HAL
open science

# Etude fonctionnelle et structurale d'un transporteur d'ATP/ADP chloroplastique

Laurène Marchand

## To cite this version:

Laurène Marchand. Etude fonctionnelle et structurale d'un transporteur d'ATP/ADP chloroplastique. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GRENV020 . tel-01343861

**HAL Id: tel-01343861**

**https://theses.hal.science/tel-01343861**

Submitted on 10 Jul 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 DE GRENOBLE

# THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie Structurale et Nanobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par


## Laurène MARCHAND


Thèse dirigée par **Eva PEBAY-PEYROULA** et **Stéphanie RAVAUD**

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

# Etude fonctionnelle et structurale d'un transporteur d'ATP/ADP chloroplastique

Thèse soutenue publiquement le **19 septembre 2014,**
devant le jury composé de :

**Bruno MIROUX** — **Rapporteur**
Directeur de Recherche, Institut de Biologie Physico-chimique, Paris

**Marc Le MAIRE** — **Rapporteur**
Professeur Université Paris Sud, iBiTECs, Saclay

**Jean-Michel JAULT** — **Président du Jury**
Directeur de Recherche, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Lyon

**Daphné BERNY** — **Examinatrice**
Chargé de Recherche, iRTSV/PCV, Grenoble

**Eva PEBAY-PEYROULA** — **Directrice de thèse**
Professeur Université Joseph Fourier, Institut de Biologie Structurale, Grenoble

**Stéphanie RAVAUD** — **CoDirectrice de thèse**
Maitre de conférences, Université Joseph Fourier, Institut de Biologie Structurale, Grenoble

*Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France /*
*Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP*

# Remerciements

Tout d'abord, je souhaiterais remercier les membres du jury, Marc le Maire et Bruno Miroux pour avoir accepté d'évaluer mon travail, Jean-Michel Jault et Daphné Berny pour avoir accepté de l'examiner.

Je tiens à remercier particulièrement Eva Pebay-Peyroula et Stéphanie Ravaud pour m'avoir donné l'opportunité de travailler au sein de leur équipe mais aussi de m'avoir guidé tout au long de cette thèse.

Merci à Stéphanie pour ses nombreux conseils et discussions scientifiques, qui ont pu me permettre d'avancer dans le projet. Merci d'avoir pris le temps de répondre à toutes mes interrogations sur ce monde compliqué des protéines membranaires.

Je remercie Delphine et Céline pour leur disponibilité et pour leur aide dans les expériences. Merci à Delphine pour m'avoir accompagné et aidé pendant les nombreuses heures passées en salle de radioactivité. Surtout merci à toutes les deux d'avoir pris le temps de m'écouter et de m'aider tout au long de cette thèse.

Je tiens à remercier les membres de l'équipe Membrane pour les journées animées au labo : Hubert, Yann, Ola, Sonja, Hugues, sans oublier les anciens thésards Pankaj et Véra.

Thanks to Hubert for the discussions, help and good ideas on the project.

Merci à Yann pour sa bonne humeur et ses jeux de mots mais aussi pour les discussions scientifiques intéressantes.

Merci à Hugues pour les nombreuses discussions et pour m'avoir aidé dans l'analyse des résultats ambigus.

Merci à Sonja et Ola pour leur bonne humeur et les discussions animées pendant les repas et les pauses.

Merci aux autres thésards pour les discussions intéressantes et animées pendant les pauses repas.

Merci à Anne-Emmanuelle sans qui les expériences de FRET et de fluorescence n'auraient pas eu lieu. Merci à Michel, pour les discussions montagne et parapente mais aussi pour ses bonnes idées pour la réalisation de certaines expériences.

Un grand merci à Etienne qui a su me supporter tout au long de ces années et qui a été là aux moments difficiles. Et merci à mes parents pour être toujours là quand j'ai besoin d'eux, de m'avoir toujours supporté pendant toutes ces années.

# Table des matières

**CHAPITRE 1 : INTRODUCTION ..... 5**

I. TRANSPORT A TRAVERS LES MEMBRANES ..... 5

II. TRANSPORT DE NUCLEOTIDES ..... 8

*A. La famille MCF ..... 9*

*B. Le transporteur ADP/ATP mitochondrial ..... 9*

*C. Les autres transporteurs de la famille MCF ..... 12*

III. FAMILLE DES NTTS ..... 13

*A. Rôle physiologique ..... 14*

*B. Caractéristiques biochimiques ..... 17*

*C. NTTs bactériens ..... 21*

*D. NTTs provenant d'autres organismes ..... 25*

IV. COMPARAISON AAC/NTT ..... 27

V. ETUDES STRUCTURALES DES PROTEINES MEMBRANAIRES ..... 28

*A. L'expression ..... 29*

*B. La purification ..... 31*

*C. La cristallisation ..... 34*

VI. OBJECTIFS DE LA THESE ..... 35

**CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES ..... 39**

I. PRODUCTION *AT*NTT ..... 39

*A. Insertion dans un vecteur ..... 39*

*B. Surexpression ..... 42*

*C. Préparation des membranes ..... 43*

II. TESTS DE CARACTERISATION ..... 45

*A. Thermal Shift Assay (TSA) ..... 45*

*B. Spectrométrie infrarouge avec transformation de Fourier (FTIR) ..... 45*

*C. Etude par ultracentrifugation analytique ..... 46*

*D. Dichroïsme circulaire ..... 46*

*E. Analyse par spectrométrie de masse ..... 46*

*F. Test d'activité ..... 47*

III. ESSAIS DE CRISTALLISATION ..... 50

**CHAPITRE 3 : RESULTATS .....53**

I. EXPRESSION ET PURIFICATION DES TRANSPORTEURS NTT D'*A. THALIANA* .....53

*A. Amélioration du protocole pour l'isoforme AtNTT1 .....53*

*B. Nouveaux développements pour l'isoforme AtNTT2 .....60*

III. FONCTION DE LA PROTEINE EN MEMBRANE .....67

*A. Détermination des différentes constantes cinétiques .....67*

*B. Transport des nucléotides .....69*

*C. Effet du pH .....72*

*D. Recherche d'inhibiteur .....74*

IV. LIAISON DES NUCLEOTIDES .....75

*A. Fluorescence des tryptophanes .....75*

*B. FRET .....78*

V. OLIGOMERISATION .....81

*A. Chromatographie d'exclusion et MALLS .....82*

*B. Analyse par ultracentrifugation analytique .....84*

VI. STABILITE DE LA PROTEINE .....87

*A. Stabilité thermique .....87*

*B. Susceptibilité de la protéine à la protéolyse .....90*

*V. Incorporation en nanodisques .....91*

VI. ESSAIS DE CRISTALLISATION .....94

**CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....97**

I. PRODUCTION DES NTT CHLOROPLASTIQUES .....97

*A. Première étape de la purification : la surexpression .....97*

*B. L'impact des détergents : cas de la Foscholine .....97*

*C. Le choix du détergent : Le LAPAO .....99*

*D. Les autres possibilités d'amélioration : les lipides .....100*

II. CARACTERISATIONS BIOPHYSIQUES DE L'ISOFORME *AT*NTT2 .....100

*A. Etat oligomérique .....100*

*B. D'autres techniques .....102*

*C. La stabilité .....103*

III. LE TRANSPORT DE NUCLEOTIDES PAR LES NTTS CHLOROPLASTIQUES .....104

*A. Import d'ATP radiomarqué .....104*

*B. Fluorescence des tryptophanes .....105*

*C. Modifications possibles* ..... *106*
*D. FRET* ..... *107*
IV. ESSAIS DE CRISTALLISATION ..... 108
*A. Les résultats préliminaires* ..... *108*
*B. Une autre méthode* ..... *109*
**CONCLUSION/PERSPECTIVES ..... 112**
**ANNEXES ..... 115**
**BIBLIOGRAPHIE ..... 125**
**RESUME ..... 132**
**ABSTRACT ..... 132**

# INTRODUCTION

# Chapitre 1 : Introduction

## I. Transport à travers les membranes

Les membranes cellulaires sont composées de lipides, de protéines et de glucides dont la proportion varie d'une cellule à une autre, d'un organite à l'autre.

Les lipides sont les principaux constituants des membranes. Ce sont des molécules amphiphiles qui s'associent en bicouche dans l'eau afin de masquer les chaines hydrophobes. Ils donnent aux membranes biologiques leurs caractéristiques ; celles-ci sont ainsi asymétriques et fluides, ce qui permet le mouvement des différents constituants au sein de cette bicouche.

Les protéines membranaires sont associées aux membranes de façon périphérique ou transmembranaire. Certaines sont ancrées aux membranes par différents types de liaisons (covalentes, hydrostatiques …) entre les lipides et les protéines. Ces protéines ont de nombreux rôles : récepteurs, transporteurs, adhérence cellulaire, catalyse enzymatique… Les protéines interagissent avec les lipides par des liaisons non covalentes.

La majorité des glucides se retrouve sous forme de glycoprotéines ou de glycolipides, ils ne sont jamais sous forme libre. A la surface des membranes, ils servent souvent de motifs de reconnaissance.

Les membranes permettent de compartimenter les différentes réactions qui ont lieu dans les cellules. Elles permettent ainsi d'établir des conditions favorables pour certaines réactions notamment en variant les facteurs physico-chimiques (pH, concentration en ions...). De plus, ces membranes ont une perméabilité sélective : elles ne sont perméables qu'aux petites molécules hydrophobes, les autres doivent avoir recours à des protéines transmembranaires qui régulent les échanges.

En effet, la diffusion simple permet à de petites molécules telles que $O_2$ et $CO_2$ de traverser librement les membranes. D'autres molécules sont aussi capables de diffuser, comme l'urée, le glycérol, l'éthanol, les hormones stéroïdes, les acides gras… Cette diffusion se fait alors

grâce au gradient de concentration. Lorsque que l'équilibre est atteint de part et d'autre de la membrane, la diffusion apparente est arrêtée.

Le transport des plus grosses molécules à travers la membrane fait appel à deux types de processus possibles : le transport passif et le transport actif.

Les principales différences entre le transport passif et le transport actif concernent :

- l'utilisation d'énergie nécessaire au transport
- le gradient de concentration.

Le transport passif ne requiert pas d'énergie de la part de la cellule. En effet, le gradient de concentration de part et d'autre de la membrane est suffisant pour permettre ce transport. Il existe alors deux moyens d'obtenir un équilibre de concentration : la diffusion simple ou la diffusion facilitée. Toutefois, seule la diffusion facilitée est applicable aux grosses molécules.

La diffusion facilitée est effectuée grâce à des protéines transmembranaires qui permettent de transporter des molécules polaires et des ions dans le sens du gradient de concentration. Ces protéines transmembranaires, canaux ou transporteurs ont une fonction primordiale dans le fonctionnement cellulaire. En effet, elles permettent l'approvisionnement en métabolites, l'élimination en déchets métaboliques et le maintien de concentrations ioniques précises. Ces protéines ont la particularité d'être très spécifiques. Cependant quelques différences existent entre les canaux et les transporteurs. En effet, les canaux sont non saturables et sont aussi régulables car ils ont la capacité de se refermer. Par exemple, certains canaux ioniques répondent à un stimulus chimique. Le récepteur 5-HT3 activé par la sérotonine permet l'entrée de $Ca^{2+}$ et $Na^{+}$ dans le neurone post synaptique induisant une dépolarisation et déclenche alors un potentiel d'action (Davies et al., 1999) ; (Dubin et al., 1999).

Les transporteurs quant à eux, doivent souvent adopter des changements structuraux importants pour déplacer la molécule de part et d'autre de la membrane. Contrairement aux canaux, les transporteurs sont saturables. De plus, les molécules se déplacent plus vite à travers les canaux qu'à travers les transporteurs. Il existe de nombreux transporteurs référencés dans la classification décrite par Saier (Saier et al., 2014).

Lorsque le transport nécessite de l'énergie alors le transport est dit actif. Celui-ci se fait contre le gradient de concentration, c'est un transport non spontané. Le transport actif primaire utilise l'énergie fournie par l'hydrolyse d'un nucléotide triphosphate. Par exemple, la pompe

$Na^+/K^+$ ATPase est capable de transporter trois $Na^+$ vers le milieu extracellulaire et d'importer deux $K^+$ dans le cytosol, contre le gradient de concentration. Pour ce faire, elle va hydrolyser une molécule d'ATP pour permettre le passage du $Na^+$ et relargue le Pi après transport du $K^+$ (Skou, 1989).

Le transport actif secondaire ou couplé utilise l'énergie fournie par une différence de potentiel électrochimique, comme pour le co-transporteur de Na-glucose (SGLT Sodium-glucose co transporteur – 1). Cette protéine participe à la réabsorption rénale du glucose. Elle transporte le glucose contre son gradient de concentration en utilisant le gradient transmembranaire de $Na^+$ produit par la pompe ATPase $Na^+/K^+$. SGLT est un transporteur de type « symport » car le $Na^+$ et le glucose sont transportés dans la même direction (Crane R., 1961).

Il existe de nombreuses familles de transporteurs capables de transporter différents substrats. Certaines de ces protéines sont capables de transporter les nucléotides afin de pourvoir les différentes réactions cellulaires. En effet, l'ATP constitue l'énergie indispensable à tout organisme vivant. Pour être utilisée dans chaque compartiment cellulaire, cette molécule doit être capable de traverser chaque barrière membranaire. Cependant, la taille et la charge de l'ATP ne lui permettent pas de diffuser librement à travers les membranes. Il est donc transporté via des transporteurs membranaires. Ce transport d'ATP entre les compartiments étant essentiel à la majorité des réactions métaboliques, il existe de nombreux transporteurs de nucléotides dans les différents organites (Figure 1.1) : mitochondries, peroxysomes, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, chloroplaste…La plupart échange un nucléotide contre un autre. Certains de ces transporteurs ont aussi la capacité à transporter d'autres substrats tels que le glucose ou des nucléotides-oses (utilisés comme des donneurs pour les réactions de glycosylation).

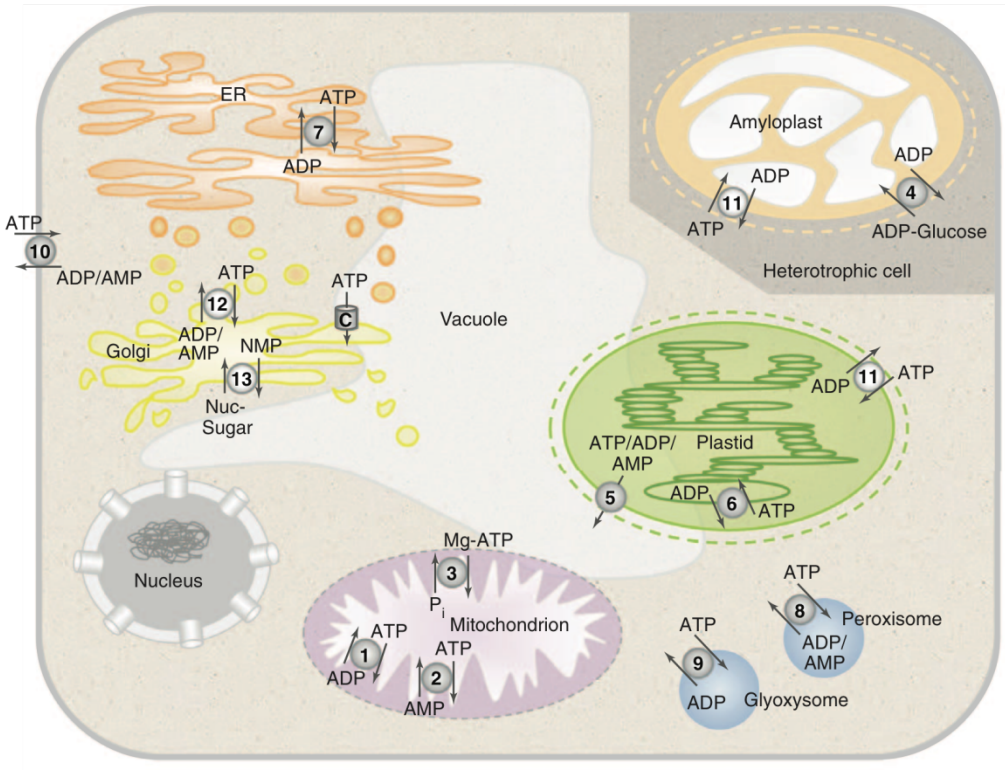



*Figure 1.1 : les différents transporteurs membranaires de nucléotides adénine dans une cellule de plante (Haferkamp et al., 2011). Dans la membrane interne de la mitochondrie, il existe trois transporteurs appartenant à la famille MCF : le transporteur d'ADP/ATP (1), le transporteur d'ATP/AMP (2) et le transporteur d'ATP-Mg/Pi (3). Dans le chloroplaste, les transporteurs d'ATP/ADP sont localisés dans les thylakoïdes (6) et dans la membrane interne de l'enveloppe (11). Il existe de nombreux autres transporteurs localisés dans l'appareil de Golgi (12) et (13) et dans le réticulum endoplasmique (7). La plupart sont capables de transporter uniquement les nucléotides adénine sauf certains qui peuvent transporter de l'ADP-glucose (4) ou des nucléotides glycosylés (13).*

## II. Transport de nucléotides

De nombreuses réactions métaboliques importantes ont besoin d'énergie libre. Pour cela, les êtres vivants tirent leur énergie de l'oxydation des nutriments mais ne sont cependant pas capable de l'utiliser telle quelle. Celle-ci est captée par un intermédiaire, majoritairement l'ATP, qui est capable par hydrolyse, de libérer cette énergie.

La synthèse de l'ATP se déroule dans la mitochondrie par respiration ou dans les chloroplastes par photosynthèse. Son transport à travers les membranes est donc essentiel

pour la plupart des réactions enzymatiques se déroulant dans le cytoplasme. Ainsi, un grand nombre de transporteurs d'ATP/ADP sont présents dans les différents organites tels que les mitochondries, les chloroplastes, et autres types de plastes.

## A. La famille MCF

L'un des transporteurs de nucléotides le plus connu et étudié est le transporteur d'ADP/ATP mitochondrial (AAC) appartenant à la famille MCF (mitochondrial carrier family) (cf. pour revues (Kunji, 2004), (Klingenberg, 2008)). Les protéines de cette famille partagent certaines caractéristiques de séquences. En effet, les transporteurs MCF sont composés d'environ 300 acides aminés et possèdent une répétition de 3 fois 100 acides aminés. En comparant les séquences et malgré une faible homologie, un consensus de deux motifs d'acides aminés, répété trois fois, est trouvé chez tous les membres de cette famille :

P-X-(D/E)-X-X-(K/R)-X-(K/R)- 20 à 30 résidus -(D/E) –G–X-X-X-X-a (K/R)-G

avec a représentant un acide aminé aromatique.

Les études biochimiques et fonctionnelles ont permis de postuler l'existence d'un réseau de ponts salins entre les résidus chargés de la première partie du motif (Nelson et al., 1998). La structure atomique d'AAC a confirmé l'existence de ces ponts salins qui participent à la conformation *c*, c'est-à-dire avec une cavité ouverte vers l'espace intermembranaire et fermée vers la matrice mitochondriale (Pebay-Peyroula et al., 2003) (Ruprecht et al., 2014). Une analyse réalisée par E. Kunji (Kunji and Robinson, 2010) postule l'existence d'un 3$^{ème}$ motif situé dans les hélices paires, proche de l'espace intermembranaire : (F/Y)-(D/E)-X-X-(R/K). Ce motif n'aurait pas de fonction dans la conformation *c* mais pourrait, de la même manière que l'autre motif, créer un réseau de ponts bloquant le transporteur en conformation *m* (ouverte côté matricielle) (Traba et al., 2011).

## B. Le transporteur ADP/ATP mitochondrial

Localisé au niveau de la membrane interne de la mitochondrie, AAC importe l'ADP dans la mitochondrie et exporte l'ATP après synthèse vers le cytosol. Ce transporteur s'inscrit dans la

chaine de production de l'ATP au sein de la mitochondrie. En effet, l'ATP produit grâce à la phosphorylation oxydative est échangé avec l'ADP grâce à ce transporteur. De plus, il est important de noter que AAC n'a aucun homologue chez les procaryotes.

La structure haute résolution de bAAC (bovine ADP/ATP mitochondrial carrier) a été obtenue en 2003 (Pebay-Peyroula et al., 2003) dans une conformation ouverte du côté cytoplasmique (état appelé état *c*) bloquée grâce à un inhibiteur appelé CATR (carboxyatractyloside). Combinée à des données biochimiques et des études de dynamique moléculaire, cette structure a permis de comprendre une partie du mécanisme de transport ((Nury et al., 2006),(Dehez et al., 2008)). Pendant l'échange d'ATP et ADP, la protéine subit des changements de conformation, passant de l'état *c* à un état *m* (Figure 1.2). Dans l'état *c* le substrat (ADP) entre dans le transporteur du côté cytosolique et s'y lie. La protéine va se réarranger pour atteindre un état de transition permettant d'avoir un maximum d'interaction avec le substrat. La protéine subit de nouveau un changement de conformation pour relarguer le substrat dans la matrice mitochondriale. Le passage à l'état *m* est encore hypothétique tout comme la structure de la protéine dans cette conformation.

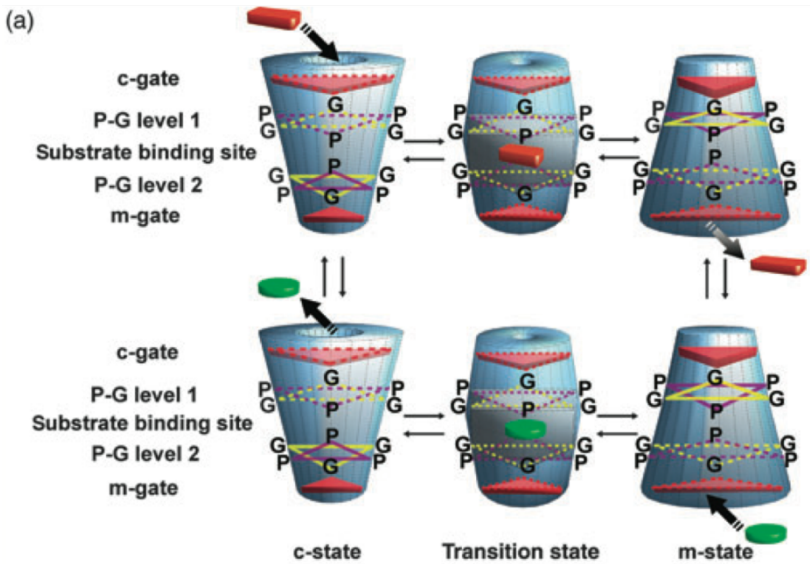



*Figure 1.2: modèle proposé pour le fonctionnement du transporteur d'ADP/ATP mitochondrial. Adapté de (Palmieri et al., 2011). La représentation de l'état c à gauche montre l'état du transporteur après relargage du substrat (haut) et après son entrée (bas). A droite, le transporteur est représenté à l'état m. Au centre est représenté l'état transitionnel.*

L'architecture de l'AAC consiste en 6 hélices transmembranaires connectées par 3 boucles du coté matriciel et 2 boucles du coté de l'espace intermembranaire. Les boucles localisées dans la matrice sont partiellement structurées et contiennent de courtes hélices amphipathiques. Les hélices transmembranaires impaires (1, 3 et 5) ont la propriété de former un coude de 20 à 35° de par la présence des prolines dans les motifs MCF (Pebay-Peyroula et al., 2003). La cavité formée par les hélices transmembranaires est très profonde et traverse presque complètement la membrane. Cette cavité est large et principalement hydrophile. L'entrée a un diamètre de 20 Å et se termine par un tunnel plus étroit (longueur : 20 Å ;  diamètre : 8 Å).

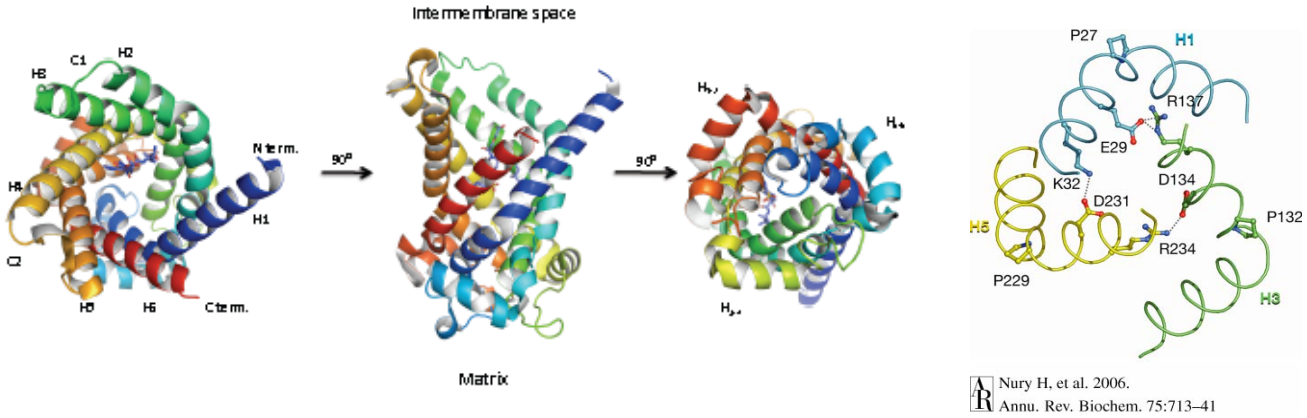



*Figure 1.3 : a) Structure de AAC obtenue en 2003 (Pebay-Peyroula et al., 2003) montrant un repliement en hélices avec les 6 domaines transmembranaires. La structure est ici présentée en présence de CATR qui bloque AAC dans une conformation ouverte.*

*b) Les hélices impaires forment l'entrée de la cavité. Les ponts salins permettent l'ouverture et la fermeture de cette cavité. Les coudes sont formés par les motifs MCF (Nury et al., 2006).*

Grâce à toutes ces caractéristiques, l'AAC est capable de transporter l'ADP $^{3-}$ et l'ATP $^{4-}$. Les conditions physiologiques de la protéine lui permettent d'échanger 1 ADP pour 1 ATP. Cependant, il a été montré que AAC peut aussi transporter un seul ATP ou ADP dans un sens (Brustovetsky and Dubinsky, 1999). L'affinité pour ces nucléotides est très forte avec un $K_M$ autour de 4-8 µM chez la protéine humaine. Cependant il a été remarqué que la protéine n'est capable de transporter que la forme libre des nucléotides. En effet, les formes Mg-ATP et Mg-ADP ne sont pas transportées.

La structure a révélé trois molécules de cardiolipides liées à AAC. Ces lipides ont été copurifiés avec la protéine. Il a été montré que ceux-ci jouent un rôle important dans la biogenèse et la stabilité des protéines de la famille MCF (Jiang et al., 2000) ; (Klingenberg,

2009). De plus, les cardiolipides permettent d'augmenter l'activité des AAC mitochondriales recombinantes et de certaines autres protéines MCF (Heimpel et al., 2001).

Plusieurs isoformes ont été décrites : initialement trois pour bAAC (Powell et al., 1989) et quatre pour hAAC (Skarka et al., 2003). La présence de ces isoformes est probablement due aux caractéristiques particulières de chaque tissu où sont exprimées ces isoformes. En effet, hAAC1 est fortement exprimée dans les muscles et est induit pendant la différenciation des myoblastes. hAAC2 est stimulée par des facteurs de croissance dans les fibroblastes et dans les cellules neoplastiques. hAAC3 est exprimée dans les cellules cancéreuses (Li et al., 1989) alors que hAAC4 est faiblement exprimée (Dolce et al., 2005).

Récemment, de nouvelles structures de la famille des MCF ont été résolues. En effet, l'équipe de E. Kunji a résolu les structures de AAC2 et AAC3 de *Saccharomyces cerevisiae* (Ruprecht et al., 2014). Ces protéines possèdent 52% d'identité de séquence avec bAAC1 et plus de 90% entre-elles. La comparaison de bAAC1 à ces deux nouvelles structures a permis d'en connaitre un peu plus sur les caractéristiques des protéines de cette famille. En effet, cette comparaison a mis en avant quelques différences malgré les nombreuses similitudes. Ces structures ont été obtenues en bloquant les protéines avec le CATR. Celles-ci sont alors capables de former les mêmes intéractions que celles décrites pour bAAC1. Les différences résident principalement dans la position des hélices du côté cytoplasmique. Quelques différences de structures sont à noter telles que l'hélice 1 (H1) de AAC3 qui s'étend quasiment jusqu'au N-terminus et le C-terminus de AAC2 qui se replie dans la cavité.

## C. Les autres transporteurs de la famille MCF

D'autres transporteurs ADP/ATP de la famille MCF ont également été décrits au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (Figure 1.1). Le transporteur ER-ANT1 récemment identifié dans les plantes possède une forte homologie de séquence avec les AAC mitochondriaux (Haferkamp et al., 2011).

On retrouve aussi un transporteur de la famille MCF dans la membrane des thylakoïdes, TAAC (Figure 1.4). Initialement décrit comme important l'ATP dans les thylakoïdes permettant ainsi le fonctionnement du photosystème II (Thuswaldner et al., 2007), son rôle et sa localisation sont aujourd'hui contreversés. Il pourrait être localisé dans l'enveloppe des

chloroplastes et transporter du PAPS en échange avec du PAP et ATP (Gigolashvili et al., 2012)

## III. Famille des NTTs

Chez les plantes, en absence de synthèse d'ATP *via* la photosynthèse, c'est-à-dire à l'obscurité ou dans les plastes non chlorophylliens (Linka and Weber, 2010), l'import d'ATP dans le stroma est nécéssaire afin de permettre les différentes réactions métaboliques, en particulier la biosynthèse d'acides gras ou d'amidon. Cet import d'ATP est assuré par la présence de transporteurs d'ATP/ADP (Figure 1.4).

Dans le chloroplaste, ces protéines appartiennent à la famille NTT (nucleotide transporter) et transportent l'ATP du cytosol vers le stroma, à l'intérieur du chloroplaste, en l'échangeant avec de l'ADP et du Pi (cf pour revue (Spetea and Lundin, 2012)). Il n'existe à ce jour aucune donnée structurale sur cette famille de protéine. D'après la classification faite par Saier (Saier et al., 2014), les NTTs font parties de la superfamille MSF (Major Facilitator Superfamily), et plus précisément de la famille des AAA (2.A. ATP/ADP Antiporter).

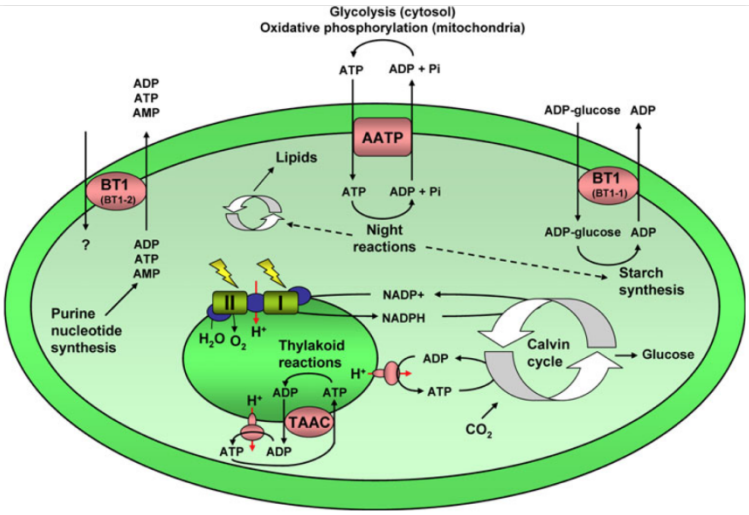



*Figure 1.4: Dans le chloroplaste, de nombreux transporteurs sont impliqués dans le transport de nucléotides adénines. Le transporteur d'ATP/ADP (AATP) situé dans la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste est autrement nommé NTT (Traba et al., 2011). L'ATP importé par la protéine est nécessaire pour la synthèse des lipides mais aussi de l'amidon lorsque la quantité de lumière est insuffisante, et pour les plastes non chlorophylliens.*

## A. Rôle physiologique

Chez *Arabidopsis thaliana*, deux transporteurs ATP/ADP de la famille NTT ont été décrits, NTT1 (*At*NTT1) et NTT2 (*At*NTT2) (Mohlmann et al., 1998). Ils sont localisés dans la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste et constituent moins de 5% des protéines membranaires. Il s'est avéré que ces protéines ont une fonction majeure dans le métabolisme des cellules mésophiles. Celles-ci se situent au milieu des feuilles et possèdent une grande quantité de chloroplastes.

*At*NTT1 a aussi été identifiée dans d'autres types de plantes tels que les tubercules de pommes de terre *Solanum tubersosum* (Tjaden et al., 1998), le germe de colza *Brassica napus* (Schwender et al., 2004) et une algue rouge *Galderia sulfuralia* (Mohlmann et al., 1998). Les plastes hétérotrophiques utilisent la glycolyse endogène pour produire de l'ATP stromal qui contribue à alimenter les réactions anaboliques pour compenser partiellement l'absence de transport d'ATP plastidique (Reiser et al., 2004).

Quand *At*NTT1 et *At*NTT2 ne sont pas fonctionnelles, elles ne supplémentent pas le stroma en ATP. Cela affecte l'assemblage de la Magnésium - chélatase et réduit son activité. L'expression des gènes des 3 sous unités de la Magnésium - chélatase n'est pas modifiée mais les modifications post-traductionnelles sont impactées : la conversion de la forme inactive de l'enzyme en forme active holoenzyme nécessite de l'ATP. Lorsque la fonctionnalité de cette enzyme impliquée dans la biosynthèse des chlorophylles est réduite, on observe une accumulation de la protoporphyrine IX dans l'enveloppe des chloroplastes induisant une forte production d'espèce réactive de l'oxygène et de photooxydation. Même si la biosynthèse des chlorophylles se déroule principalement à la lumière (enzyme lumière dépendante), le complexe Magnésium - chélatase doit se former avant la fin de la nuit. De plus, il a été montré que l'hydrolyse d'ATP était nécessaire au maintien de la sous-unité D de cette enzyme clé (Lake et al., 2004).

La protoporphyrine IX est un précurseur de tous les chlorophylles, les cytochromes, les hèmes. Une fois activée par la lumière, elle entraîne la peroxydation des membranes conduisant à la nécrose des cellules ainsi qu'à une dégradation pigmentaire. Ces symptômes induisent alors chez les plantes un phénotype nain (Reinhold et al., 2007). De plus, les

doubles mutants (*At*NTT1 et *At*NTT2 silencieuses) ont une augmentation de l'expression des gènes permettant de se défendre contre les espèces réactives de l'oxygène.

Il est important de noter que le phénotype nain n'apparaît pas si le double mutant pousse dans des conditions de forte lumière (1000 μE) et temps d'illumination court (10 h) ou à faible luminosité (100 μE) et un temps d'illumination long (16 h). Dans ces conditions de luminosité, l'amidon dégradé chez les doubles mutants permettrait la régénération de l'ATP stromal par la phosphorylation du substrat. Il a été montré que l'activité de phosphoglycérate kinase, responsable de la conversion réversible de l'ATP en ADP, est beaucoup plus importante chez les doubles mutants que chez le type naturel. De plus les pyruvate-kinases localisées dans le stroma s'accumulent de façon très importante. Ces conditions permettent de mobiliser toutes les réserves d'amidon disponibles durant la phase nuit qui seront ensuite utilisées par l'activité glycolytique stimulée du stroma.

L'absence de *At*NTT1 et *At*NTT2 entraine donc chez les cellules mésophiles une transmission erronée d'information sur la quantité d'ATP nocturne. Celle-ci étant insuffisante, les cellules déclenchent donc tout un processus moléculaire permettant de régénérer l'ATP provenant de la glycolyse au sein des chloroplastes (Reinhold et al., 2007).

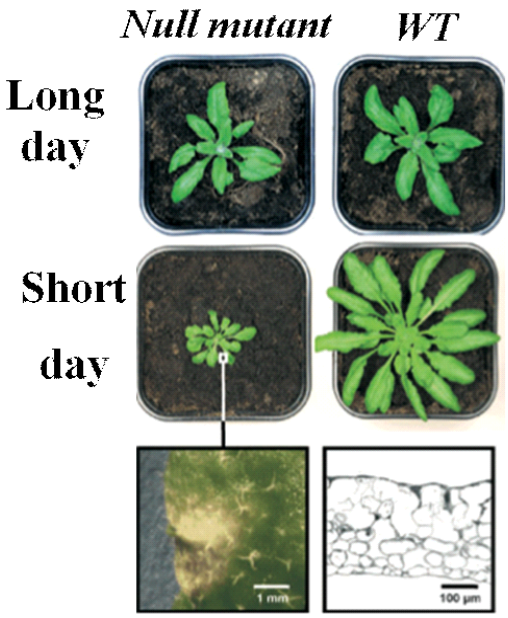



*Figure 1.5: Phénotypes des mutants affectés dans l'expression de AtNTT1 et AtNTT2 (Reinhold et al., 2007).*
*A gauche (Null mutant) : AtNTT1 et AtNTT2 ne s'expriment pas. En l'absence de ces protéines et en condition de culture sous faible intensité lumineuse, le phénotype obtenu est une plante naine possédant des feuilles nécrosées.*
*A droite (WT) : AtNTT1 et AtNTT2 sont exprimées normalement.*

Les ARNm de *At*NTT1 et *At*NTT2 s'accumulent dans les feuilles où la photosynthèse a lieu ainsi que dans les tiges. Cependant, les 2 isoformes ne sont pas exprimées de la même manière. En effet, *At*NTT1 est exprimée dans les tiges et racines alors que *At*NTT2 est exprimée principalement dans les racines et les jeunes cotylédons. De plus, *At*NTT1 est à peine exprimée durant la croissance de la plante alors que *At*NTT2 est très importante. En effet, il a été montré qu'en absence de *At*NTT2, la croissance des racines primaires est fortement diminuée et l'accumulation de chlorophylle est retardée. Cela conduit à une croissance réduite. La diminution de croissance des racines est probablement due à une inhibition de la synthèse des acides gras. L'absence de *At*NTT1 dans les racines ne provoque pas de modification de la croissance (Reiser et al., 2004).

## B. Caractéristiques biochimiques

La forme complète, contenant la séquence d'adressage, d'*At*NTT1 est composée de 624 acides aminés pour une masse moléculaire de 68 kDa. D'après les prédictions de structures secondaires, ces protéines présentent 11 à 12 hélices transmembranaires. Les dernières prédictions sont plutôt en faveur de 12 hélices transmembranaires pour *At*NTT1 (Figure 1.6). Une extension d'une centaine acides aminés en N-terminal permet à la protéine de s'insérer dans la membrane du chloroplaste. Cette séquence signal est clivée de la protéine mature pendant son intégration dans la membrane.

D'après les travaux menés par A. Deniaud (Deniaud et al, 2011), la séquence utilisée dans les différentes expériences présentées par la suite a subi des troncations pour enlever la séquence d'adressage chloroplastique. La séquence utilisée est décrite en Annexe 1, elle est constituée de 544 acides aminés pour une masse moléculaire de 58kDa.

*At*NTT2 possède 82,7% d'identité de séquence avec *At*NTT1 (cf annexe 2).

