



**HAL**  
open science

# Etude structurale et fonctionnelle par RMN d'une chaperonine de 1 MDa en action

Guillaume Mas

► **To cite this version:**

Guillaume Mas. Etude structurale et fonctionnelle par RMN d'une chaperonine de 1 MDa en action. Biochimie [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAV036 . tel-01484643

**HAL Id: tel-01484643**

**<https://theses.hal.science/tel-01484643>**

Submitted on 7 Mar 2017

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

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

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Biologie Structurale et Nanobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Guillaume Mas**

Thèse dirigée par **Jérôme Boisbouvier**

préparée au sein du **Laboratoire de RMN biomoléculaire**  
dans l'**École Doctorale de Chimie et Science du Vivant**

## Étude structurale et fonctionnelle par RMN d'une chaperonine de 1 MDa en action

Thèse soutenue publiquement le **03/12/2015**,  
devant le jury composé de :

**Dr. Guy Schoehn**

Directeur de recherche CNRS, Président

**Pr. Bruno Kieffer**

Professeur à l'université de Strasbourg, Rapporteur

**Dr. Ewen Lescop**

Chargé de recherche CNRS, Rapporteur

**Dr. Pavel Macek**

Chercheur AstraZeneka (Manchester), Examineur

**Dr. Michael Plevin**

Lecturer à l'université de York, Examineur

**Dr. Jérôme Boisbouvier**

Directeur de recherche CNRS, Directeur de thèse





---

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon encadrant, Jérôme, pour m'avoir donné l'occasion de faire une thèse et ce qu'il m'a appris durant ces trois années. Je voudrais également remercier Elodie avec qui j'ai démarré ce projet. Il me semble également important de remercier Pavel qui a activement participé à une grande partie des travaux présentés dans cette thèse. Je remercie également Paul pour les discussions scientifiques autour du projet et la mise en place d'une partie des expériences RMN.

Parmi les personnes impliquées dans le projet thermosome, je tiens à remercier Elisa et Jia-Ying pour leur aide et leur implication pendant la dernière année de ma thèse.

Un grand merci également à Pierre pour les importantes corrections de mon manuscrit qui ont permis d'en améliorer grandement la qualité.

Je souhaite également remercier les rapporteurs Bruno Kieffer et Ewen Lescop qui ont accepté d'évaluer mon travail. J'espère que la lecture de ma thèse et les discussions qui s'en sont suivies ont été intéressantes pour eux. Je remercie tous les membres du jury pour avoir accepté de prendre part à ma thèse (Michael Plevin, Pavel Macek et Guy Schoehn).

Je remercie les ingénieurs.e.s qui permettent d'assurer le bon fonctionnement du laboratoire (Audrey, Isabel, Lionel), ainsi que les ingénieurs qui s'occupent des spectromètres RMN et permettent de rendre leur utilisation plus simple (Adrien et Sergio).

Lors de ma thèse, j'ai pu profiter de l'expertise de l'équipe de microscopie électronique que je remercie vivement pour la qualité et la rapidité de leur analyse.

---

Je remercie l'organisme qui finance ma thèse, l'université Joseph Fourier (UJF), ainsi que l'organisme qui a permis le financement du projet sur lequel j'ai effectué ma thèse (ERC : seenanolifeinaction).

Lors de ma thèse, j'ai eu la chance de pouvoir participer à plusieurs conférences internationales. Je souhaite ici tout particulièrement remercier Zsófia et Lauriane qui ont été présentes lors de ces aventures et les ont rendu beaucoup plus intéressante.

Enfin, je remercie tous les ingénieur.e.s, thésard.e.s, post-docs et stagiaires, qui font que le temps passé au labo soit toujours agréable, et que le temps passé hors labo le soit tout autant. Je pense notamment à Audrey, Zsófia, Elisa, Jia-Ying, Caroline, Mathieu, Nicolas, Mathilde, Orso et Jens pour les sorties ski / via ferrata / laser game/ alcool/ et autres.

# Table des matières

Remerciements	i
Table des matières	iii
Glossaire	x
Table des figures	xi
Liste des tableaux	xvii
<b>1 Introduction</b>	<b>1</b>
1.1 Le repliement des protéines . . . . .	1
1.1.1 Le problème du repliement des protéines . . . . .	2
1.1.2 Le paradoxe de Levinthal et le repliement des protéines . . . . .	3
1.1.3 Développement d'un modèle pour le repliement des protéines . . . . .	4
1.1.3.1 Application de la théorie de l'état de transition pour l'étude du repliement des protéine . . . . .	4
1.1.3.2 Différents modèles de repliement des protéines . . . . .	6
1.1.3.3 La théorie du paysage énergétique . . . . .	8
1.1.4 Certaines protéines ont besoin d'aide pour leur repliement et leur assemblage . . . . .	10
1.1.5 Repliement <i>in vitro</i> et repliement <i>in vivo</i> : Quelles sont les diffé- rences? . . . . .	10
1.2 Le système des chaperonnes moléculaires . . . . .	12
1.2.1 Qu'est ce qu'une chaperonne moléculaire? . . . . .	12
1.2.2 Mode d'action des chaperonnes moléculaires . . . . .	16
1.2.2.1 La séquence primaire des protéines contient toute l'infor- mation nécessaire pour leur repliement . . . . .	16
1.2.2.2 Le mécanisme d'action des chaperonnes dépend de leur taille	16

## TABLE DES MATIÈRES

---

1.2.2.3	Les chaperonnes agissent sous la forme d'un réseau interconnecté . . . . .	16
1.2.2.4	Évolution du repliement post-traductionnel vers le repliement co-traductionnel . . . . .	17
1.2.3	Voie impliquant des chaperonnes dans le cytoplasme. . . . .	18
1.3	Deux familles de chaperonines . . . . .	19
1.3.1	Introduction sur les chaperonines . . . . .	19
1.3.2	Chaperonine du groupe I . . . . .	21
1.3.2.1	Informations structurales sur le complexe GroEL/GroES . . . . .	21
1.3.2.2	Cycle fonctionnel des chaperonines du groupe I . . . . .	23
1.3.2.3	Modèles de repliement des protéines par les chaperonines . . . . .	26
1.3.3	Chaperonine du groupe II . . . . .	29
1.3.3.1	Informations structurales sur les chaperonines du groupe II . . . . .	29
1.3.3.2	Mécanisme de fermeture des chaperonines du groupe II . . . . .	32
1.3.3.3	Cycle fonctionnel des chaperonines du groupe II . . . . .	34
1.3.3.4	Repliement des protéines clientes par les chaperonines du groupe II . . . . .	35
1.3.3.5	Co-facteur des chaperonines du groupe II : Les préfoldines . . . . .	39
1.4	Les chaperonines d'archée comme modèle des chaperonines du groupe II . . . . .	42
1.4.1	Les archées . . . . .	42
1.4.2	Pourquoi s'intéresser aux chaperonines d'archée (thermosome) . . . . .	42
1.4.3	Le thermosome de <i>Pyrococcus horikoshii</i> . . . . .	44
1.4.3.1	Modélisation par homologie de PhCpn : . . . . .	45
<b>2</b>	<b>Développements méthodologiques pour l'étude d'une machinerie de 1 MDa</b>	<b>47</b>
2.1	La RMN pour l'étude des assemblages de haut poids moléculaire . . . . .	47
2.1.1	Les groupements méthyles comme sonde pour la RMN . . . . .	47
2.1.2	Intérêt des groupements méthyles . . . . .	48
2.1.3	Méthodes pour le marquage des groupements méthyles . . . . .	49
2.1.4	Marquage combinatoire de plusieurs groupements méthyles . . . . .	51
2.2	Test de différents marquages de méthyles sur PhCpn . . . . .	53
2.2.1	Développement d'un marquage d'un groupement méthyle des valines . . . . .	55
2.2.1.1	Article I : Specific labeling and assignment strategies of valine methyl groups for NMR studies of high molecular weight proteins. . . . .	58

2.2.1.2	Marquage résidu-spécifique du groupement méthyle Val- [ <sup>13</sup> CH <sub>3</sub> ]-proS de PhCpn . . . . .	78
2.3	Attribution des groupements méthyles de protéines ou d'assemblage de haut poids moléculaire . . . . .	79
2.3.1	Stratégies d'attribution des groupements méthyles pour des pro- téines ou des assemblages de haut poids moléculaire . . . . .	79
2.3.1.1	Diviser pour conquérir . . . . .	79
2.3.1.2	Attribution des groupements méthyles par mutagenèse (Se- SAM) . . . . .	80
2.3.2	Quelle stratégie utiliser pour l'attribution des groupements mé- thyles de PhCpn? . . . . .	81
2.4	Stratégie SeSAM pour l'attribution des groupements méthyles d'assem- blage de haut poids moléculaire . . . . .	83
2.4.1	Analyse statistique des déplacements chimiques secondaires causés par la mutation d'un résidu . . . . .	84
2.4.2	Parallélisation et miniaturisation de la stratégie d'attribution par mutagenèse . . . . .	86
2.5	Attribution des groupements méthyles Val-[ <sup>13</sup> CH <sub>3</sub> ]-proS et Met-[ <sup>13</sup> CH <sub>3</sub> ]-ε de PhCpn . . . . .	88
2.5.0.1	Cas simple permettant l'attribution du signal du mutant . . . . .	89
2.5.0.2	Modifications de plusieurs signaux qui n'empêchent pas de conclure sur l'attribution du mutant . . . . .	93
2.5.0.3	Attribution des cas les plus complexes à l'aide de l'expé- rience 3D HMQC-NOESY méthyle-méthyle . . . . .	97
2.5.0.4	Combinaison de l'utilisation des DCS et des nOe pour la confirmation des attributions . . . . .	108
2.5.1	Conclusion de l'attribution des groupements méthyles Val-[ <sup>13</sup> CH <sub>3</sub> ]- proS et Met-[ <sup>13</sup> CH <sub>3</sub> ]-ε de PhCpn . . . . .	110
2.5.1.1	Attribution des groupements méthyles [ <sup>13</sup> CH <sub>3</sub> ]-ε des rési- dus méthionines de PhCpn . . . . .	110
2.5.1.2	Attribution des groupements méthyles Val-[ <sup>13</sup> CH <sub>3</sub> ]-proS de PhCpn. . . . .	111
<b>3</b>	<b>Étude du cycle fonctionnel du thermosome de <i>Pyrococcus horikoshii</i> par RMN</b>	<b>113</b>
3.1	Production et purification du thermosome de <i>Pyrococcus horikoshii</i> (PhCpn)	113
3.1.1	Production de PhCpn . . . . .	113

## TABLE DES MATIÈRES

---

3.1.2	Purification de PhCpn . . . . .	114
3.1.2.1	Purification de PhCpn (Étape 1) : . . . . .	114
3.1.2.2	Purification de PhCpn (Étape 2) : . . . . .	117
3.1.2.3	Analyse par microscopie électronique de l'échantillon de PhCpn . . . . .	120
3.1.2.4	Purification du PhCpn : Résumé du protocole permettant d'obtenir la particule native de PhCpn . . . . .	121
3.2	Détermination des conditions optimales pour l'étude de PhCpn . . . . .	122
3.2.1	Optimisation des conditions de l'activité ATPase de PhCpn . . . . .	122
3.2.1.1	Effet de la concentration de différents cations sur l'activité ATPase de PhCpn . . . . .	123
3.2.1.2	Effet du pH sur l'activité ATPase de PhCpn . . . . .	125
3.2.1.3	Effet de la température sur l'activité ATPase de PhCpn . . . . .	126
3.2.1.4	Quelles sont les conditions optimales pour l'activité ATPase de PhCpn ? . . . . .	126
3.2.1.5	Activité ATPase de PhCpn deutéré . . . . .	128
3.2.1.6	Stabilité de la particule native de PhCpn dans les conditions optimales pour l'activité ATPase . . . . .	128
3.2.1.7	Activité ATPase de PhCpn et données publiées dans la littérature . . . . .	129
3.3	Identification des signaux RMN des conformations ouvertes et fermées de PhCpn . . . . .	130
3.3.1	Conditions d'étude de l'interaction entre PhCpn et un analogue de l'ATP (AppNHp) . . . . .	131
3.3.2	Interactions de PhCpn avec l'ADP et l'AppNHp . . . . .	132
3.3.2.1	Interaction de PhCpn avec l'ADP . . . . .	132
3.3.2.2	Interactions de PhCpn avec l'AppNHp . . . . .	133
3.3.2.3	Attribution des groupements méthyles Met-[ <sup>13</sup> CH <sub>3</sub> ]-ε de PhCpn lié à l'AppNHp . . . . .	135
3.3.3	Modifications conformationnelles de PhCpn induites par l'AppNHp en fonction de la température . . . . .	138
3.3.4	Observation de l'équilibre entre les conformations ouvertes et fermées de PhCpn par microscopie électronique . . . . .	140
3.4	Observation de l'activité ATPase de PhCpn en temps réel par RMN . . . . .	142
3.4.1	Activité ATPase de PhCpn . . . . .	142

3.4.1.1	Comparaison de l'activité ATPase à différentes température par RMN . . . . .	142
3.4.1.2	Modifications conformationnelles de PhCpn à 75°C avec de l'ATP . . . . .	144
3.4.2	Activité ATPase de PhCpn avec un système de régénération de l'ATP	148
3.4.2.1	Activité ATPase de PhCpn avec le système de régénération de l'ATP . . . . .	151
3.4.2.2	Modifications conformationnelles avec le système de régénération de l'ATP à 75°C . . . . .	153
3.4.3	Cycle fonctionnel avec et sans protéine cliente . . . . .	157
<b>4</b>	<b>Interaction de PhCpn avec une protéine modèle : le lysozyme</b>	<b>159</b>
4.1	Validation du lysozyme comme protéine cliente de PhCpn . . . . .	159
4.1.1	Attachement du lysozyme à la forme apo de PhCpn à différentes températures . . . . .	160
4.2	Production et purification du lysozyme en système d'expression <i>Escherichia coli</i> . . . . .	162
4.2.1	Production et purification du lysozyme recombinant de <i>Gallus gallus</i>	162
4.2.2	Repliement du lysozyme sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique . . . . .	163
4.2.3	Test d'activité du lysozyme recombinant . . . . .	164
4.2.4	Confirmation du repliement du lysozyme recombinant par RMN . . . . .	165
4.2.5	Attribution des groupements méthyles Val-[ <sup>13</sup> CH <sub>3</sub> ]-proS, Leu-[ <sup>13</sup> CH <sub>3</sub> ]-proS et Ile-[ <sup>13</sup> CH <sub>3</sub> ]-δ1 du lysozyme . . . . .	166
4.3	Effet de la température sur le dépliement du lysozyme . . . . .	167
4.3.1	Dépliement du lysozyme à 75°C . . . . .	167
4.3.2	Dépliement du lysozyme à différentes températures . . . . .	168
4.3.3	Caractérisation de l'échange entre les états dépliés et repliés du lysozyme . . . . .	169
4.3.3.1	Transfert de l'attribution de l'état replié vers l'état déplié du lysozyme . . . . .	169
4.3.3.2	Échange entre les états repliés et dépliés du lysozyme . . . . .	170
4.4	Effet « holdase » de la forme apo de PhCpn . . . . .	172
4.4.1	Interaction du lysozyme avec PhCpn à 75°C . . . . .	172
4.4.2	Détermination de l'affinité de l'interaction entre PhCpn et le lysozyme	173
4.4.3	Étude de l'influence de la température sur l'interaction entre PhCpn et le lysozyme . . . . .	176

## TABLE DES MATIÈRES

---

4.4.4	Observation de la formation du complexe entre le lysozyme déplié et PhCpn . . . . .	179
4.4.5	Identification de la surface d'interaction entre PhCpn et le lysozyme déplié . . . . .	182
4.5	Observation du repliement du lysozyme par PhCpn . . . . .	186
4.5.1	Activité ATPase de PhCpn avec le lysozyme . . . . .	187
4.5.2	Repliement du lysozyme par PhCpn à 65°C . . . . .	188
4.5.3	Modifications conformationnelles de PhCpn avec le lysozyme . . . . .	190
4.5.4	Cycle fonctionnel avec une protéine dépliée . . . . .	193
<b>5</b>	<b>Discussion et Conclusion : Modèle du fonctionnement du thermosome de <i>Pyrococcus Horikoshii</i>, un exemple de chaperonine du groupe II</b>	<b>195</b>
5.1	Limites et possibilités offertes par la RMN pour la caractérisation des différents états fonctionnels de PhCpn . . . . .	195
5.1.1	Vitesse de relaxation transversale . . . . .	196
5.1.2	Vitesse de relaxation longitudinale . . . . .	196
5.1.3	AppNHP un modèle pour la liaison de l'ATP ? . . . . .	198
5.2	Modèle du cycle fonctionnel de PhCpn sans et avec une protéine dépliée . . . . .	201
5.2.1	Cycle fonctionnel sans une protéine dépliée . . . . .	201
5.2.2	Cycle fonctionnel avec le lysozyme déplié . . . . .	203
5.2.3	Cycle fonctionnel des chaperonines du groupe II . . . . .	204
5.2.3.1	Modèle du cycle fonctionnel de PhCpn en l'absence de protéine dépliée . . . . .	204
5.2.3.2	Modèle du cycle fonctionnel de PhCpn avec une protéine dépliée . . . . .	206
5.2.4	Repliement du lysozyme et modifications du cycle fonctionnel par le lysozyme déplié . . . . .	207
5.2.4.1	Repliement du lysozyme dans la cavité de PhCpn . . . . .	207
5.2.4.2	Accélération du cycle fonctionnel en présence du lysozyme déplié . . . . .	209
5.3	Conclusions et perspectives . . . . .	210
	<b>Références bibliographiques</b>	<b>213</b>
<b>6</b>	<b>Annexes</b>	<b>223</b>
6.1	Annexe 1 : Modélisation par homologie . . . . .	224
6.2	Annexe 2 : Article n°2 . . . . .	226
6.3	Annexe 3 : Production et purification de PhCpn . . . . .	243

6.4 Annexe 4 : Production et purification du lysozyme . . . . . 246

## Glossaire

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADP</b>	Adenosine diphosphate
<b>AppNHp</b>	Adenosine-5'-[( $\beta,\gamma$ )-imido]triphosphate
<b>AppCp</b>	Adenosine-5'-[( $\beta,\gamma$ )-methyleno]triphosphate
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ATP</b>	Adenosine triphosphate
<b>ATP<math>\gamma</math>S</b>	Adenosine-5'-( $\gamma$ -thio)-triphosphate
<b>BRMB</b>	Biological Magnetic Resonance Bank
<b>CCT</b>	Chaperonin-containing TCP-1
<b>CE</b>	chromatographie d'exclusion
<b>DCS</b>	Déplacement chimique secondaire
<b>DO</b>	Densité optique
<b>EXSY</b>	EXchange SpectroscopY
<b>GSH</b>	Glutathion
<b>GSSG</b>	Disulfure de glutathion
<b>HMQC</b>	Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation
<b>HSQC</b>	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
<b>Hsp</b>	Heat shock protein
<b>IDP</b>	Intrinsically disordered proteins
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>nOe</b>	nuclear Overhauser effect
<b>NOESY</b>	nuclear Overhauser effect spectroscopy
<b>PhCpn</b>	<i>Pyrococcus horikoshii</i> Chaperonine
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>SDS</b>	Sodium Dodecyl Sulphate
<b>TROSY</b>	Transverse relaxation optimized spectroscopy

# Table des figures

1.1	Schéma résumant les expériences d'Anfinsen . . . . .	3
1.2	Théorie de l'état de transition appliquée au repliement d'une protéine . . .	5
1.3	Modèle "charpente" . . . . .	6
1.4	Modèle de l'effondrement-hydrophobe . . . . .	7
1.5	Modèle de nucléation- condensation . . . . .	7
1.6	Représentation du repliement d'une protéine par la théorie du paysage énergétique . . . . .	9
1.7	Différentes classes de chaperonnes moléculaires . . . . .	15
1.8	Vue d'ensemble des structures des chaperonines . . . . .	20
1.9	Flexibilité conformationnelle des chaperonines du groupe I . . . . .	22
1.10	GroEL/ES : Repliement d'une protéine selon le modèle "bullet cycle" . . .	24
1.11	GroEL/ES : Repliement d'une protéine selon le modèle "football cycle" . .	25
1.12	Modèles du repliement de protéine par GroEL . . . . .	28
1.13	Flexibilité conformationnelle des chaperonines du groupe II . . . . .	30
1.14	Affinité des sous-unités de CCT pour l'ATP . . . . .	31
1.15	Conformations des chaperonines du groupe II avec différents nucléotides . .	32
1.16	Chaperonine du groupe II : Modèle du repliement d'une protéine . . . . .	35
1.17	Interactions entre une protéine dépliée et les chaperonines . . . . .	36
1.18	Composition en acides aminés de la cavité des chaperonines . . . . .	38
1.19	Structure d'une préfoldine . . . . .	39
1.20	Modèle du repliement d'une protéine par l'interaction entre une chape- ronine et une préfoldine . . . . .	41
2.1	Schéma simplifié des voies de biosynthèse des acides aminés possédant un groupement méthyle chez <i>Escherichia coli</i> . . . . .	50
2.2	Fenêtre spectrale des différents groupements méthyles dans un spectre 2D ( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C) . . . . .	52
2.3	Comparaison des différents marquages de groupements méthyles de PhCpn	53

## TABLE DES FIGURES

---

2.4	Stratégies permettant un marquage résidu spécifique des valines . . . . .	56
2.5	Stratégies permettant un marquage résidu spécifique des valines ou des leucines . . . . .	57
2.6	Comparaison des deux marquages des groupements méthyles des valines et leucines de PhCpn . . . . .	78
2.7	Comparaison des spectres 2D ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ) HMQC du monomère et de la forme native de PhCpn avec un marquage du groupement méthyle Met- ( $^{13}\text{CH}_3$ )- $\epsilon$ . . . . .	82
2.8	Analyse des effets de la mutation d'un résidu sur les signaux des résidus situés dans son environnement . . . . .	85
2.9	Comparaison de la stratégie classique d'attribution par mutagenèse avec la stratégie améliorée . . . . .	86
2.10	Spectres 2D ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ) HMQC des mutants méthionines de PhCpn permettant une attribution direct du signal correspondant au mutant . . . . .	90
2.11	Spectres 2D ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ) HMQC des mutants valines de PhCpn permettant une attribution direct du signal correspondant au mutant (1/2) . . . . .	91
2.12	Spectres 2D ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ) HMQC des mutants valines de PhCpn permettant une attribution direct du signal correspondant au mutant (2/2) . . . . .	92
2.13	Spectres 2D ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ) HMQC des mutants valines et méthionines de PhCpn avec des déplacements chimiques secondaires causés par la mutation . . . . .	96
2.14	Attribution de la valine 53 . . . . .	98
2.15	Attribution de la valine 83 . . . . .	99
2.16	Attribution de la valine 210 . . . . .	100
2.17	Attribution de la valine 225 . . . . .	101
2.18	Attribution de la valine 280 . . . . .	102
2.19	Attribution des valines 291 et 293 . . . . .	103
2.20	Attribution de la valine 350 . . . . .	104
2.21	Attribution des valines 387 et 398 . . . . .	105
2.22	Attribution de la valine 494 . . . . .	106
2.23	Attribution de la valine 521 . . . . .	107
2.24	Attribution du groupement méthyle Met- ( $^{13}\text{CH}_3$ )- $\epsilon$ de PhCpn. . . . .	110
2.25	Attribution des groupements méthyles Val- ( $^{13}\text{CH}_3$ )-proS de PhCpn. . . . .	111
3.1	Étape 1 du protocole de purification de PhCpn . . . . .	114
3.2	Étape 1 du protocole de purification de PhCpn . . . . .	116
3.3	Étape 2 du protocole de purification de PhCpn . . . . .	117
3.4	Purification du PhCpn : Séparation de la forme supposée native de PhCpn des contaminants de haut poids moléculaire . . . . .	119

3.5	Caractérisation de la forme native de PhCpn . . . . .	120
3.6	Activité ATPase de PhCpn en fonction de la concentration en MgCl <sub>2</sub> . . . . .	123
3.7	Activité ATPase de PhCpn en fonction de la concentration en KCl . . . . .	124
3.8	Comparaison de l'effet des ions paramagnétiques Mn <sup>2+</sup> et Co <sup>2+</sup> sur le spectre 2D ( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C) HMQC de PhCpn-Met-ε . . . . .	125
3.9	Activité ATPase de PhCpn en fonction du pH . . . . .	125
3.10	Activité ATPase de PhCpn en fonction de la température . . . . .	126
3.11	Activité ATPase de PhCpn deutéré en milieu <sup>2</sup> H <sub>2</sub> O . . . . .	128
3.12	Stabilité de PhCpn deutéré en milieu <sup>2</sup> H <sub>2</sub> O à 75°C . . . . .	129
3.13	Interaction de PhCpn avec l'ADP et l'AppNHp . . . . .	134
3.14	Attribution du groupement méthyle Met-( <sup>13</sup> CH <sub>3</sub> )-ε de PhCpn dans la forme liée à l'AppNHp . . . . .	136
3.15	Comparaison des modifications conformationnelles de PhCpn induites par l'AppNHp à différentes températures . . . . .	139
3.16	Statistiques sur l'équilibre entre les conformations de PhCpn avec et sans nucléotide . . . . .	141
3.17	Activités ATPase de PhCpn suivi par RMN à 65°C et 75°C . . . . .	143
3.18	Modifications conformationnelles de PhCpn pendant son activité ATPase à 75°C . . . . .	144
3.19	Équilibre entre les conformations ouvertes et fermées de PhCpn avec de l'ATP . . . . .	145
3.20	Évolution du signal de la méthionine 159, correspondant au site actif, avec de l'ATP . . . . .	146
3.21	Schéma du système de régénération de l'ATP . . . . .	148
3.22	Schéma d'un tube shigemi adapté pour les concentrations élevées en ions . . . . .	150
3.23	Activité ATPase de PhCpn avec le système de régénération de l'ATP à 65°C	151
3.24	Activité ATPase de PhCpn avec le système de régénération de l'ATP à 75°C	152
3.25	Modifications conformationnelles de PhCpn pendant son activité ATPase avec le système de régénération de l'ATP à 75°C . . . . .	154
3.26	Évolution des conformations ouvertes et fermées de PhCpn pendant l'activité ATPase avec le système de régénération de l'ATP . . . . .	155
3.27	Évolution du site actif pendant l'activité ATPase avec le système de recyclage de l'ATP . . . . .	156
4.1	Dépliage d'une protéine . . . . .	159
4.2	Formation du complexe entre la forme apo de PhCpn et le lysozyme . . . . .	161
4.3	Schéma du repliement du lysozyme sur colonne de CE. . . . .	163

## TABLE DES FIGURES

---

4.4	Activité enzymatique du lysozyme . . . . .	164
4.5	Spectres 2D ( $^1\text{H},^{15}\text{N}$ ) HSQC et 2D ( $^1\text{H},^{13}\text{C}$ ) HMQC du lysozyme . . . . .	165
4.6	Attribution des groupements méthyles Val-( $^{13}\text{CH}_3$ )-proS, Leu-( $^{13}\text{CH}_3$ )-proS et Ile-( $^{13}\text{CH}_3$ )- $\delta 1$ du lysozyme . . . . .	166
4.7	Dépliage du lysozyme à $75^\circ\text{C}$ . . . . .	167
4.8	Dépliage du lysozyme à différentes température entre $50^\circ\text{C}$ et $75^\circ\text{C}$ . . . . .	168
4.9	Attribution des groupements méthyles Val-( $^{13}\text{CH}_3$ )-proS, Leu-( $^{13}\text{CH}_3$ )-proS et Ile-( $^{13}\text{CH}_3$ )- $\delta 1$ de l'état déplié du lysozyme . . . . .	170
4.10	Intensité des quatre signaux de la valine 120 aux différents temps de mélange	171
4.11	Interaction entre le lysozyme déplié et PhCpn à $75^\circ\text{C}$ . . . . .	172
4.12	Interaction entre PhCpn et le lysozyme dépliée . . . . .	173
4.13	Ajustement de la perturbation du déplacement chimique pour déterminer le $K_D$ de l'interaction entre PhCpn et le lysozyme déplié . . . . .	174
4.14	Ajustement du pourcentage de la variation du déplacement chimique moyen pour déterminer le $K_D$ de l'interaction . . . . .	175
4.15	Dépliage du lysozyme entre $50^\circ\text{C}$ et $75^\circ\text{C}$ sans et avec PhCpn . . . . .	176
4.16	Enthalpie libre de l'équilibre entre les états dépliés et repliés du lysozyme à $70^\circ\text{C}$ . . . . .	178
4.17	Observation de la formation du complexe entre le lysozyme et PhCpn à $65^\circ\text{C}$	180
4.18	Observation de la formation du complexe entre le lysozyme et PhCpn à $75^\circ\text{C}$	181
4.19	Superposition des spectres 2D ( $^1\text{H},^{13}\text{C}$ ) HMQC à $75^\circ\text{C}$ de PhCpn-Met $\epsilon$ - Val-proS sans, avec le lysozyme et avec le lysozyme avec un marquage paramagnétique . . . . .	183
4.20	Réaction chimique du marquage des lysines avec l'OXYL-1-NHS . . . . .	184
4.21	Cartographie de la surface d'interaction entre PhCpn et le lysozyme . . . . .	185
4.22	Activités ATPase de PhCpn avec du lysozyme à $65^\circ\text{C}$ . . . . .	187
4.23	Repliement du lysozyme par PhCpn à $65^\circ\text{C}$ . . . . .	188
4.24	Évolution des états repliés et dépliés du lysozyme avec PhCpn . . . . .	189
4.25	Modifications conformationnelles de PhCpn avec le lysozyme à $65^\circ\text{C}$ . . . . .	190
4.26	Conformations ouvertes et fermées de PhCpn avec et sans le lysozyme à $65^\circ\text{C}$	191
4.27	Évolution des conformations ouvertes et fermées de PhCpn avec le lysozyme	191
4.28	Pourcentage de site actif lié à l'ATP et à l'ADP sans et avec le lysozyme à $65^\circ\text{C}$ . . . . .	192
4.29	Évolution de la liaison au site actif de l'ATP et de l'ADP . . . . .	193
5.1	Mécanisme de fermeture de l'anneau de PhCpn par la liaison avec l'AppNHp	198
5.2	AppNHp dans le site actif du thermosome de <i>Thermococcus</i> Strain-KS1 . . . . .	199

5.3	Durées caractéristiques des conformations ouvertes et fermées de PhCpn pendant le cycle fonctionnel sans protéine cliente . . . . .	202
5.4	Durées caractéristiques des conformations ouvertes et fermées de PhCpn pendant le cycle fonctionnel avec le lysozyme déplié . . . . .	204
5.5	Modèle du cycle fonctionnel de PhCpn en l'absence de protéine dépliée . .	205
5.6	Modèle du cycle fonctionnel de PhCpn avec une protéine dépliée . . . . .	206
5.7	Comparaison de la composition en résidus hydrophiles/hydrophobes de la cavité de PhCpn dans les conformations ouvertes et fermées . . . . .	207
5.8	Interactions entre le lysozyme et PhCpn dans les conformations ouvertes et fermées . . . . .	209

## TABLE DES FIGURES

---

# Liste des tableaux

1.1	Tableau résumant les fonctions de différentes chaperonnes moléculaires . . .	13
1.2	Tableau résumant les fonctions de différentes chaperonnes moléculaires . . .	14
1.3	Comparaison de la distribution de la longueur des protéines pour <i>Methanococcus jannaschi</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et <i>Caenorhabditis elegans</i> . . . . .	17
1.4	Mécanisme de fermeture pour différentes chaperonnes du groupe II . . . .	33
1.5	Données sur différents thermosomes décrits dans la littérature . . . . .	44
2.1	Protocole pour le marquage des groupements méthyles . . . . .	51
2.2	Mutations et marquages utilisés pour l'analyse de l'effet des mutations ponctuelles sur les spectres 2D ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ) HMQC . . . . .	84
2.3	Tableau résumant les DCS et les nOes observés pour les signaux des résidus valines et méthionines de PhCpn . . . . .	109
2.4	Tableau résumant l'attribution des groupements méthyles Val- $^{13}\text{CH}_3$ -proS et Met- $^{13}\text{CH}_3$ - $\epsilon$ de PhCpn. . . . .	112
3.1	Activité ATPase de différents thermosomes . . . . .	122
3.2	Activité ATPase de PhCpn à différentes températures . . . . .	143
3.3	Temps de fonctionnement théorique du système de régénération de l'ATP en fonction de la concentration en PEP . . . . .	149
3.4	Composition du système de régénération de l'ATP . . . . .	150
3.5	Activité ATPase de PhCpn à différentes températures sans et avec le système de régénération de l'ATP . . . . .	153
4.1	Activité enzymatique du lysozyme . . . . .	164
4.2	Constantes d'échanges entre les états repliés et dépliés du lysozyme . . . .	171
4.3	Affinité de l'interaction (1/2)PhCpn - lysozyme. . . . .	174
4.4	Constante d'affinité entre GroEL et plusieurs protéines . . . . .	175

## LISTE DES TABLEAUX

---

4.5	Détermination de la $T_m$ , de l'enthalpie et de l'entropie de l'équilibre entre les états dépliés et repliés du lysozyme sans et avec PhCpn . . . . .	177
4.6	Coefficient de diffusion théorique ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ) du lysozyme et de PhCpn à $65^\circ\text{C}$ et $75^\circ\text{C}$ . . . . .	179
4.7	Coefficient de diffusion ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ) du lysozyme déplié (D), replié (R) et de PhCpn à $65^\circ\text{C}$ . . . . .	180
4.8	Coefficient de diffusion ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ) du lysozyme déplié (D) et de PhCpn à $75^\circ\text{C}$ .	181
5.1	Temps de relaxation transversale des méthionines 159, 275, 279, 490 à $75^\circ\text{C}$	196
5.2	Extraction des populations des conformations ouvertes et fermées de PhCpn, et du pourcentage de site actif lié à l'AppNHp . . . . .	198
5.3	Équilibre sans protéine dépliée entre les conformations ouvertes et fermées, et du pourcentage de site actif lié à l'ADP ou à l'ATP . . . . .	201
5.4	Équilibre avec le lysozyme déplié entre les conformations ouvertes et fermées, et du pourcentage de site actif lié à l'ATP ou à l'ADP . . . . .	203

# Chapitre 1

## Introduction

### 1.1 Le repliement des protéines

Dans les années 1950-1960 les premières structures de protéines ont été résolues par cristallographie aux rayons X (Myoglobine (1), Lysozyme (2), Ribonucléase (3), Papaïne (4), ...). L'observation de ces structures amena au développement de l'idée qu'une organisation tridimensionnelle stable, appelée état natif, est nécessaire pour qu'une protéine puisse accomplir sa fonction biologique. Le génome humain contient environ 20 000 à 25 000 gènes qui codent pour environ 100 000 séquences de protéines (5). La majorité de ces protéines doit se replier sous la forme d'une structure native stable pour devenir biologiquement active. L'exploration des bases de données structurales et les estimations théoriques montrent que les protéines repliées peuvent adopter environ 1000 repliements différents (6). La variété de ces repliements permet d'expliquer la richesse des fonctions des protéines dans les cellules mais conduit également à se demander comment les protéines peuvent se replier de manière efficace et fiable après leur synthèse par le ribosome.

