Gap Junction in Connexin-43-transfected Cells. *J. Biol. Chem.* *273*, 1519–1528.
- Tsuboi, T., Takeo, S., Iriko, H., Jin, L., Tsuchimochi, M., Matsuda, S., Han, E.-T., Otsuki, H., Kaneko, O., Sattabongkot, J., et al. (2008). Wheat germ cell-free system-based production of malaria proteins for discovery of novel vaccine candidates. *Infect. Immun.* *76*, 1702–1708.
- Tsuboi, T., Takeo, S., Arumugam, T.U., Otsuki, H., and Torii, M. (2010). The wheat germ cell-free protein synthesis system: a key tool for novel malaria vaccine candidate discovery. *Acta Trop.* *114*, 171–176.
- Tsumoto, K., and Yoshimura, T. (2009). Recombinant Proteoliposomes Prepared Using Baculovirus Expression Systems. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 95–109.

- Vaitukaitis, J.L. (2004). Development of the home pregnancy test. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1038*, 220–222.
- Varnier, A., Kermarrec, F., Blesneac, I., Moreau, C., Liguori, L., Lenormand, J.L., and Picollet-D'hahan, N. (2010a). A Simple Method for the Reconstitution of Membrane Proteins into Giant Unilamellar Vesicles. *J. Membr. Biol.* *233*, 85–92.
- Varnier, A., Kermarrec, F., Blesneac, I., Moreau, C., Liguori, L., Lenormand, J.L., and Picollet-D'hahan, N. (2010b). A simple method for the reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles. *J. Membr. Biol.* *233*, 85–92.
- Veatch, S.L., and Keller, S.L. (2005). Miscibility phase diagrams of giant vesicles containing sphingomyelin. *Phys. Rev. Lett.* *94*, 148101.
- Venancio-Marques, A., Liu, Y.-J., Diguët, A., di Maio, T., Gautier, A., and Baigl, D. (2012). Modification-Free Photocontrol of  $\beta$ -Lactam Conversion with Spatiotemporal Resolution. *ACS Synth. Biol.* *1*, 526–531.
- Verkhusha, V.V., Akovbian, N.A., Efremenko, E.N., Varfolomeyev, S.D., and Vrzheschch, P.V. (2001). Kinetic analysis of maturation and denaturation of DsRed, a coral-derived red fluorescent protein. *Biochem. Biokhimiia* *66*, 1342–1351.
- Vinarov, D.A., and Markley, J.L. (2005). High-throughput automated platform for nuclear magnetic resonance-based structural proteomics. *Expert Rev. Proteomics* *2*, 49–55.
- Wachter, R.M. (2007). Chromogenic cross-link formation in green fluorescent protein. *Acc. Chem. Res.* *40*, 120–127.
- Walde, P., Cosentino, K., Engel, H., and Stano, P. (2010). Giant Vesicles: Preparations and Applications. *ChemBioChem* *11*, 848–865.
- Walther, K.A., Papke, B., Sinn, M.B., Michel, K., and Kinkhabwala, A. (2011). Precise measurement of protein interacting fractions with fluorescence lifetime imaging microscopy. *Mol. Biosyst.* *7*, 322–336.
- Wang, G., and Yau, S.-T. (2007). Spatial Confinement Induced Enzyme Stability for Bioelectronic Applications. *J. Phys. Chem. C* *111*, 11921–11926.
- Weber, L.A., Feman, E.R., and Baglioni, C. (1975). A cell free system from HeLa cells active in initiation of protein synthesis. *Biochemistry (Mosc.)* *14*, 5315–5321.
- Wesołowska, O., Michalak, K., Maniewska, J., and Hendrich, A.B. (2009). Giant unilamellar vesicles - a perfect tool to visualize phase separation and lipid rafts in model systems. *Acta Biochim. Pol.* *56*, 33–39.
- Wiedenmann, J., Oswald, F., and Nienhaus, G.U. (2009). Fluorescent proteins for live cell imaging: opportunities, limitations, and challenges. *IUBMB Life* *61*, 1029–1042.
- Wolfe, A.D., and Hahn, F.E. (1965). Mode of action of chloramphenicol IX. Effects of chloramphenicol upon a ribosomal amino acid polymerization system and its binding to bacterial ribosome. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Nucleic Acids Protein Synth.* *95*, 146–155.