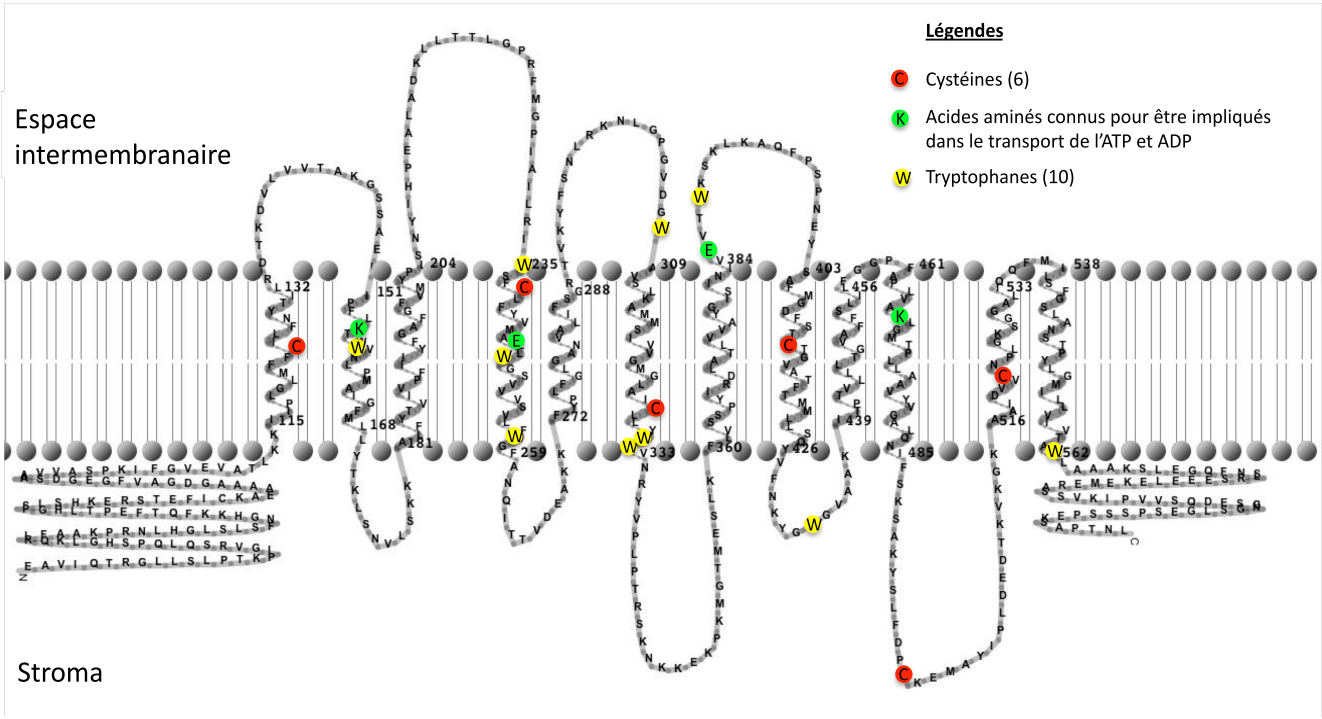



*Figure 1.6: prédiction de topologie de AtNTT1 (prédiction réalisée avec HMMTOP et représentée schématiquement avec TMRPres2)*

Ce transporteur échange en mode antiport l'ATP contre l'ADP et le Pi, la réaction est donc électriquement neutre (Trentmann et al., 2008). Le Pi est co-transporté avec l'ADP de façon équimolaire (Figure 1.7). Une concentration élevée de Pi peut inhiber le transport, celui-ci pourrait avoir un effet régulateur dans le chloroplaste. De plus, le transporteur doit probablement posséder deux sites de liaison : un pour l'ADP et le Pi, l'autre pour l'ATP (Trentmann et al., 2000).

Les données publiées concernent uniquement *At*NTT1. En effet, très peu d'informations sont connues pour *At*NTT2.

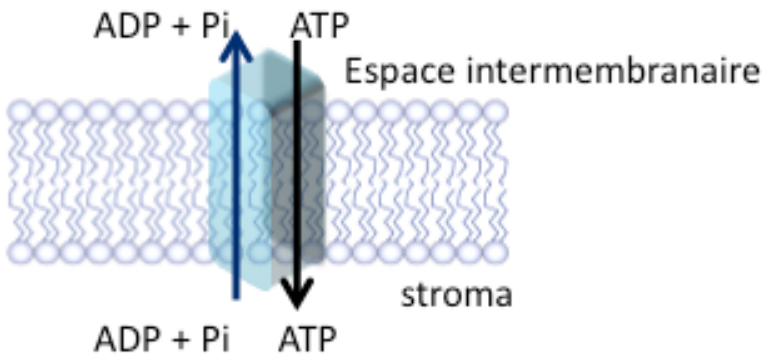



*Figure 1.7: Modèle d'échange d'ATP, ADP et Pi proposé pour AtNTT1*

*At*NTT1 et *At*NTT2 d'*Arabidopsis thaliana* possèdent une très forte affinité pour l'ATP et l'ADP (Tableau 1.1). L'affinité des deux isoformes pour ces deux nucléotides est équivalente, autour de 20µM. Le transporteur MCF d'ADP/ATP localisée dans les membranes thylakoïdes (TAAC) possède une affinité pour l'ATP et l'ADP du même ordre de grandeur que celle *d'At*NTT1 (45 µM). En revanche, TAAC possède un $V_{max}$ beaucoup plus faible que celui d'*At*NTT1, environ 0,71 nmol ATP /mg de protéine/h. NTT est plus efficace que TAAC car elle transporte plus de substrat par unité de temps.

| Protéine | Organisme | ATP | | ADP | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | $K_m$ | $V_{max}$ | $K_m$ | $V_{max}$ |
| NTT1 | *Solonum tubersosum* | 25 | 100 | 20 | 200 |
| NTT1 | *Arabidopsis thaliana* | 17 | 29 | 12 | 80 |
| NTT2 | *Arabidopsis thaliana* | 22 | 7 | 20 | 24 |
| NTT1 | *Galdiera sulphuraria* | 65 | n.d. | 18 | n.d. |
| AAC | *Arabidospis thaliana* | 45 | 0,71 | 45 | 0,53 |

*Tableau 1.1 : Données cinétiques pour les transporteurs d'ATP/ADP de plantes. Les affinités Km sont données en µM et les Vmax en nmol/mg de protéine/h – (Schmitz-Esser et al., 2004)*

Certains résidus chargés localisés dans les hélices transmembranaires (K155, E245, E385, K527) semblent jouer un rôle essentiel dans l'interaction avec le substrat et dans le transport de l'ATP. En effet, Trentmann et collaborateurs (Trentmann et al., 2000) ont montré par des expériences de mutagenèse dirigée que :

- Aucun des quatres acides aminés mutés ne semble important pour insérer le transporteur dans la membrane ou pour exprimer la protéine
- Ces quatres résidus sont conservés dans différents homologues
- L'encombrement stérique de K155 et sa charge sont très importants pour le transport. Comme le transport pour l'ADP est inexistant lorsque cet acide aminé est modifié, il est possible que K155 fasse partie du site de liaison de l'ADP.
- La charge négative de E245 et E385 est primordiale pour l'efficacité du transport
- Une charge positive à la position 527 est nécessaire pour la reconnaissance de l'ATP et de l'ADP comme substrat mais une charge positive n'est pas suffisante pour reconnaître les deux substrats car l'arginine ne peut pas substituer la lysine. On peut supposer que lorsque le domaine contenant K527 interagit avec le substrat pendant l'influx et l'efflux, il rend accessible alternativement un côté puis l'autre. De plus, lorsque la lysine en position 527 est modifiée, la liaison de l'ATP n'est plus assurée. Elle fait donc partie du site de liaison de l'ATP.
- L'impact des différentes mutations semble indiquer que la protéine fonctionne comme le modèle proposé pour AAC : une cavité permettant la liaison d'un nucléotide.

La modification des deux acides aminés K155 et K527 affectant aussi l'affinité de *At*NTT1 pour d'autres nucléotides, l'effet allostérique influence donc les deux sites de liaison. Le changement de conformation pour passer d'un état de transport à un autre nécessite la présence de résidus chargés tel que E245 (Deniaud et al., 2012).

## C. NTTs bactériens

### *1. Rôle physiologique*

Les bactéries intracellulaires sont souvent incapables de synthétiser certains nucléotides et ont une faible capacité à régénérer l'ATP. C'est pourquoi elles ont besoin de transporter différents nucléotides et NAD ou de faciliter l'échange d'ATP et ADP en provenance de la cellule hôte afin de pouvoir satisfaire leur besoin d'énergie. Il s'agit de parasitisme d'énergie. Les *Rickettsia* et les *Chlamydia* sont capables d'adapter leur système de survie. En effet, lorsque la charge énergétique de la cellule hôte diminue, de moins en moins de transporteurs d'ATP/ADP sont synthétisés par Rickettsia (Winkler and Neuhaus, 1999). Les Chlamydiales et les Rickettsiales ne sont pas les seules à pouvoir utiliser l'ATP d'un organisme hôte, d'autres espèces de pathogènes de mammifères tels que *Lawsonia intracellularis* (Schmitz-Esser et al., 2008) et *Encephalitozoon cuniculi* (Tsaousis et al., 2008) en sont également capables.

Les protéines transportant les nucléotides ont des origines très anciennes. Elles seraient d'abord apparues chez *Chlamydiae* puis par transfert latéral chez les ancêtres des *Rickettsia* pour ensuite être transférées chez les plantes.

### *2. Caractéristiques biochimiques*

NTT1 de *Rickettsia prowazekii* (*Rp*NTT1) possède 66% de similarité (42% d'identité) avec *At*NTT1 et 63% de similarité (37% d'identité) avec *At*NTT2. Pour NTT1 de *Protoclamydiae amoebophila* (*Pam*NTT1), on trouve 55% d'identité avec *At*NTT1 et 45% avec *Rp*NTT1. La séquence de *Pam*NTT1 est donc plus proche de celle d'*At*NTT1 que celle de *Rp*NTT1 (cf annexe 2).

Il a été montré qu'à la différence de *Rp*NTT1 et *At*NTT1, le transport d'ATP/ADP par *Pam*NTT1 ne semble pas être affecté par le phosphate (Trentmann et al., 2007).

$^{244}$AELWG$^{248}$, $^{259}$FANQIT$^{264}$, $^{382}$NLVE$^{385}$ et $^{525}$LGKSGG$^{531}$ (numérotation selon la nomenclature du NTT1 *d'Arabidopisis thaliana*) sont les premières séquences conservées décrites chez les transporteurs de Rickettsia et de plantes. Elles sont très importantes dans la fonction du transporteur (Mohlmann et al., 1998).

Des études (Amiri et al., 2003) ont montré que quelques résidus sont conservés parmi les séquences des NTT des plastes, de *Chlamydiae*, *Rickettsia* et *Encephalitozoon* : F153, K155, 161P, E245, S364, E385, G526, K527, W562 (numérotation selon la nomenclature du NTT1 *d'Arabidopisis thaliana*). Ces différents résidus sont localisés dans cinq segments transmembranaires différents. Certains de ces résidus ont été décrits chez les plantes comme étant nécessaire dans le transport de l'ATP et l'ADP (Trentmann et al., 2000) : K155, E245, E385, et K527 (Figure 1.6, acides aminés marqués en vert).

L'affinité pour l'ATP et l'ADP des NTT bactériens *Rp*NTT1 et *Pam*NTT1 est près de 5 fois plus faible que celle des NTT d'*Arabidopsis thaliana* (Tableau 1.2*)*. Le $V_{max}$ de *Pam*NTT1 est beaucoup plus élevé que pour *Rp*NTT1. *Pam*NTT1 semble donc plus efficace.

| **Protéine** | **Organisme** | **ATP** | | **ADP** | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | **$K_m$** | **$V_{max}$** | **$K_m$** | **$V_{max}$** |
| NTT1 | *Protoclamydiae amoebophila* | 95 | 384 | 55 | 384 |
| NTT1 | *Rickettsia prowazekii* | 114 | 6 | n.d. | n.d. |

*Tableau 1.2 : Données cinétiques pour les NTT bactériens. Les affinités Km sont données en µM et les Vmax en nmol/mg de protéine/h (Schmitz-Esser et al., 2004)*

### *3. Caractéristiques chez différentes bactéries parasites*

*Rickettsia prowazekii* est responsable du typhus exanthématique transmis par les poux. Contrairement aux autres rickettioses, l'homme est le réservoir principal de cette maladie et reste porteur de la bactérie toute sa vie.

Les caractéristiques des différents NTTs varient d'une espèce bactérienne à l'autre. En effet, l'ATP/ADP translocase chez *Rickettsia prowazekii* possèdent cinq isoformes de NTT appelées TLC1 à TLC5 (Audia and Winkler, 2006) mais seule l'isoforme 1 est capable de

transporter l'ADP et l'ATP. Les substrats de TLC2 et TLC3 ne sont pas connus. Les isoformes 4 et 5 sont présentes afin de maintenir la réserve de nucléotides pour la synthèse d'acides nucléiques mais ne fournissent pas la bactérie en énergie. En effet, TLC4 est inhibé par le GTP et transporte CTP/UTP et GDP alors que TLC5 transporte le GDP/GTP. La présence de ces transporteurs a permis à *Rickettsia* d'épurer son génome : certains mécanismes de biosynthèse *de novo* ne sont plus présents. De plus, quelques études topologiques (Audia et al., 2006) ; (Alexeyev and Winkler, 2002) ont été réalisées sur *Rp*NTT1. En modifiant certains acides aminés en cystéines puis en les marquant avec des methanethiosulfonate réagissant avec les Thiols (MTS), quatre hélices transmembranaires (V, VII, X et XI) sont reconnues comme faisant partie de la voie de translocation de l'ATP.

*Protoclamydiae Amoebophila* est responsable de certaines infections respiratoires humaines. Chez cette bactérie, il existe aussi cinq isoformes de la protéine NTT permettant l'import de nucléotides pour les utiliser dans ses propres réactions métaboliques (Figure 1.8). Afin de mesurer l'affinité de chacun de ces transporteurs pour les nucléotides, chaque gène correspondant a été cloné puis exprimé dans *E.coli*. Ensuite, l'affinité pour chaque substrat a été mesurée grâce aux substrats radiomarqués (Haferkamp et al., 2006) ; (Deniaud et al., 2012).

Contrairement à *Rickettsia* et aux plantes, *Pam*NTT1 ne transporte pas de Pi et a donc un transport électrogénique (Trentmann et al., 2007). De plus, l'isoforme 4 est le premier transporteur capable de transporter le $NAD^+$ à travers les membranes biologiques. Les autres isoformes sont capables de transporter différents nucléotides :

- *Pam*NTT1 transporte l'ATP et l'ADP
- *Pam*NTT2 a une faible affinité pour les 4 nucléotides ARN.
- *Pam*NTT3 transporte l'UTP couplé à un proton
- *Pam*NTT5 importe le GTP et l'ATP grâce aux protons

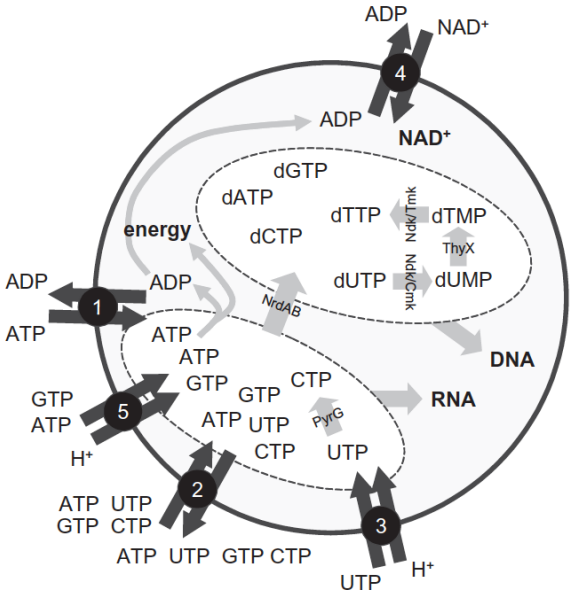



*Figure 1.8 : Interaction entre la bactérie parasite Protoclamydiae amoebophila et son hôte Acanthamoeba (Haferkamp et al., 2006). La combinaison de l'activité des 5 isoformes entraine le transport d'électron, du cofacteur NAD$^+$, de tous les nucléotides nécessaires à la synthèse de l'ARN et ADN et l'import d'énergie sous forme d'ATP.*

*Lawsonia intracellularis* (Schmitz-Esser et al., 2008) exprime aussi un transporteur d'ATP/ADP. Cette bactérie parasite entre dans la cellule hôte par phagocytose, directement dans le cytoplasme. Elle est responsable d'entéropathie proliférative chez de nombreux mammifères mais principalement chez les porcs.

Comme *Rickettsia* et *Chlamydiae*, *Lawsonia* limite l'import des nutriments essentiels à la survie de l'hôte afin que son mécanisme ne soit pas trop dégradé. En effet, la présence des NTTs ne permet que de supplémenter la production bactérienne d'énergie.

Cependant, contrairement aux bactéries pathogènes précédemment citées, *Lawsonia* est capable de générer sa propre énergie en utilisant une petite chaine respiratoire mais possède aussi une voie pour la glycolyse complète. De plus, cet organisme est capable de synthétiser les nucléotides puriques et pyrimidiques.

Le transporteur d'ATP/ADP décrit chez *Lawsonia* possède 47,5% d'identité avec *Protochlamydiae amoebophila*, 46,5% d'identité avec *Rickettsia prowazekii* et entre 39 et 44% d'identité avec les NTTs plastidiques.

## D. NTTs provenant d'autres organismes

NTT est aussi exprimée dans des organismes unicellulaires tels que les diatomées. Ces algues sont responsables de 40% de la production primaire (formation de matière organique à partir de matière minérale et d'un apport d'énergie) dans les océans, et font parties de la famille des phytoplanctons. Chez ces organismes, la synthèse des nucléotides a lieu dans le cytosol, ces nucléotides doivent donc être transportés vers les différents organites. De plus, le transport doit s'adapter car cet organisme a la particularité d'avoir des plastes avec quatre membranes, à cause de sa formation originelle par endosymbiose secondaire (Prihoda et al., 2012). De nombreuses isoformes de NTT ont été identifiées chez *Thalassiosira pseudonana* (8) et *Phaeodactylum tricornutum* (6). Ces isoformes sont nécessaires dans l'apport des nucléotides pour la synthèse d'ADN et d'ARN dans le stroma. Cela implique la présence de ces NTT dans les quatres membranes du plaste (pas uniquement dans les membranes extérieures).

Une étude (Ast et al., 2009) a montré que les NTT2 de ces deux organismes ont la capacité de transporter un grand nombre de nucléotides : ATP, ADP, AMP, CTP, GTP, TTP ainsi que leur forme déoxy. Le CTP est le substrat le mieux transporté par les 2 organismes ($K_m$ environnant 40µM alors que pour les autres nucléotides le $K_m$ est supérieur, entre 60 et 200µM). Quant à NTT1, la protéine semble mieux transporter l'ADP puis l'ATP et enfin l'AMP ainsi que leur forme déoxy. De plus, les deux isoformes étudiées semblent avoir des modes de transport très différents. En effet, en présence d'un protonophore, l'activité de transport de NTT1 semble affectée mais pas celle de NTT2.
NTT2 faciliterait donc le contre-échange des NTP et dNTP alors que le transport de NTT1 est proton - dépendant pour l'import des nucléotides à adénines. Ces deux transporteurs sont les seuls connus à ce jour capable de transporter une telle variété de substrats dans la famille des NTT.

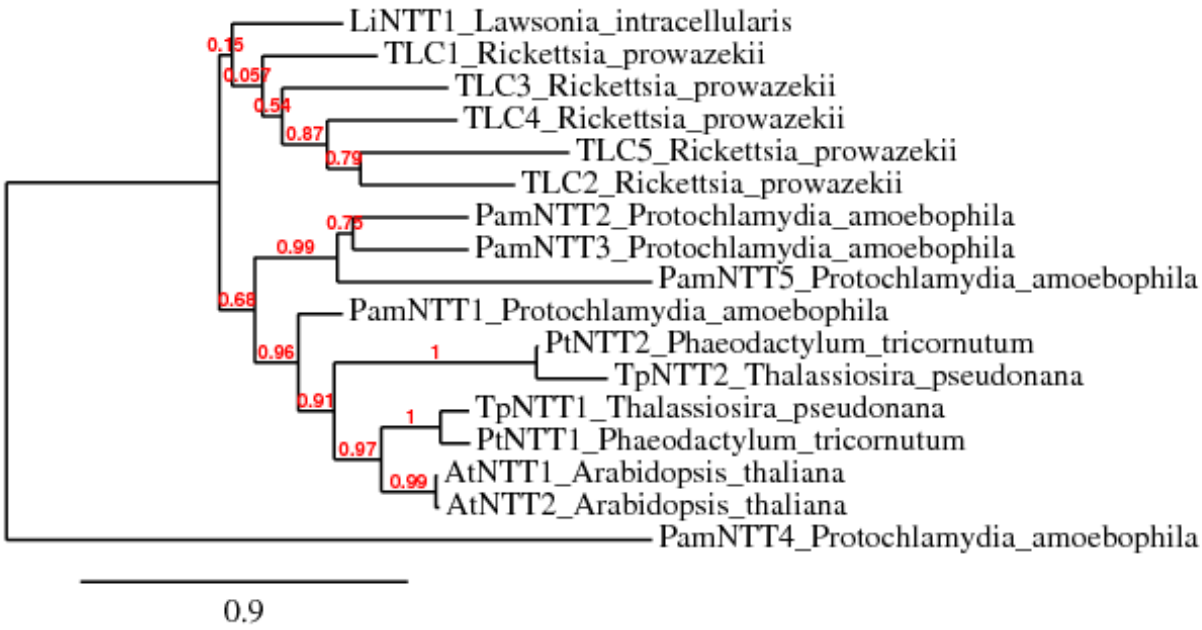



*Figure 1.9 : Arbre phylogénique entre les différentes NTTs (www.phylogeny.fr) montrant que le PamNTT4 est plutôt différent de toutes les autres NTTs mais que les AtNTT sont plutôt proches des diatomées.*

L'arbre phylogénétique présenté en Figure 1.9 permet de mieux voir les similitudes entre les différents isoformes des différents organismes. De part les caractéristiques précédemment décrites, les isoformes NTT1 et NTT2 ne se placent pas au même endroit dans cet arbre. L'isoforme 1 des diatomés semble plus proche des NTTs produits par les plantes et les algues alors que l'isoforme 2 est plus proche des NTTs bactériens.

Malgré une identité de séquence de 30 à 40 % séquences entre les NTT d'*Arabidopsis thaliana*, des bactéries et des diatomées, les fonctions de ces transporteurs sont significativement différentes.

| | *Pt*NTT2 | *At*NTT2 | *Rp*NTT2 | *Pam*NTT2 |
|---|---|---|---|---|
| *Th*NTT2 | 68% (81%) | 39% (58%) | 31% (51%) | 35% (55%) |
| *Pt*NTT2 | X | 36% (56%) | 32% (51%) | 36%(56%) |

*Tableau 1.3 : identité et similarité entre les séquences (Données obtenues avec BLAST)*

*En gras, les valeurs d'identité de séquences. Entre parenthèses, les similarités observables entre les 2 séquences comparées.*

*Th : Thalassiosira pseudonana*

*Pt : Phaeodactylum tricornutum*

*Rp : Rickettsia prowazekii*

*Pam : Protoclamydiae amoebophila*

## IV. Comparaison AAC/NTT

La famille des transporteurs MCF a été depuis longtemps très étudiée contrairement à la famille des NTTs. En comparant ces 2 familles, plusieurs caractéristiques permettent de les distinguer (Figure 1.10).

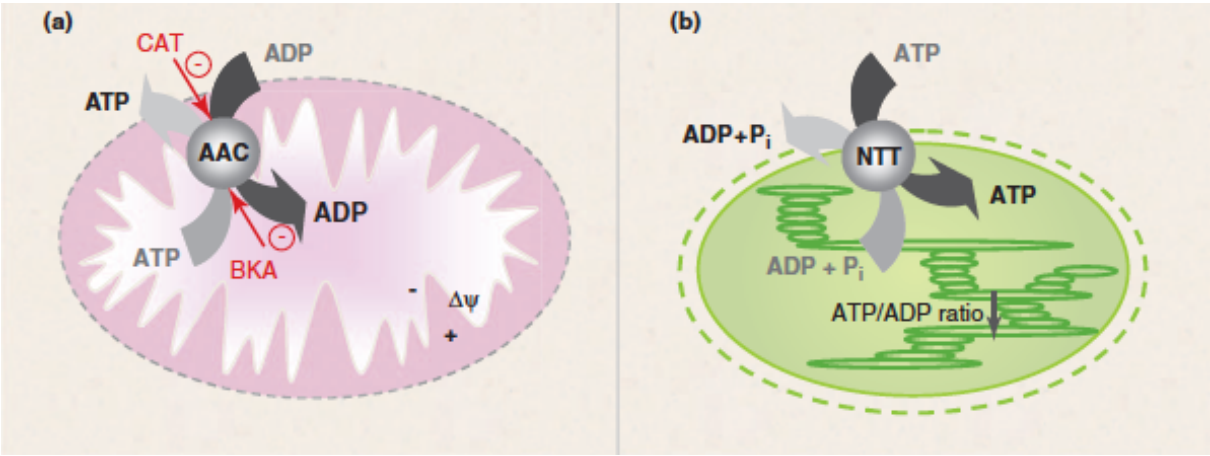



*Figure 1.10 : comparaison de AAC et NTT (Haferkamp et al., 2011).*

*(a) La protéine AAC insérée dans les membranes internes de la mitochondrie*

*(b) La protéine AtNTT1 insérée dans les membranes internes des chloroplastes*

Ces 2 familles ont des rôles physiologiques et des propriétés biochimiques différentes :

- AAC transporte l'ATP hors de la mitochondrie alors que NTT apporte l'ATP à l'intérieur du chloroplaste.

- AAC transporte 1 ATP contre 1 ADP et est donc électrogénique contrairement à NTT1 qui transporte 1 Pi avec l'ADP rendant le transport électriquement neutre. Certaines NTTs font exception à cette règle telle que *Pam*NTT1.
- AAC possède 6 hélices transmembranaires confirmées par la structure 3D de 2003 alors que les prédictions faites pour NTT proposent un modèle avec 12 hélices transmembranaires.
- Les inhibiteurs connus pour AAC tels que le carboxyactractyloside (CATR) et l'acide bongkrekique (BA) n'inhibent pas NTT.
- En comparant les séquences en acides aminés, il n'existe pas de similitude.

## V. Etudes structurales des protéines membranaires

Les protéines membranaires sont fortement représentées dans les cellules de tous les organismes : jusqu'à 30% des gènes codent pour des protéines membranaires. Elles jouent des rôles primordiaux dans une grande quantité de processus cellulaires. Cependant, de nos jours, seules 1% des protéines membranaires ont leurs structures déterminées.

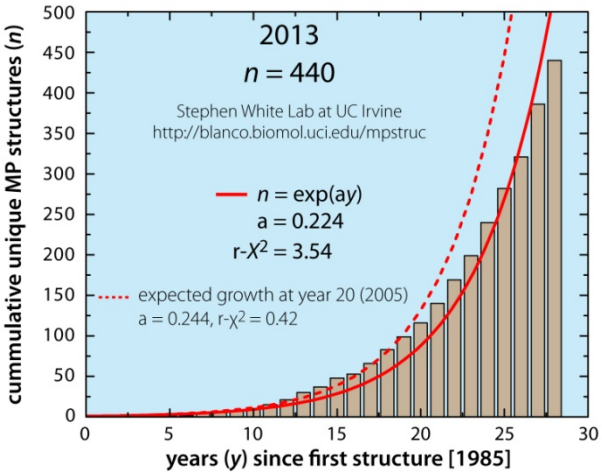



*Figure 1.11 : Evolution du nombre de structures de protéines membranaires au cours du temps (Stephen White, mpstruc)*

Depuis la première structure déterminée en 1985 (centre de réaction photosynthétique de *Rhodopseudomonas viridis,*) (Deisenhofer et al., 1985), le nombre de structure ne cesse d'augmenter (Figure 1.11). Néanmoins le taux de croissance est inférieur à celui des protéines solubles. Cette courbe traduit la difficulté à obtenir les structures de ces protéines malgré des

efforts importants. Les premières structures de protéines membranaires n'impliquaient pas de surexpression, mais uniquement de l'extraction des protéines des tissus natifs. Une grande part de la physico-chimie des détergents adaptés à la solubilisation et la cristallisation a alors était développée. Actuellement, il s'agit d'étudier des protéines peu abondantes dans leur milieu naturel. Le challenge de la cristallisation des protéines membranaires se situe à différentes étapes : la surexpression, la purification et la cristallisation.

## A. L'expression

La majorité des protéines membranaires est présente en très faibles concentrations dans les tissus natifs. Il est donc nécessaire de les surexprimer, en général dans un système hétérologue. Il faut donc avoir recours à un système d'expression recombinant. De nos jours, le clonage semble être sur un pied d'égalité entre les protéines solubles et les protéines membranaires. Toutefois, la surexpression des protéines membranaires se différencie des protéines solubles. En effet, pour être bien repliées ces protéines doivent être adressées puis insérées à la membrane. Or les systèmes d'adressage ne sont pas toujours bien connus. Les protéines surexprimées ne sont parfois pas adressées à la membrane car elles sont produites dans un état inactif incapable de s'insérer proprement dans la membrane. Ces protéines vont s'agréger et alors former des corps d'inclusion. Ensuite, le volume de membrane disponible pour ces protéines dans la cellule hôte est beaucoup plus faible par comparaison au volume du cytosol. Et finalement, intégrer des protéines dans la membrane peut être très toxique pour l'hôte. Toutes ces raisons expliquent les faibles taux d'expression souvent observés.

De nombreuses études ont permis de mieux comprendre cette surexpression afin de l'améliorer.

Dans un premier temps, le choix du système d'expression est un point important. En effet, d'un type cellulaire à l'autre (cellules mammifères, levures, bactéries), les membranes sont composées de différents lipides. Certaines protéines ne sont pas actives sans la présence de lipides. Ceci est particulièrement vrai dans le cas des stérols. Par exemple, le transporteur de sérotonine SERT a besoin de cholestérol pour son activité (Scanlon et al., 2001). De plus, les caractéristiques du système procaryote peuvent ne pas convenir à toutes les protéines, des modifications seront nécessaires :

- L'élongation peptidique est 4-10 fois plus rapide chez les procaryotes que chez les eucaryotes car le taux de repliement est plus important chez les protéines procaryotes.
- Le système d'insertion dans les membranes, le translocon, est différent chez les procaryotes et les eucaryotes.
- Le système procaryote n'est pas capable de faire les modifications post traductionnelles parfois importantes pour l'activité de la protéine.

Ces caractéristiques pourraient expliquer pourquoi certaines protéines eucaryotes n'arrivent pas à être surexprimées dans les bactéries (Tate, 2001). Une adaptation de la séquence ADN sans modification de la séquence protéique est parfois nécessaire pour que la protéine puisse s'exprimer en bactérie. Dans des rares cas, la protéine peut être extraites des corps d'inclusion. Le repliement des protéines en corps d'inclusion est un point critique : le traitement est long, fastidieux mais surtout assez agressif. Le rendement est souvent relativement faible. De plus la sélection entre les protéines correctement repliées de celles qui ne le sont pas est difficile.

White et ses collaborateurs ont aussi cherché à comprendre quelles étaient les caractéristiques intrinsèques de la protéine qui impactaient son expression (White et al., 2007). Pour cela, ils ont étudié 5573 protéines de *Saccharomyces cerevisiae* dont 1092 protéines membranaires. Plusieurs caractéristiques ont été mises en avant telles que : la taille de la protéine, le point isoélectrique, la quantité de résidus aromatiques. En effet, une protéine ayant une masse moléculaire supérieure à 80 kDa s'exprimera très mal alors qu'une protéine ayant une masse entre 20 et 40 kDa sera beaucoup mieux exprimée. Si la protéine contient plus de 14% de résidus aromatiques, la protéine est mieux exprimée. Cependant il n'existe pas de corrélation entre le niveau d'expression et

- la présence d'un homologue dans la levure ou dans un autre organisme,
- la localisation cellulaire
- la présence ou non d'un peptide signal.

Etant donné le nombre de caractéristiques impliquées dans l'expression, des méthodes ont été mises au point pour améliorer la surexpression. Il est possible de faire une coexpression avec Dna K et Dna J, protéines chaperones impliquées dans le repliement des protéines membranaires. En effet, elles permettent de réduire la formation de corps d'inclusion et d'augmenter l'expression des protéines liées à la membrane (Chen et al., 2003). De nouvelles cellules ont été développées pour les protéines membranaires et les protéines toxiques. Les

C41 et C43 dérivent des BL21. Ces souches ont subies des mutations afin de surexprimer les protéines qui seraient toxiques pour le système *E.coli*. Les mutations étant différentes d'une souche à l'autre, elles sont capables d'exprimer un large panel de protéine. De plus, les C41 et C43 d'*E.coli* utilisent le même système DE3 que les BL21 permettant une sélection par la polymérase T7 (Miroux and Walker, 1996). Les C43 possèdent aussi la propriété de surproduire des membranes permettant une meilleure intégration des protéines. D'autres types de souches sont dérivés des BL21 permettant d'améliorer l'expression. Par exemple, les Rosetta peuvent permettre de surexprimer les protéines contenant des codons rares. Pour cela, elles fournissent l'ARNt en codon AGG, AGA, AUG, CUA, CCC et GCA.

## B. La purification

Une fois la protéine surexprimée, il est nécessaire de la purifier. Pour cela, la protéine doit être extraite de la membrane. La suppression de la protection entourant la partie hydrophobe de la protéine (lipides) implique son remplacement par un solvant ayant des caractéristiques similaires afin de conserver l'intégrité de la protéine membranaire en solution. C'est pourquoi les détergents sont utilisés. La formation du complexe protéine-détergent est provoquée par l'adsorption de la partie hydrophobe du détergent sur les surfaces apolaires de la protéine.

Le choix du détergent est une étape critique à considérer : il doit être capable de solubiliser la protéine d'intérêt sous une forme non agrégée et de stabiliser la structure native de la protéine (Rosenbusch et al., 2001). Les protéines réagissant différemment les unes des autres, le protocole de purification nécessite bien souvent d'être adapté.

Le choix des détergents pour les différentes étapes de la purification est un point primordial. En effet, il existe trois classes de détergents avec différentes caractéristiques décrites dans le tableau 1.4.

| Classe | Description | Propriétés | Exemple |
|---|---|---|---|
| Détergents ioniques | Tête avec une charge nette cationique ou anionique<br>Chaine hydrocarbonée hydrophobe | Effet combiné des forces répulsives de la tête et des interactions hydrophobes de la chaine | SDS (très efficace pour la solubilisation, mais fortement dénaturant) |
| Détergents non ioniques | Tête hydrophile non chargée (polyoxyethylene ou groupe glycosidique) | Détergents doux car rompent les interactions lipides-lipides et lipides-proteines | Chaine courte (β-OG) entre la désactivation de la protéine contrairement au intermédiaire C12-C14.<br>Alkylglucosides (DDM) permettent de conserver la fonction |
| Détergents zwitterioniques | | Combinent les propriétés des 2 types de détergent et sont généralement plus désactivant que les nonioniques. | Parfois utilisé dans la cristallation (DDAO) |

*Tableau 1.4 : Description des différentes classes de détergent ainsi que leurs propriétés. (le Maire, 2000)*

Par définition, un détergent est soluble dans l'eau jusqu'à une certaine concentration, la cmc (concentration micellaire critique). Au delà de la cmc, le détergent s'organise en micelle. La cmc varie en fonction des conditions de l'environnement : le pH, la force ionique, la température, la présence de protéines, de lipides et d'autres détergents.

La cmc d'un détergent varie aussi en fonction de sa structure. En effet, à tête égale, plus la chaine alkyle est courte plus la cmc est faible. De plus, l'introduction de doubles liaisons entraine une augmentation de la cmc.

Les détergents sont aussi caractérisés par le nombre d'agrégation correspondant au nombre de molécules de monomères de détergent dans chaque micelle. Ce nombre est caractéristique de chaque détergent et est relié à la taille de la micelle.

Les détergents ont la propriété de rompre les interactions lipides-protéines et peuvent ainsi extraire les protéines des membranes. Ainsi, les protéines membranaires sont solubilisées dans un milieu aqueux grâce à une ceinture de détergents qui masque la surface hydrophobe de ces protéines. La longueur des chaînes doit ainsi être adaptée à la dimension de la surface hydrophobe, et donc à la dimension de la membrane lipidique. Typiquement, la longueur des chaînes hydrophobes est constituée de 8 à 12 carbones. Certains détergents peuvent aussi interférer avec les interactions intraprotéines et ainsi nuire à la structure tertiaire des protéines. Le choix du détergent relève donc d'un compromis entre efficacité de solubilisation en terme de rendement quantitatif et qualité des protéines solubilisées.

Afin d'obtenir une protéine d'intérêt pure, il est nécessaire d'éliminer les autres protéines provenant du système d'expression. Pour cela, l'étape de chromatographie d'affinité peut être utilisée comme pour les protéines solubles car les protéines membranaires supportent très bien l'addition d'une étiquette d'affinité (HIS, Strep,…) et/ou de partenaires de fusion (MBP…). Par exemple, une étude a été effectuée par Mohanty sur l'aquaporine (Mohanty and Wiener, 2004) montrant que peu importent l'emplacement de l'étiquette HIS et sa longueur, la solubilisation n'était pas impactée. De plus, cette étiquette ne perturbe pas non plus la structure secondaire de la protéine.

Il est toutefois connu que la présence de détergent interfère avec la liaison aux colonnes d'affinité et colonnes échangeuses d'ions. Ainsi, certains détergents comme les maltosides peuvent interférer dans le cas où la protéine est purifiée via une fusion MBP (maltose binding protein). Le détergent va entrer en compétition avec le ligand, empêchant la fixation de la protéine sur la colonne d'affinité (Loll, 2003).

En vue d'obtenir des cristaux de la protéine, il est parfois nécessaire d'enlever l'étiquette grâce à des protéases. Mais certains détergents peuvent inhiber leur action (Mohanty and Wiener, 2004).

Les détergents peuvent aussi impacter d'autres types de chromatographie, ils altèrent notamment la résolution de la chromatographie d'exclusion.

En conséquent, l'optimisation de chaque paramètre doit être faite pour l'adapter à la protéine et au détergent en question.

## C. La cristallisation

Dans l'objectif d'obtenir des cristaux qui diffractent, la pureté et l'homogénéité de la préparation sont des points clés. Il est donc nécessaire de connaître non seulement la concentration en protéines mais également la composition en détergent et lipides, et de vérifier l'intégrité de la protéine d'intérêt. Toutes les informations sont obtenues par des caractérisations biophysiques et fonctionnelles.

Afin d'obtenir des cristaux de protéines membranaires, il existe deux possibilités : soit la protéine en détergent est directement cristallisée (par des techniques classiques comme la diffusion en vapeur) soit elle est réintégrée dans une bicouche lipidique (phase cubique).

Dans le premier cas, la méthode est équivalente à celle utilisée pour les protéines solubles à la différence que le soluté est cristallisé comme un complexe de protéines avec du détergent. La formation du réseau cristallin se fait par des contacts protéine-protéine. Cependant, le détergent peut modifier ces interactions.
Les détergents possèdent aussi un diagramme de phase relativement complexe avec une phase de transition (monomère/micelle) et une limite de miscibilité (Figure 1.12). En effet, tous les détergents sont sous forme monomérique en solution à faible concentration. La limite qui sépare la forme monomérique du détergent de la forme micellaire, la cmc est dépendante de la température. La limite entre la séparation de phase et la solution micellaire est appelée limite de miscibilité (haute ou basse). La température liée à ce passage dans la phase de séparation est appelée point de trouble (cloud point). A cette température, les micelles deviennent non miscibles avec l'eau et forme de larges agrégats qui se séparent de l'eau. Pour les détergents non ioniques, le point de trouble est obtenu en augmentant la température de la solution micellaire alors que pour les détergents zwitterioniques, il est obtenu en diminuant la température de cette même solution. La séparation de phase peut être utilisée pour améliorer la purification : si le point de trouble du détergent utilisé n'est pas problématique pour la protéine (au niveau de la structure et de la fonction), sinon des modifications sont possibles (températures, pH, sels…) (Arnold and Linke, 2007).