Les importants développements de la biologie structurale et le très grand nombre de structures de protéines qui ont été résolues ont également permis d'observer que, pour de nombreuses protéines, des régions complètes ne se replient pas selon une conformation fixe mais explorent un ensemble de conformations. Les deux dernières décennies ont vu se développer le concept de protéine intrinsèquement désordonnées (IDP), qui permet d'expliquer le rôle de ces protéines qui ne présentent pas de structure fixe mais qui peuvent adopter des structures transitoires. Les caractéristiques de ces protéines rendent difficile l'observation de leur "structure", ce qui permet d'expliquer leur sous-représentation dans les bases de données structurales. Cependant, l'utilisation de logiciels de prédiction a permis d'estimer que les IDP représentent 2% des protéines d'archées, 4% des protéines de

## 1. INTRODUCTION

---

bactéries et 33% des protéines d'eucaryotes (7), ce qui semble démontrer la relative importance de ces protéines.

Le repliement des protéines a été l'un des sujets de recherche majeur des soixante dernières années. De nombreuses études théoriques et expérimentales ont permis de mieux comprendre les mécanismes qui gouvernent le repliement des protéines. Cependant la compréhension de ces mécanismes reste encore incomplète et est ouverte à de nombreux développements.

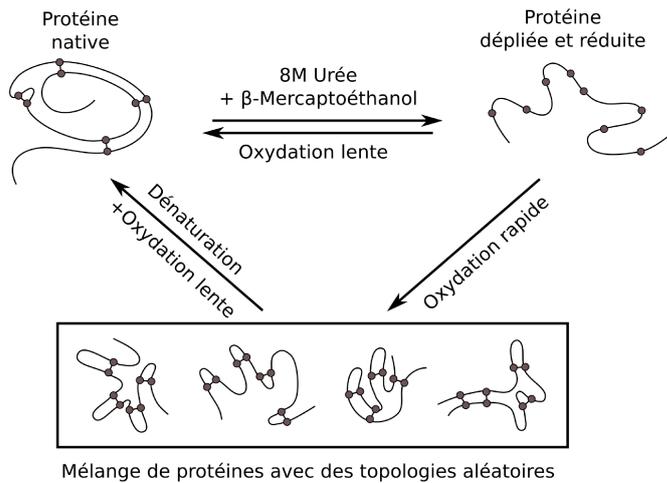
### 1.1.1 Le problème du repliement des protéines

Le dogme central de la biologie moléculaire qui décrit le transfert génétique d'information dans un système biologique a été formulé par Crick en 1970 (8). Cette théorie stipule que la transmission séquentielle d'information se fait de manière unidirectionnelle de l'ADN vers les protéines et ne peut pas être transférée des protéines vers l'ADN. La traduction de l'ADN en protéine étant rendue possible par l'utilisation du code génétique. Le repliement des protéines a été décrit comme la seconde moitié du code génétique, la séquence de la protéine codant pour sa structure tridimensionnelle. Décrypter ce code reviendrait à comprendre la nature des mécanismes gouvernant le repliement des protéines.

Les premières expériences décrivant le repliement des protéines ont été menées par Anfinsen au début des années 1960 (9).

La figure 1.1 résume l'expérience qui a permis à Anfinsen de montrer que la ribonucléase peut revenir à sa conformation initiale après dénaturation, tout en préservant son activité enzymatique. Cette expérience consiste à déplier la ribonucléase dans des conditions dénaturantes et réductrices puis à retirer l'agent dénaturant afin de permettre à la protéine de se replier. À partir de ce résultat, Anfinsen a émis l'hypothèse que toute l'information nécessaire au repliement d'une protéine est contenue dans la séquence primaire d'acides aminés (9).

Pour expliquer le repliement de la ribonucléase dans ces conditions, Anfinsen a conjecturé que des interactions entre des éléments de la séquence primaire de la protéine permettent de guider son repliement et la sélection de la bonne combinaison de ponts disulfures parmi les 105 variants possibles.



**FIGURE 1.1: Schéma résumant les expériences d'Anfinsen** - La partie supérieure du schéma résume l'expérience de 1961 d'Anfinsen, montrant le dépliement réversible de la ribonucléase (9). La partie inférieure du schéma explique l'expérience de 1962 qui a permis de mieux comprendre la nature des interactions impliquées dans le repliement des protéines (10)

Dans une deuxième série d'expériences (10), le repliement de la ribonucléase a été suivi en présence de différentes conditions qui influencent les interactions inter et intra moléculaires (pH, dénaturants, acides aminés modifiés). En présence de ces perturbateurs, des formes de la protéine possédant des propriétés physiques proches de celle de la protéine native peuvent être observées, mais ces formes ont une activité enzymatique réduite à moins de 1% de celle de l'état natif (figure 1.1). Il est possible de revenir à la forme native de la protéine en plaçant ces formes inactives dans des conditions d'oxydation lente sans perturbateur.

En comparant l'effet de ces perturbateurs en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, Haber et Anfinsen (10) émirent l'hypothèse que les forces permettant la sélection de la bonne combinaison de ponts disulfures sont les interactions, à courte distance, entre les groupements fonctionnels des chaînes latérales le long de la séquence.

### 1.1.2 Le paradoxe de Levinthal et le repliement des protéines

Les expériences d'Anfinsen ont permis d'émettre la théorie selon laquelle la séquence d'une protéine contient toute l'information nécessaire pour son repliement. Cependant, Cyrus Levinthal souligna que si une protéine devait explorer toutes les conformations possibles pour atteindre son état replié, cela nécessiterait un temps astronomique en comparaison de l'échelle de temps des phénomènes biologiques (11). Le raisonnement amenant à cette conclusion est présenté ci-dessous.

## 1. INTRODUCTION

---

Les seules rotations possibles pour la chaîne principale d'une protéine sont la liaison entre le C $\alpha$  et le CO (angle  $\Psi$ ) et la liaison entre le C $\alpha$  et le NH (angle  $\Phi$ ). Ces deux angles existent dans deux paires de conformations, appelées  $\alpha$  et  $\beta$ , dans leurs configurations énergétiques les plus faibles (12). On retrouve ces deux paires de conformations dans les structures secondaires majoritaires hélices  $\alpha$  et feuillet  $\beta$  des protéines repliées.

Théoriquement, si l'on considère le cas d'une protéine de 100 acides aminés, et que l'on limite les angles de rotation des résidus à ces deux conformations de plus faible énergie, il est possible de calculer que le nombre de conformères possible de cette protéine est de  $2^{100}$  soit à peu près  $10^{30}$  possibilités (11). La vitesse limite d'inter-conversions entre les angles  $\Psi$  et  $\Phi$  étant de l'ordre de  $10^{11}$  par seconde, un temps de  $10^{19}$  secondes ou  $10^{11}$  années serait nécessaire pour explorer toutes les conformations possibles pour cette protéine. À titre de comparaison l'âge de l'univers est de l'ordre de  $10^{10}$  années.

C'est ce que l'on appelle le paradoxe de Levinthal et qui conduit à la conclusion qu'une protéine ne peut pas physiquement explorer toutes les configurations possibles pour atteindre son état replié. Le repliement doit être guidé par la formation rapide d'interactions locales, qui déterminent le repliement de la protéine et servent de point de nucléation durant ce processus (11).

### 1.1.3 Développement d'un modèle pour le repliement des protéines

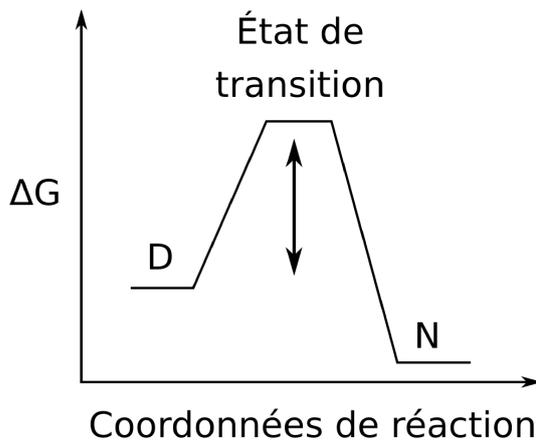
#### 1.1.3.1 Application de la théorie de l'état de transition pour l'étude du repliement des protéines

Le repliement d'une petite protéine pour laquelle l'état natif est en équilibre thermodynamique avec l'état non replié peut être décrit par un modèle à deux états (13). Dans ce modèle (figure 1.2), le repliement est une transition d'ordre zéro où les deux états en équilibre sont séparés par une barrière énergétique qui correspond à l'état de transition.

L'état de transition du repliement d'une protéine peut être assimilé à celui d'une réaction chimique simple. Le repliement d'une protéine peut, lui, être décrit en utilisant les modèles développés pour une cinétique chimique divisée en deux étapes séparées par un état de transition (14). Cependant, quelques modifications doivent être apportées pour appliquer la théorie de l'état de transition au repliement des protéines.

(1) Dans le cas d'une réaction chimique, des liaisons covalentes vont se former ou se casser. Pour une protéine ce sont des interactions de faible énergie qui vont permettre la formation de l'état de transition lors du repliement.

(2) Le repliement d'une protéine peut nécessiter le passage de plusieurs barrières énergétiques avec un état de transition de la réaction globale.



**FIGURE 1.2: Théorie de l'état de transition appliquée au repliement d'une protéine** - Réaction de repliement à deux états, avec un équilibre thermodynamique entre l'état natif (N) et l'état déplié (D). Une barrière énergétique correspondant à la formation de l'état de transition sépare les deux états.

En résumé, l'état de transition correspond à la barrière énergétique de la réaction de repliement-dépliement et les interactions favorisant le repliement vont permettre de compenser la perte d'entropie associée à la formation de l'état natif.

Il est possible d'étudier le processus de repliement par une analyse systématique des conséquences énergétiques de mutations d'une protéine. Cette méthode, nommée analyse de la valeur de  $\Phi$  (15), permet d'obtenir des informations sur l'état de transition en mesurant des différences d'énergie d'activation entre les mutants de la protéine et la protéine de référence.

L'application de cette méthode a permis de déterminer des propriétés communes à l'état de transition de différentes protéines. Il a par exemple été possible d'observer que les interactions présentes au sein de l'état natif d'une protéine peuvent être déjà présentes dans l'état de transition ou bien se former après le passage de la barrière énergétique. Dans ce cas de figure, la formation du corps hydrophobe de la protéine s'effectue progressivement durant le repliement de la protéine, par le biais d'interactions non spécifiques (16).

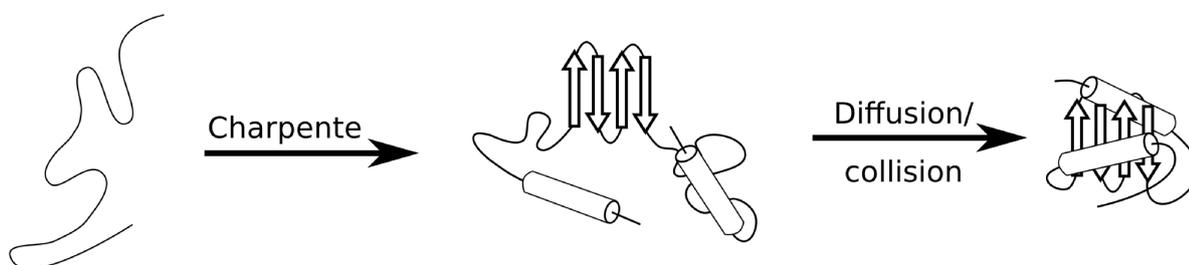
## 1. INTRODUCTION

---

### 1.1.3.2 Différents modèles de repliement des protéines

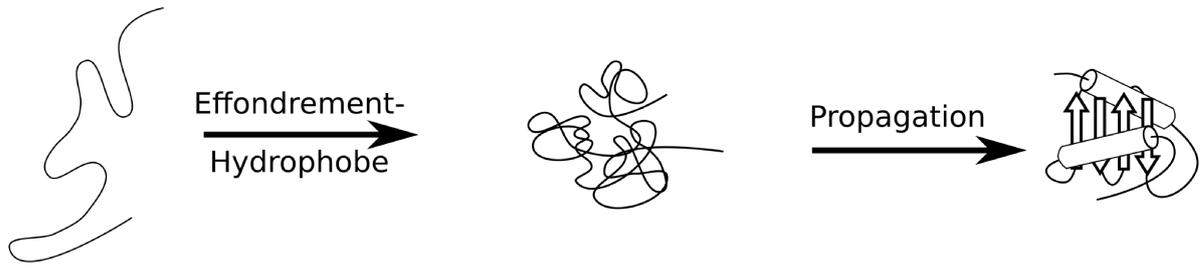
La théorie de l'état de transition permet de décrire la cinétique de repliement d'une protéine. En parallèle du développement de cette théorie, différents modèles ont été proposés afin d'expliquer le repliement d'une protéine d'un point de vue structural. Trois modèles ont été proposés pour expliquer le processus de repliement d'une protéine.

**(1) Le modèle "charpente" (figure 1.3) :** Selon ce modèle, les structures secondaires se forment rapidement et servent de "charpente" pour la mise en place des structures tertiaires (17). Deux mécanismes permettent de décrire ce modèle. Le premier de ces mécanismes est le mécanisme de diffusion-collision dans lequel la protéine est divisée en micro-domaines, présentant des ébauches de structure secondaires, qui peuvent diffuser indépendamment. La collision entre deux micro-domaines entraîne leur fusion en un multi-domaine de taille supérieure, qui peut fusionner avec d'autres micro-domaines jusqu'à obtenir la structure native (18). Le deuxième mécanisme est le mécanisme de nucléation durant lequel la formation lente d'un noyau va permettre de créer une base pour la propagation rapide des structures secondaires (19).



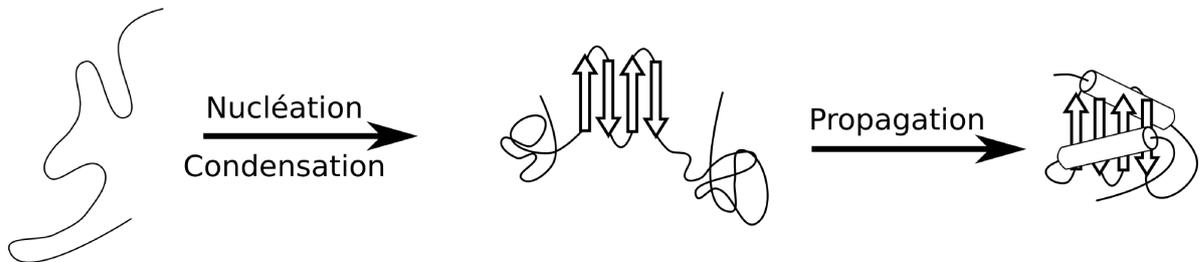
**FIGURE 1.3: Modèle "charpente"** - Schéma représentant le repliement d'une protéine selon le modèle "charpente"

**(2) Le modèle de l'effondrement-hydrophobe (figure 1.4) :** Selon ce modèle, les chaînes hydrophobes de la protéine vont interagir et rapidement former un noyau hydrophobe. La formation de ce noyau hydrophobe va conduire à un "effondrement" de la protéine sur elle-même, avec en parallèle une propagation rapide des structures natives (20). Selon ce modèle, l'état de transition se forme rapidement et correspond à une version distordue de l'état natif, qui va favoriser la formation des structures secondaires et tertiaires en parallèle (21).



**FIGURE 1.4: Modèle de l'effondrement-hydrophobe** - Schéma représentant le repliement d'une protéine selon le modèle de l'effondrement-hydrophobe

(3) **Le modèle de nucléation-condensation (figure 1.5)** : L'application de la méthode d'analyse de la valeur de  $\Phi$  (15) a par la suite permis de rapprocher ces modèles. En effet, il est possible d'observer pour certaines protéines la formation de structures secondaires et tertiaires s'effectuant en parallèle de l'étape d'effondrement hydrophobe (22). La convergence de ces modèles a ainsi donné lieu à la création d'un modèle de nucléation-condensation (13), combinant des propriétés du modèle charpente et du modèle effondrement-hydrophobe (figure 1.5).



**FIGURE 1.5: Modèle de nucléation- condensation** - Schéma représentant le repliement d'une protéine selon le modèle de nucléation- condensation

En résumé, il est possible de décrire le repliement d'une petite protéine globulaire en 3 étapes : (1) Formation d'un noyau stabilisé par des interactions faibles, qui déterminent une topologie proche de la structure native ; (2) Effondrement global de la protéine autour de ce noyau ; (3) Consolidation des régions partiellement structurées pour former la conformation native (23).

## 1. INTRODUCTION

---

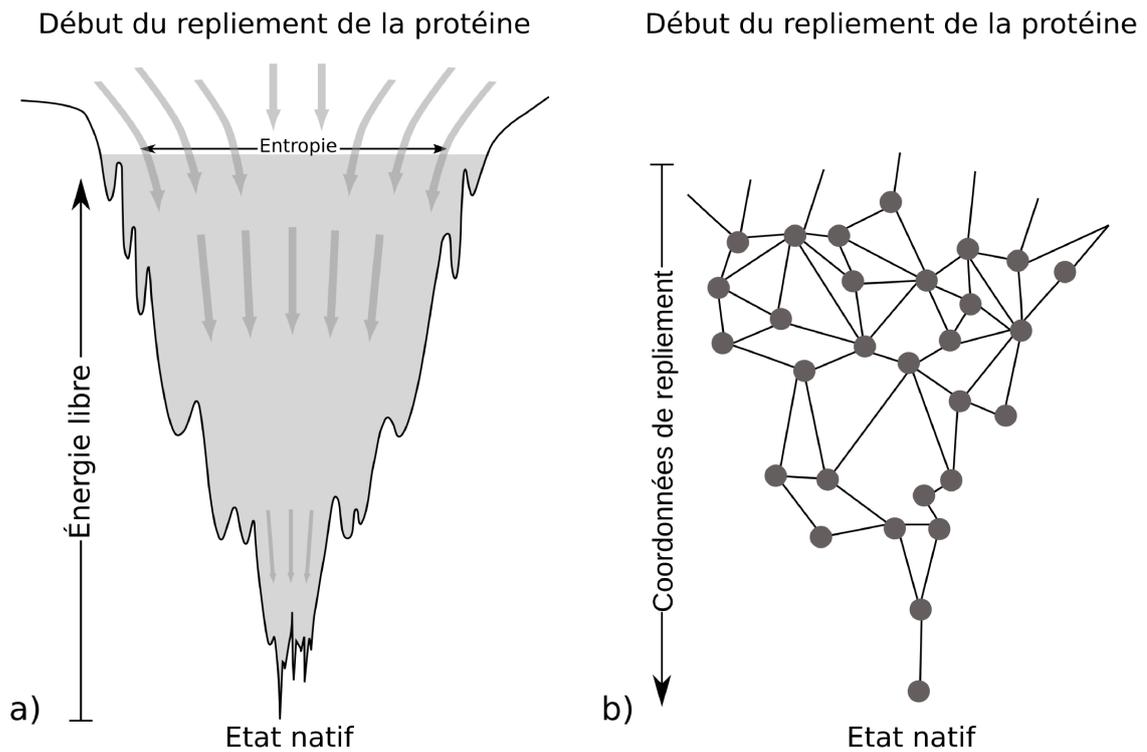
### 1.1.3.3 La théorie du paysage énergétique

La description du repliement d'une protéine par une trajectoire unique entre deux états représente une simplification du processus de repliement. Elle ne rend pas compte de la formation et de la rupture d'un très grand nombre de liaisons de faible énergie durant le repliement. Il est possible d'exprimer la diversité de ces interactions en décrivant la structure de la protéine à travers un ensemble d'états conformationnels, plutôt que par une conformation unique. Cette représentation d'ensemble est rendu possible par la description du repliement d'une protéine à travers un paysage énergétique, tenant compte des aspects cinétiques et thermodynamiques du repliement (24).

La figure 1.6(a) montre une représentation bi-dimensionnelle du paysage énergétique correspondant au repliement d'une protéine. La théorie du paysage énergétique décrit l'évolution des ensembles conformationnels à travers un "puits". La largeur permet de quantifier l'entropie associée aux conformations de la protéine et la profondeur représente la différence d'énergie libre entre les états dépliés et repliés de la protéine. Lors de l'évolution vers l'état replié, le nombre de conformations possibles va diminuer, permettant finalement d'atteindre la conformation native (25, 26, 27).

La figure 1.6(b) est une représentation complémentaire de la théorie du paysage énergétique, où chaque nœud correspond à un ensemble conformationnel de la protéine. Chaque ensemble conformationnel peut évoluer selon un chemin différent avec une diminution du nombre de chemins possible lorsqu'on se rapproche de l'état natif.

La théorie du paysage énergétique permet de proposer une solution au paradoxe de Levinthal avec, à chaque étape, une diminution du nombre de conformations possibles qui est guidée par la séquence de la protéine. Ainsi, lors du repliement la protéine n'a pas besoin d'explorer toutes les conformations possibles mais seulement un nombre limité de conformations.



**FIGURE 1.6: Représentation du repliement d'une protéine par la théorie du paysage énergétique** - a) Paysage énergétique sous forme d'un puits, avec une direction favorisée vers un état natif unique de plus basse énergie. Les creux représentent des minima d'énergie locaux, où la protéine peut être piégée dans un état défavorable lors de son repliement (figure adaptée de (28)); b) Modèle de représentation du paysage énergétique où chaque nœud représente un ensemble de conformations de la protéine lors de son repliement et chaque trait un chemin de repliement. L'axe vertical représente les coordonnées de la réaction de repliement. Les conformations dans la partie supérieure de la figure sont les plus éloignées de l'état natif et le nombre de chemin possible diminue en se rapprochant de l'état natif.

## 1. INTRODUCTION

---

### 1.1.4 Certaines protéines ont besoin d'aide pour leur repliement et leur assemblage

Le développement des modèles et théories permettant d'expliquer le repliement des protéines a rapidement été suivi, à la fin des années 1980, par la découverte de protéines qui permettent de modifier les barrières énergétiques décrites précédemment et d'aider au repliement de protéines. L'intérêt et le rôle de ces protéines, appelées chaperonnes moléculaires, ont été énoncés par Pelham (29) puis reformulés par Ellis (30) pour expliquer le repliement et l'assemblage post-traductionnel des protéines :

*"The basic argument is that in some cases the transient exposure of hydrophobic or charged surfaces normally involved in domains interactions, either within or between polypeptide chains, can results in "improper" interactions to produce incorrect structures. (...) Molecular chaperones would prevent the formation of such incorrect structures "* (30)

Par la suite, le concept a été étendu à tous les domaines du vivant avec l'observation de la présence de la chaperonne GroEL chez les eucaryotes et les procaryotes (31). L'activité de repliement *in vitro* d'une protéine par une chaperonne a été décrite pour la première fois en 1989 avec la démonstration du repliement, dépendant de l'ATP, de la protéine RUBISCO par Cpn60 (32).

### 1.1.5 Repliement *in vitro* et repliement *in vivo* : Quelles sont les différences ?

La découverte des chaperonnes moléculaires a également conduit à des questionnements quant aux différences de repliement entre les protéines *in vitro* et *in vivo*. Il est indéniable que la protéine dans un tube à essai et celle dans une cellule sont soumises aux mêmes lois physiques. Cependant, durant les 3.5 derniers milliards d'années, les protéines ont été soumises à une pression évolutive favorisant leur repliement dans un environnement bien plus concentré et complexe tel que celui des cellules. Le repliement des protéines *in vivo* diffère en de nombreux aspects du repliement des protéines étudiées *in vitro* (33, 34).

#### **Le cytoplasme des cellules est un environnement très encombré :**

*In vivo*, dans le cytoplasme, la concentration en macromolécules est de l'ordre de 200 à 400 mg/mL, et les surfaces autour de la protéine en repliement sont hautement réactive. L'encombrement et l'influence des interactions protéine-protéine, vont avoir un effet très

important sur le repliement des protéines (35).

Il est possible de simuler *in vitro* l'encombrement cellulaire en utilisant des polymères de haut poids moléculaire. L'analyse du repliement des protéines dans ces conditions a montré que le pourcentage de repliement est réduit à des valeurs proches de zéro avec, en parallèle, une très forte augmentation de l'agrégation (36). D'une manière très intéressante, il a été également montré qu'en présence de chaperonnes moléculaires, le repliement des protéines soumises à un environnement encombré pouvait être rétabli (37, 38).

### **La synthèse des protéines est un processus lent :**

*In vivo*, les protéines sont synthétisées de manière vectorielle par les ribosomes. Le canal de sortie du ribosome fait 100 Å de long mais seulement 20 Å de large (39), ce qui empêche la formation de structures secondaires plus large que des hélices  $\alpha$  (40, 41) et les interactions à longue portée entre deux parties éloignées de la protéine (42). Ainsi, le repliement de la protéine ne va pouvoir se faire qu'après sa synthèse complète ou par domaine ( $\pm$  50-300 résidus) pendant sa synthèse.

Ce modèle de repliement de protéine par domaine a été confirmé par l'observation par RMN de la synthèse de la chaîne polypeptidique par le ribosome (43). Dans ces expériences, la synthèse d'une protéine a été arrêtée à différents niveaux de sa séquence et l'étude structurale de ces intermédiaires a permis d'observer la formation de domaines indépendants.

La traduction étant un phénomène relativement lent (15–75 s pour une protéine de 300 acides-aminés), il a été proposé que le repliement des protéines pouvait se faire de manière co-translationnelle avant que la chaîne polypeptidique ne soit entièrement synthétisée pour éviter les risques de dégradation.

### **Étude des chaperonnes moléculaires pour mieux comprendre le repliement des protéines *in vivo* :**

Les nombreuses différences qui existent entre le repliement des protéines *in vitro* et leur repliement *in vivo* pourraient s'expliquer par le rôle des chaperonnes moléculaires. Celles-ci permettraient la protection des protéines *in vivo* dans un environnement défavorable à leur repliement.

## 1. INTRODUCTION

---

L'étude du fonctionnement des chaperonnes moléculaires pourrait permettre d'apporter des informations pour établir la connexion entre le repliement des protéines *in vitro* et *in vivo*. Les différentes familles de chaperonnes moléculaires ainsi que leur fonctionnement vont être traités dans la partie suivante.

### 1.2 Le système des chaperonnes moléculaires

#### 1.2.1 Qu'est ce qu'une chaperonne moléculaire ?

Depuis leur "découverte" (29, 30), la description du rôle des chaperonnes moléculaires n'a cessé d'évoluer et leur rôle est aujourd'hui considéré comme primordiale. Avant de rentrer plus en détails dans la description de cette classe particulière de protéines, il est nécessaire de définir ce qu'est une chaperonne moléculaire. Nous reprenons ici la définition donnée par Hartl *et coll* (44) :

*"We define a molecular chaperone as any protein which interacts, stabilizes or helps a non-native protein to acquire its native conformation but is not present in the final functional structure"*(44)

Différentes protéines correspondent à cette définition. La plupart sont des protéines de résistance au stress ou protéines de choc thermique (Heat shock proteins (Hsps)), leur synthèse est induite par des conditions de stress qui ont pour effet d'augmenter la concentration cellulaire en intermédiaire de repliement de protéine, ce qui favorise les conditions d'agrégation.

Les chaperonnes moléculaires sont classées en différents groupes, en fonctions de leur homologie de séquence. Elles sont habituellement dénommées d'après leur masse moléculaire : Hsp40s, Hsp60s, Hsp70s, Hsp90s, Hsp100s et les petites Hsps. Mise à part leur rôle dans le repliement des protéines, elles sont également impliquées dans différents aspects de la maintenance du protéome : transport de protéines, dégradation de protéines et dissociation d'agrégats.

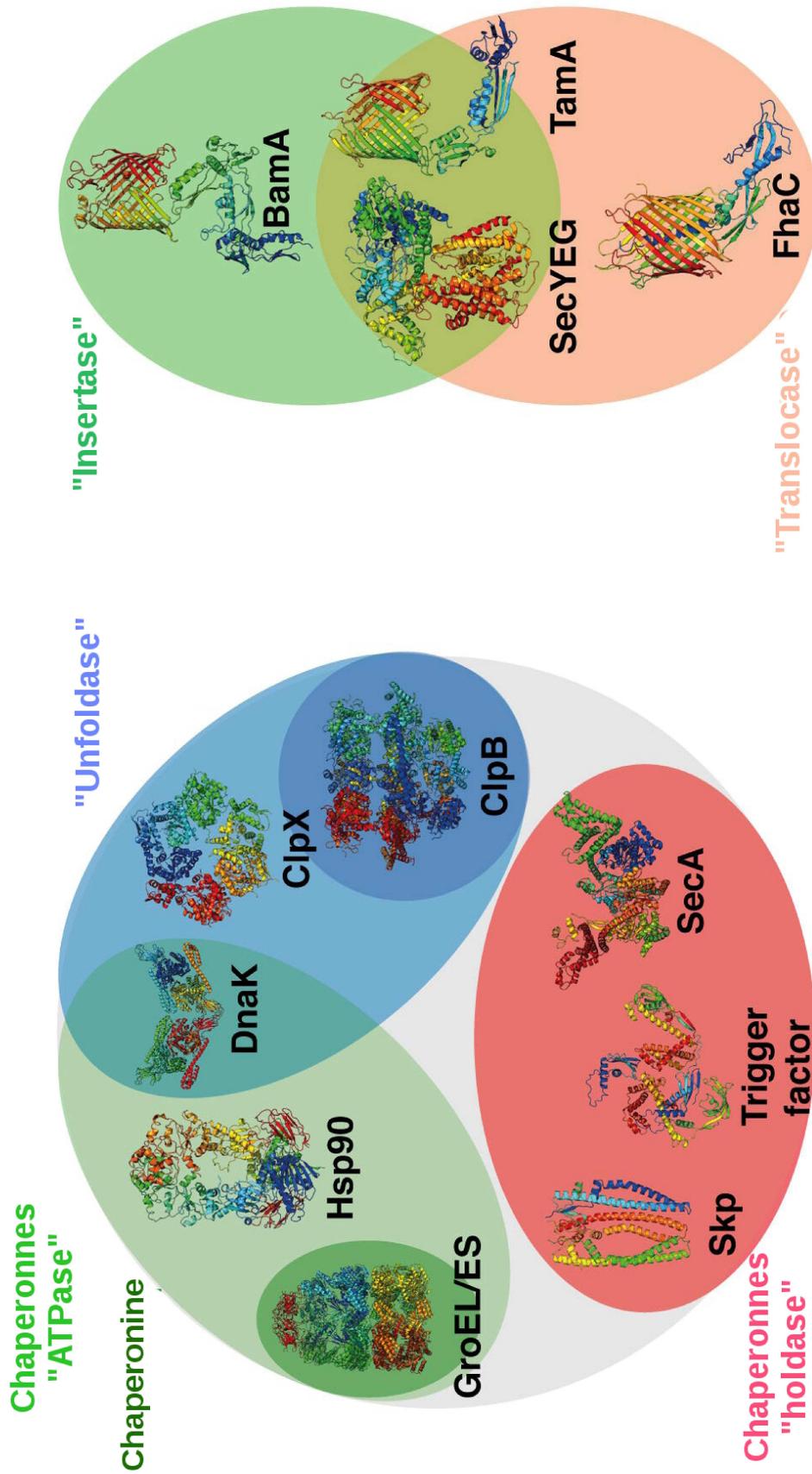
Le tableau 1.1 donne un aperçu des fonctions des différentes chaperonnes moléculaires et la figure 1.7 permet d'observer la diversité structurale des chaperonnes qui permet de répondre au problème du repliement des protéines dans la cellule.