## Bibliographie

---

- Wu, W., Zhang, L., Yao, L., Tan, X., Liu, X., and Lu, X. (2015). Genetically assembled fluorescent biosensor for in situ detection of bio-synthesized alkanes. *Sci. Rep.* 5.
- Wuu, J.J., and Swartz, J.R. (2008). High yield cell-free production of integral membrane proteins without refolding or detergents. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1778, 1237–1250.
- Xu, D., and Cheng, Q. (2002). Surface-Bound Lipid Vesicles Encapsulating Redox Species for Amperometric Biosensing of Pore-Forming Bacterial Toxins. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 14314–14315.
- Yamada, A., Le Berre, M., Yoshikawa, K., and Baigl, D. (2007). Spontaneous Generation of Giant Liposomes from an Oil/Water Interface. *ChemBioChem* 8, 2215–2218.
- Yamada, A., Barbaud, F., Cinque, L., Wang, L., Zeng, Q., Chen, Y., and Baigl, D. (2010). Oil Microsealing: A Robust Micro-compartmentalization Method for On-Chip Chemical and Biological Assays. *Small* 6, 2169–2175.
- Yan, X., and Xu, Z. (2006). Ribosome-display technology: applications for directed evolution of functional proteins. *Drug Discov. Today* 11, 911–916.
- Yang, F., Moss, L.G., and Phillips, G.N. (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 14, 1246–1251.
- Yang, J., Kanter, G., Voloshin, A., Levy, R., and Swartz, J.R. (2004). Expression of Active Murine Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in an Escherichia coli Cell-Free System. *Biotechnol. Prog.* 20, 1689–1696.
- Yang, J., Kanter, G., Voloshin, A., Michel-Reydellet, N., Velkeen, H., Levy, R., and Swartz, J.R. (2005). Rapid expression of vaccine proteins for B-cell lymphoma in a cell-free system. *Biotechnol. Bioeng.* 89, 503–511.
- Yoshikawa, Y., Umezawa, N., Imamura, Y., Kanbe, T., Kato, N., Yoshikawa, K., Imanaka, T., and Higuchi, T. (2013). Effective chiral discrimination of tetravalent polyamines on the compaction of single DNA molecules. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 52, 3712–3716.
- Zawada, J.F., Yin, G., Steiner, A.R., Yang, J., Naresh, A., Roy, S.M., Gold, D.S., Heinsohn, H.G., and Murray, C.J. (2011). Microscale to Manufacturing Scale-up of Cell-Free Cytokine Production—A New Approach for Shortening Protein Production Development Timelines. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 1570–1578.
- Zichel, R., Mimran, A., Keren, A., Barnea, A., Steinberger-Levy, I., Marcus, D., Turgeman, A., and Reuveny, S. (2010). Efficacy of a potential trivalent vaccine based on Hc fragments of botulinum toxins A, B, and E produced in a cell-free expression system. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* 17, 784–792.
- Zimmer, M. (2002). Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior. *Chem. Rev.* 102, 759–782.
- Zimmerman, E.S., Heibeck, T.H., Gill, A., Li, X., Murray, C.J., Madlansacay, M.R., Tran, C., Uter, N.T., Yin, G., Rivers, P.J., et al. (2014). Production of site-specific antibody-drug

## **Bibliographie**

---

conjugates using optimized non-natural amino acids in a cell-free expression system.  
*Bioconjug. Chem.* 25, 351–361.





## **Expression de protéines par voie « cell-free » : de la régulation *in vitro* aux protéoliposomes**

Tous les organismes vivants convertissent leurs informations génétiques en protéines fonctionnelles par des mécanismes de transcription/traduction. Ces phénomènes fondamentaux de la biologie sont maintenant maîtrisés au niveau biochimique, et il est possible par le biais de systèmes dits « cell-free » de produire des protéines *in vitro* à partir de fragments d'ADN synthétiques. Ces systèmes minimaux d'expression génique représentent autant un outil fondamental pour la compréhension des mécanismes du vivant qu'une plateforme pour de nombreuses applications biotechnologiques. Néanmoins, le contrôle (déclenchement, régulation) de ces systèmes reste limité en comparaison de leurs analogues naturels.

Dans cette thèse, j'explore tout d'abord des moyens de régulation de l'expression en système cell-free par voie métabolique, en étudiant l'influence de différents facteurs biochimiques ou énergétiques. Je m'intéresse ensuite à la mise en place d'un contrôle réversible en exploitant un couplage antibiotique/enzyme. Je montre également que l'inhibition produite par cet antibiotique peut être exploitée pour étudier les cinétiques de maturation des protéines fluorescentes. Enfin, je décris un protocole innovant de préparation de protéoliposomes géants fonctionnels permettant à la fois l'expression *in situ* de protéines membranaires eucaryotes et leur modification post-traductionnelle. Cette approche est appliquée en particulier pour la reconstitution de pores membranaires déclenchables par voie thermique ou enzymatique.

**Mots-clés :** Expression cell-free, systèmes reconstitués, protéines fluorescentes, protéines membranaires, auto-assemblage, biologie synthétique, membranes artificielles, liposomes

## **Cell-free protein expression: from *in vitro* control to proteoliposomes**

Throughout Transcription and Translation, every single living organism converts the genetic information it carries into functional proteins. These fundamental mechanisms are nowadays mastered up to their biochemical level, enabling us to produce *in vitro* proteins from synthetic DNA fragments, by the use of so called Cell-free systems. This minimalistic approach of gene expression represents both a tool to unravel biological mechanisms and a platform to develop new biotechnology applications. In spite of these credits, controlling these systems (triggering, regulation) is still scarcely achieved.

The aim of the thesis is first of all to explore new means of metabolic regulation for gene expression in cell-free systems, by studying the influence on expression levels of biochemical and energetic factors. I then focus the research to establish a reversible control comprising the coupling of an enzyme and an antibiotic. Moreover, I demonstrate that the inhibition caused by this antibiotic can be used to study the maturation kinetics of fluorescent proteins. Finally, I describe an innovative, one-pot, protocol to prepare functional giant proteoliposomes, enabling simultaneously *in situ* expression of the eukaryotic membrane proteins and their post-translational modifications. This approach is then applied to reconstitute membranous pores triggered by thermal changes or specific enzymatic activity.

**Keywords:** Cell-free expression, reconstituted system, fluorescent proteins, membrane proteins, self-assembly, synthetic biology, artificial membrane, liposomes