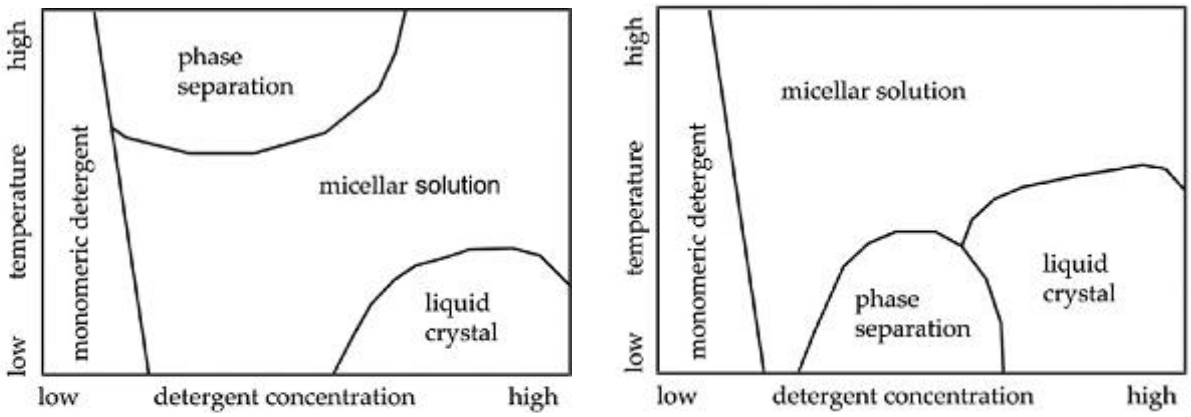



*Figure 1.12 : Diagramme de phase pour les détergents. A droite, le diagramme correspond aux détergents non ioniques, à gauche, aux détergents zwitterioniques et glycosidiques. (Arnold and Linke, 2007).*

De plus, les précipitants utilisés pour induire la cristallisation de la protéine peuvent avoir des effets sur le comportement en phase du détergent (Loll, 2003).

La deuxième méthode de cristallisation, en phase cubique a été découverte en 1996 (Landau and Rosenbusch, 1996) et s'est particulièrement développée ces dernières années avec la cristallisation de plusieurs GPCR. De nombreuses informations sont maintenant disponibles sur la compatibilité entre le détergent, les précipitants et la matrice lipidique (Cherezov et al., 2001). La méthode consiste à développer une bicouche lipidique continue. Celle-ci permet d'introduire la protéine membranaire qui sous certaines conditions va créer des interactions entre les molécules de protéines et former des cristaux. La phase cubique après insertion de la protéine subit des modifications par l'addition de précipitants qui vont diffuser dans la mésophase. Celle-ci va subir des modifications de transition et de séparation de phases (diagramme de phase spécifique à la monooléine, constituant principal de la mésophase) conduisant à la nucléation et la croissance d'un cristal (Caffrey, 2009).

## VI. Objectifs de la thèse

L'équipe s'intéresse principalement à deux familles de transporteurs : MCF et NTT. Elle travaille depuis plusieurs années sur les transporteurs mitochondriaux, en particulier sur le transporteur AAC. Plus récemment, en collaboration avec le groupe de N. Rolland (PCV, CEA Grenoble), une étude structure-fonction des transporteurs de type NTT a été initiée. Ma

thèse s'inscrit dans ce second projet, avec comme objectif principal la détermination d'une structure de l'une des isoformes NTT.
Jusqu'à présent il n'existe pas d'information structurale pour la famille des NTT. La détermination d'une structure permettrait de comprendre le mécanisme de transport de ces protéines et plus généralement comprendre les différents mécanismes de transport d'ADP et d'ATP à l'intérieur des cellules en comparant avec les informations obtenues sur la famille des transporteurs mitochondriaux.

En effet, même s'ils remplissent des fonctions similaires les transporteurs AAC et NTT présentent de nombreuses différences tant d'un point de vue structural que d'un point de vue du mécanisme de transport. L'étude présente également un intérêt à visée potentiellement thérapeutique puisque des protéines NTT existent chez des bactéries pathogènes leur permettant de se développer au sein de l'organisme hôte. Absentes des eucaryotes non photosynthétiques, ces protéines représentent donc une cible particulièrement intéressante.

Initialement, le projet s'est d'abord concentré sur *At*NTT1 (Deniaud et al., 2012). Les travaux menés ont mis en avant la présence de deux états oligomériques lorsque la protéine est purifiée en 0,1% LAPAO. De plus, l'analyse de mutants suggère la présence de deux sites de liaisons distincts.

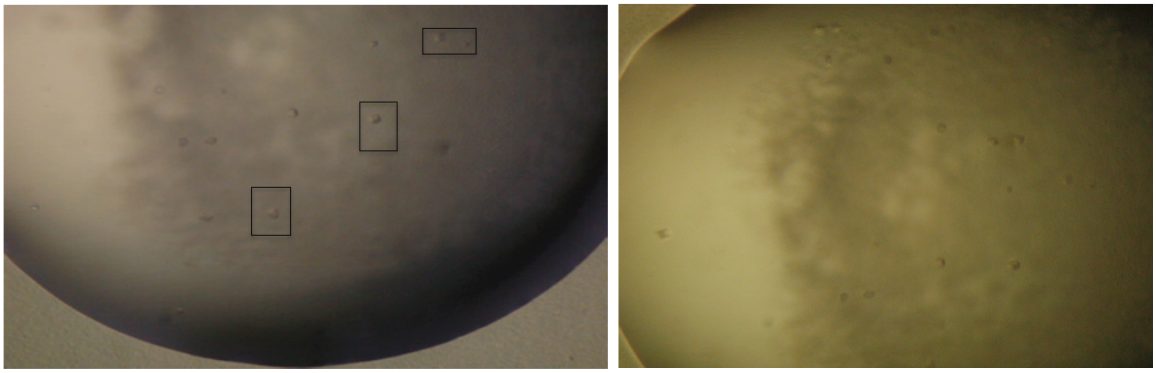


*Figure 1.13 : cristaux obtenus pour AtNTT1 purifiée en LAPAO. Les conditions dans lesquelles les cristaux ont poussé sont les suivantes : 10% (v/v) Isopropanol, 20% (v/v) PEG 4000 et 100 mM Tampon HEPES-Na pH 7,5. La meilleure diffraction obtenue est 10Å mais les cristaux n'ont jamais été reproduits.*

J'ai repris et poursuivi le travail sur *At*NTT1 afin d'essayer de reproduire et d'améliorer les cristaux déjà obtenus. En effet, des micro-cristaux diffractant à basse résolution ont déjà été obtenus dans le cadre de la thèse P. Panwar (Figure 1. 13). Pour cela, une optimisation de la

purification a été effectuée pour pouvoir aller vers la cristallisation. Les points majeurs à améliorer étaient la quantité produite, la pureté finale et surtout la reproductibilité. Une fois ces problèmes résolus, des essais cristallisation ont été entrepris. Deux approches de cristallisation ont été envisagées : la cristallisation par diffusion de vapeur et la phase cubique. Dans le cadre de cette thèse, les essais se sont déroulés uniquement par diffusion de vapeur par manque de temps.

En parallèle, le projet a été étendu à d'autres homologues NTT : les homologues bactériens et l'isoforme 2 de NTT présente chez *Arabidopsis thaliana*. La purification et la caractérisation en solution des NTT bactériens sont effectuées par Hubert Mayerhofer, post doc dans l'équipe. De mon coté, j'ai initié l'étude sur l'isoforme NTT2 d'*Arabidopsis thaliana*. En effet, de nombreuses études de caractérisation ont déjà été publiées sur *At*NTT1 contrairement à *At*NTT2. J'ai donc souhaité m'investir plus sur cet aspect du projet afin de mieux comprendre le comportement de la protéine en solution.

Les travaux ont montré qu'il était nécessaire de mettre au point des outils de caractérisation fonctionnelle à la fois pour NTT1 et pour NTT2. La mesure de la fluorescence (des tryptophanes et du FRET) a été mise en place afin d'étudier l'interaction des protéines avec certains nucléotides mais aussi de vérifier si les protéines étaient actives après chaque purification.

# Matériels et Méthodes

# Chapitre 2 : Matériels et méthodes

## I. Production *At*NTT

### A. Insertion dans un vecteur

Les constructions utilisées au cours de cette thèse sont les suivantes :

| Nom | Construction |
|---|---|
| NTT1 - pDEST | 6HIS – Cassette AttB1 – site de clivage facteur Xa – NTT1 |
| NTT2 entier – pETM11 | 9HIS – site de clivage TEV – NTT2 |
| NTT2 tronqué – pETM11 | 9HIS – site de clivage TEV NTT2Δ30aaC-ter |
| NTT2 synthétique – pETM11 | 9HIS – site de clivage TEV – NTT2 synthétique |

Dans ces constructions :

- NTT1 est dépourvue de sa séquence transit (La séquence utilisée est de 79 à 624).
- NTT2 entier correspond à la séquence complète de NTT2 sans la séquence d'adressage (la séquence décrite démarre avec l'acide aminé 85 et termine à 618).
- La forme tronquée de NTT2 est dépourvue de la séquence d'adressage et d'une partie en C-terminale (la séquence démarre avec l'acide aminé 85 et termine à l'acide aminé 588).
- La forme synthétique quand à elle correspond à la forme complète de NTT2 P92935 avec sa séquence d'adressage.

Pour l'insertion dans le vecteur pETM11 par la méthode LIC (Ligase Independent Cloning), l'insert contenant le gène NTT2 est amplifié grâce aux amorces suivantes :

| | |
|---|---|
| AtNTT2 entier amorce sens | CAGGGCGCCAGTAATGTGTTCGACGAAGGAGACAC AG |
| AtNTT2 entier amorce anti-sens | GACCCGACGCGGTTACTAAATGCCAGTAGGAGTAG ATTTCTCCG |

| | |
|---|---|
| AtNTT2 tronqué amorce sens | CAGGGCGCCAGTAATGTGTTCGACGAAGGAGACAC AG |
| AtNTT2 tronqué amorce anti-sens | GACCCGACGCGGTTATGAAGCTCTCTCCATTTCCCT CTC |
| NTT2synth amorce sens | CAGGGCGCCATGAATGTCTTCGACGAGGGCGA |
| NTT2synth amorce anti-sens | GACCCGACGCGGTTAATGCCGGTCGGGGTAGATTT |

Pour cela, on prépare un mélange contenant : 1,2 µL de chaque amorce, 1 µL de plasmide, 1 µL de quick solution, 5 µL de tampon 10X, 1 µL de dNTP et 38 µL d'eau milliQ (QuickChange Lightning site directed mutagenesis kit – Agilent).

La PCR est réalisée suivant les étapes suivantes :

- Dénaturation : 1 min – 95°C
- Dénaturation : 50 s – 95°C
- Hybridation : 50 s – 68°C
- Extension : 2 min – 72°C

} X 30

- Elongation finale 10 min à 72°C

Une fois la PCR terminée, on réalise un gel d'agarose à 1% contenant du gel red permettant de vérifier si l'insert correspond à la bonne taille. On dépose sur ce gel les 50 µL de réactions mélangées à 10 µL de tampon de charge. Les échantillons vont migrer pendant 40 min à 100V. Le gel est observé sous une lampe UV (Gel Doc 2000) et les bandes correspondant à l'insert NTT sont découpées au scalpel. L'ADN est extrait du gel grâce au kit Qiaquick Gel extraction Kit. L'ADN est élué avec 30 µL d'eau stérile.

En parallèle, le vecteur vide est linéarisé par un traitement avec la BsaI. Le mélange nécessaire à la digestion contient 5 µL de tampon New England Biolabs 3 à 10X, 5 µg de vecteur vide, et 2,5 µL de BsaI, complété par de l'eau stérile jusqu'à 50 µL. La digestion se déroule pendant 1h à 50°C. De la même façon que précédemment, la taille du vecteur est vérifiée par gel agarose à 1%. Il sera extrait du gel grâce au kit Qiaquick Gel extraction Kit

Une fois ces 2 étapes effectuées, l'insert et le vecteur linéarisé sont traités avec la polymérase ADN T4. L'activité de la polymérase en 3'→5' permet à l'enzyme de retirer les nucléotides jusqu'à ce que l'adénosine (pour l'insert) ou la thymidine (pour le vecteur linéarisé) soit atteinte :

CAGGGCGCCATG...NTT2...TAACCGCGTCGGGTC
GTCCCGCGGTAC...NTT2...ATTGGCGCAGCCCAG
| T4 DNA polymerase + dATP
V
CAGGGCGCCATG...NTT2...TA**A**
.....**A**C...NTT2...ATTGGCGCAGCCCAG

Cela permet de créer des extrémités flanquées complémentaires pour permettre l'insertion du gène dans le vecteur. Pour cela, les mélanges suivants sont effectués :

| Vecteur | Insert PCR |
|---|---|
| 2 µl 10X New England Biolabs Tampon 2 | 2 µl 10X New England Biolabs Tampon 2 |
| 600 ng vecteur linéarisé | 0,2 pmol insert |
| 0,5 µl dTTP (100 mM) | 0,5 µl dATP (100 mM) |
| 1 µl DTT (100 mM) | 1 µl DTT (100 mM) |
| 0,2 µl 100X BSA | 0,2 µl 100X BSA |
| 0,4 µl T4 DNA polymerase (3 units/µl) | 0,4 µl T4 DNA polymerase (3 units/µl) |
| Compléter jusqu'à 20 µl avec de l'eau stérile | Compléter jusqu'à 20 µl avec de l'eau stérile |

La réaction s'effectue pendant 30 min à 22°C puis la polymérase est inactivée en la mettant 20 min à 75°C.

Enfin l'insert et le vecteur traités par la polymérase T4 sont mis en contact pour permettre l'hybridation. Pour cela, on mélange dans un tube 1 µL de vecteur LIC préparé et 2 µL de l'insert traité. Ce mélange est incubé pendant 5 min à 22°C. Puis on y rajoute 1µL d'EDTA à 25 mM. L'incubation se poursuit pendant encore 5 min à 22°C. L'hybridation est complète après 5 min d'incubation. Cependant la réaction peut être incubée jusqu'à 1h en obtenant des résultats équivalents à une incubation de 5 min.

Pour vérifier que l'hybridation a bien fonctionné et pour sélectionner les mutants positifs, on effectue une transformation dans des cellules compétentes Top10. Dans un premier temps, les cellules compétentes sont décongelées sur glace. Ensuite, on place quelques microlitres de la réaction d'hybridation sur glace pendant 5 min, puis on rajoute 50 µL de cellules compétentes. Ce mélange est incubé pendant 30 min sur glace. Puis la transformation est

réalisée par un choc thermique grâce à un bain marie à 42°C pendant 45 s. Les tubes sont de nouveau placés sur la glace pendant 2 min. On ajoute 200 µL de milieu LB (Luria-Bertani) dans chaque tube. Le mélange est incubé pendant 1h à 37°C dans un incubateur. Après cette incubation, les tubes sont centrifugés pendant 1 min à 5000 rpm. Le culot est resuspendu avec 50 µL de milieu et déposé sur une boîte de Pétri contenant 50 µg/mL de kanamicine. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C dans un incubateur pendant une nuit.

Les colonies positives sont sélectionnées et servent à inoculer des précultures de 5 mL de milieu LB (Luria-Bertani) contenant 50 µg/mL de kanamycine. Les cellules sont alors incubées pendant une nuit à 37°C dans un incubateur avec une agitation 180 à 200 rpm.

Les cellules sont ensuite centrifugées 10 min à 4000 g. Le surnageant est éliminé. Le culot est resuspendu dans le tampon permettant de préparer une mini prep en utilisant le kit Qiaprep Spin MiniPrep Kit (Qiagen).

Une fois la séquence de la protéine vérifiée (séquençage par Beckman Coulter Genomics), la mini prep est utilisée pour amplifier le plasmide en effectuant une maxi prep (NucleoBond® Xtra Midi / Maxi de chez Macherey Nagel).

## B. Surexpression

On effectue une transformation avec le plasmide contenant la protéine d'intérêt et des cellules compétentes préalablement déterminées. Pour déterminer le type de cellules à utiliser, l'efficacité de l'expression est testée dans différents types d'*E.coli* : C41, C43, BL21, Rosetta. Les meilleurs rendements d'expression ont été obtenus avec les cellules C43 pour *At*NTT1 et les cellules C41 pour *At*NTT2.

Une colonie fraîchement transformée dans des cellules C43 ou C41 est mise en préculture dans du milieu LB avec l'ampicilline à 100 µg/mL ou la kanamycine à 50 µg/mL pendant 24h à 37°C. Ces précultures sont ensuite utilisées pour inoculer à une $A_{600}$ initiale de 0,1 des cultures d'1L de TB (terrific broth) contenant 100 µg/mL ampicilline ou 50 µg/mL de kanamycine. Les cultures sont induites avec 0,5 mM d'IPTG (Isopropyl β-D thiogalactoside) lorsque l'absorbance (A600) est comprise entre 1 et 1,5. L'expression se poursuit alors à 20°C

sur la nuit. Les cultures sont ensuite centrifugées pendant 20 min à 4800 g, 4°C. Les culots sont lavés avec du PBS 1X froid et centrifugés de nouveau à 3900 g pendant 30 min, 4°C.

## C. Préparation des membranes

Les culots sont resuspendus dans le tampon de lyse (300 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8, 20% glycérol, 1mM benzamidine, anti-protéase) et homogénéisés à l'aide d'un potter. Les cellules sont lysées par deux passages successifs dans un microfluidizer à 16 000 psi. Les débris cellulaires, les cellules non lysées et les gros corps d'inclusion sont éliminés par une étape d'ultracentrifugation à 25 000 g pendant 20 min. Le surnageant est ultracentrifugé à 120 000 g pendant 1h pour sédimenter les membranes bactériennes. Celles-ci sont resuspendues dans un tampon contenant 300 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8, 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, à raison de 1 mL de tampon pour 1 L de culture. La quantité de protéine est estimée grâce au dosage BCA (Sigma Aldrich).

## D. Purification

### *1. Solubilisation*

Les membranes sont solubilisées grâce à la Foscholine 12 (Nombre d'agrégation 54, masse molaire 351,5 g/mol). Les protéines contenues dans les membranes sont solubilisées à 3-4 mg/mL dans un tampon contenant 100 mM de NaCl, 100 mM Tris pH 8, 10% (w/v) Glycérol, 1% (w/v) Foscholine 12, et de l'anti-protéase (Clapa 1X) pendant 1 h en rotation à 4°C. On effectue ensuite une ultracentrifugation de 1h à 120 000 g. Le surnageant contient les protéines solubilisées.

### *2. Chromatographie d'affinité*

La colonne de chromatographie d'affinité est préparée avec de la résine de nickel (résine Ni-agarose His 60) à raison de 1mL de résine pour 1 mL de membranes. La résine est lavée avec de l'eau puis équilibrée avec le tampon de lavage A (100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8, 0,1% (w/v) LAPAO, 40 mM imidazole) et enfin incubée pendant 1h avec le surnageant provenant de l'ultracentrifugation contenant les protéines.

Une fois l'incubation terminée, le mélange est transféré dans une colonne d'élution par gravité. La résine est ensuite lavée plusieurs fois avec du tampon contenant des concentrations

croissantes d'imidazole : 40 mM et 70 mM que l'on nommera respectivement lavage A et lavage B. L'élution est effectuée avec le tampon d'élution contenant 100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8, 0,1% LAPAO et 400 mM d'imidazole.

### *3. Chromatographie par exclusion de taille*

Une fois la protéine éluée de la colonne d'affinité, le volume obtenu doit être réduit pour être injecté sur la colonne Superdex 200 10/30 de 25 mL. Pour avoir une bonne résolution, le volume à injecter sur cette colonne ne doit pas dépasser 500 µL. La protéine est concentrée grâce à un concentrateur de type amicon avec un seuil de coupure de 50 kDa, tout en faisant attention à ne pas faire agréger la protéine. La vitesse de centrifugation est donc très basse, 1740 g. Une fois les 500 µL atteint, la solution est centrifugée à 4°C, 15 min à 20 000 g pour éliminer les agrégats qui pourraient colmater la colonne.
Les 500µL sont ensuite injectés sur la colonne grâce au système AKTA FPLC. La colonne a été au préalable équilibrée avec un tampon contenant 100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8, 0,1% (w/v) LAPAO. La protéine est chargée sur la colonne avec un flux de 0,4 mL/min. Des fractions de 500 µL sont collectées à partir du volume mort de la colonne (7,9 mL) jusqu'à la fin du volume de la colonne.
La pureté de chaque fraction est vérifiée grâce à un gel 12% SDS-PAGE coloré au bleu de coomassie ou à l'argent (Kit Silver staining Pierce).

Afin d'estimer le rayon de Stokes ou la masse moléculaire apparente des espèces éluées, une calibration de la colonne a été effectuée et les formules suivantes utilisées :

$$\log(Rs) = -0{,}5588\frac{Ve}{Vo} + 2{,}432$$

$$\log(MW) = -1{,}457 \times \frac{Ve}{Vo} + 7{,}522$$

$V_e$= volume d'élution

$V_0$ = volume mort de la colonne qui est de 7,9 mL.

# II. Tests de caractérisation

## A. Thermal Shift Assay (TSA)

Le thermal shift assay permet d'évaluer la stabilité thermique d'une protéine dans différents tampons ou avec différents ligands. Pour les protéines membranaires, le fluorophore utilisé est le CPM (7-diethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin) qui se lie aux cystéines de la protéine étudiée (Alexandrov et al., 2008). La solution mère de CPM est à 4 mg/mL. Elle doit être diluée au 1/20 avec le tampon dans lequel la protéine se trouve.
On utilise 10 µg de protéine diluée dans un volume total de 120 µL. 10 µL du fluorophore dilué y sont ajoutés. Pour vérifier les possibles liaisons entre le fluorophore et le tampon, on prépare en parallèle la protéine et le tampon dans la condition à étudier. Ces mélanges sont préalablement incubés 30 min sur glace à l'obscurité.

Les mesures sont réalisées sur un fluorimètre (Cary Eclipse Varian – logiciel Thermal). Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission du CPM sont respectivement de 387 nm et 463 nm. Une rampe de température est appliquée à raison de 2°C/min sur un intervalle de 4°C à 90°C. Les données collectées sont traitées avec Excel afin de soustraire l'effet du tampon à la protéine.

## B. Spectrométrie infrarouge avec transformation de Fourier (FTIR)

Le FTIR est une technique qui permet d'obtenir le spectre d'absorption infrarouge de l'échantillon, et une partie du spectre correspond au détergent.
Les mesures sont effectuées sur un spectromètre (VERTEX-70, Bruker, Allemagne) équipé d'un détecteur de tellurure de mercure-cadmium (MCT). Celui-ci est mis sous air sec afin de limiter les contributions spectrales de la vapeur d'eau atmosphérique.
Dans un premier temps, des standards contenant différentes quantités de détergent connues sont utilisés pour déterminer la courbe de calibration. Les standards sont préparés dans le même tampon que celui utilisé pour la chromatographie d'exclusion. 20 µL sont déposés sur le cristal. L'appareil effectue 128 scans entre 800 $cm^{-1}$ et 3 500 $cm^{-1}$. La courbe de calibration réalisée permet d'obtenir la quantité relative de détergent en solution ou lié avec la protéine.

## C. Etude par ultracentrifugation analytique

L'étude par ultracentrifugation analytique permet d'examiner l'homogénéité de l'échantillon, de déterminer la masse moléculaire, d'étudier le système d'association.

Dans notre cas, nous souhaitons déterminer les formes oligomériques de *At*NTT2 et *At*NTT1 en solution ainsi que la quantité de détergent liée. Les expériences de vitesse de sédimentation sont effectuées sur une ultracentrifugeuse analytique XLI (Beckman Coulter, Palo Alto, USA) à 42 000 rpm à 10°C, avec le rotor anti-60 et des cellules à doubles canaux de 12 mm de trajet optique avec des fenêtres de saphir. La référence utilisée est le tampon sans détergent. L'acquisition a été faite en absorbance à 280 nm et en interférence.

L'étude est effectuée sur la plateforme de l'IBS Ultracentrifugation Analytique AUC.

## D. Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire permet d'étudier la structure secondaire de protéines en solution en utilisant l'UV lointain. Les expériences ont été réalisées sur un spectropolarimètre (JASCO model J-810) équipé d'un système de contrôle de température par effet Peltier. Pour cela, la protéine en solution (20 mM Tris, 100 mM NaCl, 0,1% (w/v) LAPAO) est mise dans une cuve à trajet optique de 1 mm. Pour obtenir la composition en structures secondaires, on collecte l'émission entre 190 et 250 nm à 4°C.

## E. Analyse par spectrométrie de masse

A partir d'un gel d'acrylamide coloré au bleu, les bandes d'intérêts sont découpées pour permettre d'identifier l'espèce. Dans un premier temps, les bandes d'acrylamide sont lavées puis traitées pour la réduction et l'alkylation des cystéines et enfin digérées par la trypsine. Les peptides sont ensuite extraits afin de les étudier par spectrométrie de masse MALDI TOF MS (Autoflex, Bruker Daltonics). La matrice utilisée est composée d'acide sinapinique à 10 mg/mL dans un mélange acetonitrile/eau – 0,1%TFA (50 :50).

Cette étude est effectuée sur la plateforme de spectrométrie de masse de l'IBS.

## F. Test d'activité

### *1. Import d'ATP radioactif dans des bactéries exprimant NTT*

La protéine *At*NTT est surexprimée en C41 ou C43. A partir de cette transformation, on démarre une préculture de 5 mL contenant 50 µg/mL de kanamycine ou 100 µg/mL d'ampicilline. Une fois que ces précultures ont atteints une $A_{600}$ de 1, elles sont utilisées pour inoculer des cultures de 50 mL avec une absorbance $A_{600}$ initiale de 0,1. Ces cultures sont induites avec 0,1 mM d'IPTG à une $A_{600}$ comprise entre 0,6 et 0,8. Après une induction à 20°C sur la nuit, les cellules sont centrifugées à 3900 g pendant 30 min à 4°C. Le culot est lavé avec un tampon phosphate (50 mM KPi, pH 7) puis resuspendu dans le même tampon pour obtenir 0,1 g de cellules par mL de tampon. En parallèle, une culture d'*E.coli* transformée avec un plasmide ne contenant pas la protéine d'intérêt est réalisée dans les mêmes conditions. Elle servira de contrôle négatif dans les expériences. 10 µM (20 µM dans la détermination des constantes de cinétique) d'[α-$^{32}$P]ATP sont incubés avec 30µL de suspension bactérienne pendant 15 min. Le transport est arrêté par l'ajout du KPi froid. L'ATP non transporté est éliminé par filtration sous vide. Les filtres retenant les cellules sont lavés trois fois avec 1 mL de KPi froid puis transférés dans des fioles de scintillation contenant 3,5 mL d'eau. La radioactivité est mesurée grâce un compteur de scintillation.

Pour les tests d'inhibition/compétition, les cellules sont préincubées pendant 15 min avec du lysosyme à 0,5 mg/mL, puis mis en contact avec les composés à tester à 100 µM pendant 5 min. L'ATP radioactif est ensuite ajouté, la réaction de transport est arrêtée après 15 min.

### *2. Mesure de la fluorescence des tryptophanes*

La majorité des émissions fluorescentes d'une protéine repliée provient de l'excitation des tryptophanes. L'influence de l'environnement direct du tryptophane se reflète sur la fluorescence émise. Dans notre cas, la mesure de fluorescence permet de mesurer la fixation de l'ATP sur la protéine. En effet, lorsque l'ATP (non fluorescent) se fixe sur son site de fixation, la protéine subit un changement de conformation mesurable par la diminution du signal de fluorescence. Les mesures sont effectuées à 20°C sur un PTI quanta master 4.

La protéine en détergent est diluée afin d'avoir une concentration de 2 µM dans 100 µL. Ce volume est ensuite mis dans une cuvette en quartz. Pour mesurer la fixation de l'ATP, *At*NTT2 est mis en présence de différentes quantités d'ATP (solution stock à 25 mM). En parallèle, la fluorescence du tampon est mesurée avec la même quantité d'ATP.

Les tryptophanes sont excités à 295 nm. Le signal d'émission est collecté entre 300 et 400 nm.

Comme contrôle on utilise le NATA (N-Acetyl-L-tryptophanamide) qui est un analogue du tryptophane. Cela permet d'éliminer l'effet du filtre interne, en utilisant la formule suivante :

$$F_{corrigé} = \frac{F_{NTT} - F_{Tampon}}{F_{NATA} - F_{Tampon}}$$

Il faut aussi prendre en compte les facteurs de dilution. Il est donc nécessaire de corriger avec la formule suivante :

$$F_{corrigé} = \frac{F}{C_{corrigé}}$$

avec $C_{corrigé}$ correspondant à la concentration en *At*NTT2 ou en NATA corrigée en fonction des volumes ajoutés dans la cuve de lecture.

## *3. FRET*

La technique du FRET (transfert d'énergie entre molécules fluorescentes ou transfert d'énergie par résonnance de type Förster) consiste à quantifier les variations de l'intensité de fluorescence en mesurant la diminution de la fluorescence du donneur, et l'augmentation de celle de l'accepteur. Un signal FRET peut apparaître seulement si le spectre d'émission du donneur recouvre le spectre d'excitation de l'accepteur (Figure 2.1).

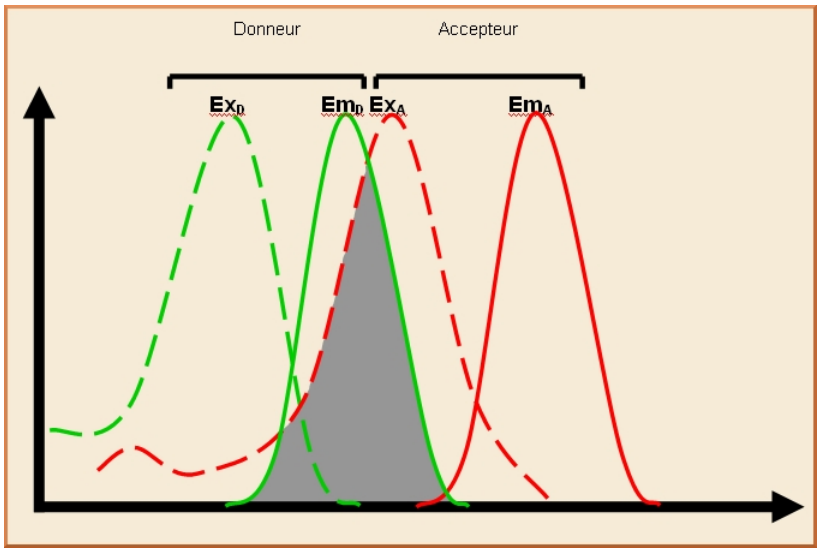



*Figure 2.1 : Transfert d'énergie entre donneur et accepteur (Centre de biophysique moléculaire – CNRS)*

Comme pour la mesure de la fluorescence des tryptophanes, la protéine en détergent est diluée à 2 µM dans 100 µL. L'ATP fluorescent utilisé est l'ATP couplé au fluorophore MANTES (MANT-ATP) à des concentrations comprises entre 1 à 20 µM.

Pour enregistrer le spectre montrant le transfert d'énergie, les tryptophanes sont excités à 295 nm et le signal d'émission est collecté entre 300 et 500 nm. De plus, il est nécessaire de mesurer l'absorbance à 295 nm et 433 nm à chaque ajout du nucléotide fluorescent afin de prendre en compte le filtre interne. La formule suivante est alors appliquée :

$$F_{corrigé} = F_{observé} x 10^{\frac{DO_{295}+DO_{433}}{2}}$$ (Lakowicz, 2006)

## 4. *Incorporation dans les nanodisques*

Dans un premier temps, les lipides conservés en chloroforme sont préparés. Le solvant est évaporé sous un flux d'azote et puis les lipides sont séchés sur la nuit.

Le film lipidique est repris dans un tampon (20 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 8,6 mg DDM/mL), vortexé puis mis à incuber à 37°C pendant 10 min.

*At*NTT2, la protéine d'assemblage MSP1E3D1 et la solution lipidique sont mélangées selon le ratio voulu : *At*NTT2/MSP1E3D1/Lipide 0,15/1/1 (w/w). Ensuite, le mélange est incubé pendant 1h30 à température ambiante. En parallèle, les biobeads-SM2 sont préparées par différents lavages : 2 lavages avec de l'éthanol, 5 lavages avec de l'eau et 3 lavages avec le tampon d'assemblage (20 mM Tris-Hcl pH 7,4 ; 100 mM NaCl, 0,5 mM EDTA). Les biobeads sont ajoutés au mélange contenant *At*NTT2, la protéine d'assemblage et les lipides selon le ratio suivant : 0,65 g de biobeads humides par mL de réaction. Ce mélange est incubé pendant 2 h sous agitation à température ambiante. Après ces 2 h, les biobeads sont enlevées en filtrant la solution avec un filtre en PVDF. Au final, on observe la formation des nanodisques par chromatographie d'exclusion avec une colonne superdex 200 (Tampon d'élution : 10 mM NaPi pH 7,4 ; 150 mM NaCl)

## III. Essais de cristallisation

Dans le cadre de ma thèse, les essais de cristallisation ont été réalisés par la technique de diffusion par vapeur.

La protéine utilisée a été purifiée selon le protocole décrit précédemment puis concentrée. Plusieurs concentrations ont été testées mais il semble que les concentrations proches de 10 mg/mL soient les plus aptes à cristalliser.

Les premiers criblages ont été réalisés sur la plateforme de cristallisation HTX du PSB avec des plaques de 96 puits. Chaque goutte a un volume de 200 nL dont 100 nL de protéines concentrées. Les différents kits commerciaux testés sont les suivants :

| Kit | Description |
|---|---|
| The PEGs | Sels faiblement concentrés avec comme précipitant du PEG 3350 ainsi qu'un large spectre de PEG (200 à 20 000) à pH 4 |
| The Classics | Criblage de base utilisé pour toutes les protéines |
| Crystal Screen Lite + PEG/ion | Différentes conditions avec sels, tampon et PEG. |
| MembFac | Différentes conditions pour protéines membranaires |

*Tableau 2.1 : Description des différents criblages utilisés.*

Les plaques ont été incubées à 20°C dans un Imager qui permet de prendre des photos en visible et en UV à 1 jour, 3 jours, 15 jours, 1 mois.

Les conditions ayant donné des cristaux ont été reproduites à la main afin d'obtenir des cristaux de plus grande taille. Le volume final de la goutte était de 2 µL avec un ratio 1 :1 (protéine concentrée : mélange sels/précipitants). Le réservoir contenait 500 µL.

# Résultats

# Chapitre 3 : Résultats

## I. Expression et purification des transporteurs NTT d'*A. thaliana*

### A. Amélioration du protocole pour l'isoforme *At*NTT1

Le clonage initial de la protéine *At*NTT1 dans le vecteur pDEST 17 a été effectué au préalable par la technologie « Gateway » comme décrit dans la publication (Deniaud et al., 2011). Il en résulte la construction suivante : HHHHHH- Cassette AttB1 – NTT1 – Strep. Une analyse par protéolyse ménagée avait permis de mettre en évidence la flexibilité du côté N-terminal. Afin d'éviter des problèmes d'hétérogénéité lors de la cristallisation, un site de coupure pour le facteur Xa a été introduit après les cinq premiers acides aminés de la séquence.

Par la suite Pankaj Panwar (Thèse 2008-2012) a montré que les cellules compétentes C43 (DE3) permettaient de produire des protéines fonctionnelles avec un rendement correct. La purification établie avec cette construction comportait une étape de chromatographie d'affinité sur une colonne de streptavidine. Cependant, les essais cristallisations menées avec ce protocole ont conduit à des cristaux de streptavidine (Panwar et al., 2012).

Dans le cadre de ma thèse, plusieurs optimisations de ce protocole ont été réalisées afin notamment de rectifier le problème de reproductibilité constaté entre chaque purification.

#### *1. La surexpression*

Tout d'abord concernant l'expression, nous avons cherché à augmenter les rendements de production, en testant si la fermentation pouvait présenter un avantage par rapport à la culture en Erlen.

D'après les différents résultats de surexpression décrits dans le tableau 3.1, la production en fermenteur n'a pas été retenue. En effet, même si en fermenteur la biomasse produite est bien plus élevée qu'en Erlen, la quantité d'*At*NTT1 ne semble nettement pas plus importante. De

plus, la méthode en Erlen semble la plus intéressante étant donnée que la quantité de contaminants est moins importante.

| Mode | Milieu | Induction | | | Quantité produite dans les membranes et rendement | Pureté |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | IPTG | Durée | T (°C) | | |
| Fermenteur 2L | TB | 0,5 mM | 18h | 20°C | 768 mg de protéines membranaires, 392 µg NTT1 => 0,05% | NTT1- |
| Fermenteur 2L | TB | 0,1 mM | 18h, puis 2ème induction de 4h | 30°C | 240 mg de protéines membranaires, 260 µg NTT1 ⇨ 0,11% | NTT1- |
| Erlens 8x1L | TB | 0,1 mM | 4h | 37°C | 360 mg de protéines membranaires, 470 µg NTT1 ⇨ 0,13% | NTT1- |
| Erlens 8x1L | TB | 0,1 mM | 18h | 20°C | 193 mg de protéines membranaires, 500 µg NTT1 ⇨ 0,3% | NTT1- |

*Tableau 3.1 : Description des différentes méthodes de surexpression de la protéine AtNTT1. Les deux premiers gels SDS-PAGE sont colorés au bleu de coomassie et les deux derniers à l'argent. Les marqueurs de masses moléculaires se situent à droite.*

## 2. *La solubilisation*

La solubilisation est une étape majeure pour le reste de la purification (cf description protocole de purification dans Matériels et méthodes). En effet, il est nécessaire de choisir le détergent permettant de solubiliser un maximum de protéine d'intérêt bien repliée. En général, une dizaine de détergents est testée lors de la première étape de solubilisation. Ces détergents sont répertoriés dans le tableau 3.2 avec leurs caractéristiques principales (taille de la micelle, concentration micellaire critique, degré d'efficacité du détergent). Les différents détergents testés appartiennent à différentes familles.

| | Micelle | Description | Cmc |
|---|---|---|---|
| LDAO | Micelle de petite taille (nombre d'agrégation : ≈70 ; Masse moléculaire de la micelle : 16kDa) | Détergent relativement « dur » : seules 20% des protéines membranaires sont résistantes à son effet dénaturant | $1 \times 10^{-3}$ M |
| LAPAO | Nombre d'agrégation ≈126 ; masse moléculaire de la micelle : 38kDa) | Détergent relativement « dur » | $1,6 \times 10^{-3}$ M |
| CYMAL 6 | (Nombre d'agrégation ≈63; Masse moléculaire de la micelle 32kDa) | Détergent relativement « doux » caractérisé par une force ionique faible dépendant du nombre d'agrégation | $5,6 \times 10^{-3}$ M |
| DDM | Large micelle (Nombre d'agrégation ≈98 ; masse moléculaire de la micelle 50kDa) | Détergent « doux » et est favorable pour maintenir la fonctionnalité des protéines qui ont tendance à agréger. | $1,5 \times 10^{-4}$ M |
| MNG3 | Taille des micelles inconnues | Augmente la stabilité des protéines, aide à la cristallisation. | $1 \times 10^{-5}$ M |

| | | | |
|---|---|---|---|
| β-OG | Micelle compacte (Nombre d'agrégation ≈90 ; masse moléculaire de la micelle 26kDa) | Détergent relativement « dur » mais moins que LDAO | $2,5x10^{-2}$ M |
| CHAPS | Micelle de petite taille (Nombre d'agrégation ≈10, masse moléculaire de la micelle 6kDa) | | $8 \times 10^{-3}$ M |
| Foscholine 12 | Micelle de petite taille (nombre d'agrégation ≈54 ; masse moléculaire de la micelle 19 kDa) | Détergent « dur » qui permet de solubiliser la majorité des protéines membranaires mais peut atteindre l'intégrité et donc la fonction des protéines | $1,5 \times 10^{-3}$ M |

*Tableau 3.2: Description des différents détergents utilisés pour la solubilisation et la purification (le Maire, 2000);(Chae et al,2010)*

Dans le cas de *At*NTT1, un premier criblage avait déjà été effectué par P.Panwar ; je n'ai donc pas testé tous les détergents détaillés dans le tableau 3.2.