Famille	Organisme	Chaperonne	Taille	Fonctions	Ref.
<b>Hsp10</b>	Bactéries	GroES (c)	(10 kDa) <sub>7</sub>	Co-chaperonnes des Hsp60. Elles sont essentielles pour le fonctionnement de GroEL et des chaperonines mitochondriales.	
	Archées	Préfoldine (c)	(15 kDa) <sub>6</sub>		
	Eucaryotes	Préfoldine (c) HSP10 (m)	(15 kDa) <sub>6</sub> (10 kDa) <sub>7</sub>		
<b>Hsp40</b>	Bactéries	DnaJ (c)	(40 kDa) <sub>4</sub>	Module l'activité ATPase des Hsp70s (DnaK et Hsc70/Hsp70) et l'association de ces chaperonnes aux protéines dépliées.	(45)
	Eucaryotes	HSP40 (c)	(40 kDa) <sub>4</sub>		(46)
<b>Hsp60</b>	Bactéries	GroEL(c)	(60 kDa) <sub>7</sub>	Repliement des protéines par un mécanisme d'encapsulation qui permet de protéger les protéines.	
	Archées	Thermosomes(c)	(60 kDa) <sub>7-9</sub>		
	Eucaryotes	TRiC/CCT (c) mtHSP60 (m)	(60 kDa) <sub>7-9</sub> (60 kDa) <sub>7</sub>		
<b>Hsp70</b>	Bactéries	DnaK (c)	(40 kDa) <sub>4</sub>	Chaperonnes impliquées dans de nombreux processus liés au repliement des protéines comme la prévention de l'agrégation, l'assemblage et le désassemblage de protéines oligomériques.	(47)
	Eucaryotes	Hsc70, Hsp70 (c) mtHsp70 (m)	(40 kDa) <sub>4</sub> (40 kDa) <sub>4</sub>		(48),(49) (50)
<b>Hsp90</b>	Bactéries	Hsp90 (c)	(90 kDa) <sub>2</sub>	Repliement des protéines de signalisation, régulation des récepteurs de stéroïdes et des kinases. Transport et repliement des protéines sécrétées.	(51, 52)
	Eucaryotes	TRAP1 (c)	(90 kDa) <sub>2</sub>		(53)

**TABLE 1.1: Tableau résumant les fonctions de différentes chaperonnes moléculaires** - Pour chaque chaperonne le compartiment cellulaire dans lequel elle se situe est indiqué (c) cytoplasme ou (m) mitochondrie

Famille	Organisme	Chaperonne	Taille	Fonctions	Ref.
<b>Hsp100</b>	Bactéries	ClpA, ClpB (c)	(40 kDa) <sub>6</sub>	Prévention de l'agrégation, désassemblage des agrégats et repliement des protéines dépliées.	(54, 55)
	Eucaryotes	Hsp101 (c)	(100 kDa) <sub>6</sub>		(56, 57)
<b>Trigger Factor</b>	Bactéries	Trigger Factor (c)	(50 kDa) <sub>2</sub>	Attachement et repliement des protéines à la sortie du ribosome.	(58, 59)
<b>Associées au ribosome</b>	Archées	NAC (c)	(14 kDa) <sub>4</sub>	Fonctions similaires au trigger factor mais aucune homologie de séquence entre les deux familles de chaperonnes.	(60)
	Eucaryotes	RAC (c)	(14 kDa) <sub>4</sub>		
<b>Petite Hsp</b>	Eucaryotes	$\alpha\beta$ -Crystalline (c)	(15-30 kDa) <sub>12-50</sub>	Désagrégation dépendante de l'ATP.	(61, 62)
<b>Autres</b>	Bactéries	SecB (c)	(17 kDa) <sub>4</sub>	Transport des protéines sécrétées. Repliement des protéines du périplasma et association du pilus.	(63)
		Skp (p)	(17 kDa) <sub>3</sub>		(64)
<b>Autres</b>	Eucaryotes	Tim9-Tim10 (m)	(10 kDa) <sub>6</sub>	Transfert des protéines dans l'espace inter-membranaire.	(65, 66)
<b>Insertion dans la membrane</b>	Bactéries	Bam A (c)	(88 kDa)	Chaperonnes impliquées dans la translocation ou l'insertion de protéines à travers la membrane de manière dépendante ou indépendante de l'ATP.	(67)
	Eucaryotes	Tom40 (c)	(40 kDa)		(68)

TABLE 1.2: Tableau résumant les fonctions de différentes chaperonnes moléculaires - Suite du tableau 1.1



**FIGURE 1.7: Différentes classes de chaperonnes moléculaires** - Illustrations des différentes classes de chaperonnes moléculaires présentées dans le tableau 1.1 avec quelques exemples pour chaque classe (code PDB : trigger factor, 1W26 ; Hsp90, 2CG9 ; GroEL/ES, 1AON ; ClpX, 3HWS [39] ; ClpB, 4D2U ; Skp, 1SG2 ; SecA, 2FSF ; DnaK, 4B9Q ; FhaC, 2QDZ ; BamA, 4K3B ; SecYEG, 3DIN ; TamaA, 4C00). Figure adaptée de Burmann *et al.* (69).

## 1. INTRODUCTION

---

### 1.2.2 Mode d'action des chaperonnes moléculaires

#### 1.2.2.1 La séquence primaire des protéines contient toute l'information nécessaire pour leur repliement

Les chaperonnes moléculaires ne modifient pas le chemin emprunté par la protéine pour se replier mais vont seulement l'aider à se placer dans les conditions adéquates pour son repliement. Cela est supporté par le fait que parmi les trois familles de chaperonnes moléculaires les plus connues pour interagir avec les protéines nouvellement synthétisées (Hsp70, Hsp40 et les chaperonines) aucune ne montre une spécificité particulière pour l'interaction avec des protéines (70, 71).

#### 1.2.2.2 Le mécanisme d'action des chaperonnes dépend de leur taille

On peut classer les chaperonnes moléculaires en deux familles, en fonction de leur taille : D'une part les petites chaperonnes d'une taille inférieure à 200 kDa avec Hsp90, Hsp70, Hsp40 et les co-chaperonnes (70, 71) et d'autre part les grosses chaperonnes d'une taille supérieure à 800 kDa, qui sont majoritairement représentées par les Hsp60 (70, 71, 72).

Les petites chaperonnes ne peuvent pas interagir avec la chaîne complète de la protéine dépliée mais seulement avec des petites régions hydrophobes de quelques résidus (7 résidus dans le cas de Hsp70 (70)). En masquant ces régions, elles permettent d'éviter l'agrégation, par exemple, durant le processus d'élongation de la chaîne polypeptidique (73).

Les grosses chaperonnes peuvent séquestrer la chaîne polypeptidique complète dans leur cavité centrale. Cavité où la protéine est protégée de l'agrégation et peut se replier dans des conditions favorables. Dans le cas de GroEL la cavité peut accueillir une protéine d'une taille théorique maximale d'environ 75 kDa (74).

#### 1.2.2.3 Les chaperonnes agissent sous la forme d'un réseau interconnecté

L'accumulation de protéines dans une conformation non native dans le cytoplasme entraîne de nombreux problèmes pour la cellule. Pour éviter cela, on peut imaginer que les chaperonnes forment un réseau lors des différentes étapes de la synthèse des protéines au lieu d'interagir de manière séparée. Dans ce réseau, chaque chaperonne peut transférer la protéine vers une autre chaperonne, plutôt que de la relâcher dans un environnement favorisant son agrégation. Des preuves expérimentales allant dans le sens de cette hypothèse ont été obtenues en reconstituant *in vitro* un réseau de chaperonnes pour le repliement de

la rhodhanèse comprenant DnaK, DnaJ, GrpE et GroEL–GroES (75).

### 1.2.2.4 Évolution du repliement post-traductionnel vers le repliement co-traductionnel

Il existe des différences notables dans la variété et la longueur des protéines procaryotes et eucaryotes. Pour illustrer cette différence, la comparaison de la distribution de la longueur des protéines est présentée dans le tableau 1.3.

Organisme	Taille moyenne (résidus)	> 500 résidus	Nombre de protéines analysées
<i>M. jannaschi</i>	287	8%	1735
<i>E. coli</i>	317	13%	4285
<i>S. cerevisiae</i>	484	37%	5886
<i>C. elegans</i>	442	28%	13 621

**TABLE 1.3:** Comparaison de la distribution de la longueur des protéines pour *Methanococcus jannaschi*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Caenorhabditis elegans* - Les données présentées dans le tableau ont été obtenues à partir de l'étude de Netzer *et al.* (76).

La taille des domaines structuraux des protéines, définis comme unités indépendantes de repliement, est assez proche pour tous les organismes (de 50 à 300 résidus). Ainsi, plus un génome encode pour des protéines de plus de 300 résidus, plus il encode pour des protéines multi-domaines (77).

Ces protéines plus longues créent un problème pour leur repliement car elles vont se replier de manière moins efficace et sont exposées plus longtemps lors de leur synthèse par le ribosome (78). Des travaux récents suggèrent qu'un des mécanismes permettant le repliement de ces protéines serait une évolution de l'équilibre entre le repliement post-traductionnel et le repliement co-traductionnel où un domaine se replie pendant la synthèse du domaine suivant (76, 77).

## 1. INTRODUCTION

---

### 1.2.3 Voie impliquant des chaperonnes dans le cytoplasme.

L'organisation générale des chaperonnes dans le cytoplasme est hautement conservée à travers les 3 domaines du vivant (bactérie, archée et eucaryote). Tout d'abord les chaperonnes s'attachant au ribosome (TF, NAC ou RAC) interagissent avec la chaîne polypeptidique sortant du ribosome, suivi par des chaperonnes qui n'ont pas une interaction directe avec le ribosome (Hsp70). Ainsi, le repliement d'une protéine peut démarrer de manière co-traductionnelle et finir de manière post-traductionnelle après transfert de la protéine aux chaperonnes situées en aval du réseau de chaperonnes : les chaperonines et les Hsp90.

Parmi les différentes chaperonnes moléculaires, les chaperonines présentent un intérêt tout particulier par leur mode d'action qui consiste à interagir avec la chaîne polypeptidique entière de la protéine cliente en l'encapsulant dans leur cavité à l'opposé de la majorité des chaperonnes qui vont interagir avec une partie réduite de la chaîne polypeptidique de la protéine cliente.

La taille des chaperonines ainsi que la complexité de leur mécanisme d'action fait de leur étude un sujet très intéressant mais également un défi de taille. Les chaperonines vont être traitées en détail dans le prochain chapitre.

### 1.3 Deux familles de chaperonines

#### 1.3.1 Introduction sur les chaperonines

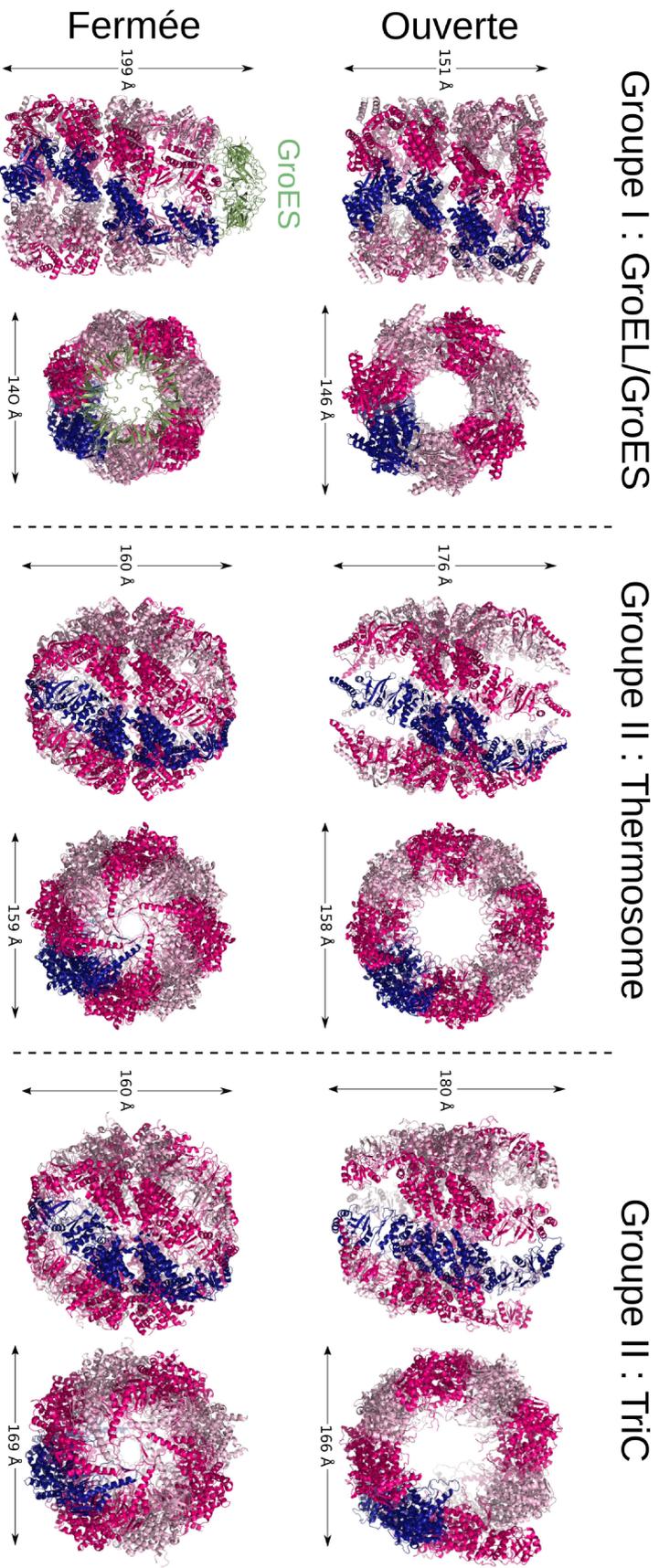
Le terme chaperonine a été utilisée pour la première fois en 1988 par Hémmingsen *et al.* (31), pour décrire une classe spécifique de protéines qui aide au repliement d'autres protéines. Les chaperonines sont organisées sous la forme d'un double anneau, de 800 à 1000 kDa, composé de 7 à 9 sous-unités par anneau (figure 1.8), chaque anneau pouvant être dans une conformation ouverte ou une conformation fermée. Dans la conformation fermée, l'anneau forme une cavité où une protéine peut se replier dans un espace isolé de l'environnement cellulaire. Le passage d'une conformation ouverte à fermée nécessite de larges changements conformationnels qui sont dépendant de la liaison et l'hydrolyse de l'ATP.

Elles sont présentes chez tous les organismes qui ont été étudiés (à l'exception de certaines souches de *Mycoplasma* et *Ureaplasma*) et ont été démontrées comme essentielles pour la survie des cellules (79, 80, 81). On distingue deux groupes de chaperonines : Le groupe I que l'on trouve chez les bactéries (GroEL) et les organites eucaryotes (Hsp60 : heat-shock protein 60), et le groupe II que l'on trouve chez les archées (Thermosome) et dans le cytoplasme des eucaryotes (CCT : Chaperonin Containing TCP-1).

La différence majeure entre les deux groupes de chaperonines est liée au mécanisme de fermeture de l'anneau. :

- Pour les chaperonines du groupe I, c'est une co-chaperone (Hsp10) qui vient fermer la cavité en formant un "couvercle".
- Pour les chaperonines du groupe II, le couvercle est encodée dans la séquence de la protéine sous la forme d'une hélice de protrusion. Le contact entre les hélices de protrusions des sous-unités d'un anneau permettant de former un couvercle.

Malgré cette différence dans le mécanisme de fermeture et leur faible identité de séquence ( $\approx 20\%$ ), les ressemblances entre la structure des particules natives des deux groupes est très importante comme on peut l'observer dans la figure 1.8.



**FIGURE 1.8: Vue d'ensemble des structures des chaperonines** - Conformations ouvertes et fermées des chaperonines des groupe I et II en représentation "cartoon" (GroEL/ES, thermosome, et CCT). Les dimères sont colorés alternativement en violet et rose et GroES en vert. Pour chaque conformation un dimère est coloré en bleu, pour mettre en évidence le mode d'interaction des sous-unités. Les conformations ouvertes et fermées sont représentées en vue de côté et vue de dessus. (codes PDB : GroEL/ES : 1XCCK (ouverte) et ISX4 (fermée) ; thermosome : 3IZH(ouverte) et 3IZM (fermée) ; CCT : 4A0V (ouverte) et 4V8R (fermée))

### 1.3.2 Chaperonine du groupe I

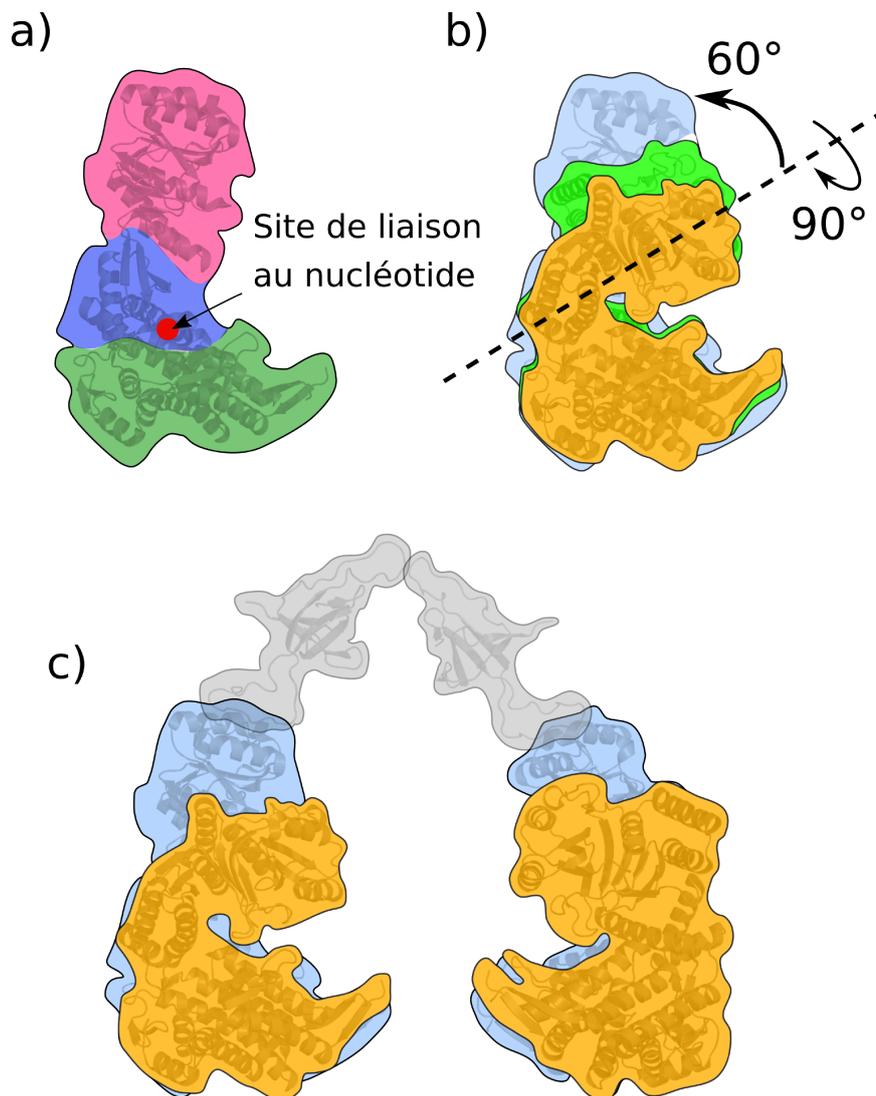
#### 1.3.2.1 Informations structurales sur le complexe GroEL/GroES

Chaque sous-unité de GroEL est composée de trois domaines (figure 1.9(a)) :

- Le domaine équatorial permet d'établir la majorité des contacts entre les sous-unités d'un anneau et entre les deux anneaux (82, 83). Il contient également un site de liaison au nucléotide dans sa partie supérieure (83).
- Le domaine intermédiaire agit comme une charnière entre les deux autres domaines. Sa flexibilité permet les importants changements conformationnels entre les conformations ouvertes et fermées (83).
- Le domaine apical est impliqué dans l'interaction avec des protéines dépliées grâce à des zones de résidus hydrophobes. Il va également permettre la liaison avec GroES.

Lors de la transition entre les conformations ouvertes et fermées, les sous unités vont subir d'importantes modifications conformationnelles. La superposition des structures d'une sous-unité dans les différentes conformations est présentée dans la figure 1.9(b). On peut observer que le domaine apical est celui qui subit les modifications les plus importantes avec une rotation de  $90^\circ$  et une rotation vers le haut de  $60^\circ$  lors du passage dans la conformation fermée (84).

La figure 1.9(c) montre une vue en coupe d'un anneau dans la conformation ouverte (orange) et dans la conformation fermée (bleue). Le passage de la conformation ouverte à la conformation fermée entraîne une augmentation de la taille de la cavité. Celle-ci permet de former un environnement isolé où la protéine cliente peut se replier (83, 85). Dans la conformation fermée la cavité peut accueillir une protéine d'une taille maximum de 75 kDa (74).



**FIGURE 1.9: Flexibilité conformationnelle des chaperonines du groupe I** - Deux types de flexibilités conformationnelles permettent le passage de la conformation ouverte à la conformation fermée des chaperonines du groupe I : Les mouvements des domaines d'une sous-unité et l'orientation des sous-unités dans un anneau. a) Trois domaines d'une sous-unité : équatorial, intermédiaire et apical respectivement en vert, bleu et rose. Le site de liaison au nucléotide est représenté par un rond rouge (GroES n'est pas représenté pour faciliter la visualisation)(code PDB : 1SX4) ; b) Superposition des structures de trois conformations de GroEL superposées sur le domaine équatorial. GroEL en orange (code PDB : 1XCK), GroEL-ATP en vert (code PDB : 27CE) et GroEL-GroES-ADP-AlFx en bleu (code PDB : 1SX4). La superposition permet d'observer la flexibilité des domaines relativement au domaine équatorial et notamment la rotation du domaine apical dans la conformation liée à l'ATP ; c) Superposition des conformations ouvertes (orange) et fermées (bleue) de GroEL, GroES est représenté en gris. Deux sous-unités sont représentées pour l'anneau.

### 1.3.2.2 Cycle fonctionnel des chaperonines du groupe I

Le cycle fonctionnel de GroEL est dépendant de la liaison et l'hydrolyse de l'ATP qui vont permettre de nombreux changements conformationnels et la liaison de GroES (86, 87). Les différentes étapes du cycle vont également être régulées par des phénomènes d'allostéries positives et négatives (respectivement intra et inter-anneaux) (88).

Les étapes de ce cycle ont été étudiées en détails durant les deux dernières décennies. Cependant, un débat existe quant à savoir si la chaperonine GroEL forme un complexe asymétrique ("bullet cycle" (89)) ou symétrique ("football cycle" (90)) pendant le cycle fonctionnel.

Nous allons tout d'abord décrire le modèle classique "bullet cycle", puis nous discuterons des différences avec le second modèle "football cycle". En plus des références citées dans le texte, la description du modèle "bullet cycle" va principalement se baser sur les publications (91, 92, 93, 94, 95) et la description du modèle "football cycle" sur les publications (96, 97, 98, 99).

#### **Modèle de repliement "Bullet cycle" (figure 1.10) :**

##### **(1) Liaison de l'ATP et de la protéine cliente à un des anneaux de GroEL.**

Au début du cycle fonctionnel une protéine dépliée se lie à GroEL (100). Ensuite la liaison de l'ATP va entraîner une rotation du domaine apical qui va avoir pour effet d'étirer la structure de la protéine dépliée (101). La liaison coopérative des 7 molécules d'ATP au domaine équatorial d'un même anneau, anneau actif (appelé CIS), va également conduire à une surélévation et une rotation du domaine apical qui passe dans une position où il peut lier la co-chaperonne GroES (102, 103).

##### **(2) Liaison de GroES et internalisation de la protéine cliente.**

La liaison de GroES va permettre le passage de l'anneau dans la conformation fermée mais également entraîner une rotation de 120 degrés du domaine apical. Après la liaison de GroES, les sites d'interactions avec la protéine cliente vont être masqués et la protéine cliente va être encapsulée dans la cavité (104).

##### **(3) Repliement de la protéine cliente.**

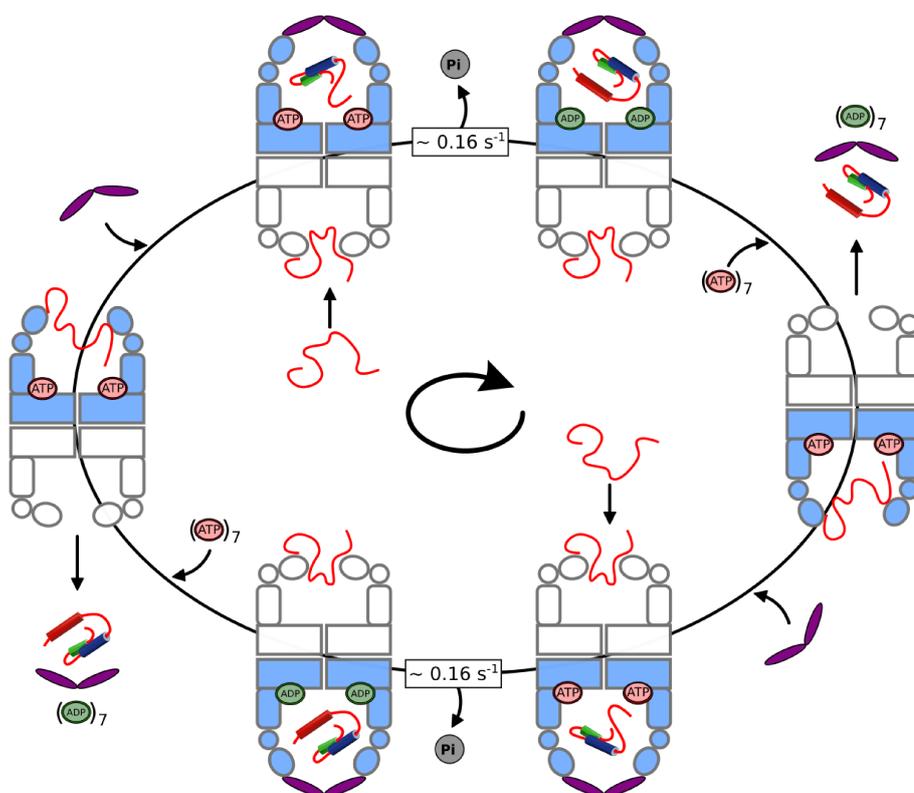
La protéine cliente encapsulée dans la cavité de l'anneau CIS va ensuite pouvoir se replier dans un environnement protégé. Environ 6 secondes après l'association avec GroES, l'ATP va être hydrolysé. Le passage de l'anneau CIS dans un état lié à l'ADP va avoir pour effet

## 1. INTRODUCTION

de diminuer l'affinité de GroEL pour GroES et également de favoriser la liaison de l'ATP dans l'anneau TRANS (102, 105).

### (4) Libération de la protéine cliente repliée.

La séparation de GroEL et GroES va permettre l'ouverture de la cavité. Ainsi, la protéine cliente va pouvoir sortir dans un état replié, ou partiellement replié qui pourra dans ce cas subir un second cycle de repliement (102, 106). La liaison de l'ATP à l'anneau TRANS dans l'étape précédente permet de démarrer un nouveau cycle dans lequel l'anneau TRANS devient l'anneau CIS.

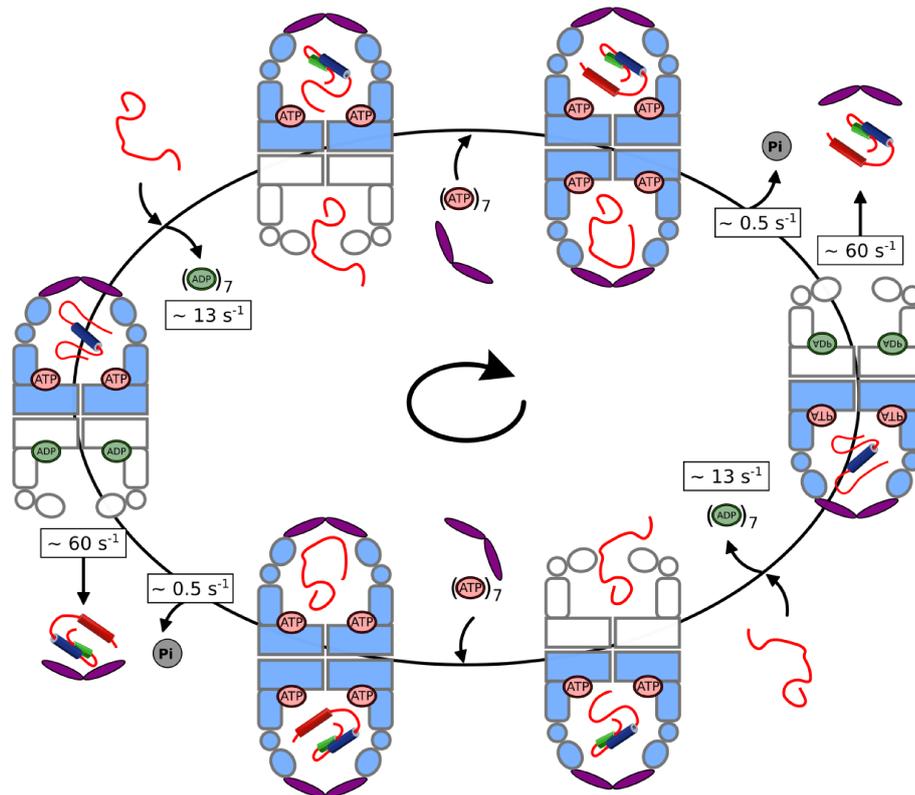


**FIGURE 1.10: GroEL/ES : Repliement d'une protéine selon le modèle "bullet cycle"** - Dans ce modèle la chaperonine fonctionne de manière alternée avec une seule cavité de repliement active à la fois. Le modèle est décrit dans le texte. L'anneau CIS est représenté en bleu, l'anneau TRANS en blanc et GroES en violet. Les constantes cinétiques pour les différentes étapes proviennent de Horwich *et al.* (93)

Dans le modèle présenté ci dessus les deux anneaux fonctionnent de manière alternés avec un complexe asymétrique GroEL/[GroES]<sub>1</sub> et une seule chambre de repliement active à la fois (106, 107).

**Modèle de repliement "football cycle" (figure 1.11) :**

La figure 1.11 illustre le cycle fonctionnel de GroEL selon le modèle du "football cycle". Dans ce modèle, le complexe symétrique GroEL/[GroES]<sub>2</sub> est la forme dominante et les deux anneaux fonctionnent presque en phase l'un avec l'autre (96).



**FIGURE 1.11: GroEL/ES : Repliement d'une protéine selon le modèle "football cycle"** - Dans ce modèle, à l'opposé du modèle précédent, l'espèce dominante est GroEL/[GroES]<sub>2</sub> avec une forme de ballon de football. L'anneau CIS est représenté en bleu, l'anneau TRANS en blanc et GroES en violet. Les constantes cinétiques pour les différentes étapes proviennent de Ye *et al.* (97)

Des études récentes ont permis de montrer que la formation du complexe symétrique serait favorisée par la présence d'une protéine dépliée (96, 97). Il est assumé dans ce modèle que sans protéine cliente la dissociation de l'ADP est l'étape limitante. L'interaction avec une protéine dépliée va accélérer la dissociation de l'ADP et ainsi de permettre la liaison de l'ATP et de GroES dans l'anneau TRANS avant qu'il n'ait pu être hydrolysé dans l'anneau CIS (97).

Haldar *et al.* (108) ont montré que l'interaction avec une protéine dépliée va également diminuer l'allostérie négative entre les anneaux. Cela permettrait d'expliquer pourquoi la

## 1. INTRODUCTION

---

formation d'un complexe symétrique est possible malgré les données montrant une allostérie négative sans protéine cliente.

Les deux modèles sont supportés par un ensemble de données structurales, biochimiques et fonctionnelles, et il n'est pas possible en l'état actuel des connaissances de trancher en faveur d'un de l'un ou de l'autre. Il est possible d'émettre l'hypothèse que le modèle "football cycle" correspondrait donc au cycle fonctionnel avec une protéine cliente et le modèle "bullet cycle" au cycle fonctionnel sans protéine cliente (96, 97, 98).

### 1.3.2.3 Modèles de repliement des protéines par les chaperonines

Dans la partie précédente, nous avons décrit le cycle fonctionnel de GroEL avec les modifications conformationnelles aux différentes étapes du cycle. Il va être également intéressant de présenter les différents modèles qui permettent d'expliquer le repliement de la protéine cliente par GroEL. Quatre modèles ont été proposés pour décrire le repliement des protéines par GroEL (109, 110). Ils sont présentés dans la figure 1.12 et décrits dans le texte ci-dessous.

#### **Modèle de la cage passive (figure 1.12(a)) :**

Le modèle de la cage passive, appelé modèle de la "cage d'Anfinsen", propose que la protéine se replie dans la cavité avec la même cinétique qu'en solution à une dilution "infinie", sans possibilité d'agrégation (107, 111). Ce modèle est le premier à avoir été proposé pour le repliement de protéine par des chaperonines. Cependant, plusieurs données sont en défaveur de ce modèle. En particulier, le fait qu'il a été possible d'observer l'accélération du repliement de protéine par GroEL/ES (101).

#### **Modèle de repliement itératif (Modèle du repliement forcé) (figure 1.12(b)) :**

Certaines protéines peuvent être piégées dans des états correspondant à un repliement incorrect. Dans ce modèle, la liaison de l'ATP à GroEL va permettre de forcer mécaniquement le dépliement de la protéine cliente (101). Ainsi, GroEL pourrait donner une nouvelle chance à la protéine en la ramenant vers un niveau plus élevé du paysage énergétique. Une autre caractéristique de ce modèle est qu'après chaque cycle de repliement, la protéine peut être soit être relâchée à l'extérieur de la chaperonine ou bien re-encapsulée dans la cavité pour subir un nouveau cycle de repliement.

#### **Modèle du repliement itératif stationnaire (figure 1.12(c)) :**

Il a été montré que plusieurs protéines d'une taille supérieure à celle de la cavité peuvent être repliées par GroEL (aconitase mitochondriale (112) , maltodextrin glucosidase (113) , malate synthase G (114)).

Le protéine cliente étant trop large pour rentrer dans la cavité, elle va rester attachée à l'anneau CIS de GroEL ce qui va permettre sa protection contre l'agrégation. Dans ce modèle, la liaison de GroES/ATP à l'anneau TRANS va entraîner des modifications qui conduisent à la libération et au repliement de la protéine cliente (113). Ainsi, le repliement de ces protéines va se faire selon un mécanisme de repliement TRANS où la protéine cliente et GroES ne se lie pas au même anneau (114).