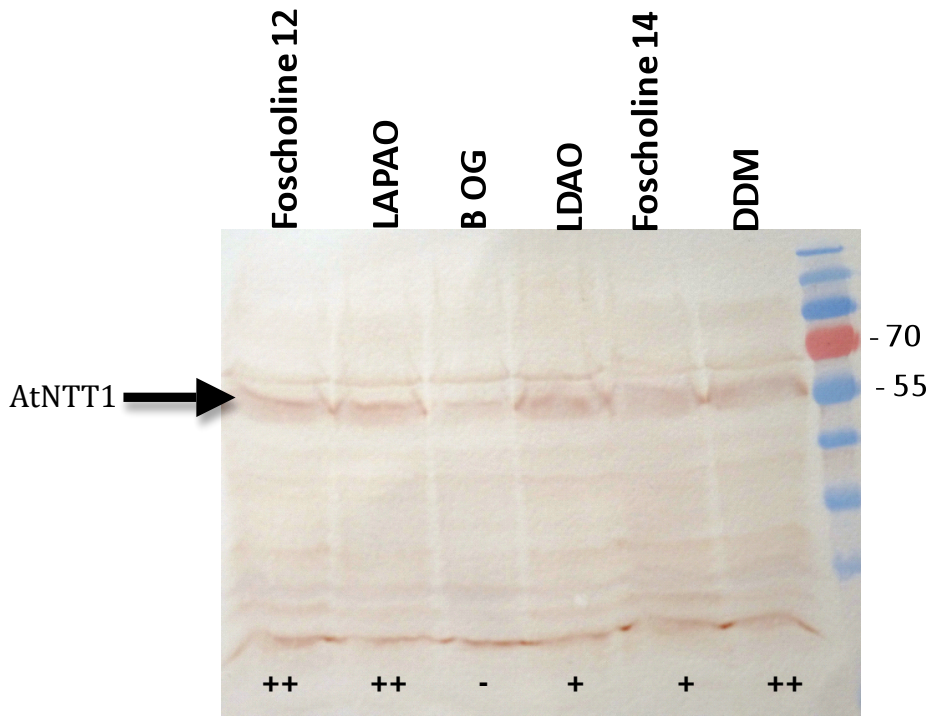



*Figure 3.1 : Test de solubilisation effectué pour AtNTT1 : Western Blot révélant AtNTT1 marqué par anticorps anti-HIS. Le marqueur est donné en kDa.*

La Figure 3.1 montre que la Foscholine 12, le LAPAO et le DDM permettent une bonne solubilisation. Sur un critère de quantité, notre choix s'est porté sur la Foscholine 12. Cependant les tests d'activité et de stabilité présentés dans les paragraphes suivants ont montré que la purification complète en Foscholine 12 ne permettait pas d'obtenir la protéine dans les meilleures conditions alors qu'après échange en LAPAO, la protéine obtenue est plus stable et active. Ces deux détergents sont zwitterioniques et ont donc une charge nette égale à zéro. La Foscholine est composée d'une tête similaire aux phospholipides et d'une seule queue hydrophobe. Ces caractéristiques lui permettent de former des micelles et plutôt que des bicouches. Cette forme particulière lui permet d'être très efficace pour la solubilisation des protéines membranaires (Kefala et al., 2010). Le DDM semble permettre aussi de solubiliser efficacement *At*NTT1. Des essais complémentaires pourront être conduit afin d'évaluer l'efficacité de cette solubilisation en DDM sur le reste de la purification.

## 3. *La purification*

Bien que l'étape de purification par chromatographie d'affinité avec l'étiquette STREP soit plus spécifique, il semble qu'elle entraîne la formation de cristaux contaminants (Panwar et al., 2012). Pour éviter cela, cette étape a donc éliminé du protocole initial et un codon STOP a été introduit avant l'étiquette STREP placée en C-terminale (Figure 3.2).

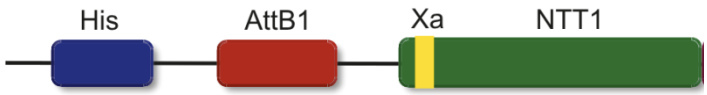



*Figure 3.2 : « nouvelle » construction permettant de surexprimer AtNTT1 en cellules E.coli C43 (DE3). L'étiquette poly-HIS, AttB1 est une cassette de clonage provenant du système Gateway, le site de clivage par le facteur Xa et la protéine NTT1.*

D'autres modifications ont également été apportées au protocole principalement pour l'étape de chromatographie d'affinité sur colonne de nickel afin d'améliorer la pureté de l'échantillon final (modification de la longueur de l'étiquette HIS, modification des concentrations en imidazole, changement de type de résine Nickel).

Le schéma de purification a finalement été réorganisé comme décrit sur la figure 3.3 afin d'améliorer la quantité, la reproductibilité et la pureté de la purification.

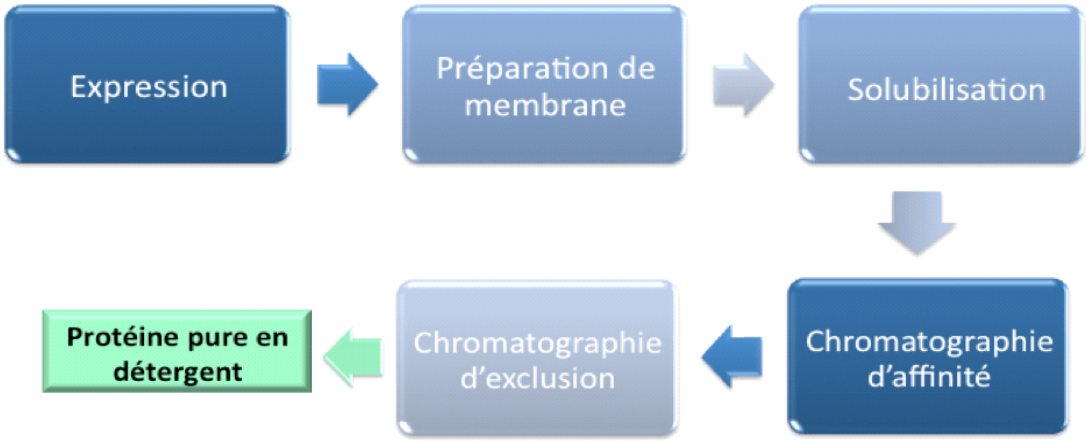



*Figure 3.3 : Résumé des grandes étapes du protocole de purification.*

## 4. *Purification type*

Dans ce protocole de purification, la solubilisation nécessite 1% (w/v) de Foscholine 12 pour solubiliser le maximum de protéine. L'échange avec le LAPAO s'effectue à l'étape de la chromatographie d'affinité, la Foscholine 12 étant remplacée par 0,1% (w/v) de LAPAO.

Un exemple de purification est montré en Figure 3.4. Dans ce cas, la protéine *At*NTT1 avait été purifiée à partir d'une préparation de membrane obtenue à partir de 8 L de culture induite avec 0,1 mM d'IPTG pendant 18h à 20°C. Les différentes étapes de purification décrites dans la Figure 3.3 ont été effectuées. On observe le profil de chromatographie d'exclusion sur la Figure 3.4 a. Le pic principal est fin mais pas complètement symétrique ce qui suggère que ce pic ne contient pas qu'une seule espèce. Pour le vérifier, nous avons déposé les différentes fractions sur un gel d'acrylamide à 12% coloré à l'argent (Figure 3.4b). Celui-ci montre différentes espèces dans la solution finale. En sortie de chromatographie d'exclusion, la protéine n'est donc pas totalement pure.

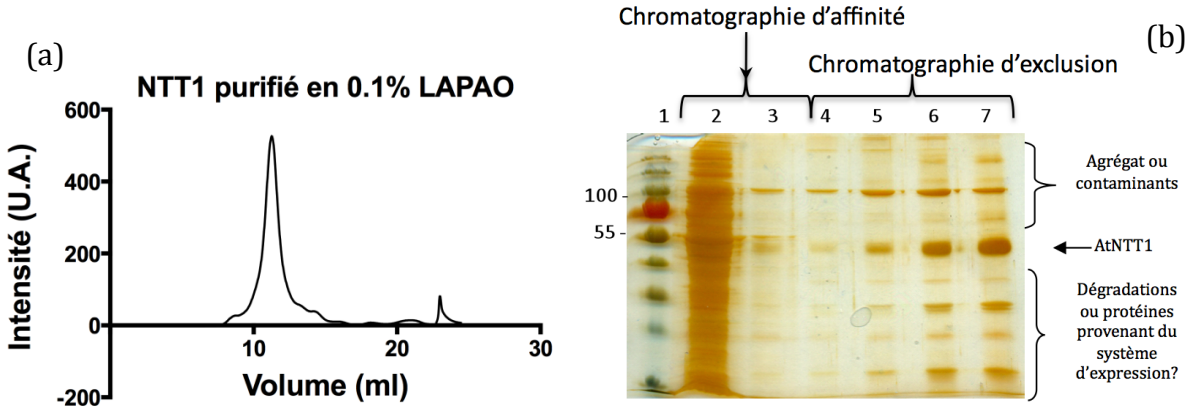



*Figure 3.4 : profil typique de chromatographie d'exclusion et gel SDS PAGE. Purification obtenue à partir de 8 L de culture (360 mg de protéines totale).*

*(a) Profil de chromatographie d'exclusion sur colonne Superdex S200 10/300 GL*

*(b) Gel SDS PAGE 12% coloré à l'argent. Les différentes fractions sorties de la colonne de chromatographie d'exclusion de la figure (a) sont déposées sur ce gel.*

*1) Marqueur de masse moléculaire, donné en kDa.*

*2) Chromatographie d'affinité : fraction non retenue par la résine de nickel*

*3 Chromatographie d'affinité : élution de la protéine de la colonne de nickel*

*4) à 7) Chromatographie d'exclusion : pic principal composé de 4 fractions de 500 µL. La piste 7 correspond au sommet du pic*

Les quantités obtenues sont d'environ 0,3 mg/mL dans 500 µL en sortie de chromatographie d'exclusion soit 150 µg de *At*NTT1 pour 8 L de culture ce qui permet d'effectuer la caractérisation fonctionnelle et biophysique.

La calibration de la colonne Superdex S200 10/300GL permet d'approximer la taille des éléments en sortie de la colonne de chromatographie d'exclusion. La masse moléculaire correspondant au maximum du pic d'élution est estimée à environ 280 kDa (avec la masse moléculaire d'un monomère de *At*NTT1 de 60 kDa). Afin de conclure quant à la composition du complexe protéine-détergent et de l'état oligomérique de *At*NTT1, il faut prendre en compte la quantité de détergent lié, mais il semble que la protéine forme au moins des dimères en solution. La chromatographie d'exclusion ne permet pas de connaître la quantité de détergent associée, c'est pourquoi une analyse par ultracentrifugation analytique a été réalisée (Cf Oligomérisation, Partie B).

## B. Nouveaux développements pour l'isoforme *At*NTT2

### *1. L'expression*

En parallèle, nous nous sommes rapidement intéressés à la deuxième isoforme existante chez *Arabidopsis thaliana, At*NTT2, pour laquelle peu de données préliminaires sont connues. En partant de l'ADNc *d'Arabidopsis thaliana* (fourni par Norbert Rolland), le gène exprimant *At*NTT2 a été cloné dans un vecteur pETM-11. Tous les essais de surexpression de la protéine entière (P92935 contenant la séquence transit, résidus 1 à 618, Cf annexe 2) se sont malheureusement avérés infructueux.

Nous avons alors réalisé une troncation en N-terminale de 85 acides aminés afin d'éliminer le peptide signal (composé de 43 acides aminés d'après la prédiction de ChloroP server, Technical University of Denmark (Bendtsen et al., 2004) et une région prédite comme désordonnée par le logiciel PFAM (http://pfam.xfam.org/). Une troncation en C-terminale a également permis d'enlever une autre région désordonnée de 30 acides aminés.

Ces différents ajustements ont résulté en une construction comprenant les résidus 85 à 588 d'*At*NTT2 (figure 3.5). Dans la suite du manuscrit, la numérotation utilisée sera basée sur la forme complète (comprenant la séquence d'adressage) de la protéine *At*NTT2.

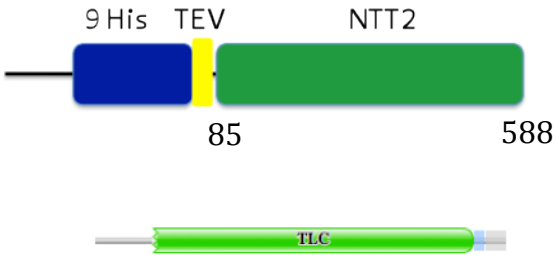



*Figure 3.5 : Schéma de la construction utilisée pour exprimer AtNTT2*

Nous avons vérifié que celle-ci était fonctionnelle par des mesures d'import d'ATP radiomarqué sur des cellules *E. coli* surexprimant la protéine (cf II.F.1. de la partie Matériels et Méthodes). Ensuite, nous avons réalisé de nouveaux tests d'expression.

Nous avons testé en priorité les souches C41 (DE3), BL21 (DE3) et C43 (DE3) (Figure 3.6).

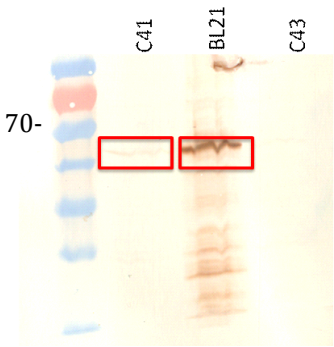



*Figure 3.6: Tests d'expression de AtNTT2 dans différents types de cellules. Western Blot avec révélation par anticorps anti-HIS. . Le marqueur est donné en kDa.*

*At*NTT2 est surexprimée en C41 et BL21. Des cultures plus importantes ont été réalisées à partir de ces deux souches, puis les membranes ont été préparées et les étapes de purification réalisées de façon identique. La purification est moins efficace lorsque la protéine est surexprimée en BL21 (DE3). En effet, la quantité de contaminants est plus importante alors que le rendement final est moins bon. Nous avons donc sélectionné la souche C41 (DE3) (données non montrées).

## 2. *La solubilisation*

Comme indiqué pour *At*NTT1, la solubilisation a été testée avec plusieurs détergents (cf tableau 3.2).

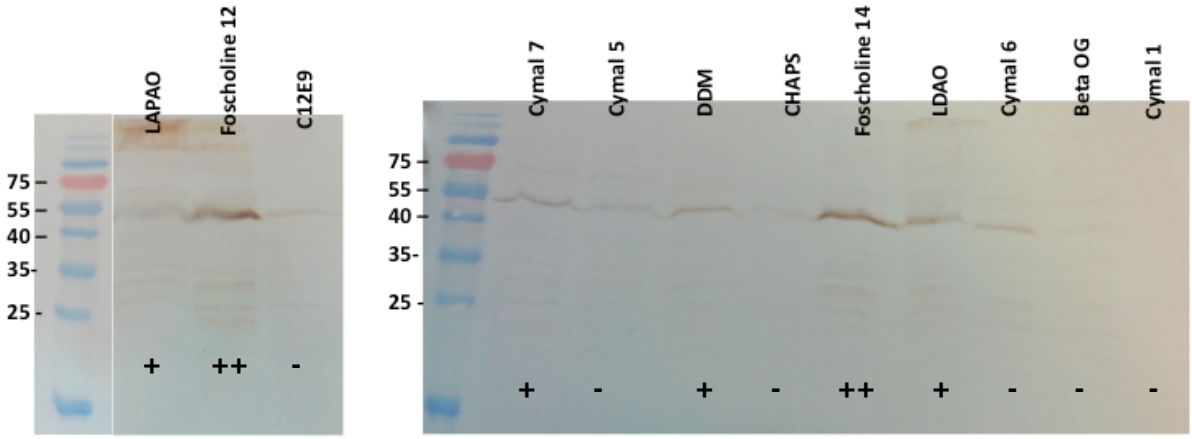



*Figure 3.7 : Tests de solubilisation en différents détergents : Western Blot révélant AtNTT2 marqué par anticorps anti-HIS. Les membranes sont solubilisées pendant 1h dans différents détergents puis ultracentifugées pour éliminer les éléments non solubilisés. Le marqueur est donné en kDa.*

Dans un premier temps, il est important de regarder l'efficacité de solubilisation (maximum de protéine solubilisée). La Figure 3.7 montre que plusieurs détergents sont capables de solubiliser *At*NTT2 : LAPAO, Foscholine 12, Cymal 7, Foscholine 14, LDAO. Les plus efficaces sont de la famille des Foscholine (12 et 14), viennent ensuite le LAPAO et LDAO.

Compte tenu du faible rendement de production nous avons dans un premier temps privilégié l'utilisation de la Foscholine 12. Nous verrons dans les paragraphes suivants que les tests de caractérisation nous ont permis de finaliser notre choix.

## 3. *La purification*

La purification de *At*NTT2 s'effectue ensuite selon le protocole établi avec *At*NTT1. Plusieurs détergents (DDM, LAPAO, MNG3, LDAO et β-OG) ont de nouveau été testés pour cette étape afin de rechercher les meilleures conditions de stabilité de la protéine en solution (afin d'éviter la formation d'agrégats) mais aussi la meilleure pureté.

Le LAPAO a été testé car il a permis de cristalliser le transporteur mitochondrial d'ADP/ATP (bAAC, (Pebay-Peyroula et al., 2003)). Ensuite le DDM, le LDAO et le β-OG ont été testés car ce sont des détergents dont les caractéristiques sont bien connues et qui ont permis de cristalliser de nombreuses protéines membranaires. Enfin, le MNG3 qui a la particularité d'être composé de deux molécules de DDM (Cf Annexe 3), est un détergent récemment synthétisé qui semble permettre une meilleure stabilité des protéines (Chae et al., 2010).

Les détergents sont échangés sur la colonne de chromatographie d'affinité.

La Figure 3.8 montre ensuite les profils obtenus en chromatographie d'exclusion avec les différents détergents ainsi que le gel SDS page associé.

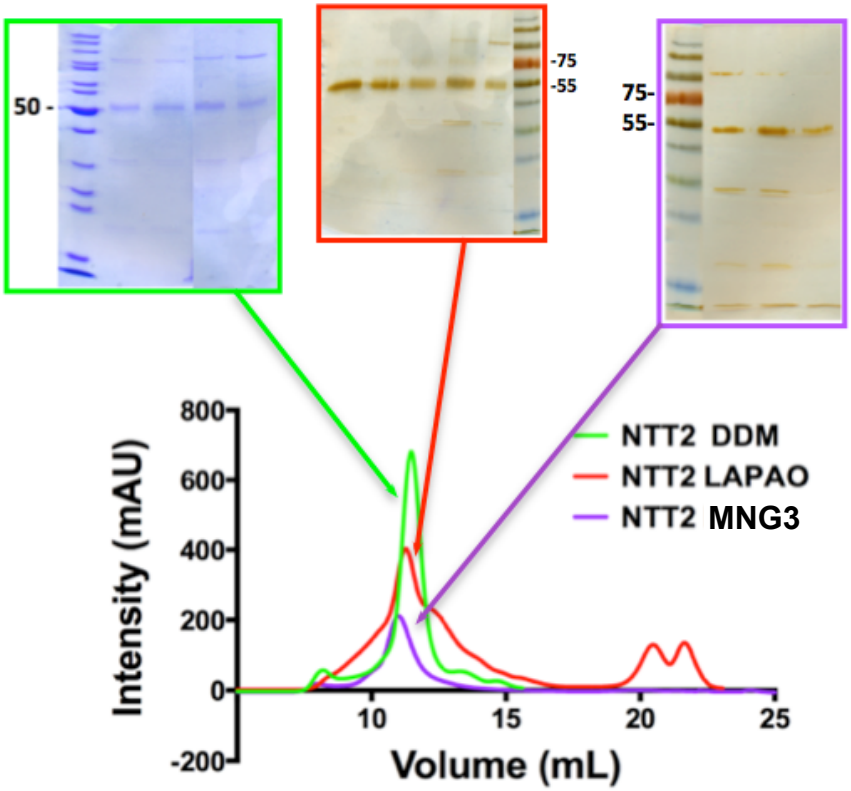



*Figure 3.8 : Ces chromatographies par exclusion sont obtenues après une solubilisation en Foscholine 12 puis en échangeant le détergent lors de l'étape de chromatographie d'affinité. Compte tenu des cmc de chacun des détergents, le DDM et le MNG3 sont utilisés à une concentration de 0,05% dans les différents tampons alors que le LAPAO est utilisé à une concentration de 0,1%.*

Différents profils sont obtenus : un profil avec un pic unique (cf en DDM) très similaire à celui obtenu avec *At*NTT1 et un profil avec un épaulement à droite (Figure 3.4).

Le profil obtenu en DDM semble très prometteur. Néanmoins, dans ces conditions, on note la présence de contaminants, même si leur quantité est faible et la protéine surtout précipite au cours de la concentration.

La purification en β-OG entraîne une agrégation de la protéine directement après l'échange entre la Foscholine 12 et le β-OG (données non montrées).

Pour la purification en LAPAO, nous avons pu vérifier sur gel SDS-PAGE que l'épaulement contient uniquement la protéine *At*NTT2, les autres contaminants ne semblent pas être présents. Quant au MNG3, il permet d'obtenir les mêmes bandes et la même quantité de *At*NTT2 que pour le DDM.

Nous avons donc choisi le LAPAO à 0,1% qui permet d'obtenir des fractions plus propres et une quantité plus importante qu'avec le MNG3.

## *4. Purification type*

Ces différents tests ont permis de déterminer le détergent favorable pour *At*NTT2. Une fois ce critère déterminé, il est possible d'effectuer des purifications à plus grande échelle afin de produire suffisamment de protéine pour faire des tests de caractérisation et des essais de cristallisation.

Une petite partie des protéines produites forme des agrégats qui sont éliminés avec le volume mort de la colonne de chromatographie d'exclusion. La Figure 3.9. montre les deux profils obtenus lors de la purification de *At*NTT2. Ces différents profils sont probablement dûs à la préparation de membrane et surtout à l'expression en *E. coli*.

Majoritairement, le profil avec un pic unique est obtenu. Cependant, plusieurs purifications ont permis d'observer un épaulement et d'avoir ainsi une meilleure purification

En 0,1% LAPAO, le pic principal est assez fin mais asymétrique (courbe violette sur la Figure 3.9 a). Ceci suggère la présence de contaminants, ce qui est confirmé en déposant les fractions sur gel SDS PAGE. Dans le cas où le profil obtenu présente un épaulement (courbe rouge sur la Figure 3.9 a), l'analyse du gel SDS PAGE correspondant (Figure 3.9 b.) montre que les deux pics contiennent des espèces différentes, la séparation est donc plus efficace. Le premier pic semble contenir plusieurs espèces : une espèce qui migre sur gel autour de 120 kDa,

plusieurs espèces ou une dégradation autour de 55 kDa et au moins deux autres contaminants avec de plus faibles masses molaires. L'épaulement contient majoritairement une espèce ayant un masse moléculaire similaire à *At*NTT2. Les deux fractions de ce pic semblent plutôt pures. On obtient alors 260 µg de *At*NTT2 dans 1 mL. Cette quantité de protéine sera utilisée pour des tests de caractérisation.

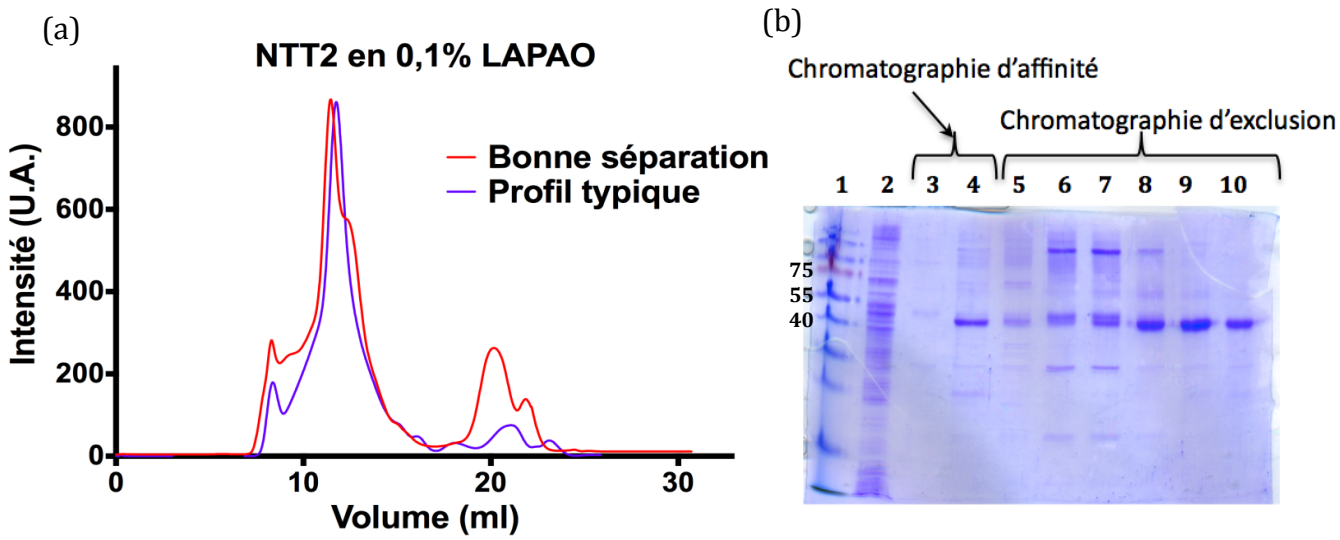



*Figure 3.9 : Comparaison de profils de chromatographie d'exclusion sur colonne Superdex S200 10/300GL d'une purification effectuée en 0,1% LAPAO.*

*(a) profil de chromatographie d'exclusion sur Superdex S200 10/300GL, en violet, le profil typique le plus souvent obtenu et en rouge, une bonne séparation.*

*(b) gel SDS PAGE à 12% d'acrylamide de la purification avec bonne séparation (rouge)*

*1) marqueur de masses moléculaires, donné en kDa.*

*2) Surnageant de solubilisation des protéines par 1% de Foscholine12*

*3) 2ème lavage des billes de nickel*

*4) Elution des protéines portant l'étiquette His avec 400 mM d'imidazole*

*5) à 8) Pic principal composé de 4 fractions de 500 µL*

*9) et 10) Epaulement composé de 2 fractions de 500 µL*

L'étude du profil avec épaulement de la Figure 3.9 permet de mettre en avant certains paramètres importants :

- la quantité d'agrégat est relativement faible par rapport à la quantité de *At*NTT2 produite.
- le profil montre un épaulement contenant *At*NTT2 et un pic contenant différentes espèces

- grâce aux volumes d'élution, il est possible de déterminer la masse moléculaire apparente du complexe protéine-détergent : pour l'épaulement la masse moléculaire apparente serait de 170 kDa (volume d'élution à 12,5 mL) et pour le pic de 260 kDa (volume d'élution à 11,5 mL).

Afin d'identifier plus clairement les différentes espèces en fin de purification, une analyse est réalisée par spectrométrie de masse : les fractions sont déposées sur gel SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie et les bandes d'intérêts sont découpées pour être analysées (Figure 3.10).

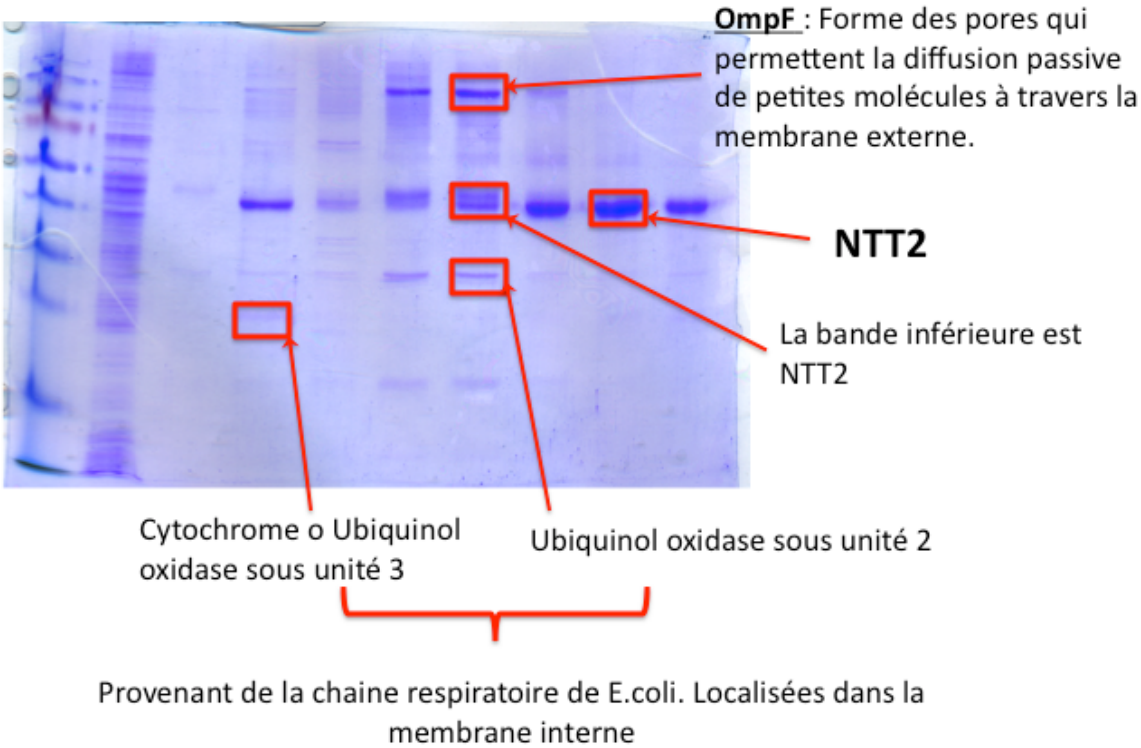



*Figure 3.10 : Caractérisation des différents contaminants en fin de purification par spectrométrie de masse après digestion à la trypsine.*

D'après l'analyse par spectrométrie de masse, il apparaît que deux types de contaminants provenant du système d'expression d'*E.coli*, semblent être encore présents en fin de purification. OmpF est une protéine membranaire qui se situe dans la membrane externe de *E.coli*. Pour éliminer cette protéine, plusieurs approches ont été testées mais restées sans succès : élimination des membranes externes par formation de sphéroplastes et par surexpression de la protéine dans des cellules C41 (DE3) délétées en OmpF. La formation des sphéroplastes entraînait une très grande perte en protéine d'intérêt alors que les cellules

délétées en OmpF avaient compensé en surexprimant une autre porine. Les protéines de la chaîne respiratoire d'*E.coli* sont plus difficiles à éliminer.
Les simples modifications apportées au protocole nous permettent cependant de nous débarrasser majoritairement des contaminants.

## III. Fonction de la protéine en membrane

Comment mesurer la fonction d'un transporteur ? Il est possible de mesurer un transport ou d'observer la fixation du ligand par la protéine d'intérêt. La première méthode est possible lorsque le transporteur est surexprimé dans les membranes d'*E.coli* ou lorsque la protéine est reconstituée dans un liposome après purification. En effet, le système constitué possède un extérieur et un intérieur séparés par une membrane. Le transport mesuré est donc dû à la protéine.

### A. Détermination des différentes constantes cinétiques

Afin de vérifier que les constructions permettant de surexprimer la protéine sont actives, une expérience mesurant le transport de l'ATP radioactif a été mise en place. Cette technique permet de tester l'activité de la protéine dans un environnement proche de l'environnement naturel.

Les protéines sont surexprimées dans les membranes plasmiques d'*E.coli* puis l'expérience consiste à mesurer la quantité d'ATP radioactif importée par la protéine à l'intérieur des cellules après un certain temps. *At*NTT est capable de transporter l'ATP et l'ADP, pour le besoin de l'expérience, seul l'$\alpha$-$^{32}$P-ATP est utilisé.

Dans un premier temps, il est important de mesurer la vitesse initiale d'*At*NTT2 pour ajuster le temps utilisé lors de la mesure de transport (Figure 3.11).

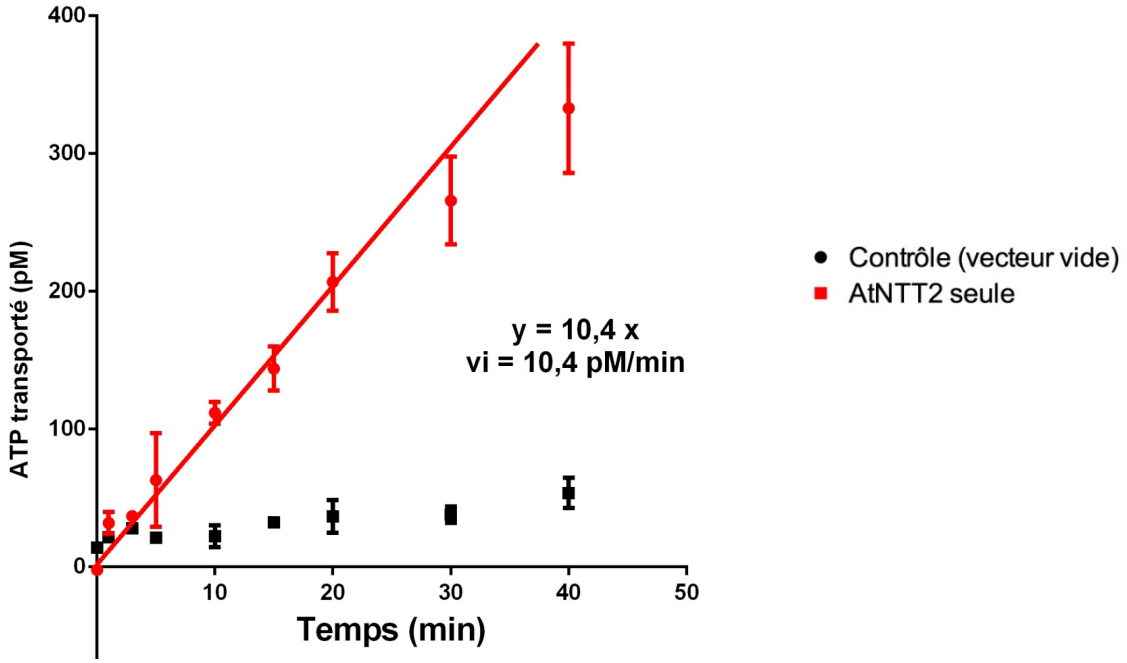
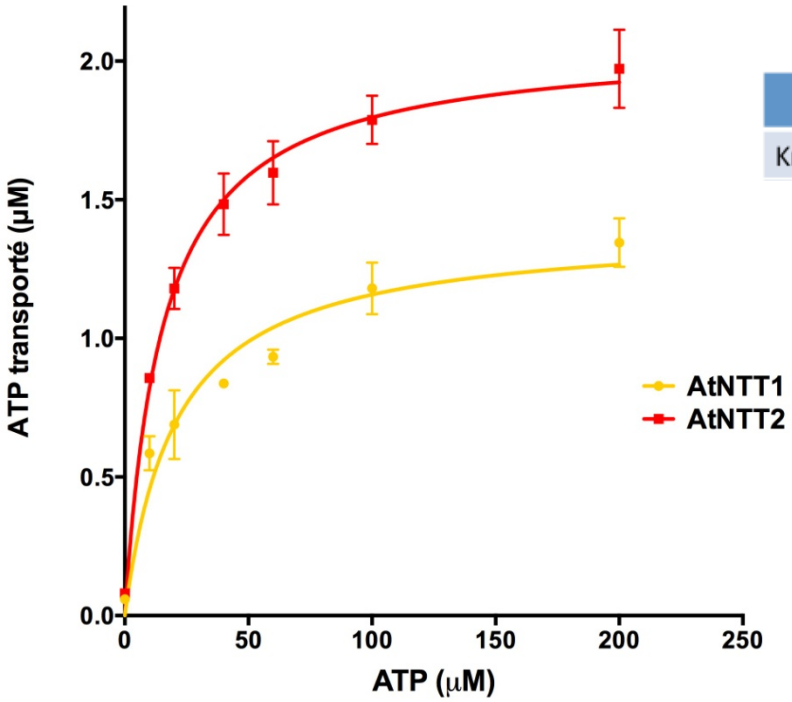



*Figure 3.11 : transport d'α-$^{32}$P-ATP par la protéine AtNTT2 au cours du temps. Les barres d'erreur sont obtenues à partir de triplicat.*

Tout d'abord, en comparant la quantité d'ATP radioactif transportée par les cellules d'*E. coli* exprimant le vecteur vide et celles exprimant *At*NTT2, nous constatons qu'*At*NTT2 est bien responsable du transport et que cette protéine est donc bien active (Figure 3.11). Même si après 40 min d'incubation le plateau n'est pas encore atteint, il est possible en traçant la tangente à la courbe à son origine de mesurer la vitesse initiale du transport assuré par *At*NTT2. La vitesse initiale mesurée est de 10,4 pM/min pour 10 µM d'ATP marqué. Cette Figure permet aussi de déterminer la gamme de temps correspondant aux conditions de vitesse initiale, tout en ayant une valeur mesurable. Le temps choisi est de 15 min.

Dans un deuxième temps, nous avons mesuré les constantes cinétiques pour *At*NTT1 et *At*NTT2. Pour cela, les cellules surexprimant la protéine d'intérêt sont incubées pendant 15 min avec une concentration croissante d'ATP radioactif allant de 10 µM à 200 µM. Les données obtenues sont rapportées en fonction de la quantité de protéine surexprimée dans les cellules (Figure 3.12).

Grâce à ce graphique, le $K_m$ est déterminé. En effet, à partir de 100 µM d'ATP, un plateau de saturation est atteint pour les deux protéines. Le $K_m$ de *At*NTT2 est 17 µM et *At*NTT1 est 20 µM. Ces valeurs sont comparables aux données de la littérature (Mohlmann et al., 1998; Trentmann et al., 2000)




| | AtNTT1 | AtNTT2 |
|---|---|---|
| Km | 22 +/- 3µM | 15 +/- 1µM |

*Figure 3.12 : Saturation du substrat par le transport de l'α-$^{32}$P-ATP dans les cellules d'E.coli. Les barres d'erreur sont obtenues à partir de triplicat.*

## B. Transport des nucléotides

Dans la littérature, le transporteur *At*NTT1 est décrit comme transportant principalement l'ATP et l'ADP. Cependant, ses homologues bactériens sont capables de transporter le GTP. Pour vérifier la capacité d'*At*NTT2 à transporter les nucléotides, les cellules d'*E.coli* surexprimant cette isoforme sont incubées dans 20 µM d'ATP marqué en présence de 300 µM d'un autre nucléotide. Une compétition pourra être observée avec les nucléotides transportés ou liés par la protéine.