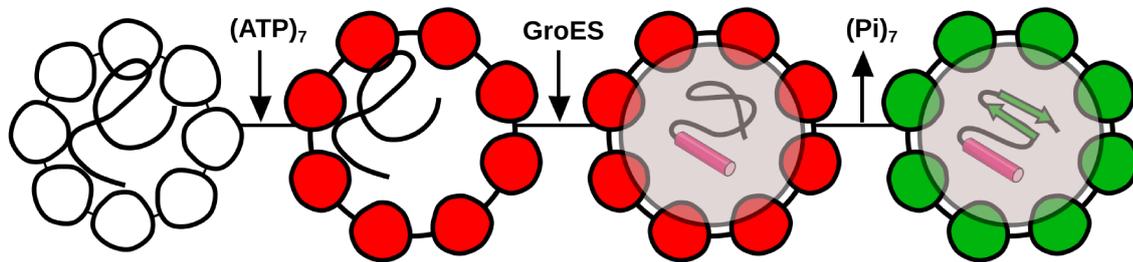
#### **Modèle de la cage active (figure 1.12(d)) :**

Dans ce modèle, la cavité contribue "activement" au processus de repliement. Cette contribution a pu être observée expérimentalement par l'accélération du repliement de protéines par GroEL/ES. Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer cette accélération :

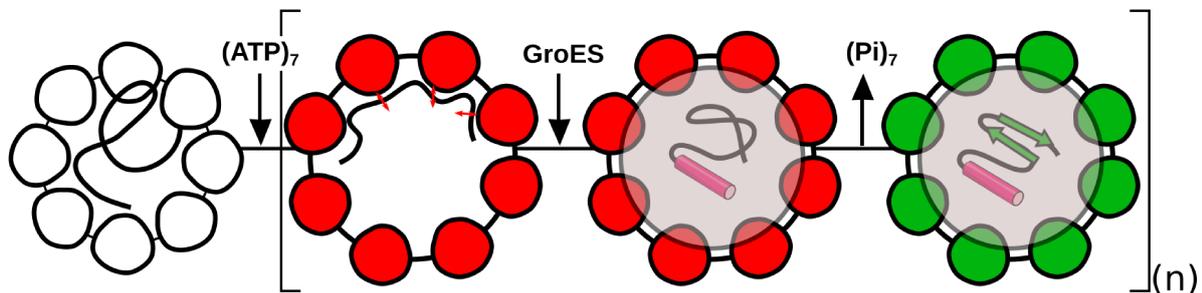
(1) Composition des parois de la cavité : Les parois de la cavité de GroEL sont majoritairement hydrophiles et composées de résidus chargés négativement (91). Il a été proposé que ces résidus hydrophiles et ces nombreuses charges négatives favoriseraient la formation du cœur hydrophobe des intermédiaires de repliement de la protéine. Ce modèle est corroboré par le ralentissement du repliement observé lorsque les résidus chargés négativement sont mutés en résidus chargés positivement (115, 116).

(2) Confinement de la protéine dans un environnement de taille réduite : La cavité de GroEL correspond à un volume très réduit par rapport à la taille que peut atteindre une protéine dépliée. La cavité permettrait donc de restreindre le nombre de conformation accessible pour la protéine et d'augmenter thermodynamiquement la vitesse de repliement (109).

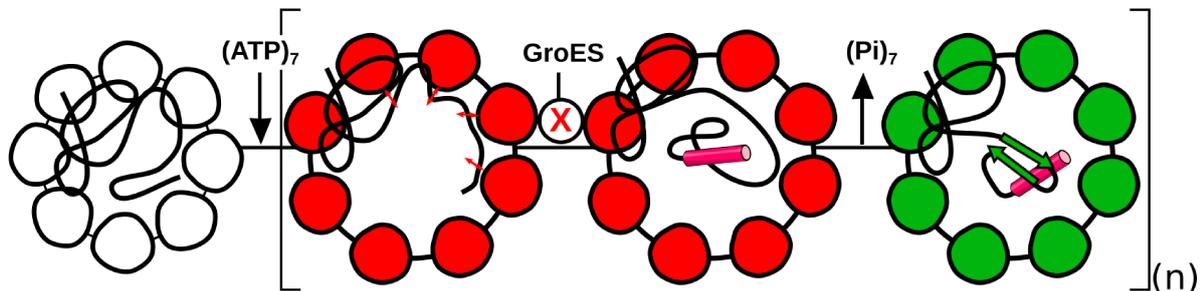
a) Modèle de la cage d'Anfinsen



b) Modèle du repliement forcé



c) Modèle du repliement itératif stationnaire



d) Modèle de la cage active

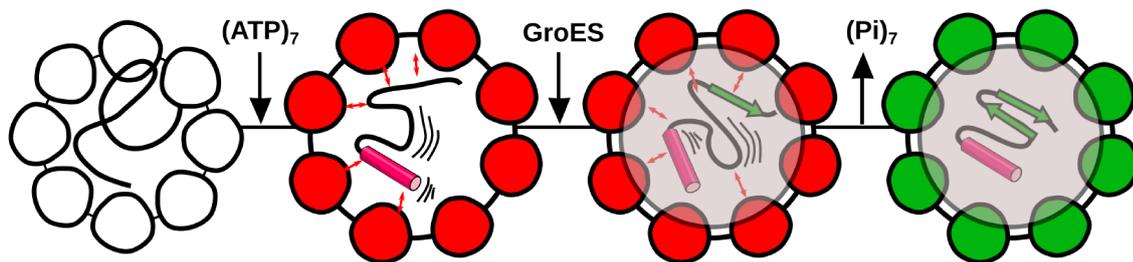


FIGURE 1.12: Modèles du repliement de protéine par GroEL - a) Modèle de la cage passive ; b) Modèle de repliement itératif (Modèle du repliement forcé) ; c) Modèle du repliement itératif stationnaire ; d) Modèle de la cage active. Vue de dessus d'un anneau de GroEL. La couleur des sous-unités correspond à l'état d'occupation du site actif : vide (blanc), ATP (rouge) et ADP (vert). GroES est représenté par un cercle semi-transparent au dessus de l'anneau CIS

### 1.3.3 Chaperonine du groupe II

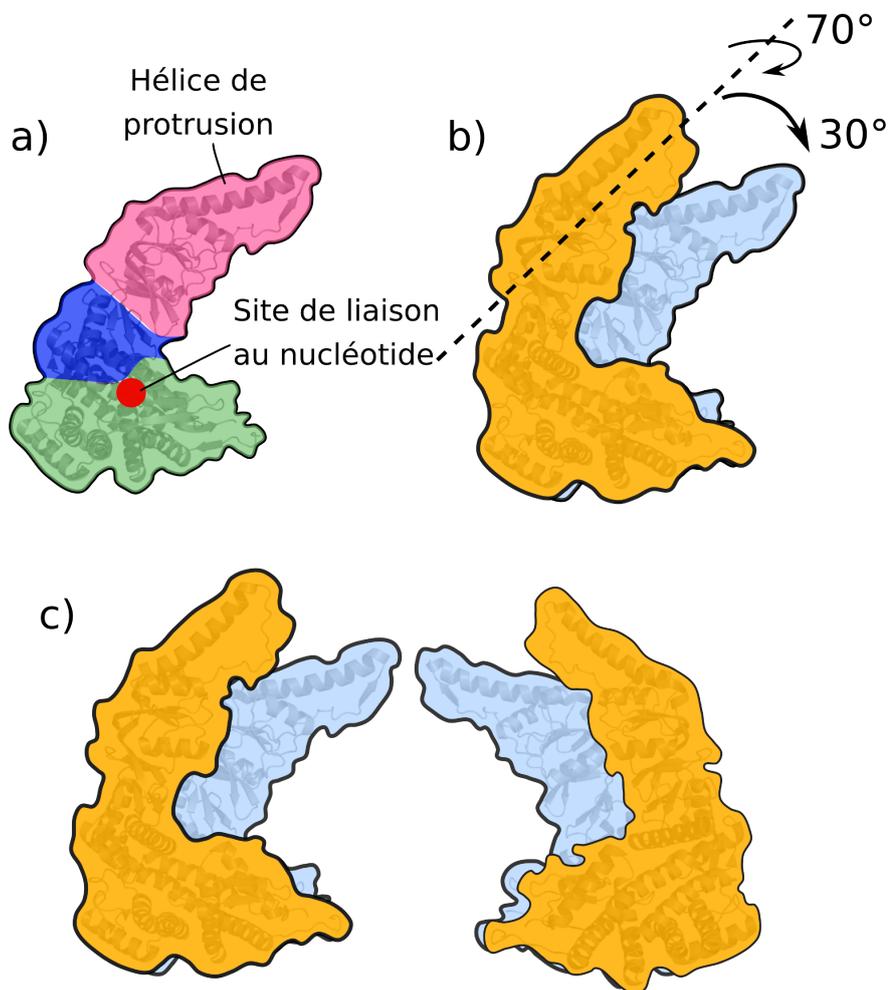
#### 1.3.3.1 Informations structurales sur les chaperonines du groupe II

On retrouve les chaperonines du groupe II dans le cytoplasme des eucaryotes et chez les archées. Les chaperonines d'archée sont appelées thermosome et sont organisées en anneau de 8 ou 9 sous unités avec une, deux ou trois sous-unités différentes (117) (figure 1.8). Dans le cytoplasme des cellules eucaryotes elles sont appelées CCT (chaperonin containing TCP1) ou TRiC (TCP1 ring complex) (118, 119). CCT est un hétéro-oligomère composé de 8 sous-unités différentes (CCT $\alpha$ -1, CCT $\beta$ -2, CCT $\gamma$ -3, CCT $\delta$ -4, CCT $\epsilon$ -5, CCT $\zeta$ -6, CCT $\eta$ -7 and CCT $\theta$ -8) (120).

Comme pour GroEL, la sous-unité des chaperonines du groupe II est composée de trois domaines (figure 1.13(a)). Par contre, le domaine apical comprend une hélice de protrusion qui permet de remplacer la co-chaperonne de GroEL.

Lors de la transition entre les conformations ouvertes et fermées, les sous unités vont subir d'importantes modifications conformationnelles. La superposition de la structure d'une sous-unité dans les conformations ouvertes et fermées est présentée dans la figure 1.13(b). On peut observer que le domaine apical est le domaine qui subit les modifications les plus importantes avec une rotation de 70° et une rotation vers le bas de 30° lors du passage dans la conformation fermée (84).

La figure 1.13(c) montre une vue en coupe d'un anneau dans la conformation ouverte (orange) et dans la conformation fermée (bleue). Le passage de la conformation ouverte à la conformation fermée permet la formation d'un environnement isolé où la protéine cliente peut se replier. Dans la conformation fermée la cavité peut accueillir une protéine d'une taille maximum de 50 kDa (84).

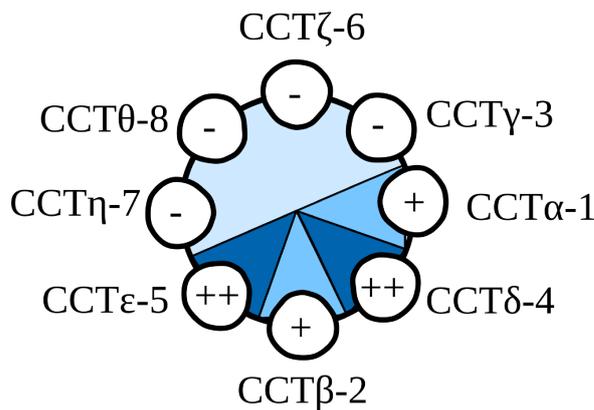


**FIGURE 1.13: Flexibilité conformationnelle des chaperonines du groupe II** - Deux types de flexibilités conformationnelles permettent le passage de la conformation ouverte à la conformation fermée des chaperonines du groupe II : Les mouvements des domaines à l'intérieur d'une sous-unité et l'orientation des sous-unités dans un anneau. a) Organisation d'une sous-unité divisé en trois domaines : équatorial, intermédiaire et apical respectivement en bleu, vert et rose. Le site de liaison au nucléotide est représenté par un rond rouge (code PDB : 3IZM) ; b) Superposition des structures des deux conformations du thermosome alignées sur le domaine équatorial. Conformation fermée en bleu (code PDB : 3IZM), et conformation ouverte en orange (code PDB : 3IZH). La superposition permet d'observer la flexibilité des domaines relativement au domaine équatorial et notamment la rotation du domaine apical qui permet la fermeture de l'anneau ; c) Superposition des conformations ouvertes (orange) et fermées (bleue). Deux sous-unités sont représentées pour l'anneau. On peut observer de larges mouvements des domaines qui permettent une fermeture de l'anneau par l'interaction entre les hélices de protrusion.

**Allostérie et mécanisme de reconnaissance du substrat :**

L'étude de thermosome de différentes espèces a montré que l'allostérie positive à l'intérieur d'un anneau est très faible alors qu'il y a une l'allostérie négative entre les anneaux (121, 122, 123). En ce qui concerne l'interaction avec des protéines clientes, le thermosome interagit grâce à un mécanisme d'interaction hydrophobe non spécifique similaire à GroEL mais la présence de l'hélice de protrusion du domaine apical va permettre d'obtenir une plus grande surface d'interaction (124, 125).

Pour CCT, différentes études ont montré que l'allostérie positive à l'intérieur d'un anneau est beaucoup plus faible en comparaison de GroEL (126, 127) et qu'il existe une spécialisation des deux parties de l'anneau (128, 129, 130).



**FIGURE 1.14: Affinité des sous-unités de CCT pour l'ATP** - Chaque sous-unité est représentée par un cercle. L'affinité pour l'ATP est indiquée par des signes + ou - et par un gradient de couleur allant du bleu clair au bleu foncé avec une affinité plus importante pour les couleurs les plus sombres.

D'un coté de l'anneau, une partie formée par les sous unités  $CCT\eta-7/CCT\theta-8/CCT\zeta-6/CCT\gamma-3$  qui ont une très faible affinité pour l'ATP et une activité d'hydrolyse de l'ATP également plus faible. De l'autre coté de l'anneau, une partie formée par les sous unités  $CCT\epsilon-5/CCT\beta-2/CCT\delta-4/CCT\alpha-1$  avec une affinité plus forte pour l'ATP et qui sont indispensables pour l'activité ATPase de CCT (figure 1.14). Cette polarité laisse penser à une spécialisation fonctionnelle des sous unités, avec une partie spécialisée dans la reconnaissance des protéines clientes et une autre impliquée dans les modifications conformationnelles, qui sont induites par la liaison et l'hydrolyse de l'ATP (131).

Autant pour les thermosome que pour CCT, l'hélice de protrusion va avoir un rôle dans la communication à l'intérieur d'un anneau (132, 133) et dans la stabilisation de la conformation fermée (132, 134).

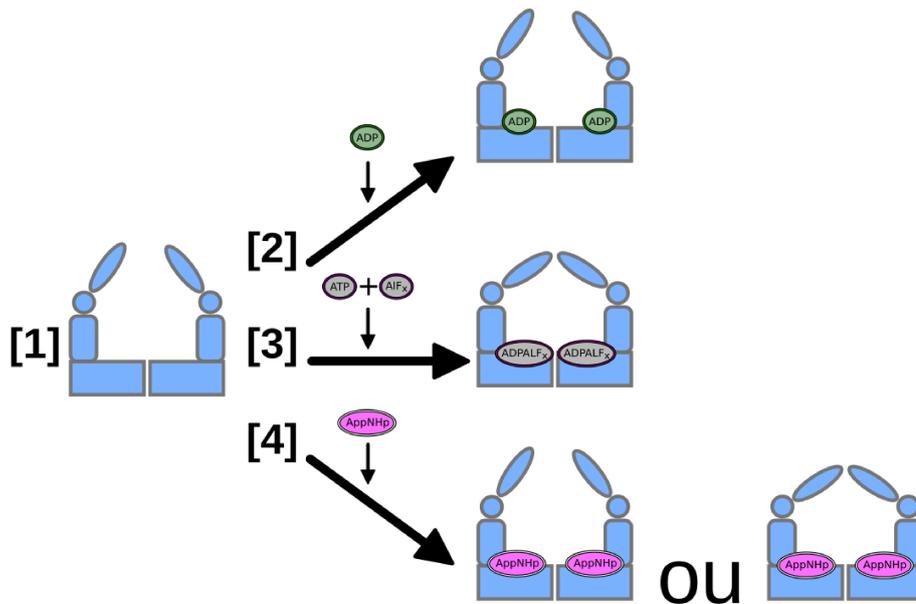
## 1. INTRODUCTION

---

### 1.3.3.2 Mécanisme de fermeture des chaperonines du groupe II

Le cycle fonctionnel des chaperonines du groupe II est dépendant de l'ATP mais sa description est encore incomplète en comparaison de celle des chaperonines du groupe I. La controverse principale qui date des premières études sur les chaperonines du groupe II concerne le mécanisme de fermeture de l'anneau, qui serait soit dû à la liaison de l'ATP soit à son hydrolyse (tableau 1.4).

Les deux modèles proposés pour le mécanisme de fermeture de l'anneau repose principalement sur l'étude de l'interaction entre des chaperonines du groupe II et différents nucléotides : ADP, ATP, AppNHp (analogue non hydrolysable de l'ATP). Nous allons présenter pour chacun des nucléotides les arguments allant dans le sens de chacun des modèles (figure 1.15).



**FIGURE 1.15: Conformations des chaperonines du groupe II avec différents nucléotides** - Seulement un des anneaux est représenté. [1] En l'absence de nucléotide, les chaperonines du groupe II sont dans une conformation ouverte et peuvent attacher la protéine cliente; [2] Dans l'état lié à l'ADP les chaperonines du groupe II sont dans une conformation ouverte et peuvent attacher une protéine cliente; [3] L'incubation avec de l'ATP et l'aluminium fluoride ( $AlF_x$ ) permet d'obtenir une conformation doublement fermée de la chaperonine (analogue de l'état de transition); [4] En fonction des études, la liaison de l'AppNHp va soit ne pas affecter la conformation ouverte des chaperonines du groupe II ou bien permettre d'obtenir une conformation fermée

#### **Liaison de l'ADP :**

La majorité des études s'accordent sur le fait qu'il existe seulement des différences mineures entre la forme apo des chaperonines du groupe II et la forme liée à l'ADP. Ces deux formes correspondent à une conformation ouverte. Ces données laissent penser que la libération du phosphate  $\gamma$  de l'ATP serait responsable du passage dans la conformation ouverte (135, 136, 137, 138, 139, 140).

#### **Liaison d'un analogue de l'état de transition :**

L'incubation d'une chaperonine du groupe II avec un analogue de l'état de transition entraîne le passage dans la conformation fermée (141, 142). Cependant, il est difficile de dire si c'est l'état de transition de l'hydrolyse de l'ATP ou la présence du phosphate  $\gamma$  qui sont responsables du passage à la conformation fermée.

#### **Liaison d'un analogue non hydrolysable de l'ATP :**

L'AppNHp permet de simuler la liaison de l'ATP avant qu'il ne soit hydrolysé. C'est en grande partie les études utilisant cet analogue qui ont conduit à la controverse quant au mécanisme de fermeture de l'anneau. Effectivement, certaines études concluent à la fermeture de l'anneau par l'interaction avec l'AppNHp (131, 133, 139, 140) alors que d'autres études à l'inverse ont montré que l'AppNHp ne permet pas la fermeture de l'anneau (138, 141).

Une explication pour ces résultats contradictoires pourrait être que le mécanisme de fermeture serait différent pour les chaperonines du groupe II de différentes espèces. Le tableau 1.4 résume pour différentes chaperonines du groupe II les publications favorables à un mécanisme de fermeture par liaison de l'ATP et celle favorables à un mécanisme de fermeture par hydrolyse de l'ATP.

Chaperonine	Liaison de l'ATP	Hydrolyse de l'ATP
<i>Thermococcus Strain KS-1</i> (a)	(140, 142, 143, 144, 145)	X
<i>Methanococcus Maripaludis</i> (a)	X	(124, 132, 134, 146, 147, 148)
CCT (e)	(135, 136, 149)	(132, 141, 150)

**TABLE 1.4: Mécanisme de fermeture pour différentes chaperonines du groupe II**  
 - Le symbole "X" signifie qu'aucune étude n'a pu être trouvée. Seul les chaperonines ayant fait l'objet de plus de cinq études sont présentées dans le tableau. (a) chaperonine d'archée, (e) chaperonine d'eucaryote

## 1. INTRODUCTION

---

Les données publiées sur les chaperonines de *Thermococcus Strain KS-1* et de *Thermoplasma Acidophilum* qui concluent à deux mécanismes opposés semble confirmer l'hypothèse que le mécanisme de fermeture serait dépendant de l'espèce étudiée.

Les données publiées sur la chaperonine CCT concluent de façon contradictoire quant aux mécanismes de fermeture. On notera cependant qu'aucune publication récente ne semble confirmer le mécanisme de fermeture par la liaison de l'ATP pour cette chaperonine. De plus, la complexité de l'organisation des sous-unités de cette chaperonine pourrait également expliquer les différentes interprétations pour le mécanisme de fermeture.

### 1.3.3.3 Cycle fonctionnel des chaperonines du groupe II

Le modèle du cycle fonctionnel des chaperonines du groupe II va être présenté en prenant en compte les deux hypothèses sur la fermeture des anneaux. Nous allons également considérer qu'après la fermeture de l'anneau les autres étapes du cycle vont pouvoir être décrites de manière similaire.

Le cycle fonctionnel est décrit avec un complexe asymétrique, où les anneaux replient une protéine de manière alternée, par analogie avec le modèle "bullet cycle" du cycle fonctionnel de GroEL. Cette description s'appuie également sur l'allostérie négative entre les anneaux (126, 127) et sur l'observation structurale de complexe asymétrique du thermosome (151, 152), de CCT en présence d'ATP (137) ou d'ADP-AlFx (153) et de KS-1 en présence d'ADP-BeFx (Fluorure de béryllium) (142).

#### (1) Liaison de l'ATP et de la protéine dépliée à un des anneaux :

Le cycle commence par l'attachement d'une protéine dépliée au domaine apical et la liaison de l'ATP à un anneau qui devient l'anneau actif.

#### (2) Fermeture du couvercle et encapsulation de la protéine cliente :

Comme indiqué précédemment, la fermeture de l'anneau pourrait être soit dû à la liaison de l'ATP soit à son hydrolyse. Dans les deux cas, une rotation du domaine apical de 70° et une rotation vers le bas de 30° permettent le passage dans la conformation fermée. Kanzaki et al. (133) ont également suggéré qu'en plus des rotations induites par l'ATP, les interactions entre les hélices de protrusions vont participer à la fermeture de l'anneau et à la stabilisation de la conformation fermée.

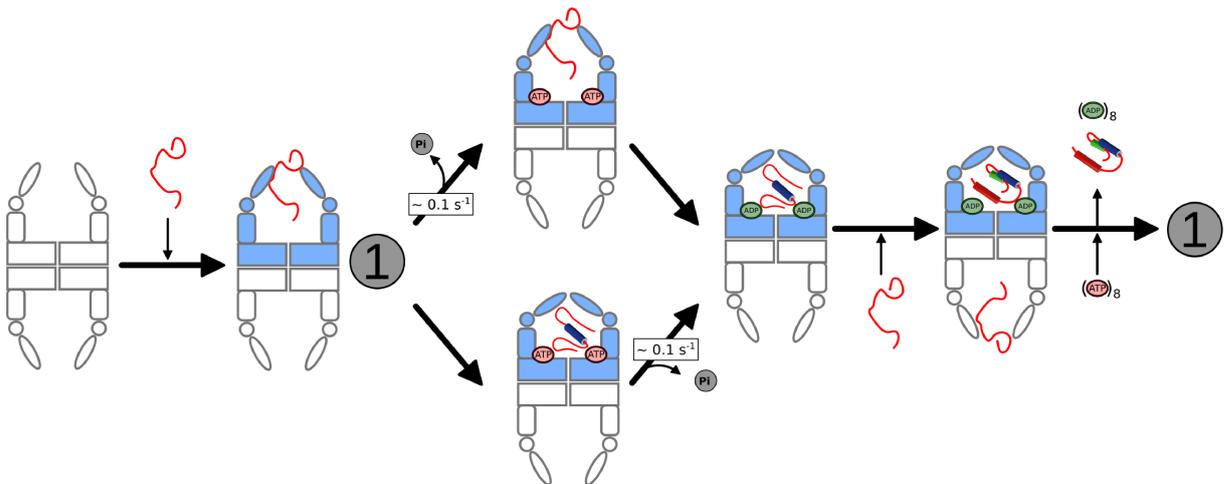
Lors du passage dans la conformation fermée, les sites hydrophobes de liaison à la protéine vont être impliqués dans la formation du couvercle. Par conséquent, la protéine dépliée va être encapsulée dans la cavité.

#### (3) Repliement de la protéine :

Après l'encapsulation, la protéine va pouvoir se replier selon les mécanismes qui sont décrits dans la partie 1.3.3.4.

#### (4) Ouverture de l'anneau et libération de la protéine :

Les événements conduisant à l'ouverture du couvercle et la libération de la protéine pour les chaperonines du groupe II sont encore mal compris. D'une manière similaire à GroEL, il est possible de penser que l'ouverture de l'anneau soit lié à la liaison de l'ATP dans l'anneau inactif et la dissociation de l'ADP dans l'anneau actif (145).



**FIGURE 1.16: Chaperonine du groupe II : Modèle du repliement d'une protéine**

- Dans ce modèle, la chaperonine fonctionne de manière alternée avec une seule cavité de repliement active à la fois. Le modèle est décrit dans le texte.

#### 1.3.3.4 Repliement des protéines clientes par les chaperonines du groupe II

Les modèles présentés pour le repliement des protéines par les chaperonines du groupe I sont considérés comme semblables pour les chaperonines du groupe II. Cependant, il va être possible de discuter des spécificités du thermosome et de CCT pour le repliement des protéines.

## 1. INTRODUCTION

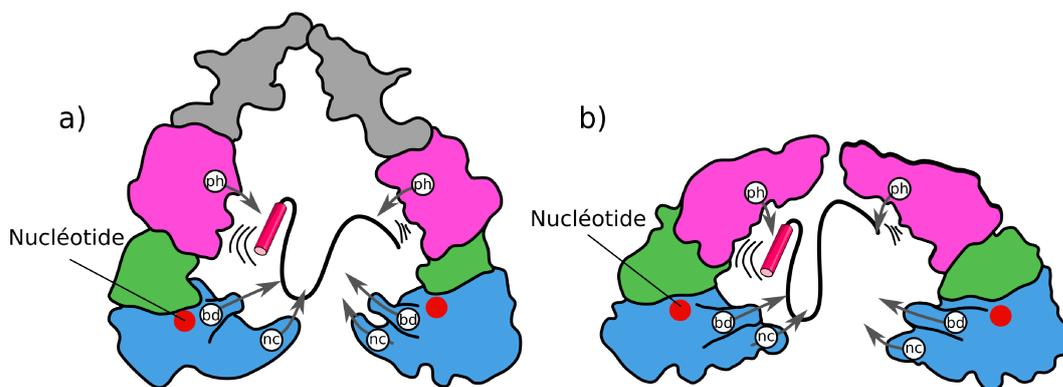
---

### Repliement des protéines par les chaperonines d'archée :

Même si la structure d'un complexe entre un thermosome et une protéine cliente n'a pas encore pu être obtenue, différentes études structurales et biochimiques ont montré que l'encapsulation est une étape essentielle pour le repliement des protéines (124, 134). En effet, les études d'une chimère sans couvercle du thermosome de *Methanococcus Maripaludis* ont montré que la présence du couvercle et par conséquent l'encapsulation de la protéine sont nécessaires pour le repliement d'une protéine (132, 141).

### Repliement des protéines par les chaperonines d'eucaryote :

La structure du complexe de CCT avec l'actine (154) ou la tubuline (155) ont permis d'observer différents sites d'interaction entre CCT et ces deux protéines. La structure du complexe entre CCT et la tubuline a permis de confirmer une zone d'interaction correspondant à une boucle, appelée boucle de détection, située dans le domaine équatorial (155). Cette boucle pourrait fonctionner comme un levier qui interagit avec la protéine cliente et les mouvements de ce levier pourraient aider la protéine cliente à atteindre sa structure native (156, 157). Il est également intéressant de noter que cette boucle est proche des extrémités N et C terminales, qui ont plusieurs fois été proposées comme pouvant intervenir dans le repliement des protéines chez GroEL et le thermosome (115, 146, 158, 159).



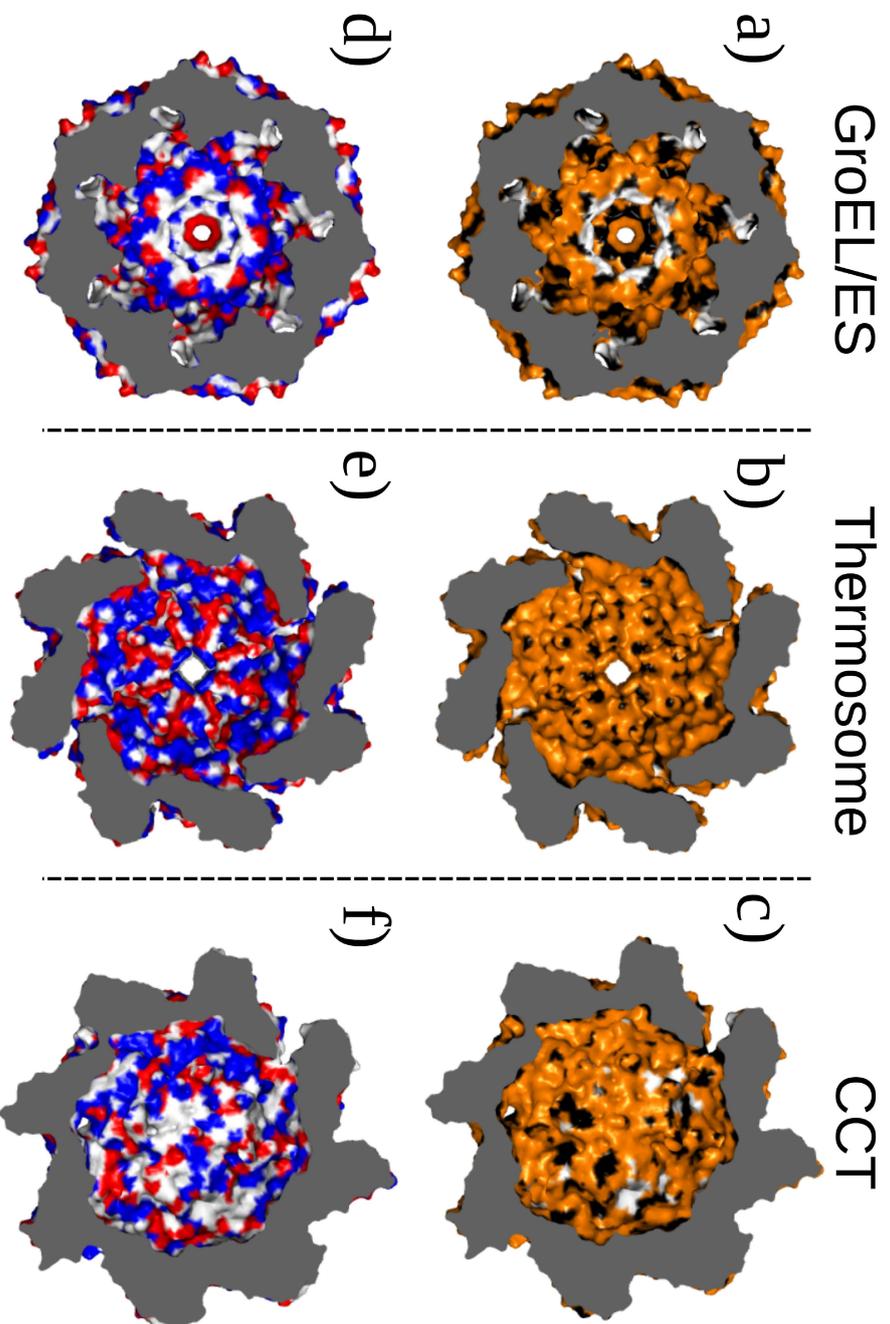
**FIGURE 1.17: Interactions entre une protéine dépliée et les chaperonines** - Comparaison des modes d'interactions entre les deux groupes de chaperonines et une protéine cliente durant sont repliement. La partie gauche montre deux sous-unités de l'anneau CIS de GroEL/ES-ADP-AlFx (code PDB : 1SX4) et la partie droite deux sous-unités du thermosome dans une conformation fermée (code PDB : 3IZM). Différentes parties des sous unités sont mises en avant pour leur interactions présumées avec la protéine cliente : **ph** patches hydrophobes, **nc** extrémités N et C terminales, **bd** boucle de détection. (115, 146, 154, 155, 156, 157, 158, 159)

#### **Composition en acides aminés de la cavité des chaperonines :**

Comme cela a déjà été discuté pour GroEL, la composition en acides aminés de la cavité joue un rôle très important dans le repliement des protéines. Il va être intéressant d'observer si il existe des différences entre les cavités des chaperonines du groupe I et du groupe II. La figure 1.18 montre les acides aminés chargés positivement et négativement ainsi que les acides aminés hydrophiles et hydrophobes pour les trois chaperonines.

Il est possible d'observer que les chaperonines du groupe II possèdent des propriétés communes avec des parois plus hydrophiles et plus riche en résidus chargés positivement alors que la cavité de GroEL est composée de plus de résidus hydrophobes et est plus riche en résidus chargés négativement.

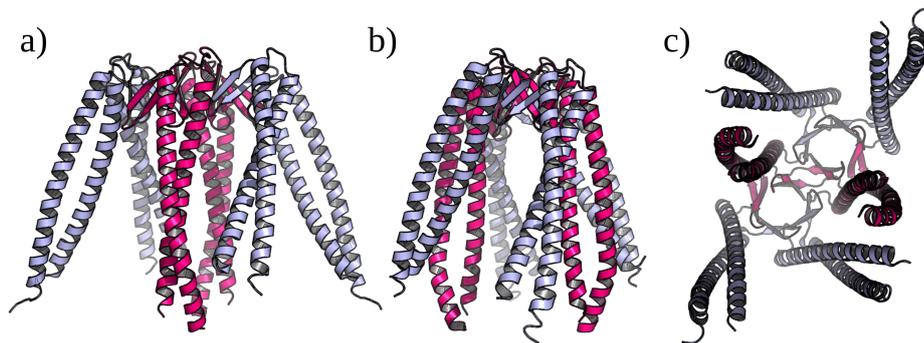
On peut également observer une différence majeure entre CCT et les autres chaperonines qui vient de sa nature hétéro-oligomérique qui crée un environnement asymétrique avec des propriétés variables selon les sous unités. Il a été proposé que cette nature asymétrique permettrait une spécificité de chaque sous unité de CCT dans le repliement de différentes protéines clientes (160).



**FIGURE 1.18: Composition en acides aminés de la cavité des chaperonines** - La structure des chaperonines GroEL/ES (code PDB : 1SX4), Thermosome (code PDB : 3IZM) et CCT (code PDB : 4V8R) est représentée par une vue de dessous. (a,b,c) Les résidus hydrophobes sont colorés en noir et les résidus hydrophiles en orange. (d,e,f) Les résidus chargés positivement sont colorés en bleu et les résidus chargés négativement en rouge.

### 1.3.3.5 Co-facteur des chaperonines du groupe II : Les préfoldines

Les chaperonines du groupe II interagissent avec de nombreux co-facteurs (161, 162). Un de ces co-facteurs est un hexamère appelé prefoldine. Les préfoldines peuvent se lier à la protéine dépliée et la transporter jusqu'à la chaperonine en permettant ainsi de limiter les risques de précipitation ou de mauvais repliement (163, 164).



**FIGURE 1.19: Structure d'une préfoldine** - Structure de la préfoldine de *Methanothermobacter thermautotrophicus* (code PDB : 1FXK). Les sous-unités bêta sont colorées en bleu et les sous-unités alpha en magenta. (a) vue de coté, (b) vue de face, (c) vue de dessous.

#### Structure des préfoldines :

Les prefoldines présentent une structure caractéristique en forme de "méduse" avec six super-hélices ressemblant à des "tentacules" qui sont rattachées à une base composée de deux tonneaux bêta. L'espace entre les "tentacules" permet la formation d'une cavité qui peut accueillir la protéine dépliée (figure 1.19). Elles sont assemblées sous la forme d'un hétéro-oligomère avec quatre sous-unités bêta et deux sous unités alpha. D'une manière similaire aux chaperonines du groupe II, on peut observer un plus haut degré de différenciation chez les prefoldines eucaryotes qui sont composées de deux types de sous-unités alpha et quatre types de sous-unités bêta (165), alors que les prefoldines d'archée ne comportent qu'un type de sous-unités alpha et un type de sous unité bêta (163, 164).

#### Interaction entre les préfoldines et les protéines dépliées :

Le modèle de l'interaction entre les préfoldines et les protéines dépliées a été déterminé à partir de données structurales (166) et biochimiques (167). Dans ce modèle, l'interaction entre la protéine dépliée et la préfoldine se fait grâce à des patches hydrophobes situés dans la région distale des "tentacules".

## 1. INTRODUCTION

---

Un mécanisme de pince moléculaire a été proposé pour décrire le mode d'action des pré-foldines avec les protéines clientes (168). Dans ce mécanisme, les "tentacules" formées par chaque sous-unité vont permettre d'accommoder des protéines de forme et de taille très diversifiées et vont agir comme des barrières stériques non spécifique qui permettent de "solubiliser" la protéine dépliée en la protégeant de l'agrégation.

### **Interactions entre les préfoldines et les chaperonines :**

Le modèle de l'interaction entre les préfoldines et les chaperonines a été déterminés à partir de données structurales (169) et biochimiques (170, 171). Dans ce modèle la pré-foldine interagit avec la chaperonine par des interactions hydrophobes entre les patches hydrophobes situés aux extrémités des "tentacules" et les patches hydrophobes des domaines apicaux de la chaperonine. Le positionnement de la pré-foldine sur la chaperonine est orienté par l'interaction exclusive des sous unités bêta de la pré-foldine avec deux sous unités de la chaperonine de chaque côté de l'anneau (figure 1.20).

Le modèle du repliement d'une protéine par l'interaction entre une chaperonine et une pré-foldine est présenté dans la figure 1.20. Il peut être divisé en trois étapes :

- (1) Liaison de la pré-foldine à une protéine dépliée.
- (2) Fixation du complexe [pré-foldine-protéine dépliée] à la partie supérieure d'un des anneaux de la chaperonine.
- (3) Libération de la protéine dépliée dans l'anneau de la chaperonine et séparation de la pré-foldine.

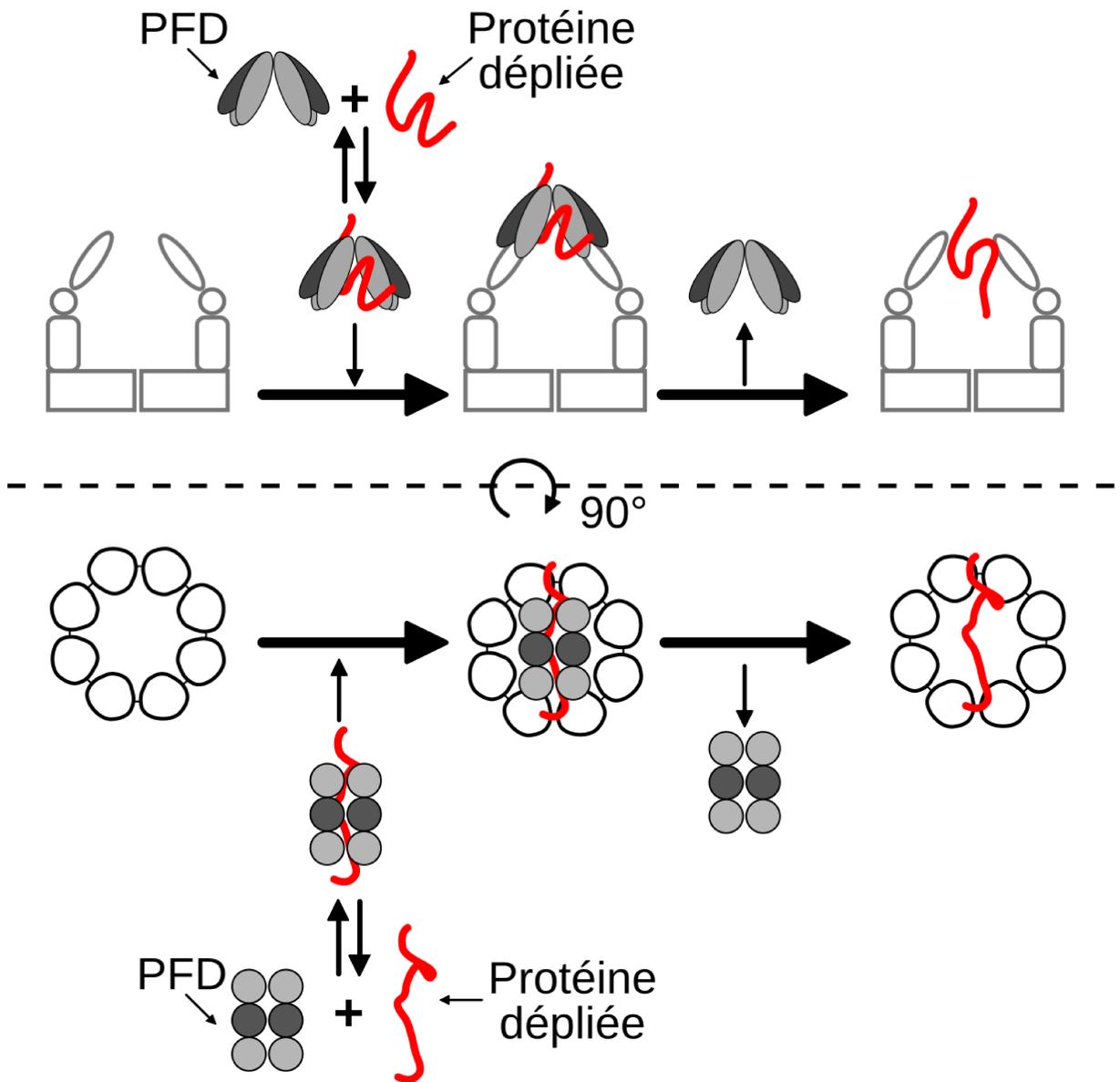


FIGURE 1.20: Modèle du repliement d'une protéine par l'interaction entre une chaperonine et une préfoldine - La chaperonine est représentée en blanc avec un seul anneau pour simplifier la visualisation. La préfoldine est représentée en gris clair (sous unités bêta) et gris foncé (sous unités alpha). La partie supérieure du schéma est une vue de côté et la partie inférieure une vue de dessus.

### 1.4 Les chaperonines d'archée comme modèle des chaperonines du groupe II

#### 1.4.1 Les archées

Jusqu'au milieu des années 70, la classification des êtres vivants était séparée en 5 règnes : monères (Procaryotes), protistes (Eucaryotes unicellulaires), plantes (Eucaryotes pluricellulaires photosynthétiques), mycètes (Champignons) (Eucaryotes pluricellulaires non-photosynthétiques) et animaux (Eucaryotes pluricellulaires hétérotrophes). Dans cette classification, les bactéries et les archées étaient regroupés sous le règne des monères par leur manque de ressemblance avec les cellules eucaryotes.

Le développement du séquençage ADN, au milieu des années 80, révolutionna la classification des êtres vivants en passant d'une classification traditionnelle basée sur des caractéristiques phénotypiques à une classification des caractéristiques phylogénétiques à l'échelle moléculaire. En 1990, Woese introduit un nouveau taxon le "domaine" situé au dessus du règne et classifie le vivant en 3 domaines : bactéries, eucaryotes et archées (172).

La ressemblance de archées avec les eucaryotes, et leur relative simplicité, les rend particulièrement intéressante comme modèle pour étudier des mécanismes complexes qu'elles partagent avec les eucaryotes. On citera, par exemple, l'étude de la réplication de l'ADN (173) où l'utilisation de modèles d'archées a permis de mieux comprendre ce mécanisme chez les eucaryotes. De plus, les protéines d'archées, ont souvent été utilisées pour résoudre les structures de complexe. Par exemple, la première structure cristallographique du ribosome a été celle du ribosome d'une archée (*Haloarcula marismortui*) (174).

#### 1.4.2 Pourquoi s'intéresser aux chaperonines d'archée (thermosome)

##### (1) Des modèles plus simples pour comprendre le fonctionnement des chaperonines eucaryotes :

Les chaperonines du groupe I ont été étudiées intensivement durant les vingt dernières années alors que les chaperonines du groupe II sont beaucoup moins bien connues. Les chaperonines d'archée sont un excellent modèle pour étudier les propriétés des chaperonines du groupe II.

## 1.4 Les chaperonines d'archée comme modèle des chaperonines du groupe II

Leur simplicité en comparaison des chaperonines eucaryotes va apporter de nombreux avantages. En effet, les chaperonines d'archée sont composés de une ou deux sous-unités alors que les chaperonines d'eucaryote sont composés de huit sous-unités différentes. Par conséquent, il va donc être beaucoup plus simple de sur-exprimer les chaperonines d'archée recombinantes chez *E. coli*. Cette caractéristique est particulièrement importante pour l'étude des chaperonines par RMN où il est nécessaire de pouvoir sur-exprimer de grandes quantités de protéines en milieu minimum et deutéré.

L'utilisation d'une chaperonine homo-oligomérique permettra également de réduire la complexité des spectres RMN en réduisant le nombre de signaux par particule.

### **(2) Stabilité et activité optimale à haute température :**

Il a été montré par Gutsche *et al.* (139) que les modifications conformationnelles des thermosomes sont dépendantes de la température. Par RMN, il va être possible d'étudier ces chaperonines en solution à des températures proches de leur température physiologique.

La variation de l'activité (tableau 1.5) avec la température va également permettre d'ajuster l'activité des thermosomes très facilement en changeant la température. Le facteur température va également permettre de jouer sur le dépliement de protéines clientes pour moduler leurs interactions avec le thermosome sans nécessiter l'utilisation d'agent extérieur comme des agents chaotropes.

D'un point de vue technique l'utilisation de haute température est un facteur favorable pour l'étude par RMN des chaperonines. Cela va permettre de diminuer le  $\tau_c$  de la particule et ainsi d'obtenir des spectres RMN de meilleure qualité malgré la taille de ces complexes.

### **(3) Les archées hyper-thermophiles des organismes vivants dans des conditions extrêmes :**

Les archées hyper-thermophiles par leurs conditions de développement sont des organismes vivants dans des conditions extrêmes. Comment ces organismes arrivent à se développer dans ces conditions qui peuvent profondément affecter le repliement des protéines est une question très intéressante. L'étude des chaperonines d'archée pourrait permettre de mieux comprendre leur cycle fonctionnel et le processus de repliement des protéines chez ces organismes.

## 1. INTRODUCTION

### 1.4.3 Le thermosome de *Pyrococcus horikoshii*

Avant de commencer notre étude, il a été nécessaire de choisir un thermosome ayant des caractéristiques favorables à son étude par RMN. Le tableau 1.5 résume les caractéristiques de différents thermosomes qui ont été décrits dans la littérature.

Organisme	Activité	Température Optimale	Sous-unités par anneau (État oligomérique)	Référence
<i>Sulfolobus shibatae</i>	27	75°C	9 (Hétéro)	(175)
<i>Pyrodictium occultum</i>	72	100°C	8 (Hétéro)	(176)
<i>Sulfolobus Solfataricus</i>	96	80°C	9 (Hétéro)	(177)
<i>Thermococcus Strain KS-1</i>	$\alpha$ : 38.4 $\beta$ : 72	$\alpha$ : 70°C $\beta$ : > 90°C	8 (Hétéro)	(178)
<i>Methanopyrus kandleri</i>	3	58°C	8 (Homo)	(179)
<i>Methanopyrus kandleri</i>	129.6	100°C	8 (Homo)	(180)
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	40	90°C	8 (Homo)	(181)
<i>Aeropyrum Pernix K1</i>	288	90°C	8 (Homo)	(182)
<i>Pyrococcus Furiosus</i>	62	90°C	8 (Homo)	(183)
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	19	80°C	8 (Homo)	(184)

**TABLE 1.5: Données sur différents thermosomes décrits dans la littérature** - Activité ATPase en mole d'ATP/min/mole de thermosome(particule) (Si l'activité est donnée dans une autre unité dans la publication, elle a été convertie).

On peut observer qu'il existe une grande variété d'activité avec une moyenne d'environ 50 moles d'ATP/min/mole de thermosome(particule), et que tous ces thermosomes ont une activité maximale pour des températures proche de 80-90°C. La RMN est une technique particulièrement adaptée pour étudier des phénomènes biologiques de l'ordre de la minute. Par conséquent, il est plus intéressant pour nous d'utiliser un thermosome relativement moins rapide que les autres thermosomes. De plus étant donné la taille des thermosomes, il est impératif pour notre étude d'avoir une particule homo-oligomérique.

Parmi ces thermosomes, celui de *Pyrococcus horikoshii* (PhCpn) semble présenter un bon compromis. Son activité ATPase est entre 20 et 40 moles d'ATP/min/mole de PhCpn(particule), ce qui représente environ 2 à 5 cycles fonctionnels par minute soit un nombre d'événement par minute compatible avec l'échelle de temps observable par RMN. D'une manière similaire aux chaperonines eucaryotes, PhCpn est composé de huit sous-unités par anneau ce qui en fait un bon modèle fonctionnel et c'est un homo-oligomère ce qui va faciliter son étude comme décrit plus haut.

## 1.4 Les chaperonines d'archée comme modèle des chaperonines du groupe II

PhCpn a déjà fait l'objet de quelques études (181, 184, 185), ce qui va nous servir de base grâce aux protocoles et conditions testés dans ces études.

### 1.4.3.1 Modélisation par homologie de PhCpn :

La structure de PhCpn n'est connue que grâce à des clichés de microscopie électronique (181). Par conséquent, il a été nécessaire d'utiliser une modélisation par homologie pour obtenir des modèles de sa structure dans les conformations fermées et ouvertes. Les modélisation par homologie de PhCpn ont été obtenues en soumettant la séquence de la protéine au serveur "SWISS-Model" (186) (<http://swissmodel.expasy.org/>)

Conformation fermée de PhCpn : La modélisation a été réalisée à partir de la structure de la conformation fermée du thermosome de *Thermococcus Strain KS-1* (code PDB : 1Q3R) qui présente 90 % d'identité de séquence avec PhCpn.

Conformation ouverte de PhCpn : Il n'existe aucune structure cristallographique de thermosome dans une conformation ouverte mais seulement des structures obtenues par microscopie électronique à la résolution de 8 à 10 Å. Parmi les structures avec une conformation ouverte la structure du thermosome de *Methanococcus maripaludis* (code PDB : 3IZH) qui présente 68 % d'identité de séquence a été utilisée pour la modélisation de la conformation ouverte de PhCpn.

Les analyses statistiques des modèles et de la qualité des données de modélisation sont disponibles en annexe (annexe 1).

## 1. INTRODUCTION

---

## Chapitre 2

# Développements méthodologiques pour l'étude d'une machinerie de 1 MDa

### 2.1 La RMN pour l'étude des assemblages de haut poids moléculaire

#### 2.1.1 Les groupements méthyles comme sonde pour la RMN

Cette partie va apporter un bref aperçu des méthodes et applications du marquage de méthyles pour l'étude de protéines et d'assemblages de haut poids moléculaire par RMN. Pour obtenir des informations détaillées sur ce sujet, il est possible de se reporter à différentes revues (187, 188).

L'étude par RMN du liquide de protéines et d'assemblages de haut poids moléculaire va être principalement limitée pour trois raisons :

(1) L'augmentation du nombre de signaux, de manière proportionnelle à la longueur de la séquence de la protéine, va augmenter le nombre de recouvrements possibles. Cela va rendre très complexe l'analyse des spectres RMN.

(2) L'augmentation de la taille des particules étudiées va entraîner une augmentation du  $\tau_c$  des particules. Le  $\tau_c$  étant directement lié à la relaxation transversale du signal RMN, son augmentation va causer un élargissement des signaux.

(3) Pour des assemblages de haut poids moléculaire l'élargissement des signaux va diminuer la sensibilité des expériences RMN jusqu'à une disparition complète des signaux.

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA

---

Une solution permettant de compenser les effets des points (2) et (3) est l'utilisation de protéines issues d'organismes thermophiles ou hyper-thermophiles. Ces protéines pouvant être analysées à des températures plus élevées, il va être possible de diminuer leur  $\tau_c$  en augmentant la température. Cela va permettre de compenser l'effet d'élargissement de largeur de raie des signaux.

Cependant, l'augmentation de la température ne va avoir qu'un effet limité pour les assemblage de haut poids moléculaire et n'est pas applicable à la plupart des protéines qui sont sensibles à la température. Par conséquent, il est nécessaire de diminuer l'élargissement des signaux par une autre méthode.

La principale source principale d'élargissement des signaux RMN est les interactions dipolaires entre protons ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ). La production de protéines en milieu totalement deutéré, avec ré-introduction post-expression des protons labiles (NH, OH,  $\text{NH}_2$ , ...), permet une diminution de la densité de protons dans la protéine d'un facteur cinq. Le remplacement des protons non-échangeables par des atomes de deutérium, dont le rapport gyromagnétique est six fois plus faible, permet de remplacer 80% des interactions dipolaires  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  par des interactions  $^1\text{H}$ - $^2\text{H}$ , environ 45 fois plus faibles. Il en résulte une réduction importante des phénomènes de relaxation dipolaire avec une diminution importante de la largeur des raies des signaux en comparaison avec une protéine protonée.

Un niveau de protonation de 20%, correspondant aux protons labiles, va cependant être trop élevé pour l'étude de protéines ou d'assemblages de plus de 100 kDa. Une solution permettant de dépasser cette limite est l'utilisation de protonation spécifique des groupements méthyles ( $-\text{CH}_3$ ) dans une protéine deutérée (189). Avec une protonation spécifique des groupements méthyles, il est possible de diminuer le pourcentage de protonation à environ 1 à 5%, ce qui rend possible l'étude de complexes de plusieurs centaines de kDa.

### 2.1.2 Intérêt des groupements méthyles

Les protéines sont constituées de six acides aminés naturels avec un groupement méthyle. Chaque groupement méthyle comprend trois protons équivalents qui tournent très rapidement autour de l'axe du méthyle (ps), ce qui confère à ce groupement des vitesses de relaxation transversale et longitudinale plus favorables que celles des autres protons de la protéine. Ces propriétés de relaxation combinées à la présence de trois protons équivalents

## 2.1 La RMN pour l'étude des assemblages de haut poids moléculaire

---

permettent une augmentation de la sensibilité des expériences RMN. Pour une protéine, une expérience TROSY( $^{13}\text{CH}_3$ ) sera ainsi environ 10 à 18 fois plus sensible qu'une expérience TROSY( $^{15}\text{NH}$ ) (190).

Les acides aminés avec un groupement méthyle correspondent à environ 30% des résidus d'une protéine monomérique et jusqu'à 50% des résidus présents dans le corps hydrophobe d'une protéine (191). Pour des protéines oligomériques, des valeurs similaires ont pu être observées avec une augmentation de la proportion de ces acides aminés dans les interfaces entre les sous-unités (192).

Même si les acides aminés avec un groupement méthyle ne représentent pas la majorité des acides aminés contenus dans une protéine, il a été démontré par de nombreuses études qu'ils vont permettre d'obtenir des informations sur le fonctionnement d'assemblages de haut poids moléculaire (ClpP ( $\approx 300$  kDa) (193), protéasome ( $\approx 700$  kDa) (194), SecA ( $\approx 250$  kDa) (195), TET2 ( $\approx 500$  kDa) (196)).

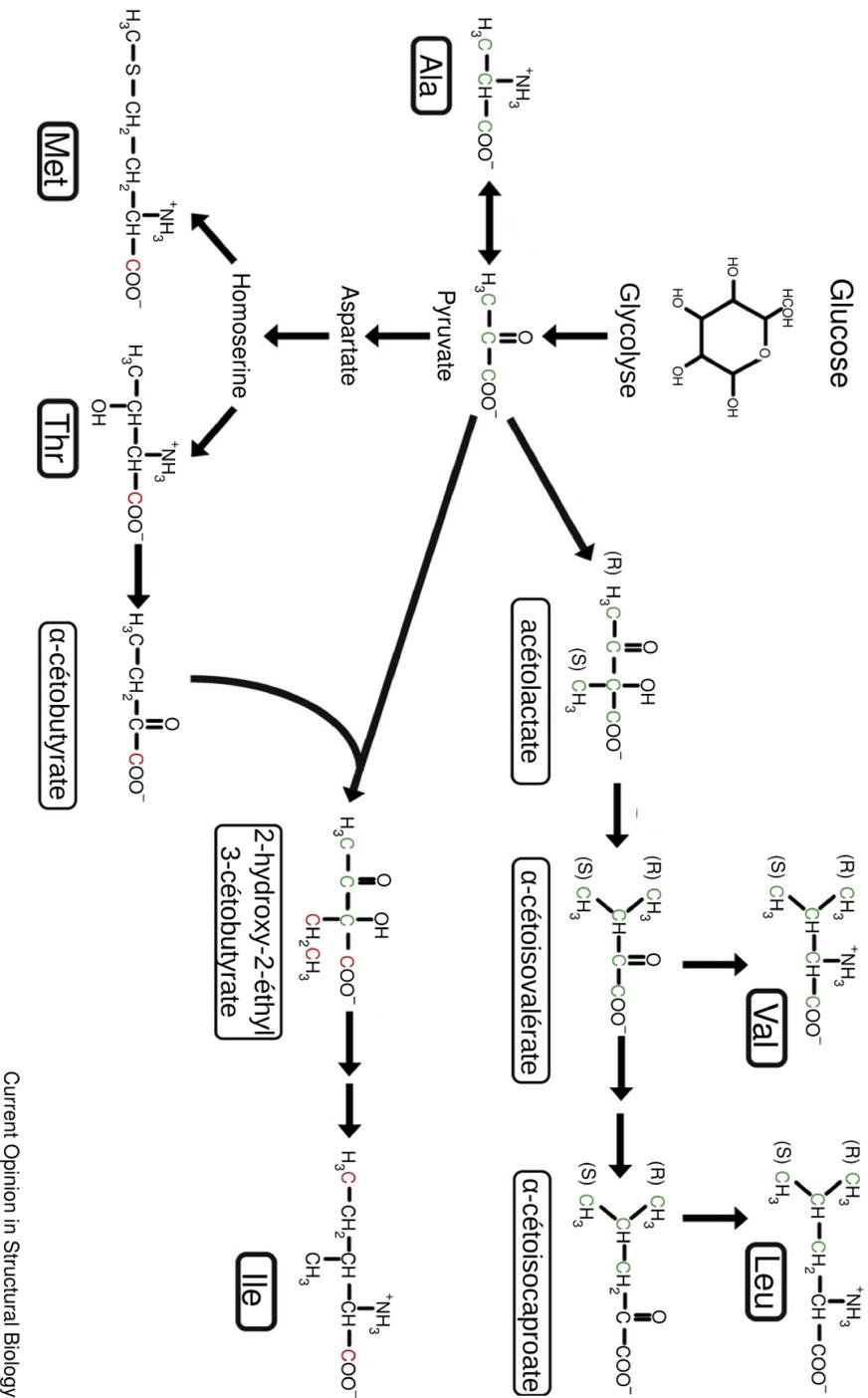
### 2.1.3 Méthodes pour le marquage des groupements méthyles

Le marquage des groupements méthyles d'une protéine doit permettre d'obtenir une deutération supérieure à 98% de la protéine, tout en re-introduisant spécifiquement une protonation et un marquage  $^{13}\text{C}$  des groupements méthyles sélectionnés à plus de 95-98%.

La production de protéines marquées spécifiquement sur les groupements méthyles est réalisée en milieu minimum M9 ( $^2\text{H}_2\text{O}$ ) avec pour seule source de carbone du glucose deutéré. Le marquage est obtenu par l'ajout dans le milieu de culture d'un précurseur métabolique de l'acide aminé ou directement de l'acide aminé marqué afin de saturer sa voie de biosynthèse (figure 2.1).

Cependant, de par la complexité et les nombreuses inter-connexions entre les voies métaboliques, l'introduction d'une molécule pour le marquage d'un groupement méthyle va pouvoir également affecter plusieurs voies métaboliques. Par exemple, si le précurseur métabolique ajouté pour le marquage n'est pas intégré à la fin d'une voie de biosynthèse irréversible, son incorporation va s'accompagner de fuites métaboliques vers d'autres acides aminés. D'une manière équivalente, des métabolites deutérés issus du métabolisme de la bactérie peuvent diluer le marquage d'un acide aminé.

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA



Current Opinion in Structural Biology

FIGURE 2.1: Schéma simplifié des voies de biosynthèse des acides aminés possédant un groupement méthyle chez *Escherichia coli* - Seuls les acides aminés et les intermédiaires qui sont utilisés pour réaliser le marquage des groupements méthyles sont représentés sur la figure. Les atomes de carbone sont colorés selon leur provenance métabolique : Pyruvate, vert ; α-cétobutyrate, rouge ; Acetyl-CoA, noir. Figure adaptée de Kerfah *et al.* 2015 (188) (Le nom des molécules a été traduit en français).

## 2.1 La RMN pour l'étude des assemblages de haut poids moléculaire

Durant les vingt dernières années, différentes stratégies ont été développées pour permettre le marquage des différents groupements méthyles chez *E. coli*. Le tableau 2.1 présente une liste de ces stratégies.

Résidus	Groupement méthyle	précurseurs	références
Alanine	C $\beta$	L-Alanine	(188, 197, 198, 199)
Isoleucine	C $\delta$ 1	$\alpha$ -cétobutyrate	(189)
	C $\delta$ 1	2-(S)-hydroxy-2-éthyl-3-cétobutyrate	(199)
	C $\gamma$ 2	2-Hydroxy-2-éthyl-3-cétobutyrate	(200, 201)
Méthionine	C $\epsilon$	L-Méthionine	(195)
	C $\epsilon$	4-Méthyl-thio-2-cétobutyrate	(202)
Thréonine	C $\gamma$ 2	L-Thréonine	(203)
Valine/Leucine	proR et proS	$\alpha$ -cétoisovalérate	(190, 204)
Valine/Leucine	proS	2-Acétolactate	(205)
Leucine	proR et proS	2-cétoisocaproate	(206)
Leucine	proS	L-Leucine stéréo-spécifiquement marquée	(207)
Valine	proS	L-Valine stéréo-spécifiquement marquée	(207)
Valine	proS	2-Acétolactate + leucine deutérée	(208)

**TABLE 2.1: Protocole pour le marquage des groupements méthyles** - Tableau adapté de Kerfah *et al.* (188).

### 2.1.4 Marquage combinatoire de plusieurs groupements méthyles

Même si le marquage de groupements méthyles permet l'observation de protéines d'une taille supérieure aux limitations classiques de la RMN du liquide, cela conduit également à une réduction importante du nombre de sondes RMN. Une solution qui pourrait permettre d'augmenter le nombre de sondes est de marquer d'une manière simultanée le groupement méthyle de différents acide aminés.

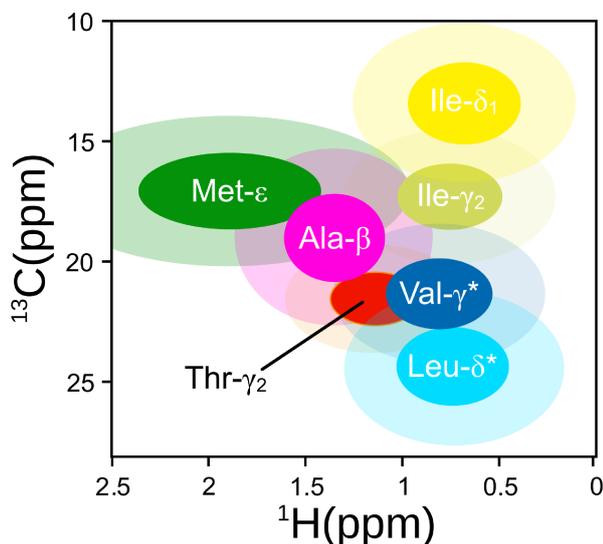
En théorie, de nombreuses combinaisons de marquage de groupement méthyle sont possibles mais différents critères doivent être pris en compte d'un point de vue expérimental pour éviter des incompatibilités entre ces marquages.

#### Recouvrement entre les signaux de différents résidus :

Les signaux RMN des groupements méthyles sont tous présents dans une fenêtre spectrale assez restreinte des spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC. Cela va avoir pour effet de favoriser les recouvrements entre les signaux de différents groupements méthyles (figure 2.2). Par conséquent, le marquage de plusieurs groupements méthyles devra permettre de limiter

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA

les possibles superpositions entre leur signaux (187). Par exemple, pour les résidus valines et leucines, il est possible de réduire les superpositions par l'utilisation de marquage stéréo (205) et résidu-spécifique (208).



**FIGURE 2.2: Fenêtre spectrale des différents groupements méthyles dans un spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )** - Les déplacements chimiques ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) proviennent de la BioMagResBank (BMRB, <http://www.bmrb.wisc.edu/>). Les cercles colorés et avec une couleur plus claire correspondent respectivement aux déviations standards première et seconde. Figure adaptée de Plevin et Boisbouvier (187)

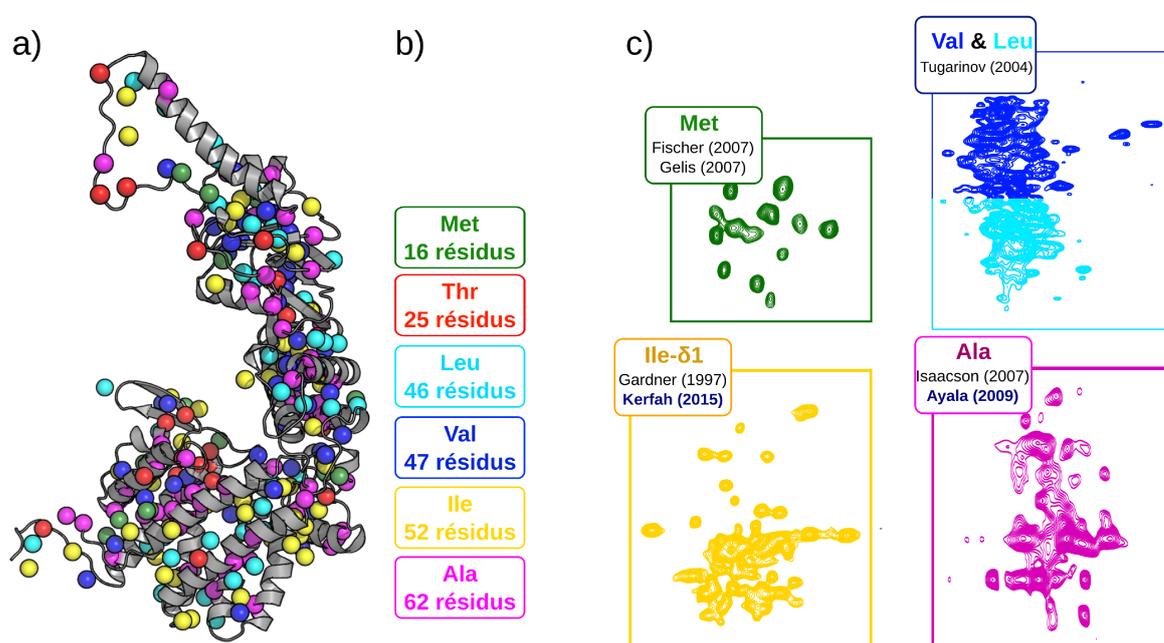
### Interactions entre les voies de biosynthèse :

Il existe de nombreuses connections entre les voies métaboliques de biosynthèse des acides aminés comprenant un groupement méthyle (figure 2.1). L'utilisation de plusieurs précurseurs, et/ou acides aminés marqués, peut conduire à des problèmes d'incorporations et à des fuites métaboliques entre les différentes voies de biosynthèses. Ainsi, les voies métaboliques des différents acides aminés utilisés pour un marquage combinatoire devront être étudiées en détail pour éviter toute incompatibilité.