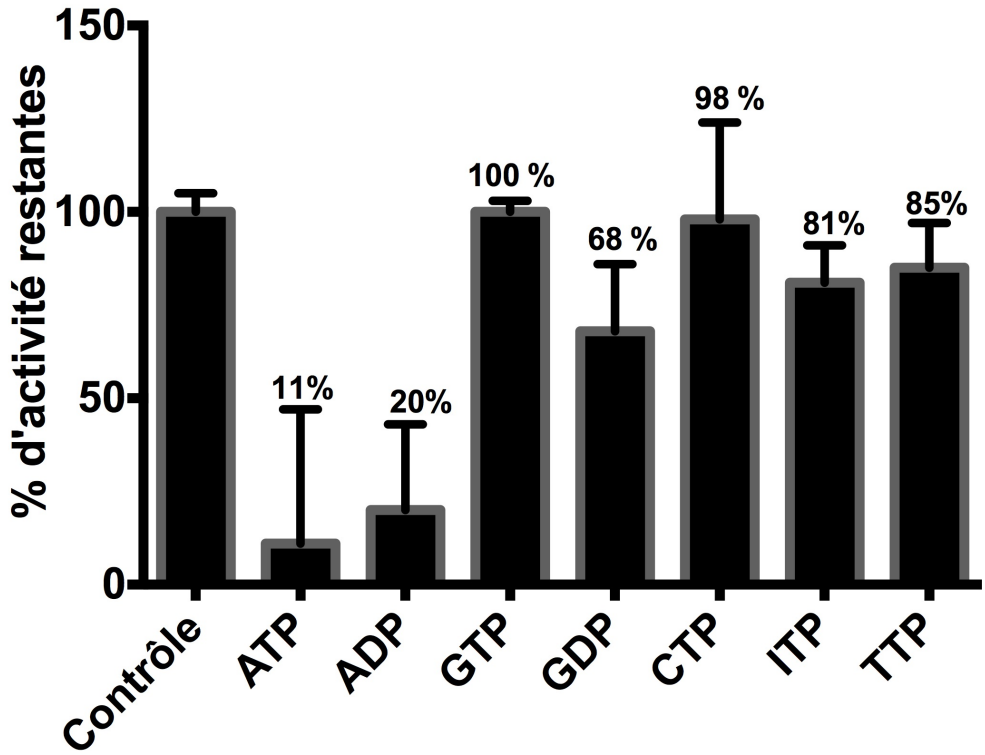



*Figure 3.13 : Compétition entre l'α-$^{32}$P-ATP et les différents nucléotides, en E.coli. Les barres d'erreur sont obtenues à partir de triplicat. Ces résultats ont été reproduits 3 fois.*

D'après cette première partie de résultats montrée en Figure 3.13, l'ATP et l'ADP sont les seuls nucléotides transportés par *At*NTT2. Ceci confirme les premières données obtenues dans la littérature.

Les dérivés fluorescents d'ADP ou d'ATP permettent de sonder les liaisons possibles entre la protéine et les nucléotides. Trois types de dérivés ont été utilisés : MANT-ATP(ADP), TNP-ATP(ADP) ou étheno-ATP(ADP). Le MANT et le TNP sont attachés au ribose alors que l'éthéno est relié à l'adénine. Afin de pouvoir utiliser la fluorescence de ces dérivés pour comprendre la liaison des nucléotides, nous nous sommes d'abord intéressés à leur propriété de transport en suivant la compétition de ces nucléotides au transport d'ATP radioactif (Figure 3.14).

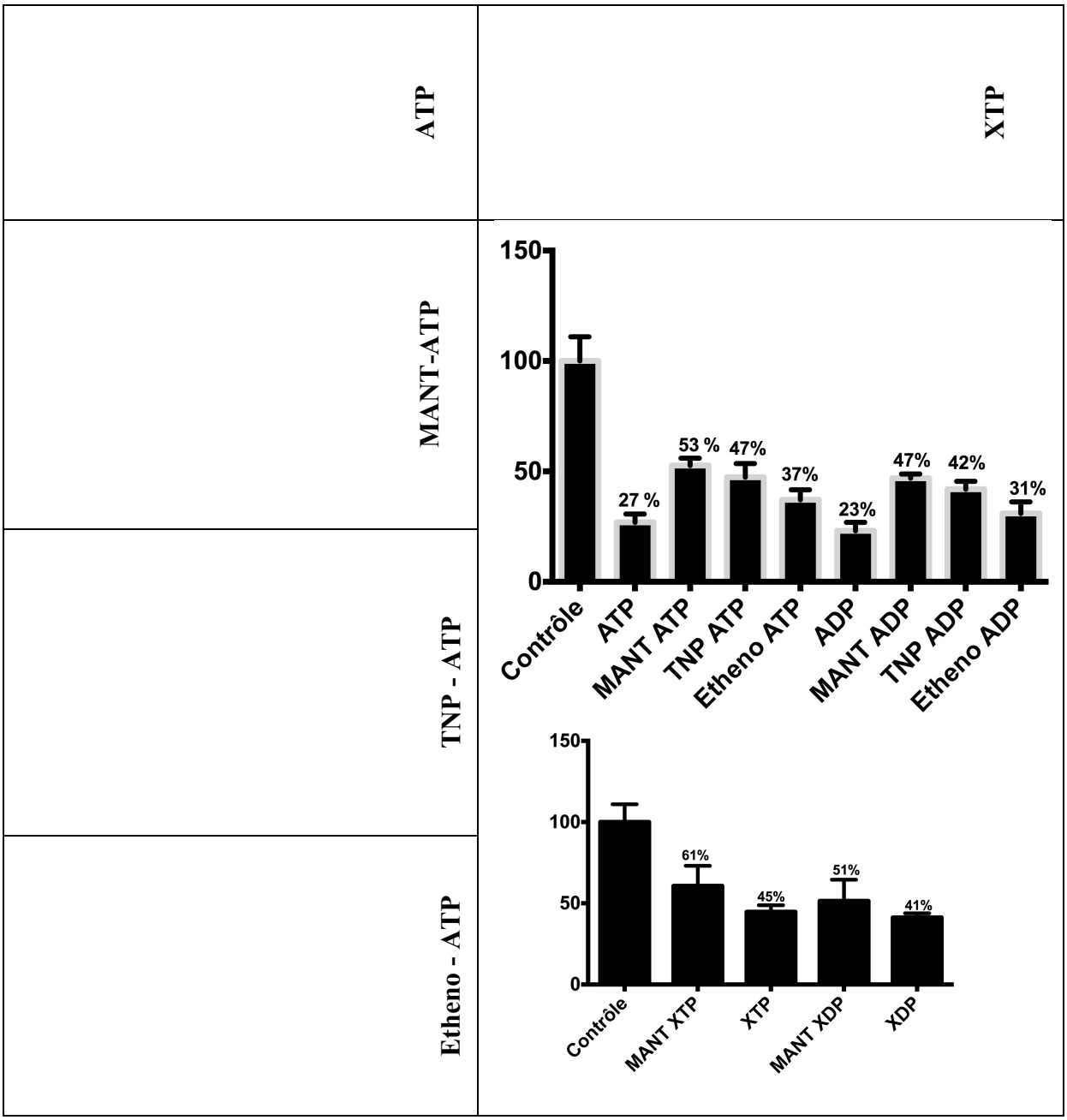



*Figure 3.14 : 1) structure des différents ATP fluorescents et XTP,*

*2) les résultats obtenus par un test de compétition entre les nucléotides et l'ATP marqué. Les barres d'erreur sont obtenues à partir de triplicat. Cette expérience n'a été effectuée qu'une seule fois au moment de la rédaction du manuscrit.*

D'après la figure 3.14, la compétition peut être découpée en 3 groupes :

- Compétition totale avec l'ATP marqué : ATP, ADP
- Compétition presque totale : Etheno-ATP, Etheno-ADP

- Compétition partielle (transport atténué d'environ 50%) : TNP-ATP, TNP-ADP, MANT-ATP, MANT-ADP, XTP, XDP, MANT-XTP et MANT-XDP.

La compétition avec les trois nucléotides fluorescents (MANT, Etheno ou TNP) est moins forte que pour le nucléotide seul (ADP ou ATP). Les dérivés etheno se comportent de façon assez similaire à l'ATP ou l'ADP. La fonction etheno ne semble que peu impacter la reconnaissance du nucléotide car la compétition observée (31% d'activité résiduelle dans le cas de l'Etheno-ADP) est proche de celle du nucléotide seul (23% dans le cas de l'ADP).

Les dérivés MANT, TNP et XTP se comportent en revanche différemment.

La xanthosine triphosphate (XTP) est un nucléotide synthétique qui n'est pas produit par les cellules vivantes. Néanmoins certains transporteurs sont capables de le lier (Aronsson et al., 2003). *At*NTT2 semble être capable d'interagir avec le XTP et l'XDP (ainsi que les nucléotides fluorescents correspondants). En effet, ces nucléotides entraînent une diminution de la radioactivité (activité restante autour de 40%), montrant une compétition avec l'ATP marqué. La présence du MANT pourrait diminuer l'affinité du nucléotide pour la protéine comme pour l'ATP et l'ADP. Toutefois, il est aussi possible que l'XTP et l'XDP agissent comme des inhibiteurs de la protéine.

## C. Effet du pH

De nombreuses études ont été menées sur le transporteur mitochondrial AAC dont la structure est connue depuis 2003 (Pebay-Peyroula et al., 2003). Une étude portant sur l'impact du pH sur l'activité de la protéine a ainsi été récemment menée par S. Ravaud et collaborateurs. Ces données montrent que le transport d'ATP par hAAC1 présente un pic d'efficacité autour de pH 6 et suit une courbe en cloche autour de ce pH (Bidon-Chanal A., 2013). AAC et NTT reconnaissent et transportent les mêmes subtrats, il était donc intéressant de conduire des expériences similaires sur NTT. Nous avons alors pu constater un comportement différent : NTT voit son activité augmenter progressivement en fonction du pH jusqu'à atteindre un plateau autour du pH 8 (figure 3.15).

Dans le cas de hAAC1, la protéine n'est pas seulement sensible à la protonation/déprotonation du substrat, son activité est aussi modifiée par la présence d'un résidu lysine qui est maintenu sous forme déprotonée dans des conditions basiques. En effet, d'après Bidon-Chanal et al

(Bidon-Chanal A., 2013), la sensibilité au pH de hAAC est due à une lysine hautement conservée chez toutes les AAC. Ce résidu K22 est situé dans le milieu de la cavité et n'engage aucune liaison avec les résidus voisins. L'$ADP^{3-}$ va établir plusieurs interactions avec les chaînes latérales de plusieurs résidus de la cavité dont K22. Lorsque le complexe est stable, les pKa de l'$ADP^{3-}$ et de K22 varient fortement en fonction de la distance du nucléotide du bas de la cavité. Ainsi K22 reste déprotoné et l'$ADP^{3-}$ reste protoné malgré la variation de pH.

Dans le cas de NTT, à pH bas, l'ATP est protoné et n'est donc pas transporté par la protéine qui n'est capable de transporter que l'$ATP^{4-}$. Ainsi plus le pH de l'environnement augmente, plus la déprotonation du substrat est importante. L'efficacité du transporteur est donc augmentée en fonction de cette déprotonation de l'ATP. Il semble que contrairement à AAC, l'activité de NTT ne soit dépendante que de l'état de l'ATP.

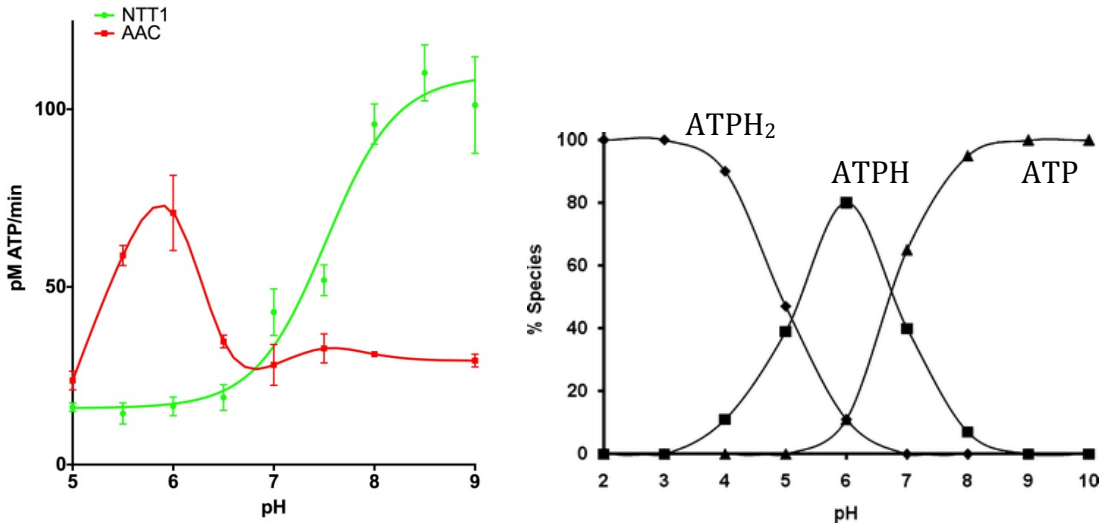



*Figure 3.15 : Efficacité du transport en fonction du pH pour deux transporteurs d'ADP et d'ATP (hAAC et AtNTT1). Les barres d'erreur sont obtenues à partir de triplicat. Courbe de protonation/déprotonation de l'ATP en fonction du pH (journal of Materials Chemistry).*

Ce résultat s'ajoute aux différences connues entre les deux transporteurs (voir introduction).

Il est à noter que la zone de pH optimale pour NTT correspond aux pH physiologiques des chloroplastes. En effet, dans l'espace intermenbranaire le pH est de 7. Dans le stroma il est de 8 à la lumière, et de 7 à l'obscurité.

## D. Recherche d'inhibiteur

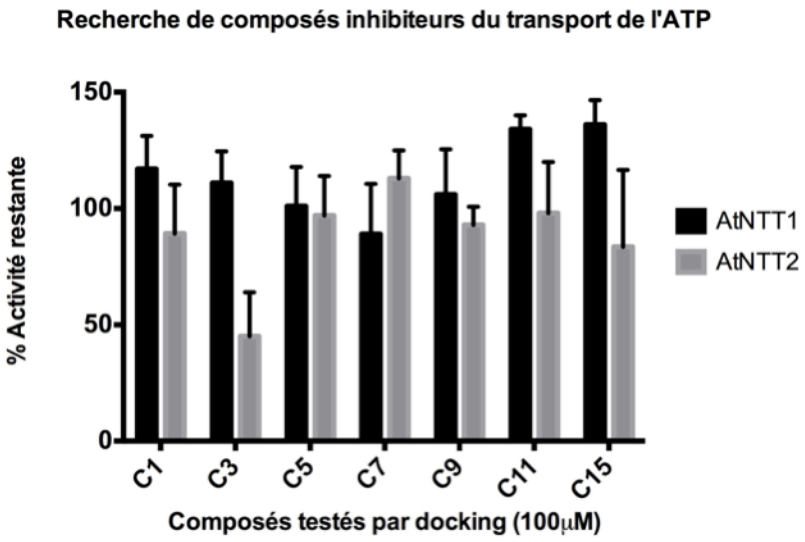
Les inhibiteurs sont un outil précieux pour les caractérisations fonctionnelles (contrôle de la spécificité de l'activité mesurée) et la cristallisation des protéines (stabilisation d'une conformation). Ainsi l'utilisation du CATR était une étape clé pour la cristallisation du transporteur AAC (cf figure 1.2) (Pebay-Peyroula et al., 2003). Au cours de sa thèse, P. Panwar a entrepris la recherche de nouveaux ligands pour AAC autres que les inhibiteurs déjà connus pour stabiliser la protéine et la « bloquer » dans une conformation qui pourrait être cristallisée. Il a ainsi réalisé un docking moléculaire : à partir de 35 millions de composés commercialement disponibles rassemblés sous forme d'une base de données nommée ZINC, un certain nombre de molécules ayant les caractéristiques nécessaires pour être un inhibiteur de AAC a été sélectionné :

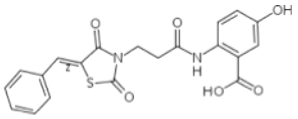
- masse moléculaire inférieure à 500 Da
- chargée négativement
- similaire à 80% à l'ADP
- G score élevé
- Interaction dans le site de liaison du CATR

Ce criblage a permis de sélectionner 18 molécules susceptibles d'inhiber l'activité d'AAC. Ces composés ont été testés grâce aux tests de transport d'ATP radioactif précédemment décrits. Pour AAC, il s'est avéré qu'un seul composé permettait effectivement de réduire l'activité de plus de 50% à 100 μM et plus 90% à 500 μM.

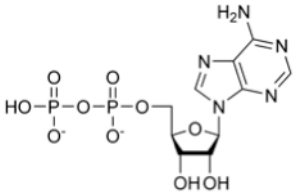
*At*NTT1 et *At*NTT2 transportent les mêmes nucléotides que AAC. En revanche aucun inhibiteur de ces protéines n'est connu, elles ne sont par exemple pas inhibées par CATR ni BA. Il nous semblait donc intéressant de tester ces 18 molécules pour *At*NTT1 et *At*NTT2.

Pour *At*NTT1, aucun composé ne semble agir sur l'activité de la protéine alors que pour *At*NTT2 la molécule C3 semble inhiber le transport (Figure 3.16).



Composé C3



Molécule d'ATP

*Figure 3.16 : Effet inhibiteur des différents composés venant du docking sur AtNTT1 et AtNTT2. Ces expériences ont été répétées 2 fois.*

D'autres tests complémentaires seront nécessaires pour valider l'impact du C3 sur le transport. Dans un premier temps, le composé sera testé avec différentes concentrations. Il sera ensuite nécessaire de vérifier si la protéine en détergent est sensible au C3.

## IV. Liaison des nucléotides

Le deuxième moyen permettant d'évaluer la fonction d'un transporteur est d'observer la fixation de son/ses ligand(s). Cette méthode consiste à purifier la protéine et à étudier quel genre de molécules est capable de se lier au transporteur. Cependant, la caractérisation n'est que partielle, cette méthode permet surtout d'étudier la liaison.

### A. Fluorescence des tryptophanes

Une fois la protéine purifiée en détergent, il est important de vérifier différentes caractéristiques dont la fonctionnalité de la protéine. Pour cela, nous avons exploré la possibilité d'utiliser la fluorescence des tryptophanes. En effet, le comportement du tryptophane reflète son environnement. Si le tryptophane se situe près du site de reconnaissance des nucléotides, alors un effet est observé sur la fluorescence. *At*NTT1 et *At*NTT2 possèdent dix tryptophanes répartis dans la séquence dont trois près des acides

aminés supposés impliqués (Cf Figure 1.6, acides aminés en vert) dans les sites de reconnaissance de l'ATP et ADP (Trentmann et al., 2000).

Cette technique consiste à exciter les tryptophanes de la protéine à 295 nm et d'étudier la fluorescence émise entre 300 et 400 nm en présence des nucléotides.

Différentes concentrations en nucléotides sont testées afin de vérifier la réponse de la protéine tout en sachant que le $K_m$ de l'ATP de *At*NTT1 et *At*NTT2 est d'environ 20 µM.

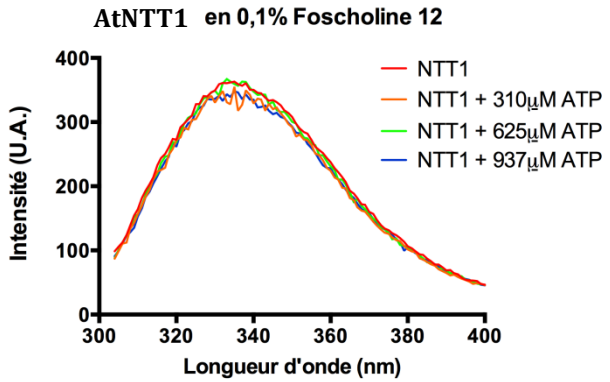



*Figure 3.17 : Spectres de fluorescence de AtNTT1 purifiée en Foscholine 12 collectés entre 300 et 400 nm après excitation à 295 nm. Différentes concentrations en ATP sont testées. Ces résultats ont été reproduits 2 fois.*

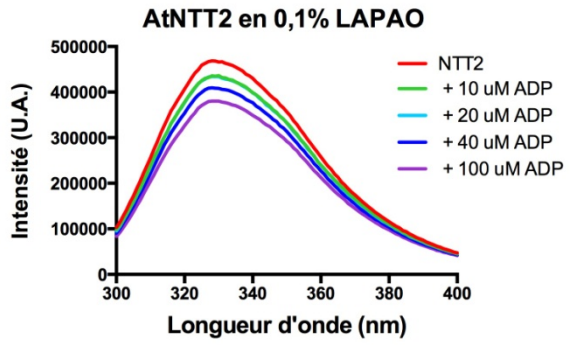



*Figure 3.18. Spectres de fluorescence de AtNTT2 purifiée en LAPAO collectés entre 300 et 400 nm après excitation à 295 nm. Différentes concentrations en ADP sont testées. Des courbes similaires ont été obtenues à plusieurs reprises sur des purifications différentes.*

La protéine *At*NTT1 purifiée en Foscholine 12 depuis la solubilisation semble plus stable d'après les mesures de stabilité thermique (voir ci-après). Néanmoins, l'absence de

modification du pic de fluorescence en présence de différentes concentrations d'ATP semble montrer que cette protéine n'est pas active (Figure 3.17).

*At*NTT2 purifiée en LAPAO après une solubilisation en Foscholine 12, montre une diminution du signal lors de l'ajout de l'ADP (Figure 3.18 et figure 3.19.). Cette diminution semble indiquer une modification de l'environnement des tryptophanes lors de l'addition du nucléotide, et peut-être une modification de conformation de la protéine.

Étant donnée la similitude entre les séquences d'*At*NTT1 et *At*NTT2 (83% d'identité), il est possible que les deux protéines réagissent de la même manière. L'observation faite avec *At*NTT2 est très certainement transposable à *At*NTT1. Nous pouvons donc postuler que la protéine en Foscholine 12 n'est pas correctement repliée, alors que l'échange de la Foscholine 12 contre le LAPAO lui restitue sa capacité à se lier au nucléotide.

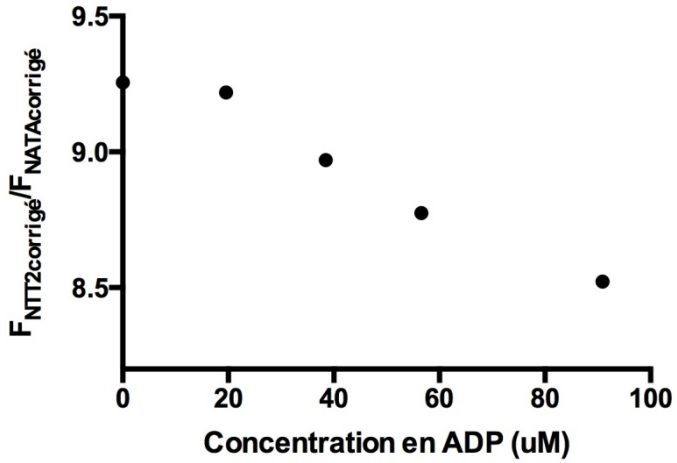



*Figure 3.19 : Courbe de saturation de la protéine AtNTT2 en présence de différentes quantités d'ADP. Le maximum de fluorescence du tryptophane est autour de 328 nm et 350 nm pour le NATA. Cette expérience n'a été effectuée qu'une seule fois au moment de la rédaction du manuscrit.*

La fluorescence émise par les acides aminés aromatiques d'une protéine peut être influencée par plusieurs facteurs externes dont il faut tenir compte. La fluorescence peut diminuer par un effet de quenching, qui correspond à une perte d'énergie par collision avec des molécules du solvant. Si les tryptophanes sont accessibles au solvant, alors l'effet de quenching peut être important et masquer un effet de diminution dû à la liaison de nucléotides. Nous avons donc utilisé le NATA, un analogue de tryptophane en solution. La mesure de la fluorescence du NATA dans les mêmes conditions d'ajout d'ATP ou d'ADP permet de corriger des effets de quenching.

Par ailleurs, l'ajout de nucléotides induit un effet de dilution qui provoque également une diminution de fluorescence dont il faut tenir compte.
La Figure 3.19 ci-dessus obtenue après correction montre clairement une diminution du signal en fonction de la quantité d'ADP ajoutée. La décroissance est très rapide au début et à tendance à ralentir lorsque la concentration atteint 100 μM. Cette information montre une liaison entre l'ADP et *At*NTT2.

## B. FRET

Le FRET est une technique largement utilisée pour mesurer l'interaction entre deux molécules. Afin de mettre en oeuvre cette approche pour NTT, la protéine purifiée est mise en présence d'un dérivé fluorescent de nucléotides, dans ce cas le MANT-ATP ou ADP. La longueur d'onde d'excitation du MANT-ATP correspond au domaine de fluorescence des tryptophanes. Les tryptophanes sont excités à 295 nm, et en cas de proximité, l'énergie des tryptophanes est transmise au MANT-ATP.

Pour *At*NTT2, quatre nucléotides ont été testés à des concentrations croissantes : MANT-ATP, MANT-ADP, MANT-XTP, MANT- XDP.

La Figure 3.20 montre que chacun des nucléotides permet d'obtenir un signal FRET. Ces courbes sont obtenues après soustraction du tampon ayant été mis en contact avec les mêmes quantités de nucléotides fluorescents. Cela permet de soustraire le bruit de fond lié à l'émission non spécifique du fluorophore.

De 300 à 400 nm le pic correspond à la fluorescence émise par les tryptophanes excités. De 400 à 500 nm, le pic correspond à la fluorescence du MANT-nucléotide, avec un maximum à 440 nm.

Les concentrations utilisées pour le MANT-ADP et le MANT-ATP sont proches du $K_m$ de chaque nucléotide pour *At*NTT2.

Le MANT-ADP permet d'obtenir une augmentation du signal FRET et une diminution du signal tryptophane proportionnelle à sa concentration. De plus, l'ajout de 500 μM d'ADP entraîne une diminution du signal FRET. Ceci implique une compétition entre le MANT-ADP et l'ADP (Tableau 3.3.).

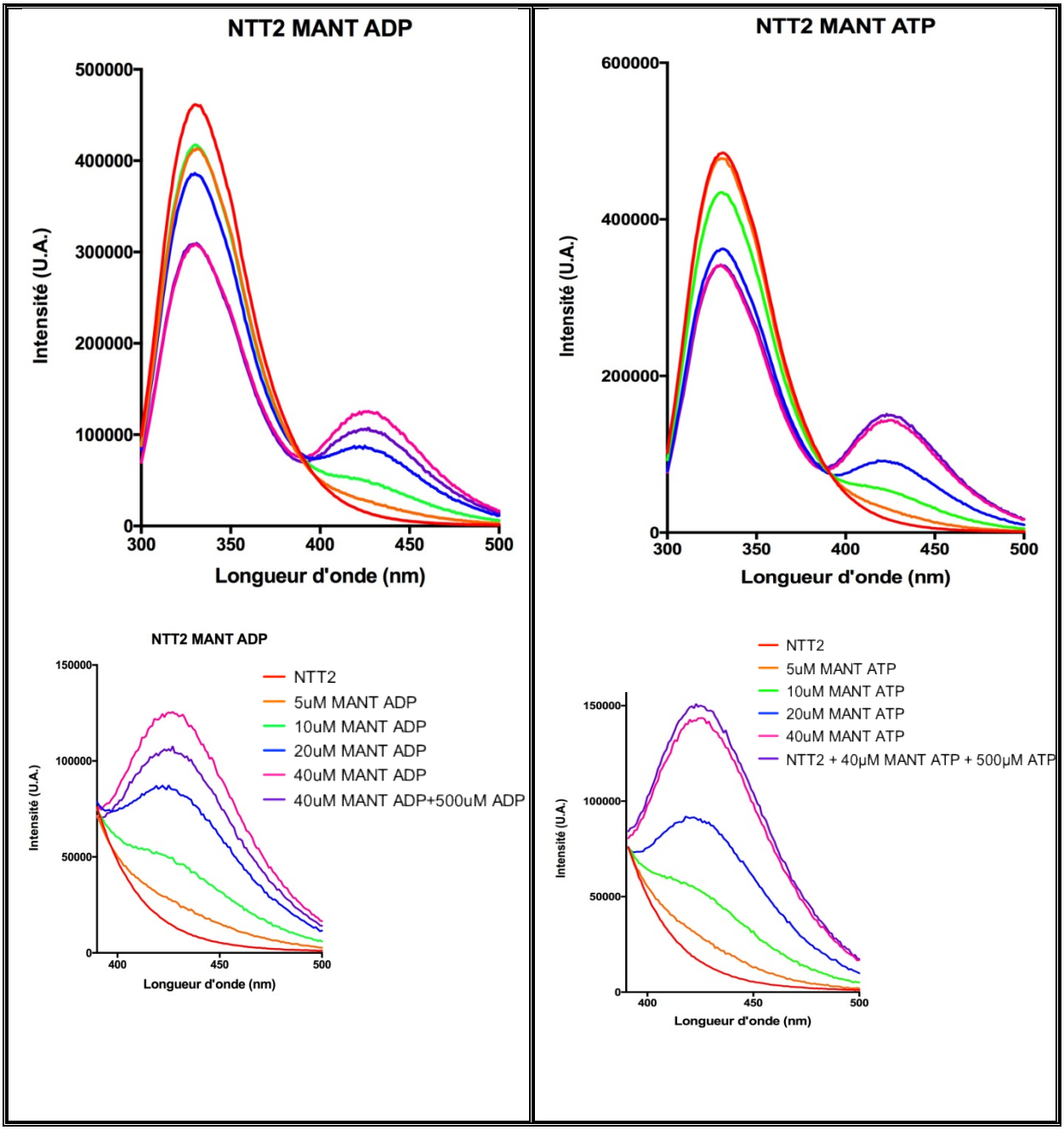
Le profil du MANT-ATP est similaire à celui du MANT-ADP. Cependant, l'ajout d'ATP n'entraîne pas de compétition entre le MANT-ATP et l'ATP (Tableau 3.3.).

Le MANT-XDP donne un signal FRET moitié moins fort que pour le MANT-ADP. Comme précédemment, l'ajout d'XDP n'entraîne pas de compétition (Tableau 3.3.).

Le MANT-XTP a un signal équivalent au MANT-ADP. Cependant à partir de 20 μM, il semble que le maximum soit atteint. Tout comme le MANT-ATP, aucune compétition entre le MANT-XTP et le XTP n'est observée (Tableau 3.3.).

| Nucléotides fluorescents | Absence ou présence de compétition |
|---|---|
| MANT ADP | Compétition entre le MANT ADP et l'ADP à 500μM |
| MANT ATP | Absence de compétition quand ajout ATP |
| MANT XDP | Absence de compétition quand ajout XDP |
| MANT XTP | Absence de compétition quand ajout XTP |

*Tableau 3.3 : Compétition entre le nucléotide fluorescent et le nucléotide non marqué*


NTT2 MANT ADP
Intensité (U.A.)
Longueur d'onde (nm)
NTT2 MANT ATP
Intensité (U.A.)
Longueur d'onde (nm)
NTT2 MANT ADP
Intensité (U.A.)
Longueur d'onde (nm)
NTT2
5uM MANT ADP
10uM MANT ADP
20uM MANT ADP
40uM MANT ADP
40uM MANT ADP+500uM ADP
NTT2
5uM MANT ATP
10uM MANT ATP
20uM MANT ATP
40uM MANT ATP
NTT2 + 40µM MANT ATP + 500µM ATP
Intensité (U.A.)
Longueur d'onde (nm)

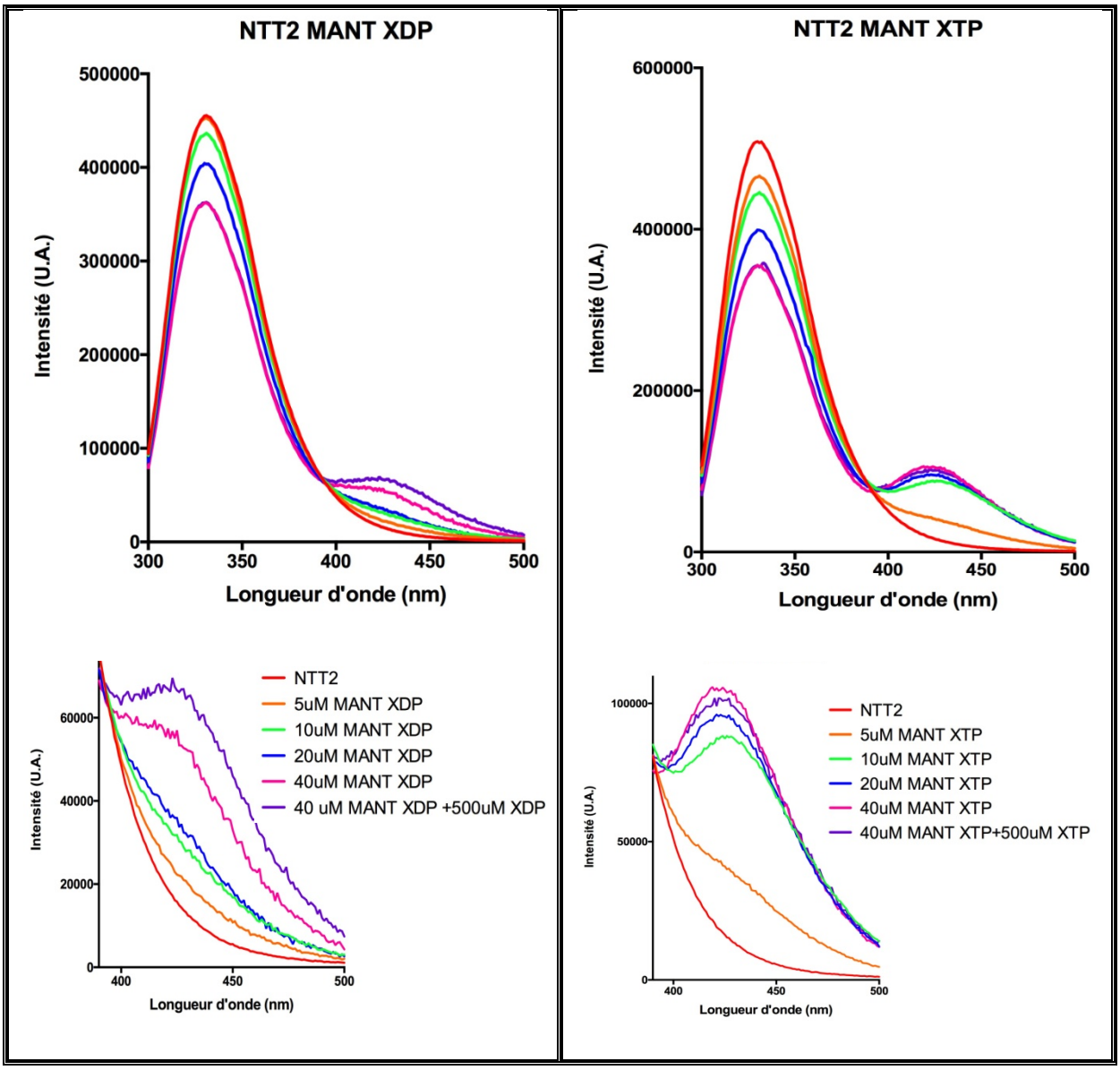



*Figure 3.20 : Spectres obtenus pour la protéine AtNTT2 purifiée en 0,1% LAPAO. Le signal de fluorescence est collecté entre 300 et 500 nm. L'agrandissement entre 400 et 500 nm correspond au pic de FRET (émission du fluorophore MANT). Les résultats ont été observés 2 fois. Ces courbes ont été obtenues après soustraction du tampon.*

## V. Oligomérisation

Observer l'état oligomérique de la protéine en détergent permet d'obtenir plusieurs informations telles que l'homogénéité de l'échantillon en fin de purification mais permet aussi d'évaluer l'unité fonctionnelle des *At*NTTs.

## A. Chromatographie d'exclusion et MALLS

Pour déterminer l'état oligomérique, nous avons utilisé différentes méthodes biophysiques. La plus facile à mettre en place est la chromatographie d'exclusion. En effet, elle permet de déterminer la présence d'agrégat, sa quantité par rapport aux protéines purifiées, l'homogénéité apparente et la taille du complexe protéine-détergent (Cf I.B.4. Purification de *At*NTT2).

Lorsque la chromatographie d'exclusion est couplée à un détecteur de diffusion statique de la lumière à trois angles (MALLS = Multi Angle Laser Light Scattering), un détecteur mesurant l'indice de réfraction et à un détecteur de d'absorbance, cela permet d'obtenir des informations plus précises sur l'homogénéité et la stœchiométrie de l'échantillon.
En effet, le MALLS analyse l'intensité lumineuse diffusée par l'échantillon sur un temps long et en déduit la masse moléculaire et la composition de l'échantillon. Pour déterminer ces paramètres, il faut connaître la concentration en protéine. Dans le cas de protéines membranaires, cette dernière est obtenue grâce à l'indice de réfraction en le combinant avec les données d'absorbance. Un autre paramètre à connaître est le $\delta n/\delta c$, qui caractérise le changement d'indice de réfraction n lorsque la concentration est modifiée, pour le LAPAO et la protéine. Le dernier paramètre important est le coefficient d'extinction de chacun des éléments de l'échantillon : le détergent et la protéine.
Cette analyse a été faite pour *At*NTT1 (Figure 3.21). Sur le profil de chromatographie, il apparaît 3 pics principaux :

- le premier (à V < 8mL) correspondant aux agrégats mais n'est pas une contribution majeure,
- le second (à V =12mL) est le pic le plus important correspondant à *At*NTT1. L'analyse donne, en considérant le coefficient d'extinction de AtNTT1, une masse moléculaire de protéine de 155 kDa, ce qui pourrait correspondre à des dimères (masse moléculaire théorique de 120 kDa) avec une très faible quantité de détergent lié (< 0,1 g/g). L'évaluation obtenue ne permettait pas de conclure par rapport aux différentes caractéristiques (MW, Rayon de giration $R_g$, Coefficient de diffustion $D_t$, Rayon hydrodynamique $R_h$). Il faut se poser la question d'une sous-estimation du coefficient d'extinction de la protéine dans le cas ou celle-ci lierait l'ADP ou l'ATP. Une estimation a été faite en considérant que la protéine lie 1 ADP pour 1 *At*NTT1. La

masse calculée pour le complexe est alors comprise entre 170 et 220 kDa ce qui correspondrait à une quantité de LAPAO lié de 1,8 - 2,6 g/g dans l'hypothèse d'un monomère et de 0,4 - 0,8 g/g pour un dimère.

- Le dernier pic (V > 14mL) ayant une absorbance faible, il pourrait correspondre au pic de détergent libre. En effet, l'analyse donne une masse qui se rapproche de la masse moléculaire du LAPAO en micelle (33 kDa contre 38 kDa théorique).