Pour une analyse complète des différentes possibilités de marquages combinatoires, il est possible de se reporter à la revue de Kerfah *et al.* (188).

## 2.2 Test de différents marquages de méthyles sur PhCpn

En comparaison des différentes études par RMN de gros assemblages, PhCpn représente un défi autant par la taille du monomère 60 kDa, que par la taille de la particule native de 960 kDa. Par conséquent, avant de pouvoir étudier son fonctionnement par RMN, nous avons testé différents marquages des groupements méthyles. Il va être nécessaire de trouver un marquage permettant d'obtenir un nombre de sondes suffisants pour couvrir la structure de PhCpn tout en évitant de trop nombreux recouvrements entre les signaux.



**FIGURE 2.3: Comparaison des différents marquages de groupements méthyles de PhCpn** - a) Modèle de la conformation ouverte de PhCpn où chaque groupement méthyle est représenté par une sphère verte (Met), rouge (Thr), turquoise (Leu), bleu (Val), jaune (Ile) ou rose (Ala). Les deux couleurs pour les signaux des valines et des leucines représentent une simplification par rapport aux fenêtres spectrales des signaux de ces résidus ; b) Nombre de résidus dans PhCpn pour les six acides aminés avec un groupement méthyle ; c) Spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC colorés en fonction du code couleur des résidus sur la structure de PhCpn. Les références correspondent aux protocoles de marquage qui ont été utilisés pour chaque résidu. L'acquisition des données a été réalisée à 75°C (Tampon  $^2\text{H}_2\text{O}$  : MES 25 mM (pH 6.5), KCl 100 mM, NaCl 50 mM et  $\text{MgCl}_2$  25 mM) sur un spectromètre opérant à une fréquence du proton de 850 MHz et équipé d'une sonde cryogénique

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA

---

Différents marquages des groupements méthyles publiés dans la littérature ont été testés pour PhCpn, dans sa forme native, et les spectres 2D ( $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ ) HMQC correspondant sont présentés avec la figure 2.3.

**Méthionine :** Le marquage du groupement méthyle des méthionines donne un spectre avec très peu de recouvrements entre les signaux. On peut observer 14 signaux ce qui est proche des 16 signaux attendus pour les méthionines de PhCpn. Ce marquage semble représenter un bon compromis entre le nombre de sondes structurales et la qualité du spectre 2D ( $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ ) HMQC pour l'étude de PhCpn

**Thréonines :** Le marquage du groupement méthyle des thréonines n'a pas été testé car il n'avait pas encore été publié au début de cette étude. De plus, la dispersion spectrale des signaux des thréonines (figure 2.2) est très réduite et serait préjudiciable pour l'utilisation de ce marquage pour l'étude de PhCpn.

**Valine et Leucine :** Le protocole standard de marquage avec de l' $\alpha$ -cétobutyrate conduit au marquage des deux acides aminés et des deux groupements méthyles de chacun des acides aminés (186 signaux). Le spectre correspondant à ce marquage ne permet d'observer que très peu de signaux isolés et il ne pourra pas être utilisé pour l'étude de PhCpn.

**Isoleucine :** Le marquage du groupement méthyle  $\delta 1$  des isoleucines donne un spectre avec environ 15 signaux isolés pour 52 résidus. Par conséquent, malgré la dynamique favorable du groupement méthyle  $\delta 1$  des isoleucines, les très nombreux recouvrements rendent peu intéressante l'utilisation de ce marquage pour l'étude de PhCpn.

**Alanine :** Le marquage du groupement méthyle des alanines permet d'observer quelques signaux isolés, mais la majorité des signaux sont dans des zones avec de nombreux recouvrements. De plus, la faible dynamique du groupement méthyle des alanines rend défavorable leur utilisation pour l'étude de PhCpn.

Parmi les quatre marquages testés, seul celui du groupement méthyle des méthionines semble favorable pour l'étude de PhCpn. Il n'y a que 16 résidus méthionines dans la séquence de PhCpn mais la dispersion des méthionines dans la structure de PhCpn est suffisante pour avoir des sondes dans les trois domaines structuraux du monomère. Ces sondes devraient donc permettre d'obtenir un bon aperçu des changements conformationnels. Cependant, pour des études plus détaillées, il pourrait être intéressant d'avoir un

nombre plus important de sondes de l'état structural de PhCpn. Aucun des autres marquages présentés ci-dessus ne semble être utilisable, avec les protocoles standards, pour permettre cela.

Le nombre de signaux des marquages isoleucines et alanines étant proportionnel au nombre de ces résidus, il n'est pas possible d'envisager de solution pour diminuer les recouvrements pour ces deux marquages. A l'opposé, il est possible de marquer stéréo-spécifiquement les groupements méthyles des valines et des leucines (205), et il est théoriquement possible de séparer le marquage de ces deux résidus. Ainsi, le nombre de signaux pourrait être divisé respectivement par deux et par quatre avec une diminution des recouvrements. Les développements mis en place pour permettre un marquage résidu et stéréo-spécifique d'un groupement méthyle des valines sont présentés dans la partie suivante.

### 2.2.1 Développement d'un marquage d'un groupement méthyle des valines

Goto *et al.* ont publié en 1999 (209) le premier protocole permettant le marquage des groupements méthyles des valines et des leucines. Cependant, ce protocole utilise de l' $\alpha$ -cétoisovalérate marqué sur ces deux groupements méthyles [ $^{13}\text{CH}_3$ ] qui conduit au marquage uniforme des quatre groupements méthyles des valines et des leucines. L'utilisation de ce marquage pour des assemblages de haut poids moléculaire va conduire à des très fortes interactions dipolaires  $^1\text{H}-^1\text{H}$ , entre les deux groupements méthyles pro-chiraux d'un résidu, avec une limitation de la sensibilité et de la résolution des expériences RMN.

Pour diminuer l'effet des interactions dipolaires, Tugarinov *et al.* (190) ont développé un protocole avec de l' $\alpha$ -cétoisovalérate protoné sur un seul de ces groupements méthyles. Ce précurseur est synthétisé sous la forme d'un mélange racémique qui permet seulement un marquage à 50% de chacun des groupements méthyles d'un résidu. Malgré cette réduction de 50% du pourcentage de résidus marqués, l'élimination des interactions dipolaires entre les deux groupements méthyles pro-chiraux d'un résidu permet une augmentation de la résolution et de la sensibilité des expériences RMN (190).

Cependant, ce protocole conduit à la détection de deux signaux pour chaque résidus leucine et valine ce qui pour des protéines ou des assemblage de haut poids moléculaire va entraîner de nombreux recouvrements entre les signaux. Ces recouvrements vont rendre

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA

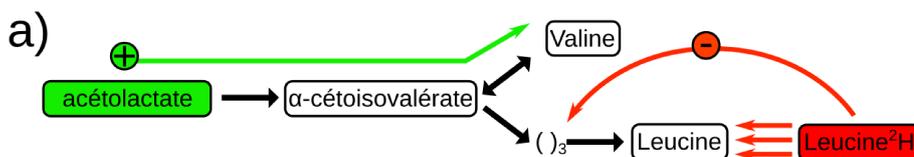
très complexe la mesure et l'analyse de données site spécifique.

En 2010, une étude a été publiée présentant le développement d'un marquage avec un précurseur (acétolactate) qui permet de marquer stéréo-spécifiquement un des groupes méthyles des leucines et des valines. L'utilisation de ce protocole permet d'une part d'augmenter par deux la sensibilité des expériences 2D ( $^1\text{H},^{13}\text{C}$ ) HMQC et d'autre part de diminuer par deux le nombre de signaux présent dans la même fenêtre spectrale et ainsi d'améliorer la résolution des spectres 2D ( $^1\text{H},^{13}\text{C}$ ) HMQC.

Cependant, malgré l'amélioration apportée par ce protocole de marquage de nombreux recouvrements sont encore possible entre les signaux des résidus leucines et valines (figure 2.2). La solution pour supprimer ces recouvrements serait de sélectivement supprimer le marquage d'un de ces résidus sans affecter le marquage de l'autre résidu. Les différentes stratégies ayant été proposées pour permettre de marquer séparément ces deux résidus sont présentées ci dessous.

### Marquage utilisant l'acétolactate comme précurseur (figure 2.4) :

L'analyse des voies de biosynthèse montre que la voie de biosynthèse des leucines est irréversible. Par conséquent, l'introduction de leucine deutérée en même temps que l'acétolactate va permettre de diluer la leucine synthétisée à partir du précurseur et également créer un phénomène de retro-inhibition sur l'incorporation du précurseur dans la voie de biosynthèse de la leucine.



**FIGURE 2.4: Stratégies permettant un marquage résidu spécifique des valines -** La description du schéma est donnée dans le texte. La triple flèche indique la dilution de la leucine par un apport exogène de leucine deutérée

Cette stratégie va permettre de découpler le marquage des valines et des leucines avec un marquage résidu et stéréo-spécifique des valines. Cependant elle ne sera pas applicable pour le marquage des leucines car la voie de biosynthèse des valines est réversible et l'ajout de valine deutérée conduirait à la dilution du marquage des leucines à partir du précurseur.

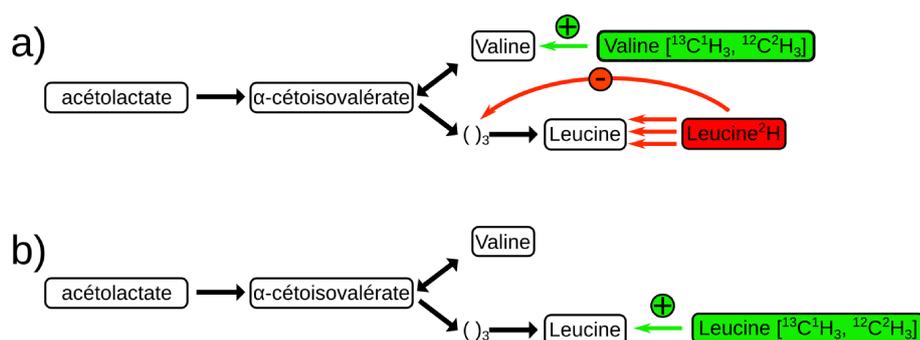
## 2.2 Test de différents marquages de méthyles sur PhCpn

**Marquage utilisant les acides aminés marqués sur un de leurs groupements méthyles (figure 2.5(a,b)) :**

À l'inverse de la stratégie précédente, cette stratégie consiste à ajouter directement dans le milieu de culture un des deux acides aminés déjà marqué.

Pour le marquage des valines, la valine marquée est ajoutée en même temps que de la leucine deutérée (figure 2.5(a)). En effet, la voie de biosynthèse des valines est réversible et l'ajout de leucine deutérée va permettre de diminuer l'incorporation du marquage de la valine marquée vers la leucine.

Pour le marquage des leucines, l'ajout de la leucine marquée est suffisant car la voie de biosynthèse des leucines n'est pas réversible (figure 2.5(b)).



**FIGURE 2.5: Stratégies permettant un marquage résidu spécifique des valines ou des leucines** - La description du schéma est donnée dans le texte. La triple flèche indique la dilution des leucines par un apport exogène de leucine deutérée

Cette stratégie permet d'obtenir un marquage à 100% des leucines et de 80% des valines (207).

La première de ces stratégies a été développée pendant ma thèse et la deuxième a été développée en parallèle par le groupe du Pr. Kainosho. Les deux stratégies ont été publiées en "back-to-back" dans le journal "Journal of Biomolecular NMR" en 2013 (207, 208). La même année une autre stratégie de marquage résidu-spécifique a été publiée mais elle conduit à un marquage non stéréo-spécifique des deux groupements méthyles et n'est donc pas compatible avec l'étude d'assemblage de haut poids moléculaire (206).

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA

---

### 2.2.1.1 Article I : Specific labeling and assignment strategies of valine methyl groups for NMR studies of high molecular weight proteins.

L'article présentant le développement du marquage résidu et stéréo-spécifique des valines est inséré dans le texte ci dessous. Les expériences permettant ces différents développements et l'application de ce marquage n'ont pas été réalisés avec PhCpn mais sur TET2 qui est un assemblage de haut poids moléculaire utilisé comme protéine modèle dans notre équipe.

"Mas, G., Crublet, E., Hamelin, O., Gans, P., and Boisbouvier, J. (2013). Specific labeling and assignment strategies of valine methyl groups for NMR studies of high molecular weight proteins. *Journal of Biomolecular NMR* 57, 251–262. DOI 10.1007/s10858-013-9785-z"

### Specific labeling and assignment strategies of valine methyl groups for NMR studies of high molecular weight proteins

Guillaume Mas · Elodie Crublet · Olivier Hamelin · Pierre Gans · Jérôme Boissbouvier

Received: 23 July 2013 / Accepted: 16 September 2013  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

**Abstract** The specific protonation of valine and leucine methyl groups in proteins is typically achieved by over-expressing proteins in M9/D<sub>2</sub>O medium supplemented with either labeled  $\alpha$ -ketoisovalerate for the labeling of the four prochiral methyl groups or with 2-acetolactate for the stereospecific labeling of the valine and leucine side chains. However, when these labeling schemes are applied to large protein assemblies, significant overlap between the correlations of the valine and leucine methyl groups occurs, hampering the analysis of 2D methyl-TROSY spectra. Analysis of the leucine and valine biosynthesis pathways revealed that the incorporation of labeled precursors in the leucine pathway can be inhibited by the addition of exogenous *L*-leucine-d<sub>10</sub>. We exploited this property to label stereospecifically the pro-*R* and pro-*S* methyl groups of valine with minimal scrambling to the leucine residues. This new labeling protocol was applied to the 468 kDa homododecameric peptidase TET2 to decrease the complexity of its NMR spectra. All of the pro-*S* valine methyl

resonances of TET2 were assigned by combining mutagenesis with this innovative labeling approach. The assignments were transferred to the pro-*R* groups using an optimally labeled sample and a set of triple resonance experiments. This improved labeling scheme enables us to overcome the main limitation of overcrowding in the NMR spectra of prochiral methyl groups, which is a prerequisite for the site-specific measurement of the structural and dynamic parameters or for the study of interactions in very large protein assemblies.

**Keywords** Stereospecific labeling · Methyl groups · Valine · Acetolactate · Large proteins · NOE

#### Introduction

Progress in the NMR spectroscopy of high molecular weight proteins has been strongly connected to the development of new isotopic labeling schemes, in particular, the expression of selectively methyl-protonated perdeuterated proteins (Gardner and Kay 1997). The objective of these labeling approaches is to produce highly deuterated (i.e., >98 %) proteins with targeted [<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>]-labeling at residue-specific methyl sites. Labeling protocols in which specifically [<sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C]-methyl labeled biosynthetic precursors are added as the sole proton source in a perdeuterated culture medium can provide a high level of methyl protonation without detectable isotopic scrambling. The combination of the selective protonation of methyl groups in fully perdeuterated proteins with optimized methyl spectroscopy (Tugarinov et al. 2003; Amero et al. 2009) has enabled structural studies of large proteins and the dynamics of protein assemblies of up to 1 MDa to be probed by solution NMR techniques (Tugarinov et al. 2005; Gelis et al. 2007;

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10858-013-9785-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

G. Mas · E. Crublet · P. Gans · J. Boissbouvier (✉)  
Institut de Biologie Structurale (IBS), Univ. Grenoble Alpes,  
6 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble, Cedex 1, France  
e-mail: jerome.boissbouvier@ibs.fr

G. Mas · E. Crublet · O. Hamelin · P. Gans · J. Boissbouvier  
CNRS, 38027 Grenoble, France

G. Mas · E. Crublet · O. Hamelin · P. Gans · J. Boissbouvier  
CEA, DSV, 38027 Grenoble, France

O. Hamelin  
Chemistry and Biology of Metals Laboratory, Univ. Grenoble  
Alpes, 38027 Grenoble, France

Published online: 28 September 2013

 Springer

Hiller et al. 2008; Sprangers and Kay 2007). Over the past 15 years, a variety of strategies for the selective labeling of the eight different types of methyl groups in proteins have been proposed (Tugarinov et al. 2006; Sprangers et al. 2007; Ruschak and Kay 2010; Plevin and Boisbouvier 2012). Initial methyl-labeling schemes used  $\alpha$ -keto-acids as the precursors in the production of  $\delta_1$ -methyl protonated isoleucine (Gardner and Kay 1997) or for the simultaneous labeling of the two prochiral methyl groups of valine and leucine (Goto et al. 1999; Hajduk et al. 2000; Gross et al. 2003). These first protocols were later complemented by new schemes to specifically label methyl groups of methionine (Gelís et al. 2007; Fischer et al. 2007), alanine (Isaacson et al. 2007; Ayala et al. 2009; Godoy-Ruiz et al. 2010), isoleucine- $\gamma_2$  (Ruschak and Kay 2010; Ayala et al. 2012) and threonine (Velyvis et al. 2012), which allowed the acquisition of high resolution spectra and the detection of structural and dynamic parameters in large molecular assemblies.

Most of these precursors allow independent labeling of each type of methyl side chain. The leucine and valine labeling schemes are more complex because the isopropyl group present in both side chains is generated before the two pathways diverge. Consequently, the labeling techniques directed towards these residues result in equal labeling of both residues. Labeling schemes based on  $\alpha$ -ketoisovalerate led to the observation of four types of methyl groups sharing a common spectral window. For high molecular weight proteins, this labeling strategy can result in an overcrowded [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ]-correlation spectra due to the sheer number of NMR-visible methyl probes. Furthermore, the first generation of  $\alpha$ -ketoisovalerate precursors proved inefficient for studying large protein assemblies because the intense intra-residue  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  dipolar interactions between prochiral methyl groups limited the sensitivity of NMR experiments. The introduction of [ $^{13}\text{CH}_3/\text{CD}_3$ ]- $\alpha$ -ketoisovalerate protonated on a single methyl (Tugarinov and Kay 2004; Lichteneker et al. 2004) has been shown to enhance the resolution and sensitivity of the methyl-TROSY spectra of large proteins, despite the 50 % incorporation reduction of "NMR visible"  $^{13}\text{CH}_3$  isotopomers in the prochiral groups. However,  $\alpha$ -ketoisovalerate is only available as a racemic mixture of pro-*S* and pro-*R* compounds. Therefore, two signals are still detected for each leucine and valine residue in the methyl-TROSY spectra. More recently, stereospecific labeling of the prochiral methyl groups of leucine and valine was achieved using specific methyl-labeled 2-acetolactate, a precursor involved in the early steps of the leucine and valine biogenesis pathway (Gans et al. 2010). The enzymatic rearrangement of the two methyl groups in labeled acetolactate during leucine and valine biosynthesis occurs in a stereospecific fashion such that the methyl group

substituent at position 2 becomes the pro-*S* methyl group and the methyl at position 4 becomes the pro-*R* methyl group. While the aforementioned labeling scheme allows the study of symmetrical protein assemblies composed of low molecular weight subunits, the large number of overlaps between the methyl groups of valine and leucine still precludes the analysis of the NMR spectra for larger protein complexes. Recently, it was shown that the methyl resonances of leucine and valine could be distinguished using spectral properties of the corresponding  $^{13}\text{C}\alpha/\beta$  atoms (Hu et al. 2012). Here, we introduce a straightforward labeling scheme to incorporate stereospecific  $^{13}\text{CH}_3$  isotopomers into valine residues without labeling the corresponding leucine groups. The protocol, based on the simultaneous incorporation of labeled acetolactate and deuterated *L*-leucine, offers a significant simplification of [ $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ]-methyl TROSY spectra. This new labeling scheme has been applied to the 468 kDa homododecameric peptidase TET2 and has allowed the complete assignment of the valine methyl resonances by combining mutagenesis, innovative labeling and adapted triple resonance experiments. As demonstrated here, this new method will be particularly useful for NMR studies of very large biomolecular assemblies.

### Materials and methods

#### Precursor synthesis

2-Hydroxy-2- [ $^{13}\text{C}$ ]methyl-3-oxo-4,4,4-tri- [ $^2\text{H}$ ]butanoate (pro-*S* acetolactate- $^{13}\text{C}$ ) and 2-hydroxy-2- [ $^2\text{H}_3$ ]methyl-3-oxo- [1,2,3,4-tetra- $^{13}\text{C}$ ]butanoate (pro-*R* acetolactate- $^{13}\text{C}_4$ ) were obtained from NMR-Bio ([www.nmr-bio.com](http://www.nmr-bio.com)). 2-Hydroxy-2- [ $^{13}\text{C}$ ]methyl-3-oxo-4,4,4-tri- [ $^2\text{H}$ ], [3,4-di- $^{13}\text{C}$ ]butanoate (pro-*Y* acetolactate- $^{13}\text{C}_3$ ) was made as described previously (Gans et al. 2010) using ethyl [3,4- $^{13}\text{C}_2$ ]-3-oxobutanoate and  $^{13}\text{CH}_3\text{I}$  (Sigma-Aldrich).

#### Optimization of the incorporation of leucine into overexpressed protein

The initial experiments to determine the level of leucine incorporation into overexpressed proteins were performed using ubiquitin as a model system. *Escherichia coli* BL21(DE3) cells were transformed with a pET41c plasmid carrying the human His-tagged ubiquitin (pET41c-His-Ubi) gene, and the transformants were grown in M9/D<sub>2</sub>O medium containing 1 g/L  $^{15}\text{ND}_4\text{Cl}$  and 2 g/L D-glucose-d<sub>7</sub>. When the optical density (O.D.) at 600 nm reached 0.8, a solution containing the labeled acetolactate precursors and the non-labeled *L*-leucine was added. After an additional 1 h, protein expression was induced by the addition of

## 2.2 Test de différents marquages de méthyles sur PhCpn

J Biomol NMR

IPTG to a final concentration of 1 mM. The induced culture was grown for 3 h at 37 °C. The ubiquitin was then purified by Ni-NTA (Qiagen) chromatography in a single step.

The optimal quantity of *L*-leucine required to achieve near complete incorporation into the overexpressed protein was assessed in a series of cultures (50 mL each) in which different amounts of non-labeled *L*-leucine were added 1 h prior to induction to final concentrations of 0, 5, 10, 15, 20 and 60 mg/L in addition to a saturating quantity of the leucine and valine precursor pro-*S* acetolactate-<sup>13</sup>C (final concentration of 300 mg/L). *L*-methionine (methyl-<sup>13</sup>C) (Sigma-Aldrich) at 125 mg/L was used as an internal reference. The level of the non-labeled *L*-leucine incorporation into the purified protein was monitored using a <sup>13</sup>C-HSQC experiment (figure S.1). When unlabeled leucine is incorporated into the overexpressed protein, the leucine-<sup>[13CH<sub>3</sub>]<sup>pro-S</sup> residues are replaced by unlabeled amino acids. The quantification was performed by comparing the volume of the leucine pro-*S* methyl group signals to the methionine methyl signals from 2D <sup>13</sup>C-HSQC.</sup>

Production and purification of specifically methyl labeled TET2

*Escherichia coli* BL21-CodonPlus<sup>®</sup>(DE3)-RIL cells transformed with a pET-41c plasmid encoding TET2 were progressively adapted in three stages over 24 h to M9/D<sub>2</sub>O medium containing 1 g/L <sup>15</sup>ND<sub>4</sub>Cl and 2 g/L *D*-glucose-*d*<sub>7</sub> (Sigma-Aldrich). In the final culture, the bacteria were grown at 37 °C in M9 medium prepared with 99.85 % D<sub>2</sub>O (Eurisotop). When the O.D. at 600 nm reached 0.8, a solution containing the labeled precursors was added. The precursor solution added per liter of culture medium contained:

- 125 mg of 2-oxo-3-[<sup>2</sup>H]-3-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]methyl-4-[<sup>13</sup>C]-butanoate ( $\alpha$ -ketoisovalerate) for the production of the U-[<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N, <sup>12</sup>C], Leu/Val-[<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>/<sup>12</sup>CD<sub>3</sub>] TET2 sample (Tugarinov et al. 2006).
- 300 mg of 2-hydroxy-2-[<sup>13</sup>C]methyl-3-oxo-4,4,4-tri-[<sup>2</sup>H]butanoate (pro-*S* acetolactate-<sup>13</sup>C) for the production of the U-[<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N, <sup>12</sup>C], Leu/Val-[<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>]<sup>pro-S</sup> TET2 sample (Gans et al. 2010).
- 300 mg of 2-hydroxy-2-[<sup>13</sup>C]methyl-3-oxo-4,4,4-tri-[<sup>2</sup>H]butanoate (pro-*S* acetolactate-<sup>13</sup>C) and 40 mg of *L*-leucine-*d*<sub>10</sub> (Sigma-Aldrich) for the production of the U-[<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N, <sup>12</sup>C], Val-[<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>]<sup>pro-S</sup> TET2 sample.
- 300 mg of 2-hydroxy-2-[<sup>13</sup>C]methyl-3-oxo-4,4,4-tri-[<sup>2</sup>H]butanoate (pro-*S* acetolactate-<sup>13</sup>C) with 40 mg of *L*-leucine-*d*<sub>10</sub> followed by the addition of 60 mg of 2-oxo-3-[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-4-[<sup>13</sup>C]-butanoate ( $\alpha$ -ketobutyrate; Gardner and Kay 1997) for the production of the U-[<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N, <sup>12</sup>C], Ile-[<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>] <sup>$\delta$ 1</sup>, Val-[<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>]<sup>pro-S</sup> TET2 sample.

- 300 mg of 2-hydroxy-2-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]methyl-3-oxo-[1,2,3,4-tetra-<sup>13</sup>C]butanoate (pro-*R* acetolactate-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>) and 40 mg of *L*-leucine-*d*<sub>10</sub> for the production of the U-[<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N, <sup>12</sup>C], Val-[2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>; 1,2,3-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>; [<sup>13</sup>C<sup>1</sup>H<sub>3</sub>]<sup>pro-R</sup>/<sup>12</sup>C<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]<sup>pro-S</sup>] TET2 sample.
- 300 mg of 2-hydroxy-2-[<sup>13</sup>C]methyl-3-oxo-4,4,4-tri-[<sup>2</sup>H],[3,4-di-<sup>13</sup>C]butanoate (pro-*Y* acetolactate-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>) and 40 mg of *L*-leucine-*d*<sub>10</sub> for the production of the U-[<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N, <sup>12</sup>C], Val-[2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>; 3-<sup>13</sup>C; [<sup>13</sup>C<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]<sup>pro-R</sup>/<sup>13</sup>C<sup>1</sup>H<sub>3</sub>]<sup>pro-S</sup>] TET2 sample.

One hour after the addition of the precursors, TET2 expression was induced by the addition of IPTG to a final concentration of 0.5 mM. The induced culture grew for 4 h at 37 °C before harvesting. TET2 was purified using one anion exchange chromatography step (Resource Q 6 mL, GE Healthcare) followed by a size exclusion chromatography step (HiLoad 16/60 Superdex 200 pg, GE Healthcare). The final yield generally reached 20 mg/L methyl-specific protonated TET2. The protein was concentrated in 250  $\mu$ L of buffered D<sub>2</sub>O (20 mM Tris (pH 7.4 uncorrected) and 20 mM NaCl) at a concentration of approximately 40–80  $\mu$ M of TET2 dodecamer (~0.5–1 mM of monomer).

Production and purification of TET2 mutants

The constructs containing valine to alanine single point mutations were generated by an automated molecular biology platform (RoBioMol—Institut de Biologie Structurale, Jean-Pierre Ebel) using an automated PCR-based protocol adapted from the QuikChange site-directed mutagenesis method (Amers et al. 2011). The library of mutants was expressed in parallel using 24-well DeepWell plates. Each TET2 mutant was produced in 10 mL of M9/D<sub>2</sub>O medium supplemented with pro-*S* acetolactate-<sup>13</sup>C and *L*-leucine-*d*<sub>10</sub>, following the protocol described above. The cells were lysed by the addition of BugBuster<sup>®</sup> lysis buffer, and the plate containing the crude extracts was heated at 85 °C for 15 min. After centrifugation of the 24-well DeepWell plates at 4,000 rpm for 30 min, the labeled proteins were purified in parallel from supernatant fractions using a 96-well filter plate containing Q-Sepharose resin (GE Healthcare). The TET2 mutants were resuspended in 20 mM Tris (pH 7.4 uncorrected) and 20 mM NaCl (in D<sub>2</sub>O) to a final concentration of ~4  $\mu$ M of TET2 dodecamer (~50  $\mu$ M of monomer). Each sample (60  $\mu$ L) was loaded in a 2.5 mm Shigemi tube placed coaxially to a regular 5 mm NMR tube used as a sample holder.

NMR spectroscopy

2D HSQC NMR spectra of ubiquitin were recorded at 37 °C on an Agilent DirectDrive spectrometer operating at

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA

a proton frequency of 600 MHz equipped with a cryogenic triple resonance probe head. All of the NMR spectra for the TET2 samples were recorded at 50 °C on an Agilent DirectDrive spectrometer operating at a proton frequency of 800 MHz equipped with a cryogenic triple resonance probe head. For the assignments of the methyl resonances using the SeSAM strategy (Amero et al. 2011), the duration of each 2D SOFAST-methyl-TROSY NMR experiment (Amero et al. 2009) was adjusted depending on the final concentration of the purified protein (experimental time ranging from 0.5 to 2 h maximum per sample). The angle of the proton excitation pulse was set to 30°, and the recycling delay was optimized to 0.8 s to enhance sensitivity.

A 3D HMQC-NOESY experiment was recorded over 64 h with a 1 mM U-[<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N, <sup>12</sup>C], Ile-[<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>]<sup>δ1</sup>, Val-[<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>]<sup>pro-S</sup> sample of TET2 with a NOE mixing time of 400 ms (which corresponds to the optimal NOE mixing time determined from the build-up of the cross-peak intensities in a series of short 2D NOESY spectra). The experiment was collected with 12 scans per increment and a maximum acquisition time of 20 ms in both the <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H indirect dimension. The 3D COSY-based “out-and-back” HCC (HC(C)C relay) experiments (Tugarinov and Kay 2003; Ayala et al. 2009; Ayala et al. 2012) were acquired in 11 h (44 h) with 0.5 mM U-[<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N, <sup>12</sup>C], Val-[2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>; 1,2,3-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>; [<sup>13</sup>C<sup>1</sup>H<sub>3</sub>]<sup>pro-R</sup>/<sup>12</sup>C<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]<sup>pro-S</sup>] and 0.5 mM U-[<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N, <sup>12</sup>C], Val-[2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>; 3-<sup>13</sup>C; [<sup>13</sup>C<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]<sup>pro-R</sup>/<sup>13</sup>C<sup>1</sup>H<sub>3</sub>]<sup>pro-S</sup>] (U-[<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N, <sup>12</sup>C], Val-[2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>; 3-<sup>13</sup>C; [<sup>13</sup>C<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]<sup>pro-R</sup>/<sup>13</sup>C<sup>1</sup>H<sub>3</sub>]<sup>pro-S</sup>)) TET2 samples, and the experimental data were collected with 4 scans (16 scans) per increment and a maximum acquisition time of 11 and 12 ms in the two indirect carbon dimensions. All of the data were processed and analyzed using nmrPipe/nmrDraw (Delaglio et al. 1995) and CCPN software (Vranken et al. 2005).

### Results and discussion

#### Leucine incorporation

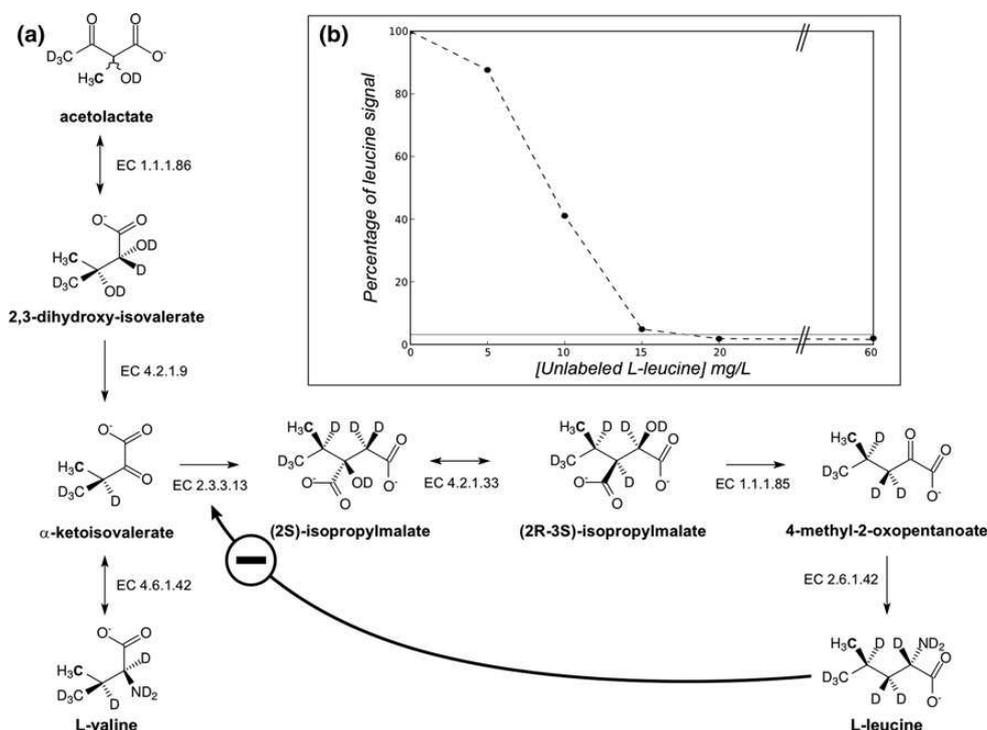
The use of regioselectively labeled acetolactate improves the quality of spectra by reducing the number of resonances by a factor of two (Gans et al. 2010). However, for high molecular weight proteins containing many valine and leucine residues, a further reduction of overlaps is a prerequisite for the unambiguous assignment and analysis of complex NMR spectra. Leucine could be the choice candidate for this specific labeling because the metabolic pathway connecting α-keto-isovalerate (the immediate precursor of valine) to Leucine is irreversible (Fig. 1a). The direct addition of [<sup>2</sup>H,<sup>13</sup>C]-labeled *L*-leucine or its corresponding precursors will allow selective labeling of the leucines without

scrambling to the valines. Recently, Lichtenecker et al. (2013) demonstrated that the addition of 2-oxo-3-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-4-[<sup>2</sup>H]-4-methyl[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-5-[<sup>13</sup>C]-pentanoate (or α-ketoisocaproate) in M9/D<sub>2</sub>O culture medium can be used to directly label the methyl groups of leucine. Furthermore, the authors reported the preparation of a racemic mixture of α-ketoisocaproate precursors leading to the non-stereospecific labeling of either pro-*S* or pro-*R* methyl groups, where the occupancy level for each prochiral site was limited to 50 %. This decreased incorporation reduces the intensities of the structurally meaningful long range NOEs by a factor of 4. Because leucine and valine residues are equivalently abundant in proteins, this labeling scheme failed to significantly reduce the spectral overlap compared to the stereospecific labeling of valine and leucine residues using acetolactate precursors (Gans et al. 2010). In other words, the valine resonances suppressed by this labeling scheme are replaced by a similar number of leucine pro-*R* methyl groups overlapping with leucine pro-*S* resonances. Therefore, deuterated *L*-leucine (or its corresponding precursor) stereospecifically labeled on a single methyl group is required for the optimal incorporation and improvement of the NMR spectra of large proteins. Such a complex stereoselective synthesis of *L*-leucine was first reported by Kainosho et al. (2006) for the in vitro production of an optimally labeled protein. A similar approach is described by the same group in an accompanying article (Miyanoiri et al. 2013) regarding the in vivo labeling of the valine and leucine prochiral methyl groups of Malate Synthase G (MSG; Howard et al. 2000) overexpressed in *E. coli*.