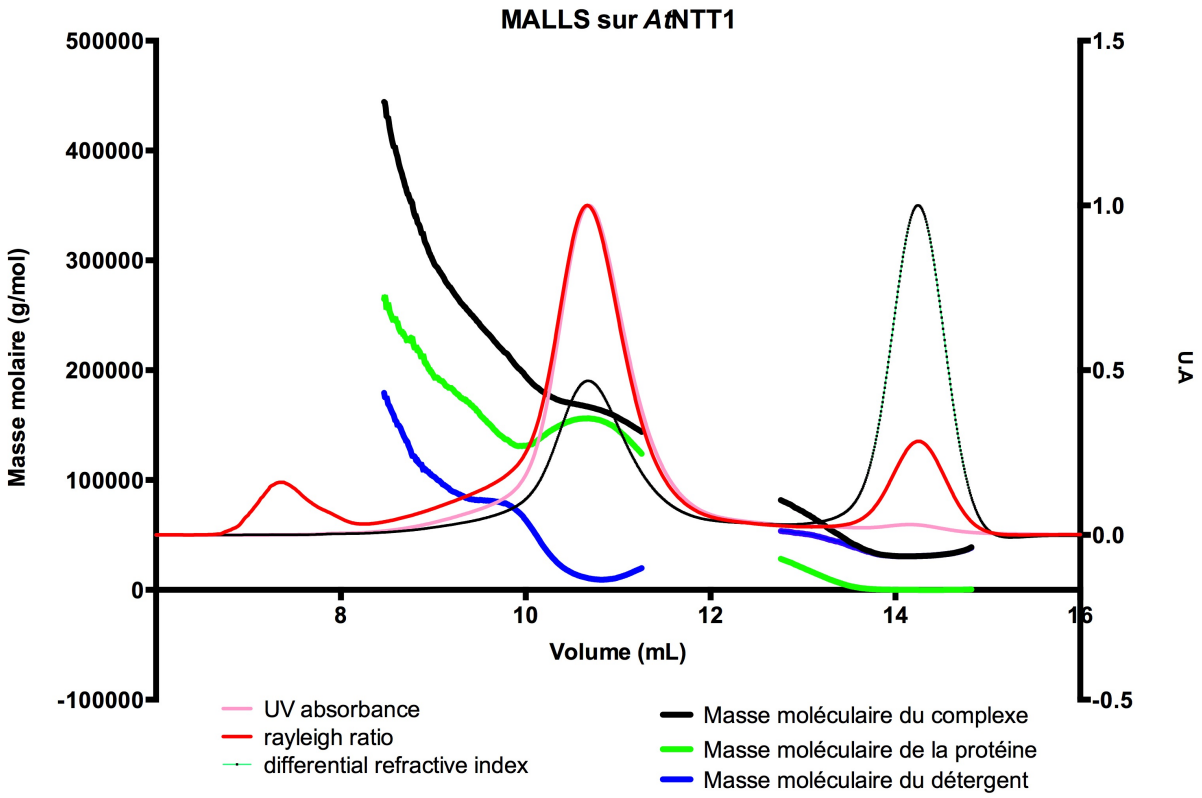



*Figure 3.21 : Analyse du profil d'élution d'une chromatographie d'exclusion couplée à un MALLS pour AtNTT1 (colonne Superdex S200). La courbe la plus haute (noire) montre la masse totale des éléments. La courbe en bleu correspondrait au détergent et la courbe en vert correspond à la protéine.*

Au moment de la rédaction du manuscrit, l'analyse n'a pas été faite sur AtNTT2. Cependant les profils de chromatographie étant quasi identique avec AtNTT1, on peut certainement transposer l'analyse faire sur AtNTT1 à AtNTT2.

Des informations complémentaires sont nécessaires pour déterminer de manière fiable l'état d'association de la protéine en détergent et la quantité de détergent lié. En effet, il faut connaître le δn/δc du LAPAO et de la protéine et leurs coefficients d'extinction. Seule l'analyse par ultracentrifugation peut permettre de répondre à cette question.

## B. Analyse par ultracentrifugation analytique

L'ultracentrifugation analytique est une méthode qui apporte des informations sur l'homogénéité, la stœchiométrie, la forme des molécules,... Elle consiste à observer à l'aide de deux détecteurs, l'absorbance et l'interférence (sensibles aux variations d'indice de réfraction), le mouvement de macromolécules en solution soumises à une force centrifuge.

Les différentes formes oligomériques sédimentent à des vitesses différentes, en fonction de leur forme, de leur densité et de leur masse. Cela permet de séparer les monomères, des dimères et autres états d'oligomérisation plus importants. L'ultracentrifugation analytique permet aussi de déterminer la quantité de détergent dans les complexes protéine-détergent.

La sédimentation d'une macromolécule est caractérisée par un coefficient de sédimentation qui reflète la vitesse de déplacement de la particule, et par un coefficient de diffusion qui traduit la capacité de la particule à diffuser. La sédimentation dépend aussi de l'interaction des particules en solution.

L'oligomérisation de la protéine et la quantité de détergent lié peuvent être déduite des paramètres décrits ci-dessous :

- Le coefficient de sédimentation, s, dépend de la masse molaire de la particule MW, de son volume partiel spécifique (inverse de la densité) et de sa taille ($R_H$ son rayon de Stokes), et de la densité (ρ), et de la viscosité du solvant (η).

  Equation de Svedberg $S = \frac{MW(1-\rho v)}{N_A 6\pi\eta R_H}$

  Pour des particules ayant la même forme, les rapports suivants peuvent être calculés pour appuyer l'état d'association observé :

  (1) $\frac{S_{\dim ère}}{S_{monomère}} = 1{,}6$ et (2) $\frac{S_{trimère}}{S_{monomère}} = 2{,}1$

- Le coefficient de diffusion est lié au rayon de Stokes ($R_H$).
- $f/f_{min}$ : permet de comparer le coefficient de friction (rayon de Stokes) au coefficient de friction minimum qu'aurait une particule ayant une forme de sphère compacte. Ce rapport permet d'évaluer la forme de la molécule en solution
- $B_{det}$, la quantité de détergent lié, est déterminée par le rapport J/A avec J le nombre de frange et A, l'absorbance.

Le tableau 3.4. résume les informations disponibles pour chaque élément de l'échantillon (protéine et détergent) et nécessaires à la détermination de l'oligomérisation et de la quantité de détergent.

| | ***At*NTT1** | ***At*NTT2** | **LAPAO** |
|---|---|---|---|
| MW (kDa) | 60 | 55,4 | 0,3 |
| V bar (mL/g) | 0,757 | 0,753 | 1,002 |
| $\varepsilon_{280}$ (mL/mg/cm) | 1,512 | 1,5 | 0,009 |
| δn/δc (mL/g) | 0,189 | 0,189 | 0,134 |

| | **s** | **$f/f_{min}$** | **$B_{det}$ (g/g)** | **Rapport J/A** | **MW (kDa)** |
|---|---|---|---|---|---|
| **NTT1** | 1,9S | 1,25 | 0,79 | 2,94 | 75 |
| | 3,4S | | | | 179 |
| **NTT2** | 1,7S | entre 1,25 et 1,28 | 1 | 3,3 | 110 |
| | 2,4S | 1,45 | 1,75 | | 268 |
| | 3,4S | 1,25 | 1 | | 313 |

*Tableau 3.4. Résumé des différentes données connues et obtenues pour AtNTT1, AtNTT2 et LAPAO. Le tableau (A) rassemble les informations théoriques sur les éléments de l'échantillon. Le tableau (B) rassemble les informations calculées lors de l'analyse des résultats.*

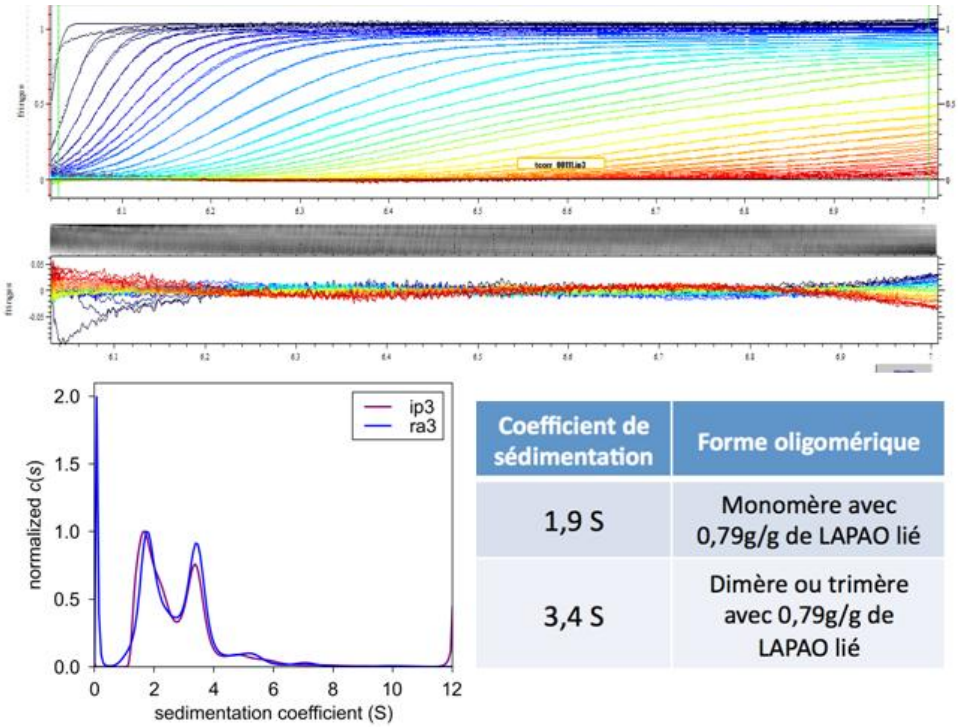
La figure 3.22. montre les résultats obtenus pour *At*NTT1 et *At*NTT2 en LAPAO.
Le LAPAO possède une flottaison faible (-1S) prise en compte dans l'analyse. En effet, le volume partiel spécifique du détergent est légèrement supérieur à 1 (sa densité est légèrement inférieure à celle du solvant)

Pour *At*NTT1, la protéine purifiée en LAPAO se retrouve sous deux formes sédimentant à 1,9S et 3,4S à 4°C, en quantité égale (Figure 3.22.A), Tableau 3.4.B)). La protéine ne semble pas préférer une forme plutôt que l'autre. *At*NTT1 a soit atteint un équilibre entre ces deux formes soit les deux formes sont stables séparément. Les distributions de coefficient de sédimentation se superposent en absorbance et interférence donc la quantité de détergent associée pour les formes monomériques et dimériques est similaire et relativement faible (0,8 g/g). En effet, le ratio est plus faible que celui publié par Deniaud et al. (Deniaud et al., 2012) à savoir 1,9 g de LAPAO lié pour 1 g de protéine.
En considérant un monomère globulaire compact liant 0,8 g/g de LAPAO, on calcule à 4°C, s=1,8S. Nous attribuons donc ce pic à un monomère. Le même calcul pour un dimère ou un trimère donne s=3S ou 4S. Le second pic pourrait donc correspondre au dimère ou trimère.

D'après la Figure 3.22 B), *At*NTT2 est aussi présente sous différentes formes oligomériques. On retrouve une contribution à 1,7S, raisonnablement le monomère, et un pic à 3,4S aussi observé pour *At*NTT1. Une troisième forme apparaît possiblement à 2,4S, et pourrait correspondre à un dimère anisotrope (Tableau 3.4.B).

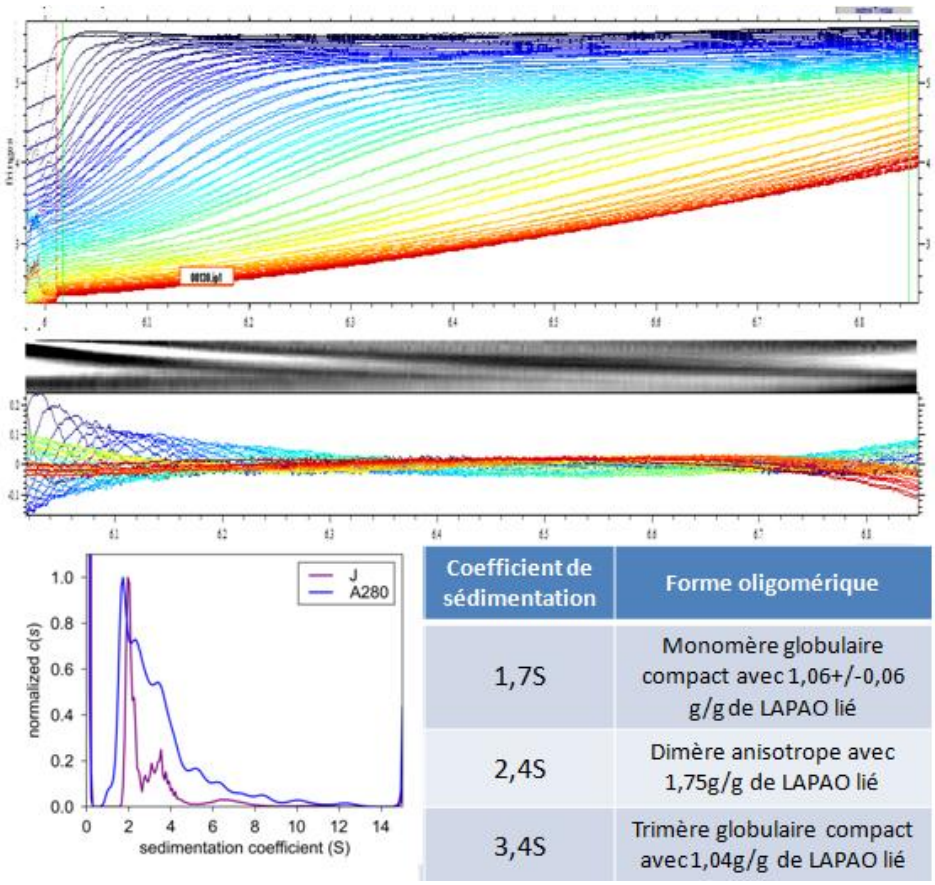
Dans le cas de *At*NTT2, les rapports décrits page 81 sont calculés. En effet, le rapport (1) est de 1,4 et le rapport (2) est de 2. Les rapports expérimentaux étant très proches des rapports théoriques, ils appuient les conclusions faites sur l'oligomérisation d'*At*NTT2. Cependant, la présence de ces 2 ou 3 formes oligomériques montre que la protéine ne favorise pas une forme plutôt qu'une autre. Cette hétérogénéité pourrait être un problème pour la cristallisation, cela pourrait perturber l'organisation du cristal. Seule une amélioration de la purification est capable de modifier le profil obtenu.

La quantité de détergent associé varie en fonction de la forme oligomérique entre 1,06 g (monomère, trimère) à 1,75 g (dimère) de LAPAO lié pour 1 g de protéine (Tableau 3.4.B).
Dans le cas d'*At*NTT2, d'autres détergents ont été testés tels que le DDM. Le profil obtenu avec ce détergent montre une très grande quantité d'agrégats.




| Coefficient de sédimentation | Forme oligomérique |
|---|---|
| 1,9 S | Monomère avec 0,79g/g de LAPAO lié |
| 3,4 S | Dimère ou trimère avec 0,79g/g de LAPAO lié |

(A)




(B)

*Figure 3.22 : Analyse par ultracentrifugation pour AtNTT1 (A) et AtNTT2 (B). Les panneaux en haut montrent la superposition des profils de sédimentation et de leur modélisation par l'analyse SEDFIT (Schuck, 2003). L'analyse est faite en considérant une distribution de coefficients de sédimentation, et aussi une espèce flottante, la micelle de LAPAO.*

*Les panneaux intermédiaires indiquent la qualité du fit. Les panneaux du bas montrent les distributions de coefficients de sédimentation, obtenus à 280nm (bleu) ou par interférence (violet). Les panneaux en bas à droite résument les résultats et leur interprétation.*

## VI. Stabilité de la protéine

### A. Stabilité thermique

La protéine réagit à son environnement. En effet, le pH, le détergent, les ions modifient sa stabilité. Pour mesurer cette stabilité, la technique décrite par Alexandrov (Alexandrov et al., 2008) a été utilisée. Elle consiste à mesurer l'augmentation de fluorescence due à la liaison

entre les cystéines de la protéine et le CPM (fluorophore) au cours de la dénaturation thermique de la protéine.

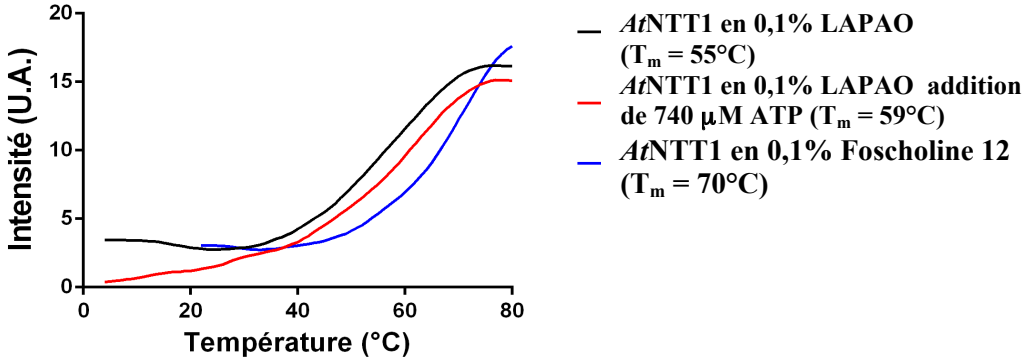
En effet, la protéine va se déplier lors de la dénaturation et permettre aux cystéines jusqu'alors enfouies d'être disponibles pour le fluorophore.

Les *At*NTTs possèdent six cystéines dont cinq sont prédites dans les hélices transmembranaires (Cf Figure 1.6), l'augmentation du signal observée correspondra donc à l'exposition des différentes cystéines.

Dans le cas de *At*NTT1, l'influence du détergent et de la présence d'ATP a été testée sur la protéine. La figure 3.23 montre l'importance du choix du détergent. En effet, le $T_m$ obtenu lorsque la protéine est solubilisée et purifiée en 0,1% de Foscholine 12 est de 70°C alors que lorsque la protéine est solubilisée en Foscholine 12 mais purifiée en 0,1% LAPAO le $T_m$ est de 55°C. Le détergent peut donc interagir fortement avec la protéine et la stabiliser. Cependant, les mesures de fluorescence ont montré que le choix de la Foscholine 12 ne semble pas le meilleur pour la purification de la protéine. En effet, la protéine ne semble pas pouvoir lier l'ATP. La protéine ainsi stabilisée est-elle dans une conformation qui ne serait pas capable de lier l'ATP ? Le détergent gênerait-il la liaison ? La protéine stabilisée n'est-elle pas fonctionnelle ?

L'addition d'un excès d'ATP entraîne un gain de 4°C lorsque la protéine est en LAPAO. Il est possible que le nucléotide se loge dans la cavité et stabilise une conformation. Ceci confirmerait que la protéine purifiée en LAPAO est fonctionnelle.

**Stabilité thermique de *At*NTT1 solubilisée en 1% Foscholine 12 puis purifiée en différents détergents**



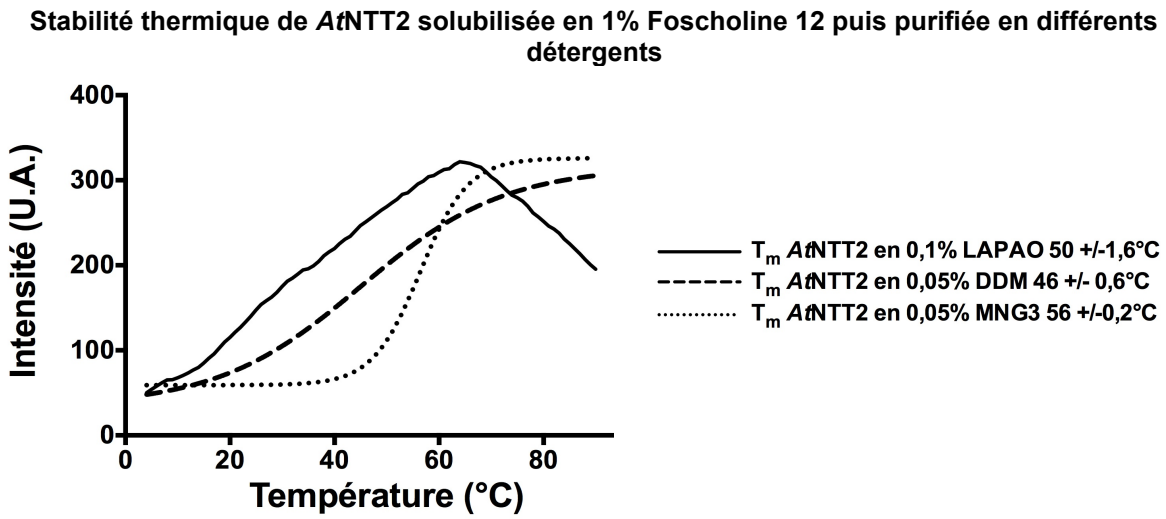



*Figure 3.23 : Mesure de la stabilité thermique en fonction des détergents pour AtNTT1 et AtNTT2. La mesure du Tm obtenu pour AtNTT1 en LAPAO, AtNTT2 en LAPAO, AtNTT2 en MNG3 a été répété au moins 2 fois. L'effet des nucléotides a aussi été observé chez AtNTT2.*

Dans le cas de *At*NTT2, différents détergents sont testés. Comme précédemment, la protéine est solubilisée en Foscholine 12 puis purifiée dans les différents détergents par échange sur les colonnes d'affinité. Cela permet de déterminer quel est le détergent qui permet de mieux stabiliser la protéine.

La Figure 3.23 montre tout d'abord que *At*NTT2 a un $T_m$ légèrement plus faible que *At*NTT1 dans le même détergent.

Le DDM donne un $T_m$ plus faible, avec une courbe montrant deux pics. Le premier pic pourrait correspondre à un état intermédiaire de dénaturation de la protéine. Ceci semble concorder avec les différentes observations faites lors de la purification : différentes formes oligomériques présentes dans le pic et une forte agrégation lors de la concentration de la protéine. La protéine ne semble pas apprécier le DDM.

Le MNG3 permet de gagner 6°C par rapport au LAPAO. Ce détergent semble intéressant mais d'une purification à une autre, il est difficile de reproduire le même résultat.

Dans l'objectif de la cristallisation, il semble que le LAPAO soit le meilleur détergent pour *At*NTT2. Ceci est confirmé par les différents tests de fluorescence qui montrent que la protéine est capable de fixer les nucléotides lorsque celle-ci est purifiée dans 0,1% LAPAO.

## B. Susceptibilité de la protéine à la protéolyse

La protéolyse limitée permet d'évaluer la stabilité de la protéine en solution et d'identifier éventuellement des zones flexibles (Deniaud et al., 2009). En effet, les enzymes sont capables de couper les régions qui sont exposées c'est-à-dire les boucles et les régions flexibles lorsque la protéine est bien repliée. La protéolyse limitée a été testée uniquement sur *At*NTT2 car elle a déjà été effectuée sur *At*NTT1 permettant de montrer que les cinq premiers acides aminés étaient flexibles (Deniaud et al., 2011).

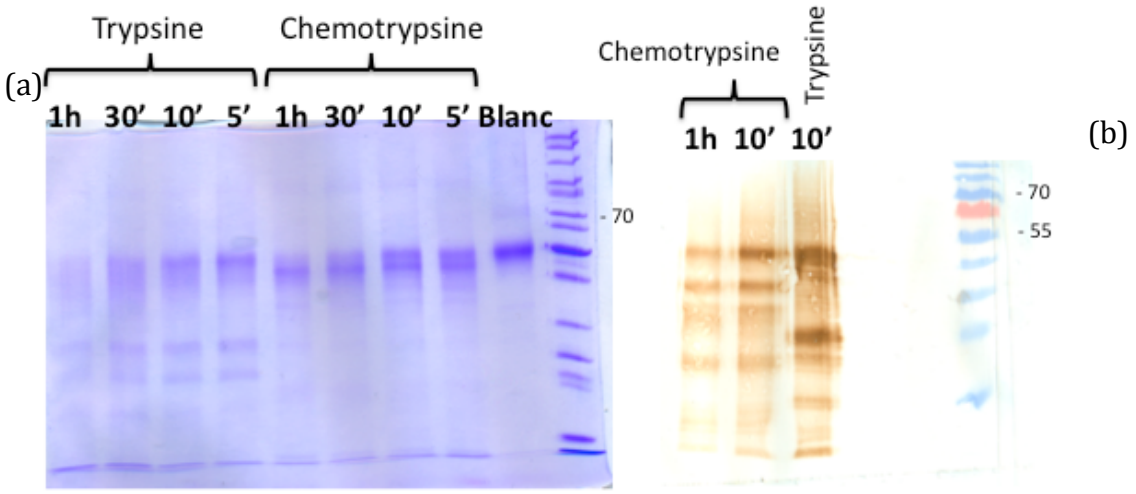



*Figure 3.24 : Protéolyse limitée sur AtNTT2 en 0,1% (w/v) LAPAO*
*(a) Gel SDS PAGE montrant la dégradation de AtNTT2 en fonction des différentes enzymes à différents temps d'incubation (5 µg/mL de chaque enzyme pour 16,3 µg de AtNTT2).*
*(b) Western Blot avec 3 fractions du gel SDS PAGE, révélation avec un anti-corps anti-HIS.*

D'après la Figure 3.24 (a), la trypsine digère très rapidement *At*NTT2, même avec une faible quantité d'enzyme. La protéine est donc très sensible et plutôt instable.

Dans un premier temps, la protéolyse concerne la partie en C-terminale, car en Western blot la bande marquée correspond à la bande la plus importante en gel (Figure 3.24 (b)).

Sous l'effet de la chymotrypsine, deux bandes apparaissent : une à 50 kDa et la seconde à 45 kDa. La première bande possède encore l'étiquette His, la protéolyse se déroule donc aussi du côté C-terminale.

La protéolyse montre que *At*NTT2 en LAPAO n'est pas très stable et qu'il serait probablement nécessaire d'effectuer des constructions plus courtes en C-terminale pour éviter une dégradation de la protéine. En effet, dans de nombreuses purifications, on observe la

présence de 2 bandes qui migrent à une masse moléculaire similaire à *At*NTT2, mais une étant un peu en dessous.

## V. Incorporation en nanodisques

Les nanodisques sont intéressants car ils permettent de créer un ensemble plus stable et plus proche d'un environnement natif. L'incorporation de *At*NTT2 en nanodisques permettrait de créer un environnement plus favorable pour son fonctionnement et de mieux comprendre son mécanisme de transport. De plus, les nanodisques étant très stables et peu affectés par la trypsine, une protéolyse orientée permettrait d'étudier la topologie d'*At*NTT2.

En collaboration avec Yann Huon de Kermadec (étudiant en thèse dans l'équipe), un test d'insertion dans les nanodisques a été réalisé. Les nanodisques consistent en une bicouche lipidique maintenue en solution par une protéine la ceinturant nommée MSP1E3D1 (apolipoprotéine).

La protéine *At*NTT2 en détergent a été mélangée après purification avec les lipides et la protéine d'assemblage. Le détergent a ensuite été éliminé avec des biobeads, ce qui entraîne la formation des nanodisques et l'insertion de la protéine membranaire dans certains nanodisques (Figure 3.25).

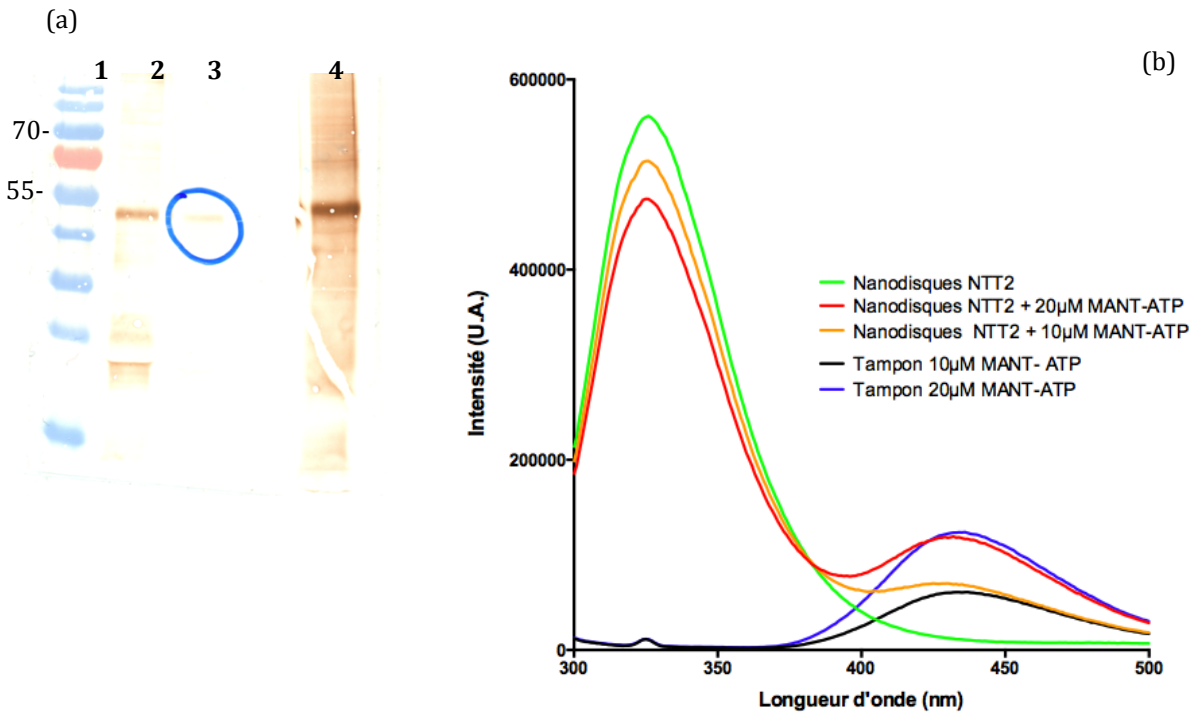



*Figure 3.25 : Vérification de l'intégration d'AtNTT2 en nanodisques.*

*(a) Western Blot révélé par un anticorps anti-His.*

*1. Marqueur de masses moléculaires, donné en kDa*

*2. Nanodisques-AtNTT2 après filtration*

*3. Nanodisques-AtNTT2 après chromatographie d'exclusion*

*4. AtNTT2 en détergent*

*(b) Mesure du FRET sur les nanodisques contenant AtNTT2.*

La Figure 3.25 a. nous montre que *At*NTT2 est insérée dans les nanodisques. En effet, la chromatographie d'exclusion permet de séparer les nanodisques et les restes du mélange d'assemblage. Dans les fractions contenant les nanodisques, on retrouve *At*NTT2 (ligne 3, Figure 3.25). Après avoir déterminé que les nanodisques vides ne produisent pas de signal FRET, cette mesure a été effectuée sur les nanodisques contenant *At*NTT2 (Figure 3.25 b.). Cependant, on ne peut observer aucun signal. Ceci est probablement dû à la présence en grande quantité de nanodisques vides. En effet, la fluorescence des trois tryptophanes de la protéine d'assemblage MSP1E3D1 produit un fort bruit de fond, empêchant la lecture de la fluorescence de *At*NTT2.

Pour éviter cela, il est judicieux d'essayer au préalable de purifier les nanodisques contenant *At*NTT2 par chromatographe d'affinité (grâce à l'étiquette HIS de *At*NTT2 en supposant que celle-ci reste disponible une fois *At*NTT2 intégrée dans les nanodisques) et ainsi éliminer les

nanodisques vides. La Figure 3.26 représente l'essai d'une purification par chromatographie d'affinité après formation des nanodisques. La piste 1 montre que cette purification est possible grâce à l'étiquette His. Cependant les nanodisques contenant NTT2 ne supportent pas bien un long contact avec l'imidazole. Des modifications sont donc encore à apporter pour obtenir des nanodisques pures stables.

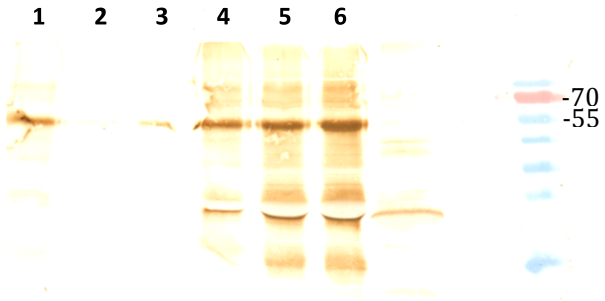



*Figure 3.26: Western Blot avec les différentes fractions de chromatographie d'affinité avec les nanodisques AtNTT2.*

*1) Elution de la colonne de chromatographie d'affinité*

*2) et 3) Lavages de la colonne de chromatographie d'affinité*

*4) Fraction non retenue sur la colonne de chromatographie d'affinité*

*5) Nanodisques AtNTT2 après filtration*

*6) Nanodisques AtNTT2 avant filtration*

Toutefois, il n'est pas acquis que l'enrichissement des nanodisques contenant la protéine *At*NTT2 soit suffisant pour se débarrasser du bruit de fond induit par les tryptophanes de la protéine MSP1E3D1. Pour y remédier, une nouvelle construction de MSP1E3D1 sans tryptophane est envisagée, La faisabilité de ces constructions est fortement appuyée par l'article (Prieto and Garda, 2011) qui montre que le remplacement des tryptophanes par la phénylalanine n'a pas d'impact sur la formation de nanodisques.

Dans le but de faire une étude topologique de la protéine *At*NTT2, plusieurs étapes sont donc à effectuer :

- l'insertion d'*At*NTT2 dans les nanodisques
- la purification des nanodisques contenant *At*NTT2
- la trypsination des nanodisques vides (contrôle) et des nanodisques contenant *At*NTT2
- l'étude par spectrométrie de masse des différents peptides coupés par la trypsine et non protégés par le nanodisque.

Les deux premières étapes sont déjà validées. Les deux dernières sont en cours d'optimisation. Des premiers essais ont déjà été effectués sur les nanodisques vides.

## VI. Essais de cristallisation

Les essais de cristallisation ne peuvent démarrer que lorsque la protéine produite répond à un certain nombre de critères, en particulier quand les paramètres suivants sont contrôlés :

- la quantité de protéines produites et la concentration finale
- la pureté de l'échantillon final
- la quantité de détergent dans l'échantillon final (Cf Annexe 4)
- la fonctionnalité et stabilité de la protéine

Le protocole de purification de *At*NTT2 a été optimisé dans ce sens et des premiers essais de cristallisation ont été réalisés.
Dans un premier temps, il est nécessaire de tester différentes conditions afin de déterminer les sels et précipitants qui conviennent à la protéine.

Dans le cas de *At*NTT2, plus de 390 conditions ont été testées grâce au robot HTX de la plateforme de cristallisation du PSB. Différentes concentrations en protéine ont été utilisées : 3,5 mg/mL, 7 mg/mL, 8,5 mg/mL et 11 mg/mL. Aucun cristal n'est apparu dans les plaques à 3,5 mg/mL et 7 mg/mL. La concentration n'est donc probablement pas suffisante.
Il est aussi important de connaître la quantité de détergent car une trop grande quantité perturberait la formation des cristaux. La quantité de LAPAO varie entre 0,1% pour 3,5 mg/mL et 1% pour 8,5 mg/mL et ne semble pas perturber la formation de cristaux.
Les premiers cristaux sont apparus d'après une protéine concentrée à 8,5 mg/mL avec 1% de LAPAO.
Deux conditions se sont avérées intéressantes avec la formation de petits cristaux ou formation cristalline. Ces formations sont apparues après 15 jours à 20°C
Ces micro-cristaux ont été obtenus à partir de différentes purifications de *At*NTT2. La pureté d'une purification à l'autre semble très similaire une fois que les protéines sont suffisamment concentrées.

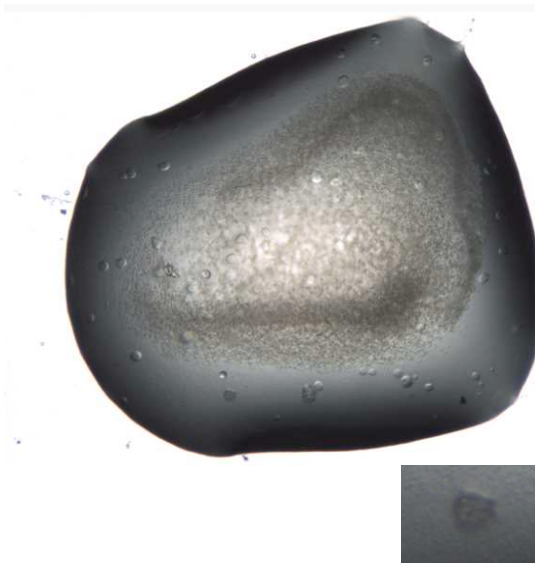
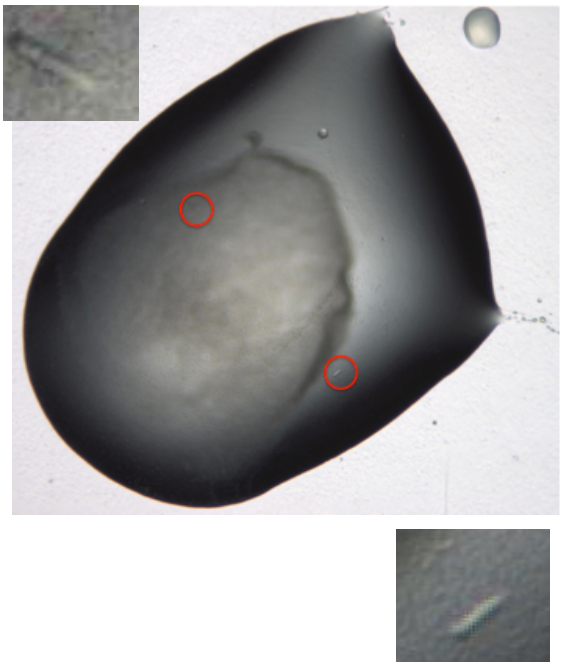
| *0,2M sodium thiocyanate, 20% PEG 3350* | *0,2M sodium formate, 20% PEG 3350* |
|---|---|
|  |  |

*Figure 3.27 : conditions testées pour AtNTT2 (9 mg/mL) grâce au robot HTX Lab, EMBL, Grenoble*

Afin de confirmer les conditions favorables, des gouttes ont été réalisées manuellement afin d'obtenir des cristaux de taille plus importante. Dans les deux cas, des cristaux sont apparus mais étaient trop petits (5-10 micron) et n'ont pas pu être pêchés.

Des optimisations ont été effectuées autour de ces conditions en faisant varier les concentrations en sel et précipitant mais ces modifications n'ont pas amélioré la qualité des cristaux. Des nouveaux essais doivent être entrepris.

# Discussion

# Chapitre 4 : Discussion

## I. Production des NTT chloroplastiques

### A. Première étape de la purification : la surexpression

La surexpression des protéines membranaires est un point clé des études structurales. Il faut en effet, déterminer le système d'expression favorable qui permet d'obtenir une protéine fonctionnelle et en quantité suffisante.
Il semble que la surexpression des NTTs chloroplastique en système *E.coli* réponde favorablement aux critères cités ci-dessus :

- d'après les *Western blot* effectués sur une préparation de membrane, la quantité exprimée dans les membranes est satisfaisante
- d'après les tests avec l'ATP radiomarqué, la protéine insérée dans les membranes est fonctionnelle.

Un autre système de production a été testé en parallèle afin de faciliter certains points problématiques du protocole tels que le rendement et la préparation de membrane : l'expression en système acellulaire (cell free). Cette méthode consiste en un système de production in vitro permettant de contourner des difficultés techniques telles que l'insertion dans les membranes et la toxicité des protéines surexprimées.
Cependant, la mise en œuvre du système classique de *E.coli* étant plus simple (ne nécessite pas de changement de vecteur et moins onéreux) et répondant aux critères de surexpression, il a été privilégié au cours de la thèse.

### B. L'impact des détergents : cas de la Foscholine

L'enjeu principal de la production de protéines membranaires est de produire une protéine en bonne quantité, stable, pure et fonctionnelle. Pour répondre à cet enjeu, le protocole de

purification a été optimisé. Cependant, dans le cadre des protéines membranaire le problème majeur concerne le choix du détergent durant les différentes étapes.

Au cours de ma thèse, le protocole de purification a été modifié à partir d'un protocole établi par Pankaj Panwar. En effet, ce protocole ne permettait pas de reproduire les purifications entre elles. Le produit final était aléatoire et ne permettait pas d'envisager les essais de cristallisation. Pour améliorer l'étape de solubilisation, un nouveau criblage a été effectué afin d'évaluer les détergents qui permettaient d'extraire un maximum de protéines de la membrane. La famille des Foscholine s'est avérée très efficace (Figure 3.1 pour *At*NTT1 et Figure 3.7 pour *At*NTT2).

Cependant, on peut se demander si l'utilisation d'un détergent aussi puissant est nécessaire et n'impacte pas l'activité et le repliement de la protéine. Ainsi M. Zoonens et collaborateurs (Zoonens et al., 2013) ont montré que la Foscholine 12 était un détergent trop fort qui interfère avec la structure d'UCP2. Les queues hydrophobes se seraient introduites entre les hélices transmembranaires induisant une dénaturation partielle de la protéine en détergent tout en préservant le réseau d'interaction formé par la protéine et son inhibiteur.

De même, la protéine SERCA purifiée en foscholine n'est plus active même après échange contre un autre détergent (communication personnelle de Marc Le Maire).