Due to the complexity of this stereoselective synthesis and the associated costs of the labeled *L*-leucine or its precursors, we explored an alternative strategy to label only the valine methyl groups using more accessible precursors: labeled acetolactate and perdeuterated *L*-leucine. The addition of exogenous *L*-leucine not only allows dilution of the endogenous <sup>13</sup>C-labeled *L*-leucine but also has an inhibitory effect on 2-isopropylmalate synthase (EC 2.3.3.13) (De Carvalho et al. 2005), catalyzing the conversion of α-ketoisovalerate to 2-isopropylmalate (the first specific step of the *L*-leucine biosynthetic pathway, Fig. 1). Therefore, the addition of exogenous *L*-leucine is expected to strongly reduce the flux of <sup>13</sup>C-carbon in this pathway and to prevent the incorporation of labeled acetolactate into *L*-leucine (Fig. 1a). The effect of the addition of exogenous unlabeled *L*-leucine on the level of the incorporation of <sup>13</sup>C into the leucine pro-*S* groups is reported on the Fig. 1b. To this end, ubiquitin was overexpressed in M9/D<sub>2</sub>O medium supplemented with a saturating amount of pro-*S* acetolactate-<sup>13</sup>C (300 mg/L) and various concentrations of unlabeled *L*-leucine. Nearly complete inhibition of incorporation (incorporation level ≤ 2 %) of pro-*S* acetolactate-<sup>13</sup>C was achieved for concentrations of unlabeled *L*-leucine ≥ 20 mg/L.

## 2.2 Test de différents marquages de méthyles sur PhCpn

J Biomol NMR



**Fig. 1** Incorporation pathway of acetolactate into the valine and leucine residues in *E. coli*. **a** The stereochemistry of the different intermediates in the leucine and valine biosynthesis pathway is displayed (assuming incorporation of pro-*S* acetolactate- $^{13}\text{C}$  in  $\text{D}_2\text{O}$ -based M9 culture medium). The enzymes responsible for catalyzing each reaction are indicated by EC number. EC 1.1.1.86: ketol-acid reductoisomerase; EC 4.2.1.9: dihydroxy-acid dehydratase; EC 2.6.1.42: branched-chain amino acid aminotransferase; EC 2.3.3.13: 2-isopropylmalate synthase; EC 4.2.1.33: 3-isopropylmalate dehydratase; and EC 1.1.1.85: 3-isopropylmalate dehydrogenase. Further information on the leucine and valine metabolic pathway can be found online: <http://www.genome.jp/kegg/>. **b** The decrease in the

$^{13}\text{C}^1\text{H}_3$  isotopomers incorporation at the leucine pro-*S* methyl group position in overexpressed ubiquitin as a function of the added amount of exogenous unlabeled leucine. Different amounts of non-labeled *L*-leucine were added to the M9/ $\text{D}_2\text{O}$  medium 1 h prior to induction to final concentrations of 0, 5, 10, 15, 20 and 60 mg/L, together with a saturating quantity of the leucine/valine precursor, pro-*S* acetolactate- $^{13}\text{C}$  (300 mg/L) and 125 mg/L *L*-methionine (methyl- $^{13}\text{C}$ ). The decrease in the leucine pro-*S* methyl group signal is analyzed using the average volume of the methionine  $\epsilon$  methyl group signals as a reference. A level of incorporation into the leucine side chains less than 5 % was obtained by adding 20 mg of leucine per liter of M9/ $\text{D}_2\text{O}$  culture medium

Furthermore, no change was observed in the stereospecificity of the valine methyl group labeling (figure S.1). Surprisingly, we observed a slight (approximately 5–7 %) decrease in the valine signal, which was dependent on the exogenous quantity of added leucine (data not shown). However, by adding U- $^{13}\text{C}$  *L*-leucine in deuterated minimal medium containing U- $^{12}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ -glucose with unlabeled acetolactate, we did not detect isotopic scrambling of the added *L*-leucine into *L*-valine (figure S.2). This result indicates that the weak unlabeled of valine residues observed when adding *L*-leucine is not due to incorporation into valine of exogenous *L*-leucine or the corresponding degradation products, but is most likely related to a weak feedback inhibition of valine biosynthesis by excess *L*-leucine. Despite not identifying the exact metabolic pathway involved in the regulation of the labeled valine biosynthesis, we postulate

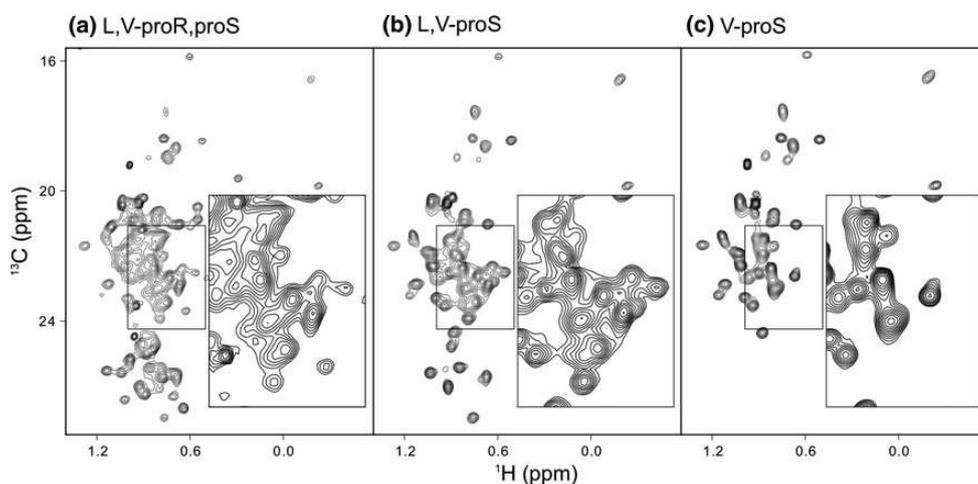
that the greater than 90 % incorporation level of the  $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$  isotopomer into the valine pro-*S* groups obtained with the protocol described in this paper, along with the residual labeling of the corresponding leucine methyl groups being reduced to less of 2 %, would be sufficient for most biomolecular NMR applications.

### Application of the labeling to TET2

This labeling strategy was then applied to the TET2 protein, a 468 kDa homododecameric aminopeptidase of 468 kDa involved in polypeptide degradation in the hyperthermophilic Archaea *Pyrococcus horikoshii*. This protein contains 37 valines and 23 leucines. The methyl groups of these 2 amino acid types have similar chemical shift dispersions, resulting in significant overlap between

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA

J Biomol NMR



**Fig. 2** Comparison of HMQC spectra recorded on specifically methyl-labeled TET2 samples (468 kDa). The 2D methyl-TROSY NMR spectra were recorded at 50 °C in D<sub>2</sub>O buffer (20 mM NaCl and 20 mM Tris, pH 7.4) on an NMR spectrometer operating at a proton frequency of 800 MHz. An enlarged picture of the central part of the spectrum is displayed in the *bottom right* corner of each panel. **a** U-[<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C], Leu/Val-[<sup>13</sup>C<sup>1</sup>H<sub>3</sub><sup>12</sup>CD<sub>3</sub>] TET2 with non-stereospecific [<sup>13</sup>C<sup>1</sup>H<sub>3</sub>]methyl labeling prepared using racemic

3-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]methyl-3-[<sup>2</sup>H]-4-[<sup>13</sup>C]- $\alpha$ -ketoisovalerate (Tugarinov et al. 2006). **b** U-[<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C], Leu/Val-[<sup>13</sup>C<sup>1</sup>H<sub>3</sub>]<sup>pro-S</sup> TET2 with stereospecific labeling prepared using 2-hydroxy-2-[<sup>13</sup>C]methyl-3-oxo-4,4,4-tri-[<sup>2</sup>H]butanoate (pro-S acetolactate-<sup>13</sup>C) (Gans et al. 2010). **c** U-[<sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C], Val-[<sup>13</sup>C<sup>1</sup>H<sub>3</sub>]<sup>pro-S</sup> TET2 with stereospecific labeling of only valine residues prepared using 2-hydroxy-2-[<sup>13</sup>C]methyl-3-oxo-4,4,4-tri-[<sup>2</sup>H]butanoate (pro-S acetolactate-<sup>13</sup>C) and *L*-leucine-d<sub>10</sub>.

them. Figure 2 shows a comparison of the <sup>13</sup>C-HMQC spectra of TET2 obtained for the non-stereospecific labeling of the leucine and valine methyl groups using an  $\alpha$ -ketoisovalerate precursor (Fig. 2a; Tugarinov and Kay 2004), the stereospecific labeling of the leucine and valine pro-*S* methyl groups using acetolactate (Fig. 2b; Gans et al. 2010) and this new labeling protocol combining the acetolactate precursor with *L*-leucine-d<sub>10</sub> for the stereospecific labeling of valine pro-*S* methyl groups only (Fig. 2c). Although the use of labeled acetolactate alone already decreased the number of signals twofold, many leucine and valine methyl resonances still overlapped (Fig. 2b), hampering spectral analysis. The specific labeling of the valine pro-*S* methyl groups enables a significant decrease in the number of signals and overlaps in the central part of the spectrum (Fig. 2b, c). The improvement of the resolution achieved in the 2D methyl-TROSY spectra using this specific labeling protocol allowed the observation of 32 individual correlations out of the 37 expected valine signals. Thus, the quality of the spectrum is sufficiently high to initiate assignment and NMR analyses using this improved labeling scheme.

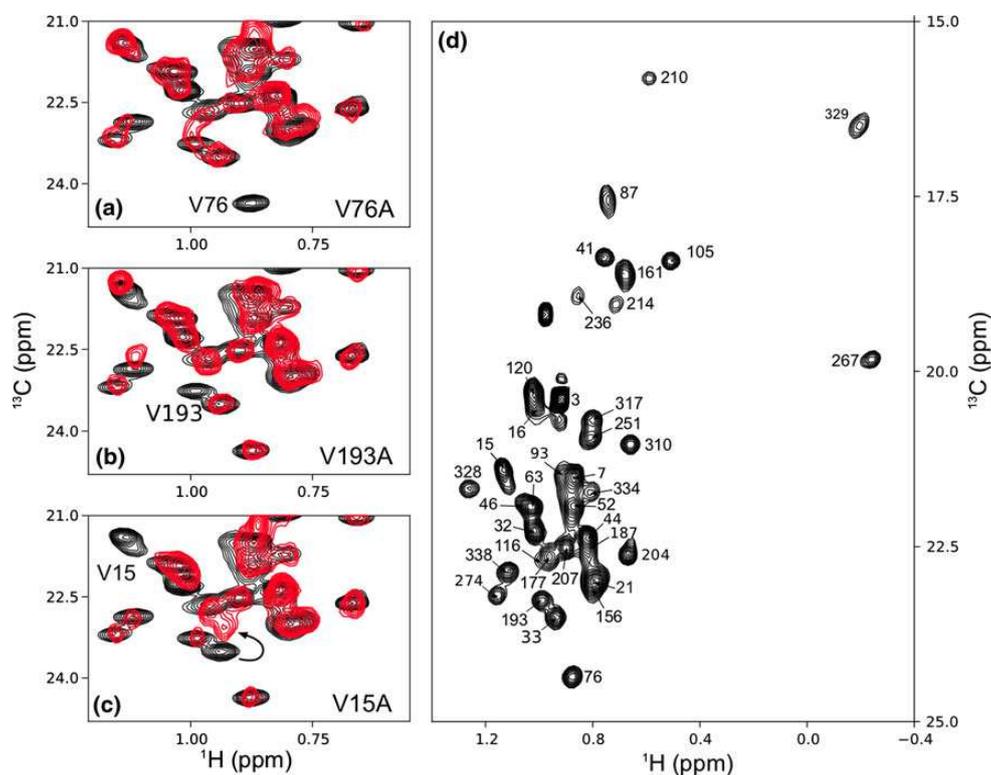
Assignment of TET2 valine pro-*S* methyl groups using the SeSAM approach

While efficient methods can be used to connect methyl resonances to sequentially assigned backbone nuclei in

medium-size proteins, the stereospecific assignment of prochiral methyl groups remains a difficult step. Moreover, the size of the TET2 particle (468 kDa) impedes sequential assignments using classical approaches relying on magnetization transfer along the backbone and the side chain bonds. Recently, we have established an efficient approach based on the systematic mutagenesis of methyl containing residues for the sequence specific assignment of methyl groups in large proteins (Amero et al. 2011). This technique, named SeSAM for Sequence-Specific Assignment of methyl groups by Mutagenesis, is based on using site-directed mutagenesis to individually “turn off” the NMR signal of each methyl-containing amino acid in the target protein and thereby provide a sequence-specific resonance assignment. Conceptually, assignment-by-mutagenesis is straightforward. In practice, however, the overlap of resonances and the occurrence of secondary chemical shift changes (Sprangers et al. 2007; Amero et al. 2011) can make the analysis more difficult. The resonance perturbations of non-mutated methyl-containing residues are likely to occur but can be minimized using conservative mutations. In the first round of this approach, all of the spectra with only one missing peak are considered for a straightforward assignment of a first set of resonances. Then, more complex spectra affected by the secondary chemical shift perturbations are analyzed taking into consideration the first set of unambiguous assignments, the 3D structure of the protein assembly and the entire set of spectra. Because

## 2.2 Test de différents marquages de méthyles sur PhCpn

J Biomol NMR



**Fig. 3** Assignment of TET2 pro-*S* valine methyl groups. The 2D SOFAST-methyl-TROSY spectra displayed in this figure were recorded using the valine to alanine mutant samples of the U- $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ , Val- $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$  $^{\text{pro-}S}$  TET2 protein assembly. **a** The mutant spectra of V76A, **b** V193A and **c** V15A and the **d** WT spectrum of

TET2 annotated with residue-specific assignments of the valine pro-*S* methyl groups. Each mutant spectrum extract (red) was overlaid with the reference spectrum of the native particle (black). The arrow in panel c indicates a secondary chemical shift perturbation

it cross-validates the results several times, considering the full library of single-site mutations greatly simplifies the process of resonance assignment.

Here, we systematically mutated each valine residue into an alanine. The stereospecific labeling of a single methyl group (valine pro-*S*) instead of the labeling of 4 methyl groups (valine and leucine) using  $\alpha$ -ketoisovalerate reduces, up to a factor of 4, peak overlapping as well as the number of correlations affected by secondary chemical shift. Therefore, in most cases, the disappearance of only one signal unambiguously provides the assignment of the corresponding valine. For TET2, 24 of the 37 valines were directly assigned from the library of mutants. Examples of these assignments are presented for valine 76 and valine 193 in Fig. 3a, b, respectively, where the mutant spectra are shown superimposed on the WT spectrum. In the remaining spectra, the disappearance of the signal upon mutation was accompanied by small changes in the chemical shift of a few additional correlations (see, for example, the V15A mutant spectrum in Fig. 3c). Peak

movements that do not directly concern the mutated resonance can complicate the process of obtaining a sequence-specific assignment from a single experiment, especially in an overcrowded region of the spectrum. Nonetheless, secondary chemical shift perturbations reflect modifications in the local electronic environment and can therefore provide complementary information that can be used to confirm the proposed assignment. Ambiguous assignments can therefore be readily cross-validated using structurally close and previously unambiguously assigned methyl groups. Analysis of the secondary chemical shift for the complete library of mutants with regards to the proximity predicted from the TET2 structure (PDB code: 1Y0R) allowed unambiguous assignment of eight supplementary valine resonances. The remaining valines correspond to weak methyl resonances or signals located in the overlapped area of the spectrum. These five remaining resonances, corresponding to valine residues 21, 46, 187, 236 and 334, were assigned based on the detection of intermethyl NOE correlations as described below. The completely assigned

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA

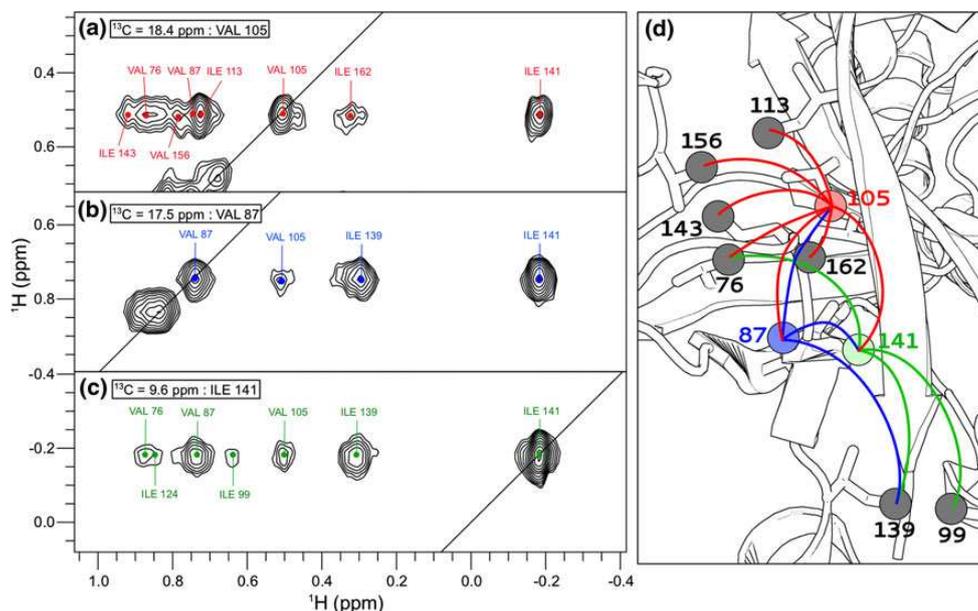
spectrum corresponding to the valine pro-*S* methyl groups of the TET2 protein is shown in Fig. 3d, and the proton and carbon-13 chemical shift values are listed in table S.1.

Cross-validation of the assignments using methyl–methyl NOEs

We have demonstrated that the use of the specific labeling of methyl groups in a small perdeuterated protein allowed the detection of long-range NOEs between methyl groups separated by up to 12 Å (Sounier et al. 2007). For a protein the size of TET2, NOEs between methyl groups separated by up to 7 Å are still expected to be detectable. Therefore, if the crystal structure of a large assembly is available, the detection of NOE correlations between remote methyl probes could be used to confirm and extend the assignments. However, the analysis of the TET2 X-ray structure (Borissenko and Groll 2005) indicates that the expected number of NOE connectivities between valine pro-*S* methyl groups is reduced to approximately 50. Such a small number of putative NOE restraints is too low to allow cross-validation of the assignment. Consequently, to increase the number of NOE connectivities detected, we combined the labeling of the valine pro-*S* groups with isoleucine- $\delta_1$  methyl probes. The resonances of these

methyl groups have distinct chemical shifts from valine resonances (figure S.3), avoiding overlapping. These methyl group resonances were previously assigned using the SeSAM approach (Amero et al. 2011).

A total of 292 NOE cross-peaks can be detected between the 71 labeled valine and isoleucine methyl probes, corresponding to an average of 4 connectivities for each methyl group. All of the observed NOE connectivities between assigned methyl probes correspond to the predicted NOE based on the theoretical methyl–methyl distance extracted from the crystal structure. We were unable to detect NOE connectivities involving leucine resonances or valine pro-*R* methyl groups, illustrating the specificity of the reported labeling strategy. Figure 4 shows examples of 2D planes extracted from the 3D  $^{13}\text{C}$ -HMQC-NOESY experiments at the  $^{13}\text{C}$  frequencies of the valine 105 pro-*S*, valine 87 pro-*S* and isoleucine 141  $\delta_1$  methyl groups. Each of these three residues presents correlations with the other two as well as with supplementary methyl groups. This unambiguous NOE network (as illustrated on the TET2 structure in Fig. 4) allows reliable cross-validation of the assignment based on mutagenesis. As already mentioned, some valine methyl groups remained unassigned after the SeSAM protocol. These residues have been assigned by analyzing the TET2 structure and looking for unassigned



**Fig. 4** Cross-validation of the valine methyl group assignments. **a** The 2D extracts of the 3D  $^{13}\text{C}$ -HMQC-NOESY spectrum of the U- $[\text{2H}, \text{15N}, \text{12C}]$ , Ile- $[\text{13CH}_3]^{\delta_1}$ , Val- $[\text{13CH}_3]^{\text{pro-}S}$  TET2 sample. The planes were extracted at the  $^{13}\text{C}$  frequencies of valine 87 (NOE connectivity annotated in blue), valine 105 (red) and isoleucine 141

(green). **b** The NOEs observed in the three planes are displayed on the 3D structure of TET2 (PDB code: 1Y0R). Lines represent the detected NOE connections between the methyl groups, where each color is related to the corresponding residues annotated in the depicted 2D extracts

## 2.2 Test de différents marquages de méthyles sur PhCpn

J Biomol NMR

NOE correlations with their neighboring residues. Examples are shown in figure S.4 for the valine 46 and valine 21 methyl groups.

The assignment of such high quality 2D correlation spectra is a prerequisite for the measurement of structural and dynamic parameters or for the study of interactions. We have already shown that methyl-specific labeling can be used to detect the interaction between large protein assemblies, such as TET2, and small molecules (Amero et al. 2011). In this previous study, isoleucine- $\delta_1$  and alanine- $\beta$  methyl probes were used to characterize the perturbations induced by the addition of amastatin, an inhibitor of aminopeptidases. The assigned valine pro-*S* groups can be used to map the binding site of this inhibitor more precisely. As shown in Fig. 5a, the addition of a saturating amount of amastatin significantly modified the position of the methyl resonances of several valine residues. Together with chemical shift changes previously detected for isoleucine- $\delta_1$  and alanine- $\beta$  methyl groups (Amero et al. 2011), these new data better defined the interaction surface of the inhibitor in the TET2 internal cavity (Fig. 5b) and agreed with the TET2/amastatin structure previously resolved by X-ray crystallography (Borissenko and Groll 2005).

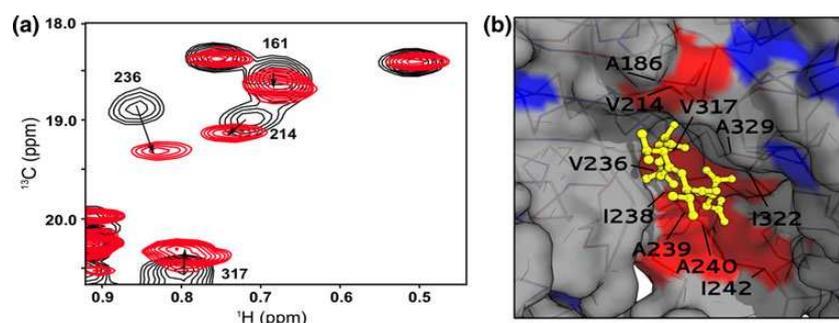
Transfer of assignments from TET2 valine pro-*S* to pro-*R* methyl groups

The stereospecific assignment of the valine pro-*R* methyl groups could be potentially obtained using the SeSAM approach. However, because the valine pro-*S* methyl groups were already assigned, it was more attractive to use these previous assignments as a starting point to identify

the corresponding pro-*R* methyl resonances. The connection between both valine methyl resonances can be achieved using through-space NOE transfer provided that the protein sample is simultaneously [ $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$ ]-labeled on both prochiral methyl groups, as previously reported (Sprangers and Kay 2007). This approach is limited by the significant overlap (Fig. 2a) from the presence of both pro-*R* and pro-*S* methyl signals in the NMR spectra and the extensive line broadening in the  $^1\text{H}$ -dimension due to the intense intra-residue methyl-methyl  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  dipolar interaction (Tugarinov and Kay 2004). To preserve the high resolution of the NMR spectra (Fig. 2c), we preferred the exploitation of the intra-residue network of scalar couplings to connect both prochiral methyl group signals.

Indeed, the frequencies of the valine pro-*S* and pro-*R* methyl groups can be connected to  $\text{C}\beta$  resonances using a combination of two different TET2 samples labeled with different labeled acetolactate precursors and simple 3D 'out-and-back' NMR experiments. Sample I (SaI) was obtained by incorporating pro-*R* acetolactate- $^{13}\text{C}_4$  (2-hydroxy-2- $^{13}\text{C}$ ]-methyl-3-oxo-[1,2,3,4-tetra- $^{13}\text{C}$ ]butanoate) to produce a TET2 sample with the valine residues containing a linear chain of  $^{13}\text{C}$  spins connecting the backbone atoms to the pro-*R*  $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$  groups (Fig. 6). A second sample (SaII) was obtained using pro-*Y* acetolactate- $^{13}\text{C}_3$  (2-hydroxy-2- $^{13}\text{C}$ ]-methyl-3-oxo-4,4,4-tri- $^{13}\text{C}$ ]-[3,4-di- $^{13}\text{C}$ ]butanoate). For SaII, only the isopropyl end of the valine side chains is  $^{13}\text{C}$ -labeled, and only the pro-*S* methyl group is protonated (Fig. 6).

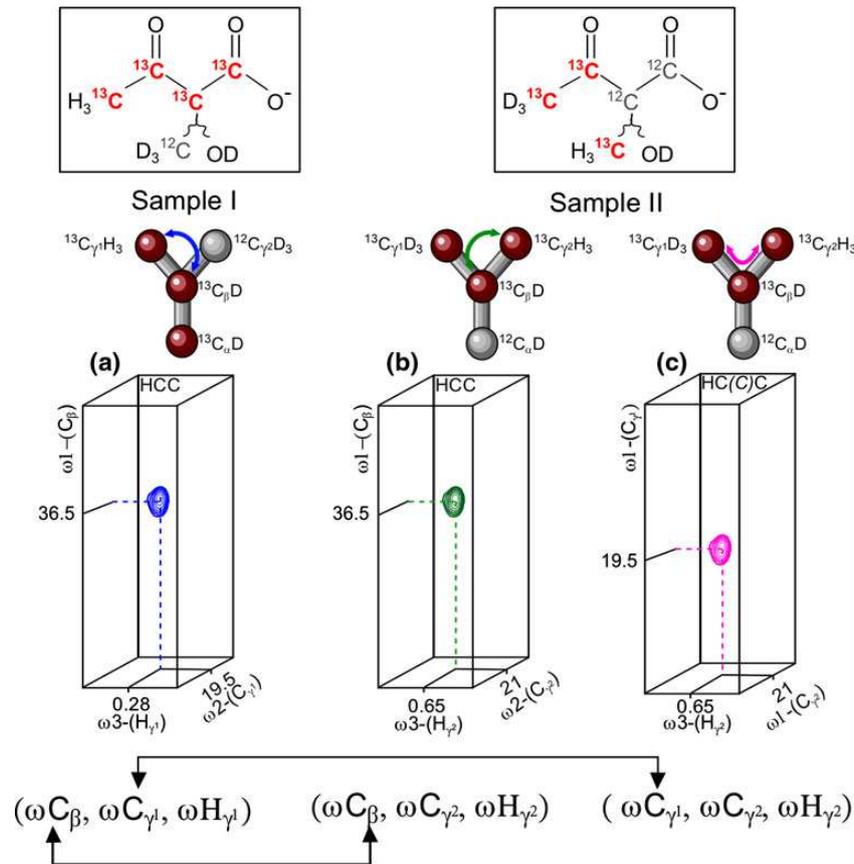
The 3D COSY-based 'out-and-back' HCC experiments (Tugarinov and Kay 2003; Ayala et al. 2009, 2012) were collected using both SaI and SaII samples for the correlation of the resonances of each methyl group to the  $\beta$  carbon



**Fig. 5** Characterization of the amastatin binding surface of TET2 by NMR spectroscopy. *Left* the overlay of a region of the 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  SOFAST-methyl-TROSY spectra (Amero et al. 2009) of free (*black*) and amastatin-bound (*red*) TET2 particles (Borissenko and Groll 2005) specifically labeled on the valine pro-*S* methyl groups. *Right* the binding-induced chemical shift perturbations mapped onto the inner surface of the TET2 dodecamer in complex with amastatin. Only an expansion of the TET2 region involved in the interaction

with amastatin is displayed. The chemical shift perturbation data obtained for the valine residues were combined with previously obtained data for alanine and isoleucine methyl groups (Amero et al. 2011). The molecular surface corresponding to these residues is color-coded in *blue* (no perturbation) and *red* (shifted resonances). We observed a moderate chemical shift perturbation for the valine 161 resonance upon addition of amastatin, but this residue is located outside of the structure zoom displayed on the *right panel*

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA



**Fig. 6** 3D 'out-and-back' HCC and HC(C)C experiments used to transfer the assignment between prochiral methyl groups. Each valine-labeling scheme is described in the upper part of the figure. The three boxes represent the 3D extracts corresponding to the correlation detected for valine-310. The experiments used for the assignment transfer are **a** a 3D HCC experiment using the U- $^{12}\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{12}\text{C}$ , Val-[2,3- $^2\text{H}_2$ ; 1,2,3- $^{13}\text{C}_3$ ; [ $^{13}\text{C}^2\text{H}_3$ ] $^{\text{pro-R}}$ /[ $^{12}\text{C}^1\text{H}_3$ ] $^{\text{pro-S}}$ ] TET2 sample prepared with pro-*R* acetolactate- $^{13}\text{C}_4$  and *L*-leucine- $\text{d}_{10}$ ; **b** a 3D HCC experiment using the U- $^{12}\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{12}\text{C}$ , Val-[2,3- $^2\text{H}_2$ ; 3- $^{13}\text{C}$ ; [ $^{13}\text{C}^2\text{H}_3$ ] $^{\text{pro-R}}$ /[ $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$ ] $^{\text{pro-S}}$ ] TET2 sample prepared with

pro-*Y* acetolactate- $^{13}\text{C}_3$  and *L*-leucine- $\text{d}_{10}$ ; and **c** a 3D HC(C)C experiment using the U- $^{12}\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{12}\text{C}$ , Val-[2,3- $^2\text{H}_2$ ; 3- $^{13}\text{C}$ ; [ $^{13}\text{C}^2\text{H}_3$ ] $^{\text{pro-R}}$ /[ $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$ ] $^{\text{pro-S}}$ ] TET2 sample prepared with pro-*Y* acetolactate- $^{13}\text{C}_3$  and *L*-leucine- $\text{d}_{10}$ . The corresponding magnetization transfers are reported on the valine structure (at the top of each panel) with colored arrows. The assignment process is described in the lower part of the figure by the arrows showing the connection between the sampled frequencies in each of the three experiments. All of the spectra were recorded at 50 °C in  $\text{D}_2\text{O}$  on an NMR spectrometer operating at a proton frequency of 800 MHz

resonances. A common frequency can be used to connect prochiral methyl groups belonging to the same residues. However, in the case of TET2, which contains 37 valines, the superimpositions of some of the  $\text{C}\beta$  signals impede unambiguous assignments for 16 valines. We then used the SaII sample to collect a 3D 'out-and-back' HC(C)C-relay experiment to obtain another frequency to resolve the ambiguities. This experiment correlates the  $^{13}\text{C}$  resonances of the pro-*R* groups to the  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  resonances of the pro-*S* methyl groups. Together with the connection to the  $\text{C}\beta$  resonances, these supplementary connectivities linking together prochiral methyl groups allowed the reliable transfer of the sequence-specific assignment obtained for the pro-*S* methyls to all of the

pro-*R* groups. This assignment protocol is illustrated in Fig. 6, which displays the 2D extracts corresponding to the methyl group chemical shifts for valine 310. The assignment of the pro-*R* methyl groups of the TET2 assembly is detailed in figure S.5, and the corresponding  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shift values are listed in table S.1.