Ces quelques exemples mettent en avant la criticité du choix de détergent. L'effet peut être plus ou moins important en fonction de la protéine étudiée. Toutefois, il est référencé dans la base de donnée PDB quelques structures de protéines pour lesquelles la Foscholine a été utilisée avec succès dans les protocoles de purification et de cristallisation :

- La protéine transporteur de zinc (YiiP, protéine en hélices alpha) a été purifiée en DDM mais dans le réservoir de cristallisation, la Foscholine 12 était présente (Lu and Fu, 2007)
- La monoamine oxydase A (MAO, protéine monotopique) du rat a été extraite et purifiée grâce à la Foscholine 12. Lors de l'étape de cristallisation, l'addition de 0,8% de dimethyldecylphosphine est cependant nécessaire (Ma et al., 2004)
- Une porine de la membrane externe Omp F (tonneau beta) a été extrait, purifié et cristallisé en Foscholine 12 (Kefala et al., 2010). Il est connu que les protéines en hélices alpha sont moins robustes que celles en tonneau beta.
- Le canal mécanosensitif MsC (protéine en hélices alpha) a été extrait, purifié et cristallisé en Foscholine 14 (Bass et al., 2002). MsC est un tétramère, la Foscholine 14 ne perturbe donc pas les liaisons, pourtant relativement faibles, entre les monomères.

Une fois les NTTs chloroplastiques purifiées, des tests d'activités ont montré que la protéine purifiée uniquement en Foscholine 12 n'est pas active ce qui rejoint les observations faites pour SERCA. Si la protéine est extraite en Foscholine 12 puis le détergent est échangé, on observe à nouveau une fixation de nucléotides. Mais est ce suffisant ? Comme décrit dans l'article de Zoonens (Zoonens et al., 2013), il est possible que la protéine soit encore capable de fixer tout en étant partiellement dénaturée. Cet effet ne serait probablement pas visible par la méthode de stabilité thermique car la dénaturation n'impacterait pas suffisamment la structure pour faire apparaître les cystéines enfouies.
L'autre possibilité est que l'échantillon final en fin de purification ne soit pas 100% homogène et contienne une partie des protéines actives et une autre dénaturée. Les techniques disponibles mesurant l'activité ne sont pas capables de mesurer cet effet. L'hétérogénéité peut s'expliquer par le fait que ce détergent étant très fort, il est capable de solubiliser la majorité des protéines, et sans doute aussi celles qui ne sont pas bien repliées.

## C. Le choix du détergent : Le LAPAO

De part les différents problèmes rencontrés avec la Foscholine 12, il serait peut être nécessaire de s'affranchir de ce détergent. Pour cela, il faut alors lui trouver un compromis. Des tests avaient déjà été effectués en utilisant le LAPAO pour extraire la protéine des membranes. En comparant deux purifications avec la même quantité de membrane, l'extraction en Foscholine 12 est beaucoup plus efficace que celle en LAPAO. Le rendement final est donc largement meilleur avec la Foscholine 12. D'après la Figure 3.7 (Chapitre 3 : Résultats), d'autres détergents semblent être capable d'extraire *At*NTT2 tel que LDAO, Cymal 7, Cymal 6, même si l'extraction est moins efficace qu'avec les foscholines. Des essais pourraient être effectués dans un premier temps avec ces détergents.

D'après les tests effectués sur les *At*NTTs, il semble que le LAPAO soit un détergent adapté à la protéine. En effet, la protéine y est stable et est capable de lier les nucléotides.. De plus, il lui permet de se concentrer à une concentration suffisante pour la cristallisation, sans avoir une quantité de détergent finale trop importante. Ce détergent pourrait toutefois être optimisé en modifiant la longueur des chaines alkyl. En effet, il a été montré que la qualité des cristaux de 2,6 Å obtenus avec les alkyl maltosides est largement dépendante de la longueur de la chaine alkyl (Ostermeier and Michel, 1997). En C12-maltoside, la diffraction est de 8 Å alors

qu'en C11-maltoside, la diffraction est de 2,6 Å. Une petite modification chimique peut entrainer une modification essentielle pour la cristallisation.

### D. Les autres possibilités d'amélioration : les lipides

L'extraction des protéines membranaires par les détergents permet d'enlever une partie des lipides contenus dans la membrane. Cependant, certains restent accrocher à la protéine et permet de la stabiliser. Dans le cas de AAC, des cardiolipides fortement liés à la protéine dans la membrane interne des mitochondries sont copurifiés avec AAC. Ils stabilisent la protéine. Ces phospholipides sont probablement aussi impliqués dans l'activité de la protéine (Hoffmann et al., 1994).

Pour améliorer la stabilité de la protéine, il est préférable d'utiliser des lipides venant de l'organisme initial. Dans notre cas, les chloroplastes ont des membranes majoritairement constituées de mono et digalactosyldiacylglycerols. Pour les obtenir, il faudrait purifier ces lipides à partir d'extrait de chloroplastes (effectué par Pankaj Panwar en collaboration avec Maryse Block, PCV Grenoble). Cependant avant d'entamer cette procédure laborieuse, des essais pourront être mis en place avec des lipides commercialisés tel que POPC ou POPE.

## II. Caractérisations biophysiques de l'isoforme *At*NTT2

### A. Etat oligomérique

Il est important de caractériser la protéine produite afin de pouvoir répéter les conditions lorsque celles-ci sont abouties. Les caractérisations biochimiques sont insuffisantes, les caractérisations fonctionnelles difficiles à mettre en œuvre. Dans un premier temps, les caractérisations biophysiques sont nécessaires pour permettre d'évaluer la protéine par rapport à son repliement, à sa stabilité.

Différentes techniques (citées dans le tableau 4.1) permettent d'obtenir des informations sur l'état d'oligomérisation de la protéine mais aussi la quantité de détergent lié. Cela permet d'évaluer l'homogénéité de la solution finale mais surtout l'état fonctionnel de la protéine.

| | MW | | Forme | Quantité de détergent lié |
|---|---|---|---|---|
| | Apparente | Protéine | | |
| SEC | 170 et 260 kDa | N.D. | N.D. | N.D. |
| MALLS | N.D. | 170 à 210 kDa | Monomères avec ajout 1 :1 ADP | 1,8-2,6 g/g |
| | | | Dimères ou trimères avec ajout 1 :1 ADP | 0,6-0,8 g/g |
| AUC | N.D. | N.D. | Monomère globulaire compact | 1,06 +/- 0,06 g/g |
| | | | Dimère anisotrope | 1 g/g |
| | | | Trimère globulaire compact | 1,02 +/- 0,02 g/g |

*Tableau 4.1 : Comparaison des différentes techniques permettant de déterminer la quantité de détergent lié et l'oligomérisation.*

Ce tableau montre que les différentes techniques permettent d'obtenir des informations plus ou moins précises. En effet, la chromatographie d'exclusion donne la masse du complexe apparente sans être capable de faire une différence entre monomère et dimère. Ceci est dû à la résolution de la colonne qui pourrait être améliorée. D'autres colonnes ont été testées au cours de la thèse sans pour autant améliorer de façon significative la résolution. Pour obtenir l'information sur l'oligomérisation, il est donc nécessaire de compléter avec d'autres techniques. Le MALLS apporte des informations sur la dimérisation et la quantité de détergent. Cependant, dans notre cas, des informations sont manquantes sur la protéine empêchant de répondre à la question. En effet, le δn/δc de chaque élément (LAPAO et protéine) n'est pas connu précisément. Dans le cadre de l'analyse MALLS, le δn/δc du LAPAO a été suggéré par une publication et le δn/δc de la protéine estimé par rapport à des protéines ayant la même masse moléculaire. De plus, cette analyse suggère qu'il est possible que la protéine soit liée à un nucléotide. Ceci modifierait alors son coefficient d'extinction et donc l'estimation de sa concentration et de sa masse moléculaire.

Pour déterminer les δn/δc, une analyse par ultracentrifugation serait nécessaire en remplaçant l'eau par du $D_20$. Pour se faire, de nombreux tests et mise au point sont nécessaires car cet élément pourrait être perturbant pour la protéine. Dans notre cas, l'AUC a servi à obtenir des

informations plus précises sur les différentes formes présentes et la quantité de détergent lié à la protéine.

## B. D'autres techniques

D'autres techniques sont utilisées pour compléter les informations biophysiques de *At*NTT2 telles que le FTIR et la microscopie électronique. La microscopie électronique permet d'analyser qualitativement la protéine en fin de purification. Celle-ci est déposée sur une grille puis la coloration négative est appliquée pour l'observation (Exemple en annexe 4). Les images montrent souvent des agrégats plus ou moins gros, des monomères et des supposés dimères. En fin de purification, l'apparition de ces gros agrégats est un point gênant. En effet, une protéine instable aurait tendance à s'agréger au cours du temps. Toutefois ceux-ci peuvent aussi être dû à la coloration utilisée. La protéine pourrait en effet être très sensible à cette coloration et s'agréger sous son impact. Etant donné que l'échantillon est fixé sur la grille, il est possible que ce ne soit pas le meilleur moyen pour représenter l'état oligomérique des protéines.

Le FTIR permet de connaitre la quantité de détergent totale dans la solution : celle liée à la protéine et celle libre sous forme de micelle. Cette information est un point clé pour la cristallisation. Une trop grande quantité de détergent perturberait fortement la formation des cristaux. La quantité mesurée pour *At*NTT2 concentrée jusqu'à 9 mg/mL est de moins de 1%. Cette quantité est raisonnable et ne devrait pas perturber la cristallisation.

Ces caractérisations biophysiques devraient faire partie d'une procédure routinière afin de caractériser les purifications et les étapes qui ont fonctionné dans le but de les reproduire à l'identique (Cf Annexe 5). L'identification des conditions dans lesquelles la protéine est capable de cristalliser est nécessaire pour pouvoir améliorer les cristaux. En effet, il est préférable d'avoir une protéine homogène (monodisperse) ainsi qu'une quantité en détergent faible au départ pour éviter d'avoir des interférences lors de la cristallisation et des problèmes de stabilité avec la protéine (Zoonens et al., 2013).

## C. La stabilité

La stabilité de la protéine dans le temps est un point important à étudier étant donné que la purification et la cristallisation sont des procédures qui durent quelques jours.

La méthode la plus simple pour observer la stabilité est de réinjecter la protéine après plusieurs jours sur la chromatographie d'exclusion. De tels tests ont été réalisés sur *At*NTT2 en la conservant 3 jours à 4°C, non concentrée puis en la réinjectant (données non montrées). Le profil obtenu était alors identique au premier. De la même manière, il a été montré que la protéine supportait très bien la congélation. La protéine non concentrée a été congelée rapidement, puis conservée quelques jours à -80°C. L'échantillon a ensuite été décongelé lentement sur glace puis réinjecté. Le profil obtenu était également identique au premier. Dans les deux cas, la stabilité de la protéine ne semble pas perturbée.

Des informations sur la stabilité de la structure peuvent être apportées par le dichroïsme circulaire qui permet d'observer la structure secondaire de la protéine. Le spectre d'*At*NTT2 montre que la protéine est majoritairement composée d'hélices alpha, comme attendu d'après les prédictions de structures secondaires. De plus, lorsque la protéine subit une dénaturation thermique, il semble que sa structure secondaire soit faiblement perturbée, le plateau de dénaturation n'étant pas atteint même à 95°C (données non montrées). Cependant, les effets de la température sur sa structure tertiaire ne sont pas connus.

La stabilité thermique peut être aussi mesurée grâce à une technique mise au point par Alexandrov (Alexandrov et al., 2008). Cette technique décrite dans matériels et méthodes permet d'observer la dénaturation de la protéine par la liaison du CPM aux cystéines. Chez *At*NTT2, 5 cystéines sur 6 sont prédites dans les hélices transmembranaires. Il est donc nécessaire d'avoir un temps d'incubation initial avec le fluorophore afin d'éliminer l'influence de la cystéine localisée dans une boucle. Bien que cette technique soit intéressante pour effectuer des criblages de conditions, il est important de noter qu'elle n'est pas très reproductible. Les contrôles doivent être répétés à chaque mesure. Ceci est peut-être dû :

- Au fluorophore en lui-même car celui-ci n'est pas très stable et est très photosensible.
- A la présence de détergent qui semble se lier partiellement à ce fluorophore. En effet, il a été montré que plus la concentration en détergent augmentait plus la fluorescence augmentait.
- A la protéine en elle-même. D'une préparation à l'autre, il est possible qu'elle est subisse une dénaturation partielle impactant sa stabilité thermique. En vue d'une

amélioration, il faudrait conserver le même temps entre la purification et les mesures, et le diminuer afin d'éviter de mesurer une possible dénaturation due à cette attente.

De plus, le fluorophore peut interagir avec certains éléments étudiés (molécules étudiées qui pourraient avoir un impact sur la stabilité de la protéine) et masquer l'effet, ou causer un artéfact. Cependant, cette technique requiert une faible quantité de protéine, ce qui permet d'effectuer plusieurs essais en parallèle.
Le CPM est aussi utilisé pour étudier les protéines membranaires dans des conditions plus proches de la membrane, en utilisant la mésophase (LCP), sans empêcher l'étude des molécules sur la protéine (Liu et al., 2010).

## III. Le transport de nucléotides par les NTTs chloroplastiques

Les caractérisations fonctionnelles permettent de vérifier que la protéine purifiée est bien repliée. Dans notre cas, il est aussi intéressant de savoir si le site de liaison est disponible et fonctionnel.

### A. Import d'ATP radiomarqué

Le test de transport grâce à l'ATP radiomarqué permet d'étudier la protéine dans le système d'expression. Cette technique valide les constructions utilisées pour l'expression et permet facilement de connaître l'activité des mutants… Elle permet de caractériser le transport pour chacune des constructions. De plus, cela montre que la protéine est active dans son système d'expression (Schmitz-Esser et al., 2004).
La mise en œuvre de cette approche est facile et rapide : comme décrit dans la partie matériels et méthodes, la seule contrainte est l'utilisation d'un radioélément.

Dans le cas de la protéine purifiée, la caractérisation devient plus complexe. Il est possible de reconstituer les protéines membranaires en liposomes (Rigaud and Levy, 2003). Cependant, cette reconstitution peut s'avérer laborieuse car plusieurs points sont déterminants : la reproductibilité, l'efficacité de l'insertion dans les liposomes, le temps nécessaire à la mise en place du protocole fonctionnel, et ne permet pas de caractériser la protéine à cristalliser. Cette technique étant compliquée, il serait difficile de la faire de manière routinière afin de caractériser chaque batch de protéines purifiées.

## B. Fluorescence des tryptophanes

Il existe d'autres méthodes plus attractives car beaucoup plus simples à mettre en œuvre telles que les mesures de fluorescence des tryptophanes et le FRET. L'avantage des méthodes de fluorescence est la facilité de la mise en œuvre mais aussi la sensibilité. L'observation individuelle des tryptophanes permet de mettre en avant des changements de conformation faibles confirmant que cette méthode est très sensible. De plus, l'étude de la fluorescence des tryptophanes peut permettre d'estimer leur microenvironnement, mais aussi de caractériser une liaison entre un substrat et la protéine. En effet, une technique permet de savoir si les tryptophanes sont enfouis ou non. Pour cela, des désactivateurs ioniques ($I^-$) ou neutre (acrylamide) peuvent être utilisés. Si le signal de fluorescence des tryptophanes en présence de ce désactivateur diminue alors certains des tryptophanes sont exposés. Lors de l'ajout de nucléotide, si une modification du signal est observable alors le tryptophane impliqué est exposé à un milieu polaire (Solomaha and Palfrey, 2005). Une autre méthode simple est de dénaturer la protéine grâce à une forte concentration en urée, et d'observer un déplacement du $\lambda_{max}$. Si celui-ci se déplace vers le rouge alors les tryptophanes sont dans un environnement apolaire. L'ajout d'un surfactant pourrait entraîner un déplacement du $\lambda_{max}$ vers le bleu indiquant que le tryptophane est intégré dans une membrane, micelle…

L'un des problèmes lié à la mesure de fluorescence est la diffusion de la lumière. Il existe deux types de diffusion de lumière : Rayleigh et Raman. Dans le premier cas, l'énergie incidente peut être soustraite et convertie en énergie vibrationnelle et rotationnelle résultant en une énergie plus faible et une longueur d'onde plus élevée. On obtient une faible émission qui pourrait interférer avec la fluorescence de l'échantillon mesuré. Dans le cas de Raman, on observe un décalage en fréquence de la lumière correspondant à un échange d'énergie entre le rayon lumineux et le milieu (PerkinElmer, 2000).

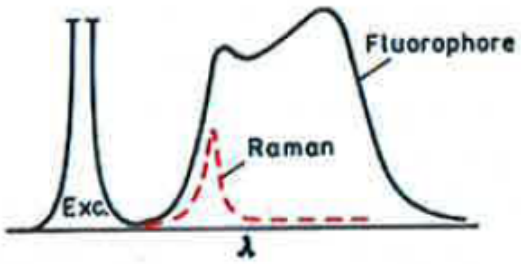



*Figure 4.1 : diffusion de la lumière*

Afin de limiter les interférences de la lumière d'excitation transmise, la fluorescence de l'échantillon est mesurée à 90° par rapport à la lumière d'excitation. Seuls les éléments de l'échantillon peuvent provoquer de la diffusion de lumière (Figure 4 .1).

## C. Modifications possibles

Dans le but d'observer l'effet de chaque résidu tryptophane seul, des mutations peuvent être effectuées afin de les enlever. Cette technique a été mise en avant par Kozachkov (Kozachkov and Padan, 2011) où tous les tryptophanes présents dans la NhaA (un antiporter $Na^+/H^+$) sont mutés. Cette protéine contient huit tryptophanes situés dans la partie membranaire et un à l'interface avec l'eau. Il est possible d'observer avec la protéine native un effet du $Li^+$ (changement de conformation de la protéine en présence de $Li^+$, $Na^+$) cependant celui-ci est relativement faible à cause du bruit de fond des tryptophanes non impliqués dans un changement de conformation. Pour éviter cela, des mutants ont été mis au point en remplaçant les tryptophanes par des phénylalanines (4) et cystéines (2) au lieu des tyrosines qui possèdent un spectre d'excitation/d'émission qui se superpose à celui des tryptophanes. Ils ont testé dans un premier temps si les mutations modifiaient l'expression et l'activité de la protéine. Il s'est avéré qu'aucun des tryptophanes n'est impliqué dans l'activité antiport de NhaA. Cela leur a permis de montrer ensuite que trois tryptophanes sont importants pour la protéine dans sa sensibilité au pH et au $Li^+$.

Dans le cas de *At*NTT1 et *At*NTT2, il serait possible de muter les dix tryptophanes et de « rallumer » un par un les tryptophanes qui pourraient être intéressants. En effet, dans la Figure 1.6, trois tryptophanes apparaissent comme étant très proches des acides aminés connus pour être impliqués dans le transport d'ATP et d'ADP. En « éteignant » les tryptophanes qui n'ont qu'un faible impact sur le transport, la fluorescence observée serait spécifique au transport.

Il est aussi possible d'observer l'effet inverse, observer l'impact sur la fluorescence pour chaque mutation des tryptophanes d'intérêt. En effet, il existe 4 acides aminés connus pour être impliqués dans le transport de l'ATP (Trentmann et al, 2000). A coté de 3 d'entre eux, on retrouve 3 tryptophanes. Dans un premier temps une mutation de ces tryptophanes permettrait d'observer s'ils sont impliqués dans le transport de l'ATP. Pour vérifier si les mutations impactent l'activité, la mesure du transport par radioactivité peut être utilisée, il faudra en parallèle vérifier que ces mutations ne modifient pas l'expression de la protéine.

## D. FRET

Le MANT est un fluorophore largement utilisé. C'est un classique pour les GTPases, les protéines G hétérotrimériques, les GPCRs. Il a la particularité d'avoir une masse moléculaire faible et d'avoir une fluorescence sensible à son environnement. Le TNP est le premier analogue fluorescent de l'ATP utilisé comme substrat pour les protéines G et les protéines liant l'ATP. L'etheno-ATP, quant à lui, est un substrat courant pour les protéines moteurs et les autres protéines liant l'ATP. Cependant ces deux composés ne permettent pas de faire du FRET. Il existe de nombreux autres fluorophores, cependant MANT semble le plus adapté dans le cas des NTTs car il permet d'utiliser les tryptophanes comme fluorophores liés à la protéine. De plus, les spectres d'émission et d'excitation du MANT chevauchent ceux du tryptophane comme décrit dans Matériels et méthodes (Figure 2.1).

Pour *At*NTT, il a été montré que la présence des MANT-ATP, TNP-ATP et Etheno-ATP entraine une compétition avec l'ATP radioactif (Figure 3.14). Ces fluorophores sont donc soit transportés, soit uniquement liés à la protéine. En effet, il est possible que les dérivés de nucléotides se lient à la protéine sans être transportés, cette liaison restant faible et n'inhibant pas le transport totalement. Une autre interprétation serait que les dérivés de nucléotides soient transportés mais de façon moins efficace que le nucléotide lui-même, expliquant ainsi une compétitivité partielle. Etant donné l'encombrement des nucléotides fluorescent, la première hypothèse semble la plus plausible.

L'etheno-ATP entraine une compétition en radioactivité plus importante que les autres nucléotides fluorescents (Figure 3.14). Cependant, les résultats jusqu'alors obtenus ne nous permettent pas de conclure quant à une compétition ou à une inhibition. Mais il est clair que l'etheno-ATP ne se comporte pas de la même manière que les autres nucléotides.

Dans le cadre du FRET, il est nécessaire que le fluorophore se lie au moins à la protéine, le transport n'est pas obligatoire. Une fois cette étape validée, il est possible d'enregistrer le signal FRET entre le MANT-ATP (ou ADP) et les tryptophanes des *At*NTTs.

Lorsque le XTP est ajouté au MANT-XTP, aucune compétition n'est observée. Ces résultats préliminaires semblent contradictoires avec ce qui est observé avec le test d'ATP radiomarqué. D'autres tests seront alors nécessaires pour répondre à cette observation. Cependant, le FRET observé avec le MANT-XTP et MANT-XDP est relativement faible. Il est possible que ce signal puisse être considéré comme du bruit de fond. Les modifications

des tryptophanes de la protéine citées plus haut (III.C.) permettraient d'avoir un signal exclusivement entre le site de fixation et le nucléotide fluorescent.
Des études ont été faites sur l'AAC et les ATP fluorescents. Contrairement à *At*NTT, l'AAC n'est pas capable de transporter certains nucléotides fluorescents tel que le N-ATP (3'-O-naphthoyladenosine 5'-triphosphate). Dupont (Dupont et al., 1982) a montré que le N-ATP était lié à la protéine mais non transporté.
D'après les résultats obtenus avec l'expérience de radioactivité, il est difficile de conclure sur cet aspect pour *At*NTT. En effet, il est possible que la protéine ne transporte que partiellement le nucléotide modifié ou bien qu'elle soit capable uniquement de fixer ce nucléotide.

Au final, au cours de ma thèse, j'ai pu mettre au point une méthode de suivi de liaison des nucléotides avec la protéine. Cela permet de vérifier relativement rapidement que la protéine est bien repliée et est capable de lier les nucléotides.

## IV. Essais de cristallisation

### A. Les résultats préliminaires

Les résultats préliminaires sont encourageants. Ils nous ont permis de déterminer deux conditions qui pourraient être intéressantes (Figure 3.26). Dans les deux cas, il a été possible de reproduire les résultats obtenus en nano volumes par les plateformes robotisées, en micro volumes de façon manuelle. Ces conditions semblent donc être contrôlées. Toutefois, dans la condition contenant du thiocyanate de sodium, les cristaux disparaissent après un certain temps. Les cristaux sont peut-être obtenus dans des conditions hors équilibre. Une optimisation est nécessaire.

Afin d'obtenir des cristaux reproductibles et qui diffractent, il reste de nombreux points à améliorer, notamment au niveau de la purification. En effet, obtenir une purification identique d'une préparation à l'autre est un des points majeurs. La quantité de protéine obtenue en fin de purification semble suffisante pour effectuer plusieurs essais et de déterminer les conditions où des cristaux apparaissent. Des essais de l'impact de différentes concentrations de protéines ont déjà été effectués. Cependant, d'autres tests pourraient être effectués afin de déterminer la concentration limite entrainant la formation de cristaux.

Jusqu'à présent, le protocole de purification semble pouvoir répondre aux critères nécessaires à la cristallisation. En effet, de tous les détergents testés, le LAPAO est le seul qui permette jusqu'à présent de purifier une protéine :

- capable de lier les nucléotides,
- capable de se concentrer jusqu'à 10 mg/mL sans agrégation majeure,
- avec une faible quantité de détergent dans la préparation finale.

Des améliorations dans la purification permettraient peut-être d'améliorer la pureté mais aussi la stabilité de la protéine en détergent. Il serait intéressant de faire un nouveau criblage de détergent.

## B. Une autre méthode

Une méthode de plus en plus utilisée est la phase cubique créée en 1996 (Landau and Rosenbusch, 1996).

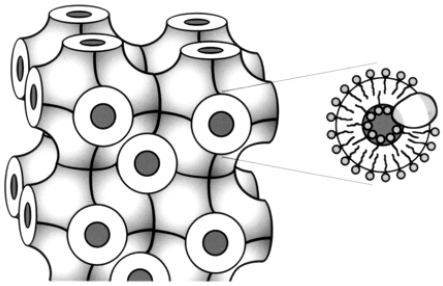


*Figure 4.2 : Modèle de bicouche phase cubique composé de monooléine, d'eau et de membrane protéine. La matrice consiste en 2 compartiments : un système membranaire avec une surface périodique 3D et un système de canaux aqueux continus. La protéine membranaire est insérée dans une bicouche lipidique courbée enveloppant le canal aqueux*

De nombreuses structures ont pu être résolues à haute résolution grâce à cette technique : 157 structures de 47 protéines. La mésophase possède plusieurs avantages :

- A 20°C, la phase cubique est hydratée à 40% (w/w) au maximum, ce qui lui permet d'être très concentrée en lipides et donc en membrane, permettant une meilleure insertion des protéines membranaires.

- La phase cubique a la propriété d'être très visqueuse et collante, elle reste donc en place une fois préparée
- La phase cubique est intrinsèquement poreuse permettant d'avoir chaque côté de la bicouche accessible aux protéines insérées contrairement aux liposomes où seule une face est disponible pour avoir des interactions (Clogston and Caffrey, 2005)

La mésophase forme alors une matrice lipidique, se rapprochant de l'environnement physiologique des protéines membranaires. L'arrangement lipidique proposé par cette phase cubique permet aux protéines de migrer et de former des contacts entre protéines et donc des cristaux. Etant donné les résultats observés avec cette technique avec des protéines difficiles, il serait intéressant d'effectuer des essais de cristallisation avec les *At*NTT.

# Conclusion & perspectives

# Conclusion/perspectives

L'étude entreprise sur la famille des NTTs a pour objectif de déterminer la structure de ces protéines afin de comprendre le transport de l'ATP et ADP à travers les membranes dans les cellules. Pour pouvoir répondre à cet objectif, je me suis focalisée sur l'étude des NTTs chloroplastiques. Des études préliminaires sur NTT1 ont permis d'établir un protocole de surexpression et de purification. Cependant un problème majeur restait à résoudre, le rendement et la reproductibilité de chaque purification. Pour cela, une optimisation de protocoles a été nécessaire au niveau de la surexpression mais aussi de la purification.
Afin de se rendre compte des caractéristiques de chaque purification, des tests de caractérisation ont été mis au point comme tests de routine. Cela permet de déterminer les conditions favorables à la protéine. En parallèle, l'isoforme 2 chloroplastique a été introduite dans un vecteur, surexprimée puis purifiée. Il s'est avéré que le rendement est meilleur que pour NTT1 et les purifications sont plus faciles à reproduire.
Après de nombreuses optimisations, des essais cristallisation ont été entrepris grâce au robot de cristallisation. Des conditions de cristallisation sont ressorties positives avec l'apparition de petits cristaux. Ils ont pu être reproduits dans des microgouttes. Une optimisation de ces conditions doit être entreprise pour améliorer les cristaux et ainsi permettre d'obtenir des cristaux qui diffractent.

Dans l'optique d'avoir la structure de la protéine, un besoin pour une caractérisation fonctionnelle de la protéine en détergent s'est fait ressentir. Pour cela, un protocole de mesure de fluorescence (tryptophane et FRET) a été mis au point. Cette méthode permet de savoir si la protéine est intacte et est donc toujours capable de lier son substrat dans les conditions de purification utilisées. Etant donné la faible quantité en protéine nécessaire, elle permet de comparer différentes condition et donc de sélectionner les meilleures conditions pour la protéine. Les caractérisations biophysiques permettent de confirmer les conditions.

Afin d'obtenir des cristaux qui diffractent, il reste quelques points à aborder.

- En effet, les conditions obtenues en diffusion de vapeur peuvent être optimisées mais il est aussi possible de tester la phase cubique étant donné que la protéine n'est pas très

stable. Pour augmenter la stabilité de la protéine, des nucléotides pourront être ajoutés (ATP, ATP fluoroscent, Azido-ATP).

- Afin de stabiliser la protéine, il est possible de trouver un inhibiteur potentiel car le composé C3 semble très prometteur. Des dérivés de ce composé pourraient être testés afin de trouver le meilleur inhibiteur possible.
- Des essais préliminaires ont déjà été effectués avec le gène NTT2 synthétique. Les modifications apportées à la séquence nucléotidique permettent à la protéine de s'exprimer sans être tronquée sans pour autant modifier les quantités obtenues. Des optimisations sont possibles au niveau de la surexpression.
- Comme proposé dans la discussion, des mutants tryptophanes peuvent être construit afin de valider complètement la méthode de mesure de fluorescence. Dans un premier temps, les mutants sans tryptophane vont être créés puis les tryptophanes seront « rallumés » un par un. Les tryptophanes les plus intéressants sont ceux proches des acides aminés connus pour être impliqués dans le transport de l'ATP et ADP. Ensuite, il faudra tester si la protéine est toujours exprimée au même niveau et si elle est active malgré les mutations. Enfin la protéine mutée sera purifiée puis tester par mesure de fluorescence des tryptophanes et par FRET. Ces mutations permettront aussi d'enlever le bruit de fond produit par les tryptophanes non impliqués dans la liaison avec le substrat.
- La poursuite des travaux avec les nanodisques permettrait de répondre partiellement à la question de structure pour savoir quelles parties de la séquence protéique sont intramembranaires et lesquelles sont extramembranaires. De plus, les nanodisques donnent à la protéine un environnement plus stable. Peut-être pourraient-ils être utilisés pour la cristallisation ?

# Annexes

# Annexes

## ANNEXE 1 : les différentes constructions utilisées

**Construction AtNTT1 (résidu 79 au résidu 624 de la séquence Q39002)**

HHHHHHLESTSLYKKAGS**M**AEAAAAGDGAVFGEGDSAAVVASPKIFGVEVATLKKI
IPLGLMFFCILFNYTILRDTKDVLVVTAKGSSAEIIPFLKTWVNLPMAIGFMLLYTKLS
NVLSKKALFYTVIVPFIIYFGAFGFVMYPLSNYIHPEALADKLLTTLGPRFMGPIAILRI
WSFCLFYVMAELWGSVVVSVLFWGFANQITTVDEAKKFYPLFGLGGNVALIFSGRT
VKYFSNLRKNLGPGVDGWAVSLKAMMSIVVGMGLAICLLYWWVNRYVPLPTRSKN
KKEKPKMGTMESLKFLVSSPYIRDLATLVVAYGISINLVEVTWKSKLKAQFPSPNEYS
AFMGDFSTCTGVATFTMMLLSQYVFNKYGWGVAAKITPTVLLLTGVAFFSLILFGGP
FAPLVAKLGMTPLLAAVYVGALQNIFSKSAKYSLFDPCKEMAYIPLDEDTKVKGKA
AIDVVCNPLGKSGGALIQQFMILSFGSLANSTPYLGMILLVIVTAWLAAAKSLEGQFN
SLRSEEELEKEMERASSVKIPVVSQDESGNGSLGESPSSSPEKSAPTNL

**Construction AtNTT2 (résidu 85 au résidu 588 de la séquence P92935)**

MKHHHHHHHHHPMSDYSIPTENLYFQGAMMVSKGEELNVFDEGDTAAMAVSPKIF
GVEVTTLKKIVPLGLMFFCILFNYTILRDTKDVLVVTAKGSSAEIIPFLKTWVNLPMAI
GFMLLYTKLSNVLSKKALFYTVIVPFIVYFGAFGFVMYPLSNLIHPEALADKLLATLG
PRFMGPLAIMRIWSFCLFYVMAELWGSVVVSVLFWGFANQITTVDEAKKFYPLFGLG
ANVALIFSGRTVKYFSNMRKNLGPGVDGWAVSLKAMMSIVVGMGLAICFLYWWVN
RYVPLPTRSKKKKVKPQMGTMESLKFLVSSPYIRDLATLVVAYGISINLVEVTWKSK
LKAQFPSPNEYSAFMGDFSTCTGIATFTMMLLSQYVFKKYGWGVAAKITPTVLLLTG
VAFFSLILFGGPFAPLVAKLGMTPLLAAVYVGALQNIFSKSAKYSLFDPCKEMAYIPL
DEDTKVKGKAAIDVVCNPLGKSGGALIQQFMILTFGSLANSTPYLGVILLGIVTAWLA
AAKSLEGQFNTLMSEEELEREMERAS

*Légende :*

Protéine d'intérêt

Lien

Etiquette His

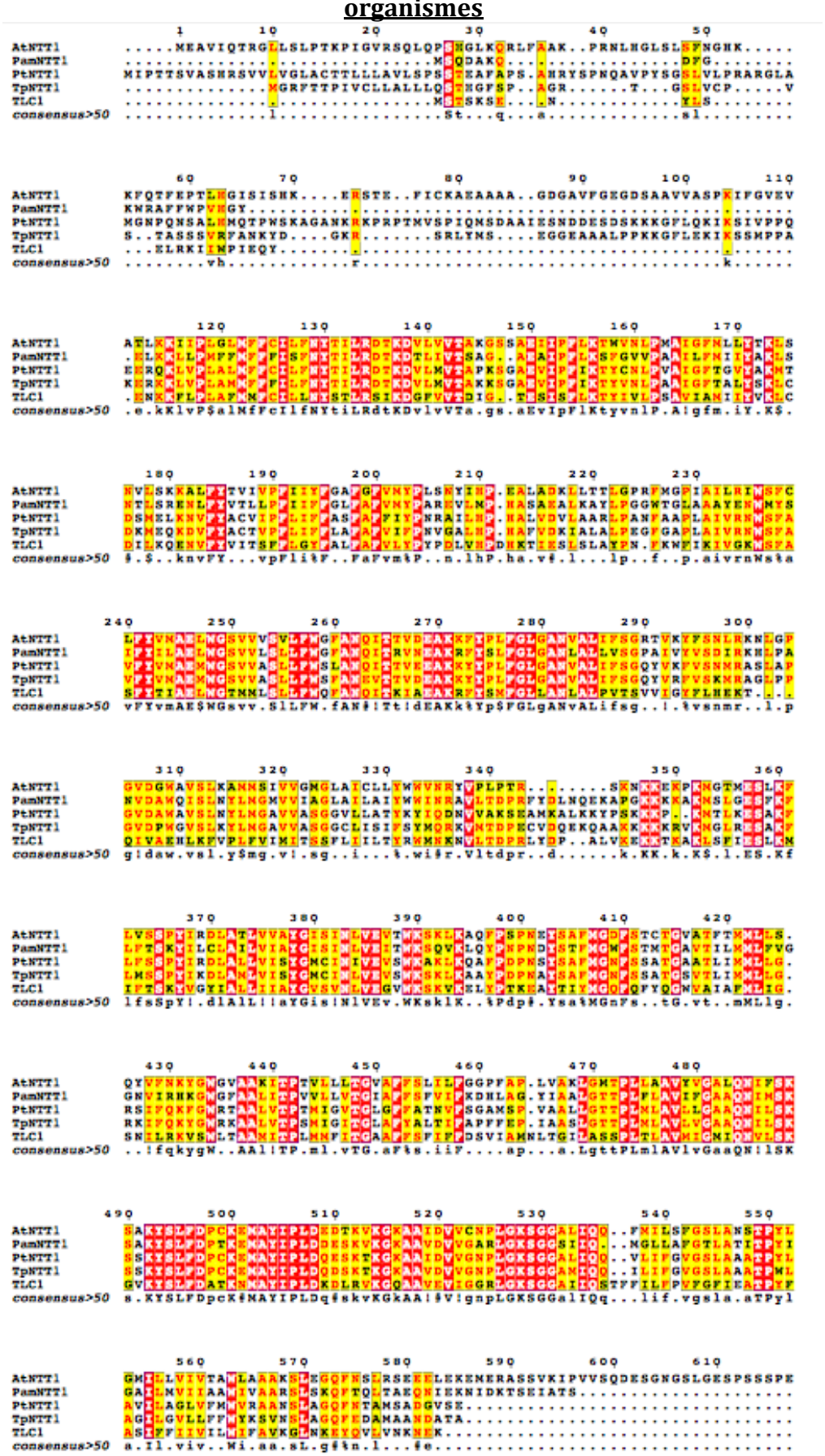
# ANNEXE 2 : Alignement de sequences

## Comparaison des 2 isoformes d'*Arabidospis thaliana* (formes complètes)

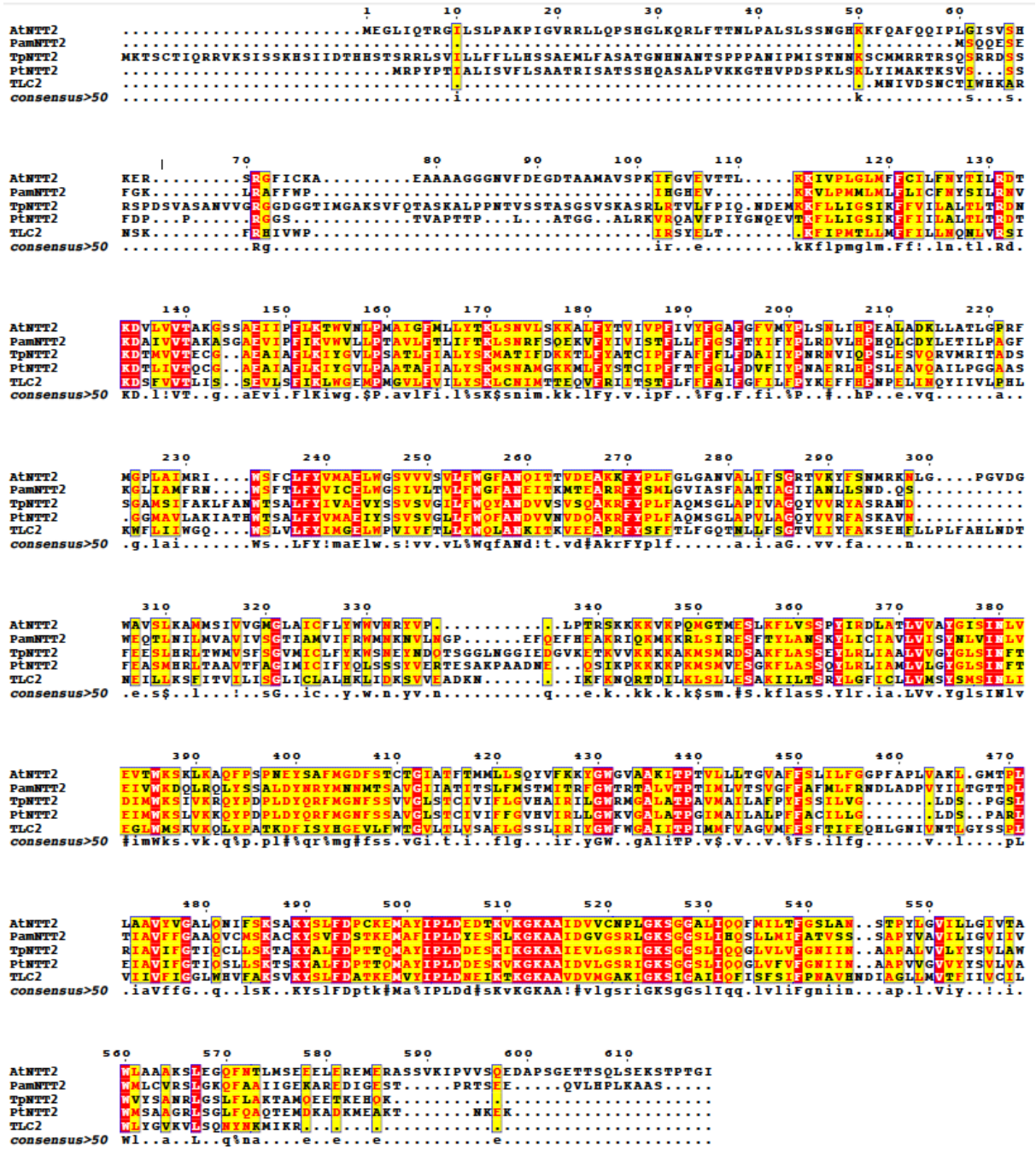
```
                1         10        20        30        40        50        60        70        80        90
AtNTT1          MEAVIQTRGLLSLPTKPIGVRSQLQPSHGLKQRLFAAKPRNLHGLSLSFNGHKKFQTFEPTLHGISISHKERSTEFICKAEAAAAGDGAV
AtNTT2          MEGLIQTRGILSLPAKPIGVRRLLQPSHGLKQRLFTT...NLPALSLSSNGHKKFQAFQQIPLGISVSHKERSRGFICKAEAAAAGGGNV
consensus>50    MEavIQTRGiLSLPaKPIGVRrlLQPSHGLKQRLFaakprNLhaLSLSfNGHKKFQaF#qillGIS!SHKERSreFICKAEAAAAGdGnV

                100       110       120       130       140       150       160       170       180
AtNTT1          FGEGDSAAVVASPKIFGVEVATLKKIIPLGLMFFCILFNYTILRDTKDVLVVTAKGSSAEIIPFLKTWVNLPMAIGFMLLYTKLSNVLSK
AtNTT2          FDEGDTAAMAVSPKIFGVEVTTLKKIVPLGLMFFCILFNYTILRDTKDVLVVTAKGSSAEIIPFLKTWVNLPMAIGFMLLYTKLSNVLSK
consensus>50    FdEGDsAAvvvSPKIFGVEVaTLKKI!PLGLMFFCILFNYTILRDTKDVLVVTAKGSSAEIIPFLKTWVNLPMAIGFMLLYTKLSNVLSK

                190       200       210       220       230       240       250       260       270
AtNTT1          KALFYTVIVPFIIYFGAFGFVMYPLSNYIHPEALADKLLTTLGPRFMGPIAILRIWSFCLFYVMAELWGSVVVSVLFWGFANQITTVDEA
AtNTT2          KALFYTVIVPFIVYFGAFGFVMYPLSNLIHPEALADKLLATLGPRFMGPLAIMRIWSFCLFYVMAELWGSVVVSVLFWGFANQITTVDEA
consensus>50    KALFYTVIVPFI!YFGAFGFVMYPLSNlIHPEALADKLLaTLGPRFMGPiAI$RIWSFCLFYVMAELWGSVVVSVLFWGFANQITTVDEA

                280       290       300       310       320       330       340       350       360
AtNTT1          KKFYPLFGLGANVALIFSGRTVKYFSNLRKNLGPGVDGWAVSLKAMMSIVVGMGLAICLLYWWVNRYVPLPTRSKNKKEKPKMGTMESLK
AtNTT2          KKFYPLFGLGANVALIFSGRTVKYFSNMRKNLGPGVDGWAVSLKAMMSIVVGMGLAICFLYWWVNRYVPLPTRSKKKKVKPQMGTMESLK
consensus>50    KKFYPLFGLGANVALIFSGRTVKYFSN$RKNLGPGVDGWAVSLKAMMSIVVGMGLAIClLYWWVNRYVPLPTRSKnKKvKPqMGTMESLK

                370       380       390       400       410       420       430       440       450
AtNTT1          FLVSSPYIRDLATLVVAYGISINLVEVTWKSKLKAQFPSPNEYSAFMGDFSTCTGVATFTMMLLSQYVFNKYGWGVAAKITPTVLLLTGV
AtNTT2          FLVSSPYIRDLATLVVAYGISINLVEVTWKSKLKAQFPSPNEYSAFMGDFSTCTGIATFTMMLLSQYVFKKYGWGVAAKITPTVLLLTGV
consensus>50    FLVSSPYIRDLATLVVAYGISINLVEVTWKSKLKAQFPSPNEYSAFMGDFSTCTG!ATFTMMLLSQYVFnKYGWGVAAKITPTVLLLTGV

                460       470       480       490       500       510       520       530       540
AtNTT1          AFFSLILFGGPFAPLVAKLGMTPLLAAVYVGALQNIFSKSAKYSLFDPCKEMAYIPLDEDTKVKGKAAIDVVCNPLGKSGGALIQQFMIL
AtNTT2          AFFSLILFGGPFAPLVAKLGMTPLLAAVYVGALQNIFSKSAKYSLFDPCKEMAYIPLDEDTKVKGKAAIDVVCNPLGKSGGALIQQFMIL
consensus>50    AFFSLILFGGPFAPLVAKLGMTPLLAAVYVGALQNIFSKSAKYSLFDPCKEMAYIPLDEDTKVKGKAAIDVVCNPLGKSGGALIQQFMIL

                550       560       570       580       590       600       610       620
AtNTT1          SFGSLANSTPYLGMILLVIVTAWLAAAKSLEGQFNSLRSEEELEKEMERASSVKIPVVSQDESGNGSLGESPSSSPEKSAPTNL
AtNTT2          TFGSLANSTPYLGVILLGIVTAWLAAAKSLEGQFNTLMSEEELEREMERASSVKIPVVSQEDAPSG...ETTSQLSEKSTPTGI
consensus>50    sFGSLANSTPYLGvILLvIVTAWLAAAKSLEGQFNsLmSEEELEkEMERASSVKIPVVSQ##agnGslgEspSqlpEKSaPTni
```

La numérotation utilisée dans le manuscrit ne tient pas compte de la méthionine en position 1.

## Comparaison de différentes séquences de NTT1 provenant de différents organismes



## Comparaison de différentes séquences de NTT2 provenant de différents organismes

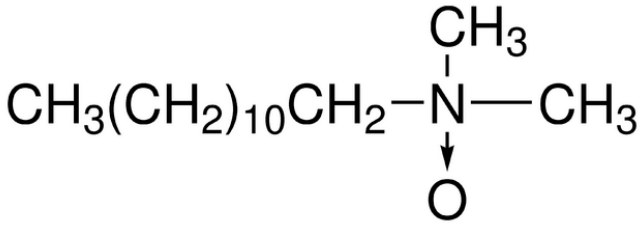



La numérotation utilisée dans le manuscrit ne tient pas compte de la méthionine en position 1.

# ANNEXE 3 : Les détergents

**LDAO**
***N,N*-Dimethyldodecylamine *N*-oxide**

$CH_3(CH_2)_{11}N(O)(CH_3)_2$

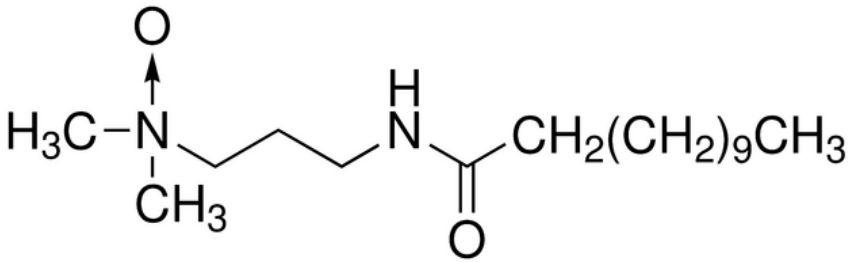



---

**LAPAO**

**3-Lauramidopropyl-N,N-dimethylamine oxide, Dodecylamidopropyldimethylamine oxide**

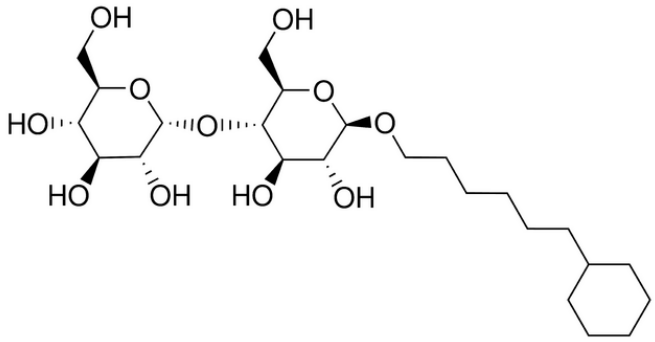
$C_{17}H_{36}N_2O_2$




---

**CYMAL 6**
**6-Cyclohexylhexyl β-D-maltoside**

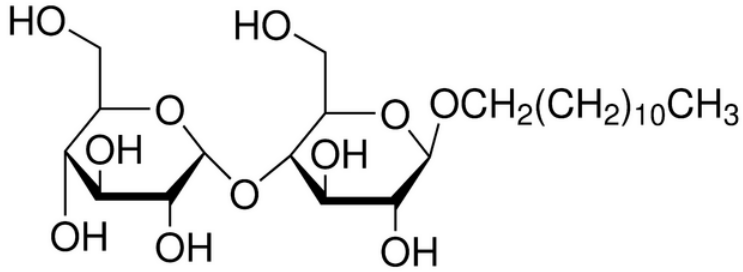
$C_{24}H_{44}O_{11}$




---

**DDM**
***n*-Dodecyl β-D-maltoside,** Lauryl-β-D-maltoside

$C_{24}H_{46}O_{11}$

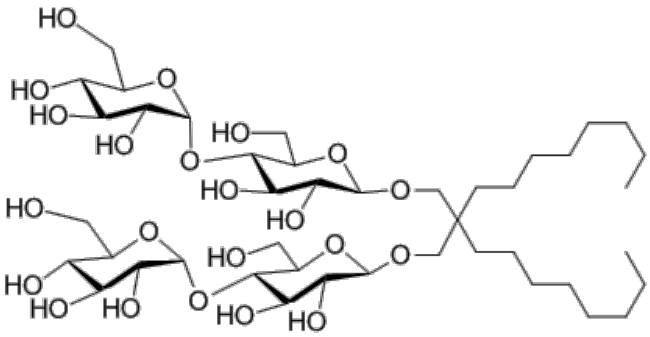



---

**MNG3**

**Decyl Maltose-neopentyl glycol**

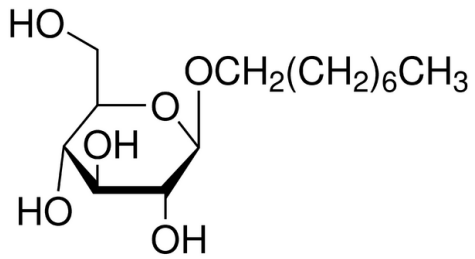
$C_{43}H_{80}O_{22}$



**β-OG**

**Octyl β-D-glucopyranoside**

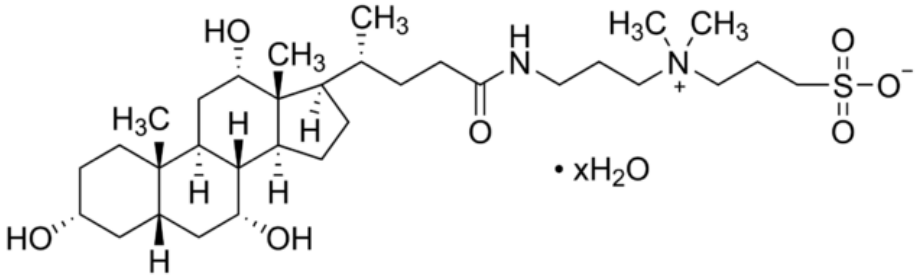
$C_{14}H_{28}O_6$




**CHAPS**

**3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate**

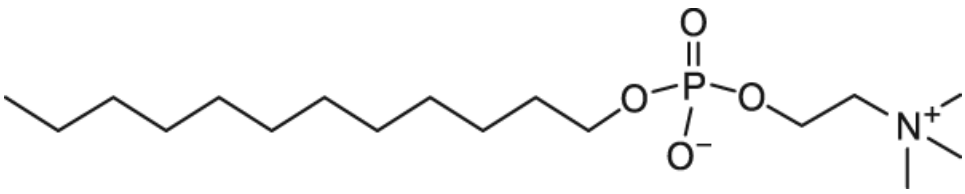
$C_{32}H_{58}N_2O_7S \cdot xH_2O$




**Foscholine 12**

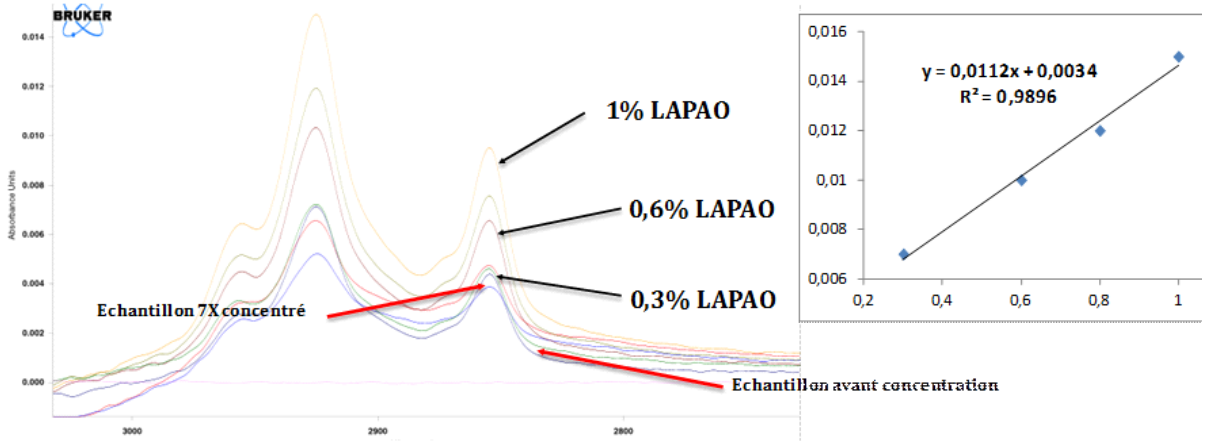
**n-Dodecylphosphocholine (DPD, FC 12, FOS12)**

$C_{17}H_{38}NO_4P$



# ANNEXE 4 : FTIR et Microscopie électronique

**<u>Test de caractérisation</u> : spectrométrie infrarouge avec transformation de Fourier (FTIR)**




Spectre d'infrarouge entre 3000 et 2600 $cm^{-1}$. Les pics sont extraits du spectre complet de l'échantillon. Les différentes courbes correspondent à différentes concentrations en détergent. L'intensité maximale du pic permet d'obtenir la courbe de calibration sur la droite.

**<u>Microscopie électronique</u> : coloration négative de l'échantillon provenant de la purification figure 3.9.**

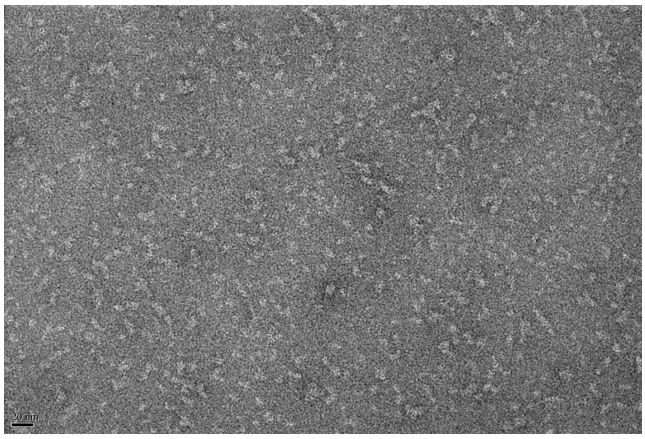
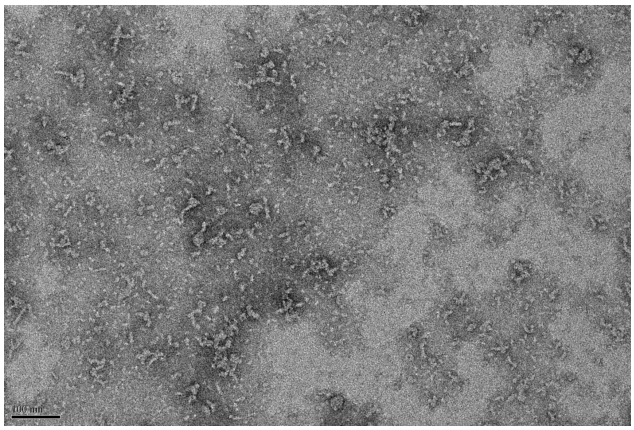


**Photo 1 : L'épaulement du pic correspondant à une fraction plutôt pure.**

**Photo 2 : Le pic principal correspondant à un mélange d'espèce (Cf gel SDS-PAGE)**



**ANNEXE 5 : Résumé des différentes techniques appliquées au 2 isoformes**

| Techniques | AtNTT1 | AtNTT2 | Pourquoi ? |
|---|---|---|---|
| Analyse par utltracentrifugation | X | X | Quantité de detergent lié? Etat oligomérique? |
| Microscopie électronique | X | X | Homogénéité |
| Stabilité thermique | X | X | Dans quelle condition est-elle plus stable? |
| Protéolyse limitée | | X | Flexibilié de la protéine |
| Dichroisme circulaire | | X | Structure secondaire |
| Test de radioactivité | X | X | Détermination des constantes de cinétique et recherche d'inhibiteur |
| Mesure de la fluorescence des tryptophanes | | X | Détermination des constantes de cinétique en détergent. |
| F.R.E.T. | | X | Activité en détergent |
| Nanodisques | | X | Activité ? Topologie ? |

# Bibliographie

# Bibliographie

Alexandrov, A.I., Mileni, M., Chien, E.Y.T., Hanson, M.A., and Stevens, R.C. (2008). Microscale fluorescent thermal stability assay for membrane proteins. Structure *16*, 351-359.

Alexeyev, M.F., and Winkler, H.H. (2002). Complete replacement of basic amino acid residues with cysteines in Rickettsia prowazekii ATP/ADP translocase. Biochim Biophys Acta *1565*, 136.

Amiri, H., Karlberg, O., and Andersson, S.G. (2003). Deep origin of plastid/parasite ATP/ADP translocases. J Mol Evol *56*, 137-150.

Arnold, T., and Linke, D. (2007). Phase separation in the isolation and purification of membrane proteins. Biotechniques *43*, 427-430.

Aronsson, H., Combe, J., and Jarvis, P. (2003). Unusual nucleotide-binding properties of the chloroplast protein import receptor, atToc33. Febs Lett *544*, 79-85.

Ast, M., Gruber, A., Schmitz-Esser, S., Neuhaus, H.E., Kroth, P.G., Horn, M., and Haferkamp, I. (2009). Diatom plastids depend on nucleotide import from the cytosol. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 3621-3626.

Audia, J.P., Roberts, R.A., and Winkler, H.H. (2006). Cysteine-scanning mutagenesis and thiol modification of the Rickettsia prowazekii ATP/ADP translocase: characterization of TMs IV-VII and IX-XII and their accessibility to the aqueous translocation pathway. Biochemistry *45*, 2648-2656.

Audia, J.P., and Winkler, H.H. (2006). Study of the five Rickettsia prowazekii proteins annotated as ATP/ADP translocases (Tlc): Only Tlc1 transports ATP/ADP, while Tlc4 and Tlc5 transport other ribonucleotides. J Bacteriol *188*, 6261-6268.

Bass, R.B., Strop, P., Barclay, M., and Rees, D.C. (2002). Crystal structure of Escherichia coli MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel. Science *298*, 1582-1587.
Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. J Mol Biol *340*, 783-795.

Bidon-Chanal A., K.E., Blot D, Pebay-Peyroula E., Chipot C., Ravaud S., Dehez F. (2013). How Do Membrane Transporters Sense pH? The Case of the Mitochondrial ADP–ATP Carrier. Journal of Physical Chemistry Letters, 4 (21), pp 3787–3791.

Brustovetsky, N., and Dubinsky, J.M. (1999). EDTA-induced monovalent fluxes through the Ca2+ uniporter in brain mitochondria. Ann N Y Acad Sci *893*, 258-260.

Caffrey, M. (2009). Crystallizing membrane proteins for structure determination: use of lipidic mesophases. Annu Rev Biophys *38*, 29-51.

Chae, P.S., Rasmussen, S.G., Rana, R.R., Gotfryd, K., Chandra, R., Goren, M.A., Kruse, A.C., Nurva, S., Loland, C.J., Pierre, Y., *et al.* (2010). Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. Nat Methods *7*, 1003-1008.

Chen, Y., Song, J., Sui, S.F., and Wang, D.N. (2003). DnaK and DnaJ facilitated the folding process and reduced inclusion body formation of magnesium transporter CorA overexpressed in Escherichia coli. Protein Expr Purif *32*, 221-231.

Cherezov, V., Fersi, H., and Caffrey, M. (2001). Crystallization screens: compatibility with the lipidic cubic phase for in meso crystallization of membrane proteins. Biophys J *81*, 225-242.

Clogston, J., and Caffrey, M. (2005). Controlling release from the lipidic cubic phase. Amino acids, peptides, proteins and nucleic acids. J Control Release *107*, 97-111.

Crane R., M.D., Bihler I. (1961). The restrictions on possible mechanisms of intestinal transport of sugars. In Czech Academy of Sciences & Academic Press, 439–449.

Davies, P.A., Pistis, M., Hanna, M.C., Peters, J.A., Lambert, J.J., Hales, T.G., and Kirkness, E.F. (1999). The 5-HT3B subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. Nature *397*, 359-363.

Dehez, F., Pebay-Peyroula, E., and Chipot, C. (2008). Binding of ADP in the mitochondrial ADP/ATP carrier is driven by an electrostatic funnel. J Am Chem Soc *130*, 12725-12733.

Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., and Michel, H. (1985). Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of Rhodopseudomonas viridis at 3A resolution. Nature *318*, 618-624.

Deniaud, A., Bernaudat, F., Frelet-Barrand, A., Juillan-Binard, C., Vernet, T., Rolland, N., and Pebay-Peyroula, E. (2011). Expression of a chloroplast ATP/ADP transporter in E. coli membranes: behind the Mistic strategy. Biochim Biophys Acta *1808*, 2059-2066.

Deniaud, A., Goulielmakis, A., Coves, J., and Pebay-Peyroula, E. (2009). Differences between CusA and AcrB crystallisation highlighted by protein flexibility. PLoS One *4*, e6214.

Deniaud, A., Panwar, P., Frelet-Barrand, A., Bernaudat, F., Juillan-Binard, C., Ebel, C., Rolland, N., and Pebay-Peyroula, E. (2012). Oligomeric status and nucleotide binding properties of the plastid ATP/ADP transporter 1: toward a molecular understanding of the transport mechanism. PLoS One *7*, e32325.

Dolce, V., Scarcia, P., Iacopetta, D., and Palmieri, F. (2005). A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution. Febs Lett *579*, 633-637.

Dubin, A.E., Huvar, R., D'Andrea, M.R., Pyati, J., Zhu, J.Y., Joy, K.C., Wilson, S.J., Galindo, J.E., Glass, C.A., Luo, L.*, et al.* (1999). The pharmacological and functional characteristics of the serotonin 5-HT(3A) receptor are specifically modified by a 5-HT(3B) receptor subunit. J Biol Chem *274*, 30799-30810.

Dupont, Y., Brandolin, G., and Vignais, P.V. (1982). Exploration of the nucleotide binding sites of the isolated ADP/ATP carrier protein from beef heart mitochondria. 1. Probing of the nucleotide sites by Naphthoyl-ATP, a fluorescent nontransportable analogue of ATP. Biochemistry *21*, 6343-6347.

Gigolashvili, T., Geier, M., Ashykhmina, N., Frerigmann, H., Wulfert, S., Krueger, S., Mugford, S.G., Kopriva, S., Haferkamp, I., and Flugge, U.I. (2012). The Arabidopsis thylakoid ADP/ATP carrier TAAC has an additional role in supplying plastidic phosphoadenosine 5'-phosphosulfate to the cytosol. Plant Cell *24*, 4187-4204.

Haferkamp, I., Fernie, A.R., and Neuhaus, H.E. (2011). Adenine nucleotide transport in plants: much more than a mitochondrial issue. Trends Plant Sci *16*, 507-515.

Haferkamp, I., Schmitz-Esser, S., Wagner, M., Neigel, N., Horn, M., and Neuhaus, H.E. (2006). Tapping the nucleotide pool of the host: novel nucleotide carrier proteins of Protochlamydia amoebophila. Mol Microbiol *60*, 1534-1545.

Heimpel, S., Basset, G., Odoy, S., and Klingenberg, M. (2001). Expression of the mitochondrial ADP/ATP carrier in Escherichia coli. Renaturation, reconstitution, and the effect of mutations on 10 positive residues. J Biol Chem *276*, 11499-11506.

Hoffmann, B., Stockl, A., Schlame, M., Beyer, K., and Klingenberg, M. (1994). The reconstituted ADP/ATP carrier activity has an absolute requirement for cardiolipin as shown in cysteine mutants. J Biol Chem *269*, 1940-1944.

Jiang, F., Ryan, M.T., Schlame, M., Zhao, M., Gu, Z., Klingenberg, M., Pfanner, N., and Greenberg, M.L. (2000). Absence of cardiolipin in the crd1 null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. J Biol Chem *275*, 22387-22394.

Kefala, G., Ahn, C., Krupa, M., Esquivies, L., Maslennikov, I., Kwiatkowski, W., and Choe, S. (2010). Structures of the OmpF porin crystallized in the presence of foscholine-12. Protein Sci *19*, 1117-1125.

Klingenberg, M. (2008). The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. Bba-Biomembranes *1778*, 1978-2021.

Klingenberg, M. (2009). Cardiolipin and mitochondrial carriers. Biochim Biophys Acta *1788*, 2048-2058.

Kozachkov, L., and Padan, E. (2011). Site-directed tryptophan fluorescence reveals two essential conformational changes in the Na+/H+ antiporter NhaA. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 15769-15774.

Kunji, E.R., and Robinson, A.J. (2010). Coupling of proton and substrate translocation in the transport cycle of mitochondrial carriers. Curr Opin Struct Biol *20*, 440-447.

Kunji, E.R.S. (2004). The role and structure of mitochondrial carriers. Febs Lett *564*, 239-244.

Lake, V., Olsson, U., Willows, R.D., and Hansson, M. (2004). ATPase activity of magnesium chelatase subunit I is required to maintain subunit D in vivo. Eur J Biochem *271*, 2182-2188.

Lakowicz, J.R. (2006). Instrumentation for fluorescence spectroscopy. In Principles of fluorescence spectroscopy, J.R. Lakowicz, ed. (Springer US), 27-61.

Landau, E.M., and Rosenbusch, J.P. (1996). Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 14532-14535.

Li, K., Warner, C.K., Hodge, J.A., Minoshima, S., Kudoh, J., Fukuyama, R., Maekawa, M., Shimizu, Y., Shimizu, N., and Wallace, D.C. (1989). A human muscle adenine nucleotide translocator gene has four exons, is located on chromosome 4, and is differentially expressed. J Biol Chem *264*, 13998-14004.

Linka, N., and Weber, A.P.M. (2010). Intracellular Metabolite Transporters in Plants. Mol Plant *3*, 21-53.

Liu, W., Hanson, M.A., Stevens, R.C., and Cherezov, V. (2010). LCP-Tm: an assay to measure and understand stability of membrane proteins in a membrane environment. Biophys J *98*, 1539-1548.

Loll, P.J. (2003). Membrane protein structural biology: the high throughput challenge. J Struct Biol *142*, 144-153.

Lu, M., and Fu, D. (2007). Structure of the zinc transporter YiiP. Science *317*, 1746-1748.

Ma, J., Kubota, F., Yoshimura, M., Yamashita, E., Nakagawa, A., Ito, A., and Tsukihara, T. (2004). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of rat monoamine oxidase A complexed with clorgyline. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr *60*, 317-319.

Miroux, B., and Walker, J.E. (1996). Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. J Mol Biol *260*, 289-298.

Mohanty, A.K., and Wiener, M.C. (2004). Membrane protein expression and production: effects of polyhistidine tag length and position. Protein Expr Purif *33*, 311-325.

Mohlmann, T., Tjaden, J., Schwoppe, C., Winkler, H.H., Kampfenkel, K., and Neuhaus, H.E. (1998). Occurrence of two plastidic ATP/ADP transporters in Arabidopsis thaliana L - Molecular characterisation and comparative structural analysis of similar ATP/ADP translocators from plastids and Rickettsia prowazekii. Eur J Biochem *252*, 353-359.

Nelson, D.R., Felix, C.M., and Swanson, J.M. (1998). Highly conserved charge-pair networks in the mitochondrial carrier family. J Mol Biol *277*, 285-308.

Nury, H., Dahout-Gonzalez, C., Trezeguet, V., Lauquin, G.J., Brandolin, G., and Pebay-Peyroula, E. (2006). Relations between structure and function of the mitochondrial ADP/ATP carrier. Annu Rev Biochem *75*, 713-741.

Ostermeier, C., and Michel, H. (1997). Crystallization of membrane proteins. Curr Opin Struct Biol *7*, 697-701.

Palmieri, F., Pierri, C.L., De Grassi, A., Nunes-Nesi, A., and Fernie, A.R. (2011). Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: a review with new insights. Plant J *66*, 161-181.

Panwar, P., Deniaud, A., and Pebay-Peyroula, E. (2012). Contamination from an affinity column: an encounter with a new villain in the world of membrane-protein crystallization. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr *68*, 1272-1277.

Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trezeguet, V., Lauquin, G.J.M., and Brandolin, R. (2003). Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. Nature *426*, 39-44.

PerkinElmer (2000). An intoduction to Fluorescence Spectroscpy. In Light scattering, p. 14.

Powell, S.J., Medd, S.M., Runswick, M.J., and Walker, J.E. (1989). Two bovine genes for mitochondrial ADP/ATP translocase expressed differences in various tissues. Biochemistry *28*, 866-873.

Prieto, E.D., and Garda, H.A. (2011). Membrane insertion topology of the central apolipoprotein A-I region. Fluorescence studies using single tryptophan mutants. Biochemistry *50*, 466-479.

Prihoda, J., Tanaka, A., de Paula, W.B., Allen, J.F., Tirichine, L., and Bowler, C. (2012). Chloroplast-mitochondria cross-talk in diatoms. J Exp Bot *63*, 1543-1557.

Reinhold, T., Alawady, A., Grimm, B., Beran, K.C., Jahns, P., Conrath, U., Bauer, J., Reiser, J., Melzer, M., Jeblick, W.*, et al.* (2007). Limitation of nocturnal import of ATP into Arabidopsis chloroplasts leads to photooxidative damage. Plant J *50*, 293-304.

Reiser, J., Linka, N., Lemke, L., Jeblick, W., and Neuhaus, H.E. (2004). Molecular physiological analysis of the two plastidic ATP/ADP transporters from Arabidopsis. Plant Physiol *136*, 3524-3536.

Rigaud, J.L., and Levy, D. (2003). Reconstitution of membrane proteins into liposomes. Methods Enzymol *372*, 65-86.

Rosenbusch, J.P., Lustig, A., Grabo, M., Zulauf, M., and Regenass, M. (2001). Approaches to determining membrane protein structures to high resolution: do selections of subpopulations occur? Micron *32*, 75-90.

Ruprecht, J.J., Hellawell, A.M., Harding, M., Crichton, P.G., McCoy, A.J., and Kunji, E.R. (2014). Structures of yeast mitochondrial ADP/ATP carriers support a domain-based alternating-access transport mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A *111*, E426-434.

Saier, M.H., Jr., Reddy, V.S., Tamang, D.G., and Vastermark, A. (2014). The transporter classification database. Nucleic Acids Res *42*, D251-258.

Scanlon, S.M., Williams, D.C., and Schloss, P. (2001). Membrane cholesterol modulates serotonin transporter activity. Biochemistry *40*, 10507-10513.

Schmitz-Esser, S., Haferkamp, I., Knab, S., Penz, T., Ast, M., Kohl, C., Wagner, M., and Horn, M. (2008). Lawsonia intracellularis contains a gene encoding a functional rickettsia-like ATP/ADP translocase for host exploitation. J Bacteriol *190*, 5746-5752.

Schmitz-Esser, S., Linka, N., Collingro, A., Beier, C.L., Neuhaus, H.E., Wagner, M., and Horn, M. (2004). ATP/ADP translocases: a common feature of obligate intracellular amoebal symbionts related to chlamydiae and rickettsiae. J Bacteriol *186*, 683-691.

Schwender, J., Ohlrogge, J., and Shachar-Hill, Y. (2004). Understanding flux in plant metabolic networks. Curr Opin Plant Biol *7*, 309-317.

Skarka, L., Bardova, K., Brauner, P., Flachs, P., Jarkovska, D., Kopecky, J., a Ostadal, B. (2003). Expression of mitochondrial uncoupling protein 3 and adenine nucleotide translocase 1 genes in developing rat heart: putative involvement in control of mitochondrial membrane potential. J Mol Cell Cardiol *35*, 321-330.

Skou, J.C. (1989). The identification of the sodium-pump as the membrane-bound Na+/K+-ATPase: a commentary on 'The Influence of Some Cations on an Adenosine Triphosphatase from Peripheral Nerves'. Biochim Biophys Acta *1000*, 435-438.

Solomaha, E., and Palfrey, H.C. (2005). Conformational changes in dynamin on GTP binding and oligomerization reported by intrinsic and extrinsic fluorescence. Biochem J *391*, 601-611.

Spetea, C., and Lundin, B. (2012). Evidence for nucleotide-dependent processes in the thylakoid lumen of plant chloroplasts - an update. Febs Lett *586*, 2946-2954.

Tate, C.G. (2001). Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies. Febs Lett *504*, 94-98.

Thuswaldner, S., Lagerstedt, J.O., Rojas-Stutz, M., Bouhidel, K., Der, C., Leborgne-Castel, N., Mishra, A., Marty, F., Schoefs, B., Adamska, I., *et al.* (2007). Identification, expression, and functional analyses of a thylakoid ATP/ADP carrier from Arabidopsis. J Biol Chem *282*, 8848-8859.

Tjaden, J., Mohlmann, T., Kampfenkel, K., Henrichs, G., and Neuhaus, H.E. (1998). Altered plastidic ATP/ADP-transporter activity influences potato (Solanum tuberosum L.) tuber morphology, yield and composition of tuber starch. Plant J *16*, 531-540.

Traba, J., Satrustegui, J., and del Arco, A. (2011). Adenine nucleotide transporters in organelles: novel genes and functions. Cell Mol Life Sci *68*, 1183-1206.

Trentmann, O., Decker, G.C., Winkler, H.H., and Neuhaus, H.E. (2000). Charged amino-acid residues in transmembrane domains of the plastidic ATP/ADP transporter from Arabidopsis are important for transport efficiency, substrate specificity, and counter exchange properties. Eur J Biochem *267*, 4098-4105.

Trentmann, O., Horn, M., van Scheltinga, A.C., Neuhaus, H.E., and Haferkamp, I. (2007). Enlightening energy parasitism by analysis of an ATP/ADP transporter from chlamydiae. Plos Biol *5*, e231.

Trentmann, O., Jung, B., Neuhaus, H.E., and Haferkamp, I. (2008). Nonmitochondrial ATP/ADP Transporters Accept Phosphate as Third Substrate. J Biol Chem *283*, 36486-36493.

Tsaousis, A.D., Kunji, E.R.S., Goldberg, A.V., Lucocq, J.M., Hirt, R.P., and Embley, T.M. (2008). A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of Encephalitozoon cuniculi. Nature *453*, 453-553.

White, M.A., Clark, K.M., Grayhack, E.J., and Dumont, M.E. (2007). Characteristics affecting expression and solubilization of yeast membrane proteins. J Mol Biol *365*, 621-636.

Winkler, H.H., and Neuhaus, H.E. (1999). Non-mitochondrial ATP transport. Trends Biochem Sci *24*, 64-68.

Zoonens, M., Comer, J., Masscheleyn, S., Pebay-Peyroula, E., Chipot, C., Miroux, B., and Dehez, F. (2013). Dangerous liaisons between detergents and membrane proteins. The case of mitochondrial uncoupling protein 2. J Am Chem Soc *135*, 15174-15182.

# Résumé

L'hydrolyse de l'ATP en ADP constitue la principale source d'énergie de la cellule. Le transport de ce nucléotide depuis son lieu de synthèse vers le cytosol est essentiel pour la plupart des réactions métaboliques et nécessite un passage à travers les membranes. Ainsi, un grand nombre de transporteurs d'ATP/ADP sont présents dans les différents organites tels que les mitochondries, les chloroplastes, et autres types de plastes mais aussi chez les bactéries pathogènes (*Rickettsia prowazekii*, *Protoclamydiae amoebophila*) (Trentmann et al, 2007).
L'équipe s'intéresse principalement à 2 types de transporteurs d'ADP et d'ATP, la famille des transporteurs mitochondriaux (MCF) et la famille des NTT (plastes et bactéries). Malgré des fonctions similaires, ces 2 familles de transporteurs possèdent des propriétés biochimiques et structurales différentes. De nos jours, il n'existe aucune information structurale disponible sur la famille des NTTs. La détermination de cette structure pourrait permettre de comprendre le mécanisme de transport de ces transporteurs mais plus généralement comprendre le transport de l'ATP et ADP dans les cellules.
Une étude a été initiée sur la structure et la fonction de la famille des NTT plus particulièrement des transporteurs chloroplastiques d'*Arabidopsis thaliana* mais aussi des transporteurs bactériens. Toutefois, ma thèse concerne principalement les transporteurs chloroplastiques NTT1 et NTT2. Ces 2 isoformes sont localisées dans la membrane interne des chloroplastes et permettent de pourvoir le stroma en ATP lorsque la photosynthèse ne peut pas avoir lieu par manque de lumière.
Nous avons déterminé et optimisé les conditions de surexpression des 2 isoformes dans un système hétérologue puis de purification en détergent). Nous avons mis au point des méthodes permettant de caractériser le transporteur en solution et de mesurer son activité dans le but d'aboutir à une étude structurale. Des pistes de cristallisation ont également étaient obtenues.

# Abstract

ATP is the main energy currency in the cell and its transport across membranes is essential for most of the metabolic reactions. A large number of ATP/ADP transporters are present in the different cell organelles such as mitochondria, chloroplasts, other types of plastids and some are also found in bacteria (*Rickettsia prowazekii*, *Protoclamydiae amoebophila*) (Trentmann et al, 2007). The team is mainly interested in two distinct transporters families, the mitochondrial carrier family (MCF) and the NTT family. Despite similar function, mitochondrial ADP/ATP transporters (Pebay-Peyroula et al, 2003) and NTT proteins exhibit different structural and biochemical properties. To date no structural information is available on the NTT family. The determination of a structure would help for understanding the transport mechanism of these carriers and more generally the different mechanisms of the transport of ADP and ATP within the cell.
We initiated a structure-function study on the NTT family focusing on chloroplast transporters from *Arabidopsis thaliana* and also from bacteria. My thesis is focused on chloroplast NTT1 and NTT2. These isoforms are localized in the inner membrane of chloroplast. They transport ATP inside the chloroplast in order to supply the different reactions occurring in the stroma when the photosynthesis does not occur.
We have determined and optimized conditions to overexpress these 2 isoforms in heterologous systems and to purify the protein in detergents. We have also set up tools to characterize the carrier in solution and to measure its transport activity opening the way to functional and structural studies. We obtained promising crystallization hits.