### Conclusion

A stereospecific labeling scheme of the valine methyl groups in large proteins was developed based on the simultaneous introduction of specifically labeled 2-acetolactate and

## 2.2 Test de différents marquages de méthyles sur PhCpn

J Biomol NMR

perdeuterated *L*-leucine into the culture medium. This protocol enables efficient inhibition of the incorporation of labeled methyl groups into the leucine side chains (scrambling was reduced to less than 2 %), while the stereospecific incorporation of the  $^{13}\text{C}_3$  isotopomers in valine is preserved (at approximately 95 %). This innovative labeling scheme was applied to the 468 kDa homododecameric TET2 protein to give a significant reduction in the number of overlaps between the resonances of the prochiral methyl groups. The resulting improvement of the 2D methyl TROSY spectra resolution allowed the assignment of all 37 valine methyl resonances of TET2 through a combination of mutagenesis, innovative labeling and adapted triple resonance experiments. This robust and simple labeling strategy will be particularly useful for the detection of meaningful structural and dynamic parameters or for the study of interactions in large oligomeric proteins containing many leucine and valine residues.

**Acknowledgments** We would like to thank Drs. M. Kainosho, P. Macek, M. Plevin, P. Schanda, A. Sivertsen, Mrs I. Ayala and R. Kerfah, as well as Mr. T. Ogden, for stimulating discussions, Dr. D. Marion for help in processing the NMR spectra and Drs. T. Vernet and M. Noirclerc-Savoie for the preparation of the library of mutants. We thank Dr. B. Franzetti for providing clones of TET2. This work used the RoBioMol, high-field NMR and the isotopic labeling facilities at the Grenoble Instruct Centre (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). The research leading to these results has received funding from the European Research Council under the European Community's Seventh Framework Program FP7/2007-2013 Grant Agreement no. 260887.

### References

- Amero C, Schanda P, Durá MA, Ayala I, Marion D, Franzetti B, Brutscher B, Boisbouvier J (2009) Fast two-dimensional NMR spectroscopy of high molecular weight protein assemblies. *J Am Chem Soc* 131:3448–3449
- Amero C, Durá MA, Noirclerc-Savoie M, Perollier A, Gallet B, Plevin MJ, Vernet T, Franzetti B, Boisbouvier J (2011) A systematic mutagenesis-driven strategy for site-resolved NMR studies of supramolecular assemblies. *J Biomol NMR* 50:229–236
- Ayala I, Sounier R, Usé N, Gans P, Boisbouvier J (2009) An efficient protocol for the complete incorporation of methyl-protonated alanine in perdeuterated protein. *J Biomol NMR* 43:111–119
- Ayala I, Hamelin O, Amero C, Pessey O, Plevin MJ, Gans P, Boisbouvier J (2012) An optimized isotopic labelling strategy of isoleucine- $\gamma_2$  methyl groups for solution NMR studies of high molecular weight proteins. *Chem Commun* 48:1434–1436
- Borissenko L, Groll M (2005) Crystal structure of TET protease reveals complementary protein degradation pathways in prokaryotes. *J Mol Biol* 346:1207–1219
- De Carvalho LPS, Argyrou A, Blanchard JS (2005) Slow-onset feedback inhibition:  $\alpha$  inhibition of mycobacterium tuberculosis  $\alpha$ -isopropylmalate synthase by *L*-leucine. *J Am Chem Soc* 127:10004–10005
- Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J, Bax A (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 6:277–293
- Fischer M, Kloiber K, Häusler J, Ledolter K, Konrat R, Schmid W (2007) Synthesis of a  $^{13}\text{C}$  methyl group labeled methionine precursor as a useful tool for simplifying protein structural analysis by NMR spectroscopy. *Chem Biochem* 8:610–612
- Gans P, Hamelin O, Sounier R, Ayala I, Durá MA, Amero CD, Noirclerc-Savoie M, Franzetti B, Plevin MJ, Boisbouvier J (2010) Stereospecific isotopic labeling of methyl groups for NMR spectroscopic studies of high molecular weight proteins. *Ang Chem Int Ed* 49:1958–1962
- Gardner KH, Kay LE (1997) Production and incorporation of  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$  ( $^1\text{H}$ - $\delta_1$  methyl) isoleucine into proteins for multidimensional NMR studies. *J Am Chem Soc* 119:7599–7600
- Gelis I, Bonvin AMJJ, Keramisanou D, Koukaki M, Gouridis G, Karamanou S, Economou A, Kalodimos CG (2007) Structural basis for signal-sequence recognition by the translocase motor SecA as determined by NMR. *Cell* 131:756–769
- Godoy-Ruiz R, Guo C, Tugarinov V (2010) Alanine methyl groups as NMR probes of molecular structure and dynamics in high-molecular-weight proteins. *J Am Chem Soc* 132:18340–18350
- Goto N, Gardner K, Mueller G, Willis R, Kay L (1999) A robust and cost-effective method for the production of Val, Leu, Ile ( $\delta_1$ ) methyl-protonated  $^{15}\text{N}$ -,  $^{13}\text{C}$ -,  $^2\text{H}$ -labeled proteins. *J Biomol NMR* 13:369–374
- Gross JD, Gelev VM, Wagner G (2003) A sensitive and robust method for obtaining intermolecular NOEs between side chains in large protein complexes. *J Biomol NMR* 25:235–242
- Hajduk PJ, Augeri DJ, Mack J, Mendoza R, Yang J, Betz SF, Fesik SW (2000) NMR-based screening of proteins containing  $^{13}\text{C}$ -labeled methyl groups. *J Am Chem Soc* 122:7898–7904
- Hiller S, Garces RG, Malia TJ, Orekhov VY, Colombini M, Wagner G (2008) Solution structure of the integral human membrane protein VDAC-1 in detergent micelles. *Science* 321:1206–1210
- Howard BR, Endrizzi JA, Remington SJ (2000) Crystal structure of *Escherichia coli* malate synthase G complexed with magnesium and glyoxylate at 2.0 Å resolution: mechanistic implications. *Biochemistry* 39:3156–3168
- Hu W, Nananja AT, Wong S, Chen Y (2012) Selective editing of Val and Leu methyl groups in high molecular weight protein NMR. *J Biomol NMR* 53:113–124
- Isaacson RL, Simpson PJ, Liu M, Cota E, Zhang X, Freemont P, Matthews S (2007) A new labeling method for methyl transverse relaxation-optimized spectroscopy NMR spectra of alanine residues. *J Am Chem Soc* 129:15428–15429
- Kainosho M, Toizawa T, Iwashita Y, Terauchi T, Mei Ono A, Güntert P (2006) Optimal isotope labelling for NMR protein structure determinations. *Nature* 440:52–57
- Lichtenecker R, Ludwiczek ML, Schmid W, Konrat R (2004) Simplification of protein NOESY spectra using bioorganic precursor synthesis and NMR spectral editing. *J Am Chem Soc* 126:5348–5349
- Lichtenecker RJ, Coudevylle N, Konrat R, Schmid W (2013) Selective isotope labelling of leucine residues by using  $\alpha$ -ketoacid precursor compounds. *Chem Biochem* 14:818–821
- Miyanoiiri Y, Takeda M, Okuma K, Ono AM, Terauchi T, Kainosho M (2013) Differential isotope-labeling for Leu and Val residues in a protein by *E. coli* cellular expression using stereospecifically methyl labeled amino acids. *J Biomol NMR*. doi:10.1007/s10858-013-9784-0
- Plevin MJ, Boisbouvier J (2012) Isotope-labelling of methyl groups for NMR studies of large proteins. In: Clore GM, Potts J (eds) Recent developments in biomolecular NMR. Royal Society of Chemistry 1–24. doi:10.1039/9781849735391-00001
- Ruschak A, Kay L (2010) Methyl groups as probes of supra-molecular structure, dynamics and function. *J Biomol NMR* 46:75–87

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA

---

- Sounier R, Blanchard L, Wu Z, Boisbouvier J (2007) High-accuracy distance measurement between remote methyls in specifically protonated proteins. *J Am Chem Soc* 129:472–473
- Sprangers R, Kay LE (2007) Quantitative dynamics and binding studies of the 20S proteasome by NMR. *Nature* 445:618–622
- Sprangers R, Velyvis A, Kay LE (2007) Solution NMR of supramolecular complexes: providing new insights into function. *Nat Meth* 4:697–703
- Tugarinov V, Kay LE (2003) Ile, Leu, and Val methyl assignments of the 723-residue malate synthase G using a new labeling strategy and novel NMR methods. *J Am Chem Soc* 125:13868–13878
- Tugarinov V, Kay LE (2004) An isotope labeling strategy for methyl TROSY spectroscopy. *J Biomol NMR* 28:165–172
- Tugarinov V, Hwang PM, Ollerenshaw JE, Kay LE (2003) Cross-correlated relaxation enhanced  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of methyl groups in very high molecular weight proteins and protein complexes. *J Am Chem Soc* 125:10420–10428
- Tugarinov V, Choy W-Y, Orekhov VY, Kay LE (2005) Solution NMR-derived global fold of a monomeric 82-kDa enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:622–627
- Tugarinov V, Kanelis V, Kay LE (2006) Isotope labeling strategies for the study of high-molecular-weight proteins by solution NMR spectroscopy. *Nat Protoc* 1:749–754
- Velyvis A, Ruschak AM, Kay LE (2012) An economical method for production of  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{CH}_3$ -threonine for solution NMR studies of large protein complexes: application to the 670 kDa proteasome. *PLoS One* 7:e43725
- Vranken WF, Boucher W, Stevens TJ, Fogh RH, Pajon A, Llinas M, Ulrich EL, Markley JL, Ionides J, Laue ED (2005) The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins* 59:687–696

**Specific Labeling and Assignment Strategies of Valine  
Methyl Groups for the NMR Studies of  
High Molecular Weight Proteins**

**Supporting Information**

**Authors:** Guillaume Mas<sup>a,b,c</sup>, Elodie Crublet<sup>a,b,c</sup>, Olivier Hamelin<sup>b,c,d</sup>, Pierre Gans<sup>a,b,c</sup>, Jérôme Boisbouvier<sup>a,b,c,\*</sup>

Affiliations :

[a] Univ. Grenoble Alpes, Institut de Biologie Structurale (IBS), F-38027 Grenoble, France

[b] CNRS, F-38027 Grenoble, France

[c] CEA, DSV, F-38027 Grenoble, France

[d] Univ. Grenoble Alpes, Chemistry and Biology of Metals Laboratory, F-38027 Grenoble, France

**\* Corresponding author:**

Jérôme Boisbouvier

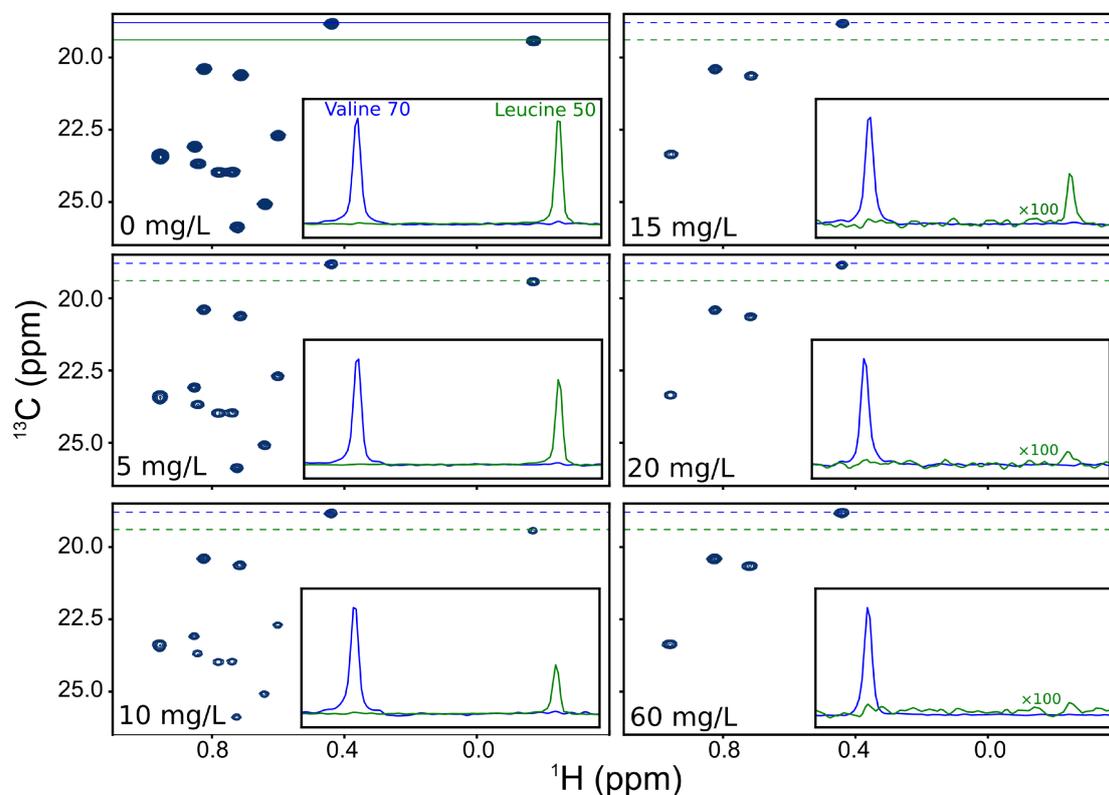
Institut de Biologie Structurale

41 rue Jules Horowitz

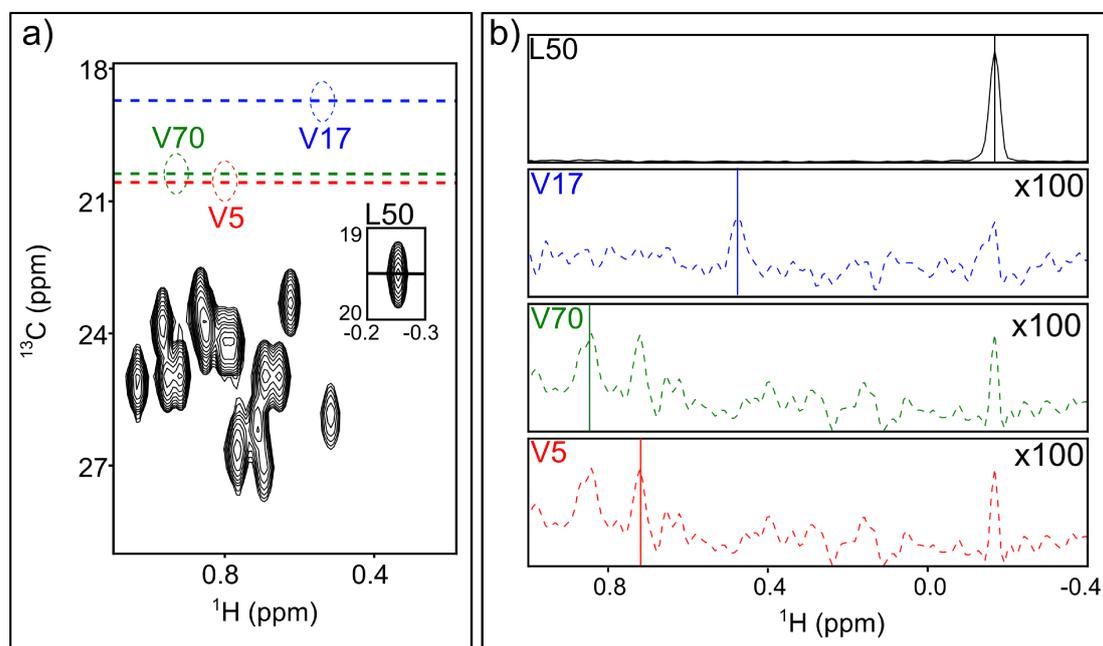
38027 GRENOBLE CEDEX 1 – FRANCE

Email: jerome.boisbouvier@ibs.fr

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA

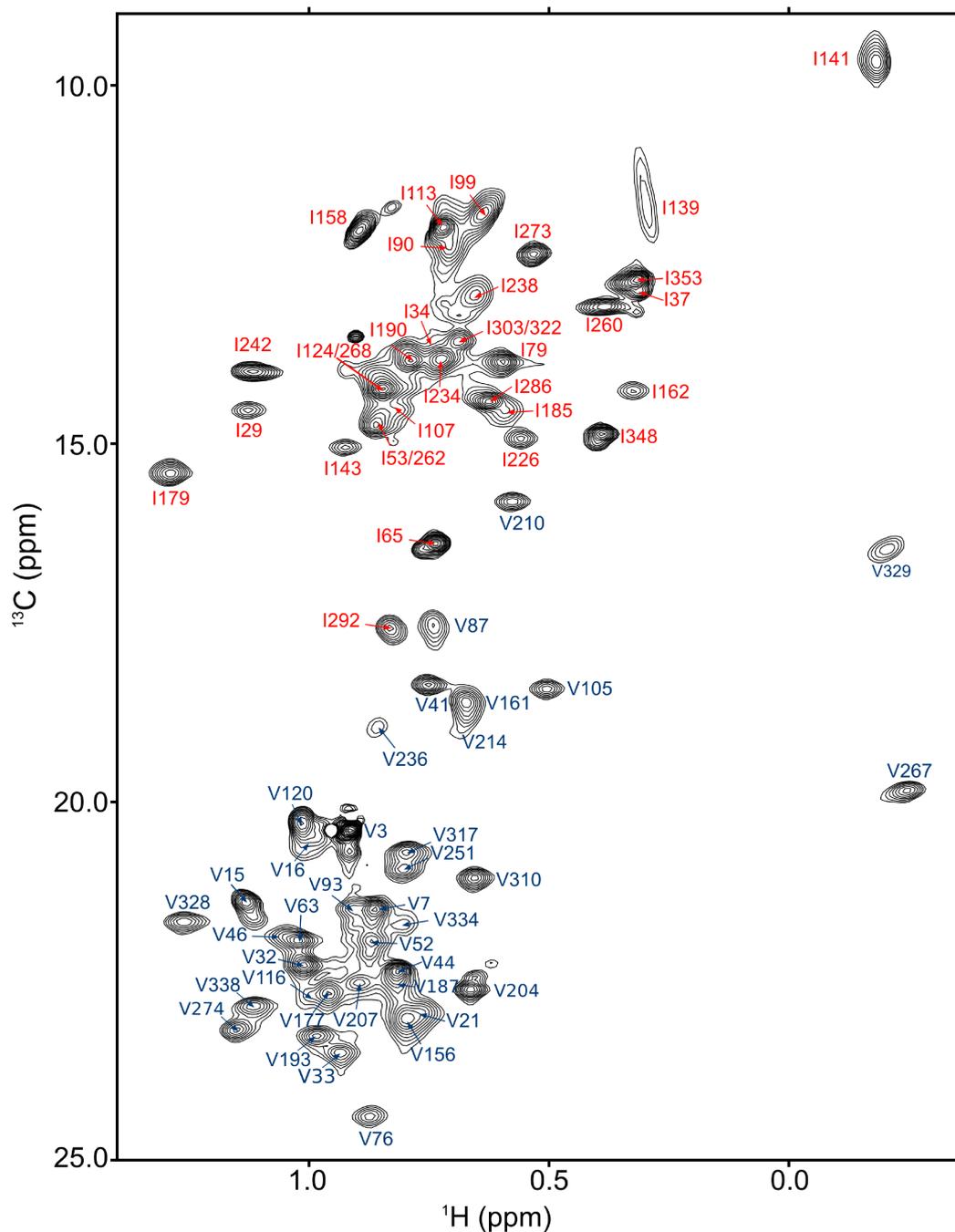


**Figure S1. Saturation of leucine biosynthetic pathway by exogenous leucine.** HSQC spectra of ubiquitin prepared in M9/D<sub>2</sub>O containing U-[<sup>12</sup>C], U-[<sup>2</sup>H] glucose supplemented with 0, 5, 10, 15, 20, 60 mg/L of U-[<sup>12</sup>C], U-[<sup>1</sup>H] *L*-leucine and a saturating concentration of pro-*S* acetolactate-<sup>13</sup>C at 300 mg/L. For each spectrum, 1D extracts for valine 70 in blue and for leucine 50 in green are depicted in a box on the lower right part of the spectrum.



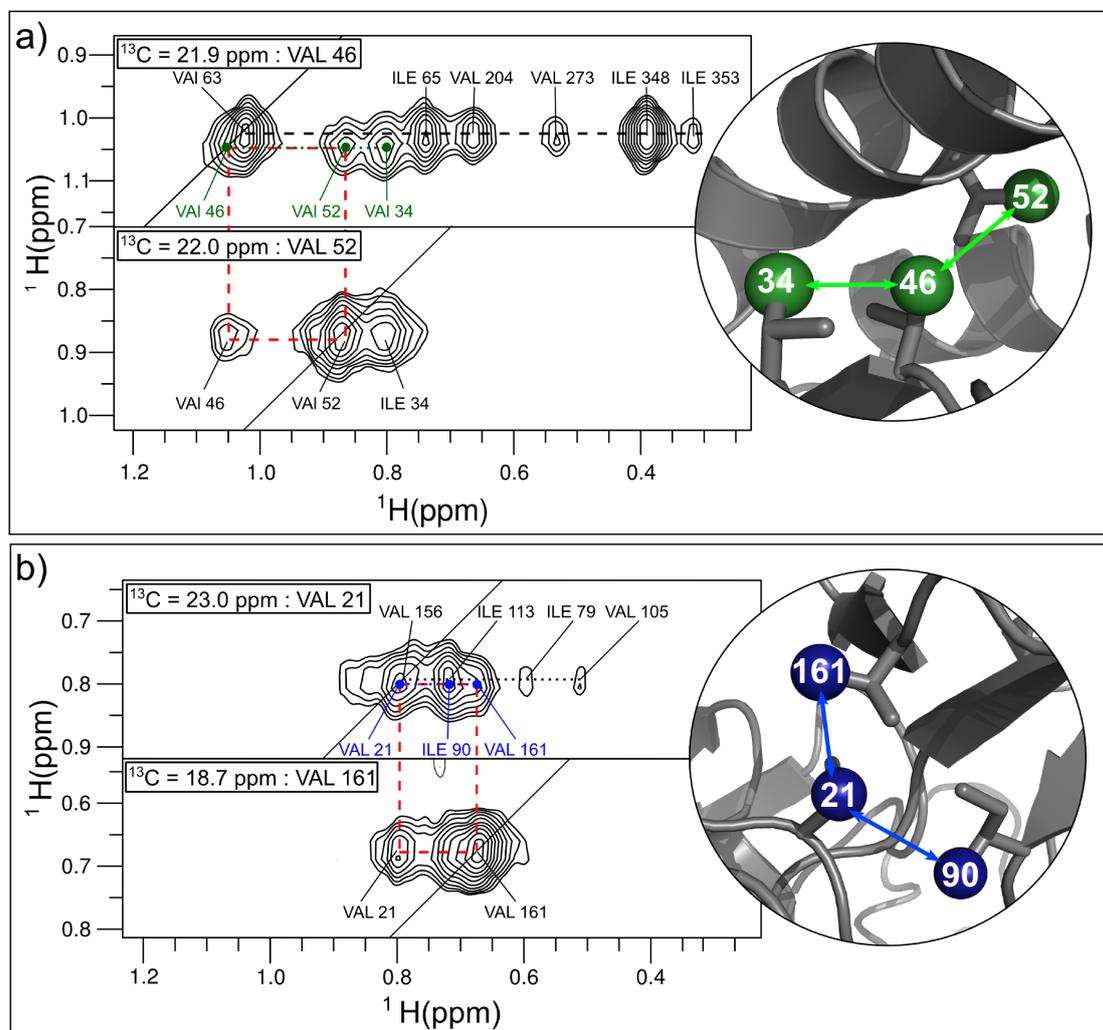
**Figure S2. NMR Spectrum of Ubiquitin specifically labeled using *L*-leucine U- $^{13}\text{C}$ .** Ubiquitin was overexpressed in minimal media containing U- $^{12}\text{C}$ , U- $^{2}\text{H}$  glucose supplemented with 40 mg/L of U- $^{13}\text{C}$  *L*-leucine and 300 mg/L of U- $^{12}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  acetolactate. (a) HSQC spectrum of U- $^{15}\text{N}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ , Leu- $^{13}\text{C}_6$  ubiquitin. (b) 1D extract from the HSQC spectrum corresponding to the expected position of pro-*S* methyl groups of valine 17, 70, 5 (respectively in blue, green, red) and pro-*S* methyl groups of leucine 50 (black). As expected, maximum signals detected for valine methyl groups account for *c.a* 1% of average leucine methyl peak intensities, which corresponds to natural abundance level of  $^{13}\text{C}$  in incorporated unlabeled acetolactate.

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA



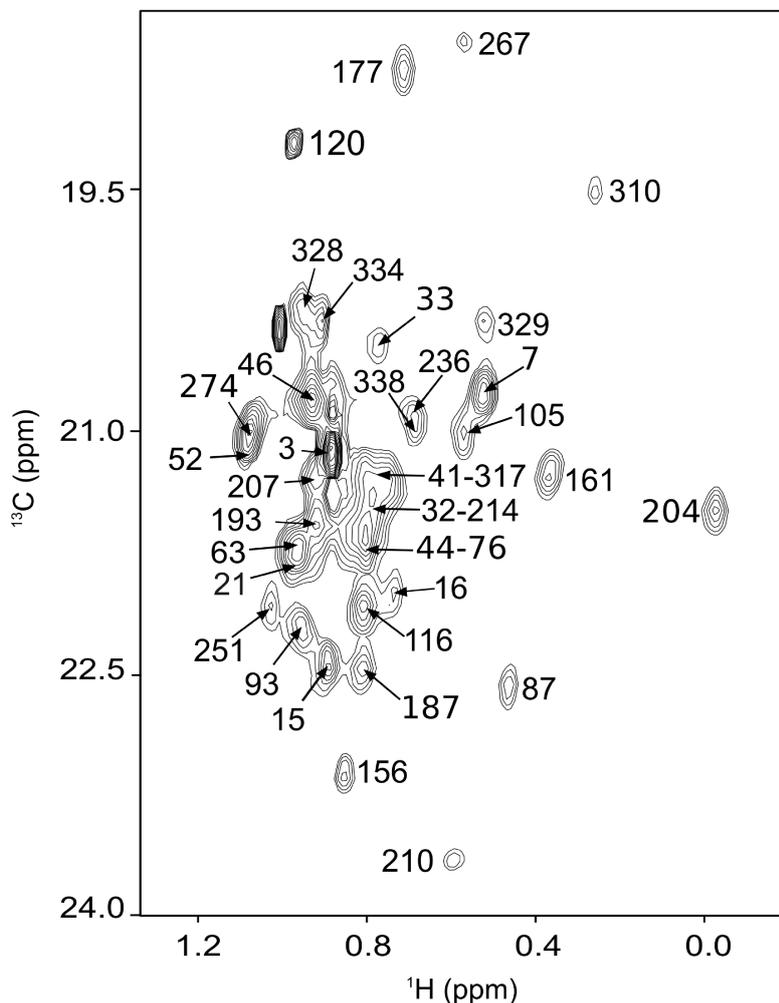
**Figure S3. :** 2D Methyl TROSY spectrum of U- $^2\text{H}$ , U- $^{15}\text{N}$ , U- $^{12}\text{C}$ , Val- $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$ <sup>proS</sup>, Ile- $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$ <sup>δ1</sup> TET2. TET2 was produced in presence of 300 mg/L of 2- $^{13}\text{C}$  methyl-4- $^2\text{H}_3$ -acetolactate and 60 mg/L of 2-oxo-3- $^2\text{H}_2$ -4- $^{13}\text{C}$ butyrate. 2D  $^{13}\text{C}$ -methyl TROSY spectrum was recorded at 50°C in  $\text{D}_2\text{O}$  on a NMR spectrometer operating at a proton frequency of 800 MHz. Each cross-peak is annotated with corresponding residue number.

## 2.2 Test de différents marquages de méthyles sur PhCpn



**Figure S4. Assignment of valines 46 and 21 using NOE connectivities.** 2D extracts of 3D  $^{13}\text{C}$ -HMQC-NOESY spectrum of U- $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{12}\text{C}$ ], Ile- $^{13}\text{CH}_3$ ] $^{\delta 1}$ , Val- $^{13}\text{CH}_3$ ] $^{\text{pro-S}}$  TET2 sample. Planes were extracted at the  $^{13}\text{C}$  frequencies of (a) valines 46/63 and 52; (b) valines 21 and 161. NOEs observed in the three planes are displayed on the 3D structure of TET2 (pdb code 1Y0R) on the right panels. Lines represent the detected NOE connections between methyl groups, each color is related to the corresponding residue annotated in the 2D extracts.

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA



**Figure S5. Assignment of valine pro-R methyl groups transferred from valine  $\gamma 2$  methyl groups using 3D HCC and HC(C)C experiments.** 2D HMQC NMR spectrum of U- $[\text{}^2\text{H}, \text{}^{15}\text{N}, \text{}^{12}\text{C}]$ , Val- $[\text{}^2,3\text{-}^2\text{H}_2; 1,2,3\text{-}^{13}\text{C}_3; [\text{}^{13}\text{C}^1\text{H}_3]^{\text{pro-R}}/[\text{}^{12}\text{C}^2\text{H}_3]^{\text{pro-S}}]$  TET2 sample. All the cross-peaks correspond to valine pro-R methyl groups and were annotated with the corresponding residue number. Splitting in the  $^{13}\text{C}$  dimension due to  $^1\text{J}_{\text{CC}}$  was removed at the processing stage using maximum entropy reconstruction (Shimba et al. J. Am. Chem. Soc. 2003; 125, 2382–2383).

## 2.2 Test de différents marquages de méthyles sur PhCpn

**Table S1. Stereospecific assignments of TET2 valine methyl groups.**

NMR samples were prepared as described in materials and methods section. NMR sample buffer used was 20 mM Tris-DCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, in 100% D<sub>2</sub>O. NMR data were collected at 50°C.

Residue	Assignment Method	C $\beta$	H $\gamma$ 2	C $\gamma$ 2	H $\gamma$ 1	C $\gamma$ 1
V3	Unambiguous	32.5	0.92	20.4	0.9	21.2
V7	CS	33.6	0.87	21.5	0.54	20.7
V15	Unambiguous	31.9	1.13	21.4	0.9	22.4
V16	CS	30.6	0.98	20.6	0.75	22.0
V21	NOE	33.0	0.80	23.0	1.00	21.8
V32	Unambiguous	31.8	1.01	22.3	0.80	21.6
V33	CS	30.8	0.94	23.5	0.79	20.5
V41	Unambiguous	34.0	0.75	18.4	0.76	21.3
V44	Unambiguous	33.9	0.82	22.4	0.81	21.8
V46	NOE	32.7	1.05	21.9	0.95	20.9
V52	Unambiguous	32.8	0.87	21.9	1.10	21.3
V63	CS	34.8	1.03	21.9	0.97	21.7
V76	Unambiguous	32.3	0.88	24.4	0.86	21.7
V87	Unambiguous	37.3	0.74	17.5	0.48	22.6
V93	CS	34.5	0.91	21.5	0.96	22.2
V105	Unambiguous	30.2	0.51	18.4	0.58	21.0
V116	Unambiguous	36.1	0.96	22.7	0.81	22.1
V120	Unambiguous	32.7	1.02	20.3	0.97	19.2
V156	CS	31.0	0.79	23.0	0.86	23.1
V161	Unambiguous	34.0	0.68	18.6	0.38	21.3
V177	Unambiguous	34.0	1.01	22.7	0.73	18.8
V187	NOE	31.5	0.82	22.4	0.83	22.5
V193	Unambiguous	31.5	0.99	23.3	0.93	21.6
V204	Unambiguous	33.6	0.67	22.6	-0.01	21.5
V207	Unambiguous	34.0	0.89	22.5	0.93	21.5
V210	Unambiguous	32.6	0.59	15.8	0.60	23.6
V214	CS	30.4	0.70	19.1	0.79	21.5
V236	NOE	32.4	0.86	18.9	0.72	20.8
V251	Unambiguous	28.7	0.81	21.0	1.04	22.0
V267	CS	35.5	-0.24	19.8	0.65	18.5
V274	Unambiguous	32.3	1.15	23.2	1.08	21.0
V310	Unambiguous	36.5	0.65	21.0	0.28	19.5
V317	Unambiguous	33.1	0.80	20.8	0.81	21.4
V328	Unambiguous	36.9	1.26	21.7	0.98	20.3
V329	Unambiguous	35.0	-0.20	16.5	0.53	20.4
V334	NOE	31.4	0.81	21.7	0.93	20.5
V338	Unambiguous	32.1	1.12	22.9	0.70	21.0

*Unambiguous*: Direct assignment using SeSAM analysis without secondary chemical shift.

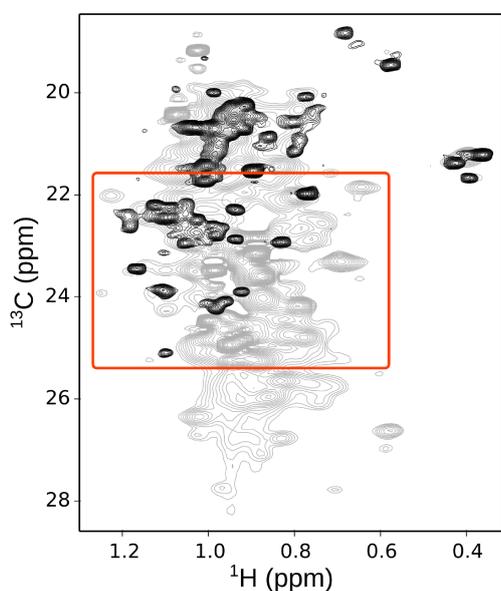
*CS*: corresponding mutant spectrum display secondary chemical shift perturbations. Assignment was performed considering full library of mutant spectra, structure of TET2 and previously unambiguously assigned resonances.

*NOE*: Assignments obtained from 3D HMQC-NOESY experiments and considering previously assigned correlation and TET2 structure.

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA

### 2.2.1.2 Marquage résidu-spécifique du groupement méthyle Val- [ $^{13}\text{C}$ ]-proS de PhCpn

Après avoir été développé sur une protéine modèle, le protocole de marquage résidu et stéréo-spécifique des valines a été appliqué sur PhCpn. La figure 2.6 présente la comparaison entre le marquage de PhCpn avec l'acéto-isovalérate, qui conduit au marquage équivalent des deux résidus et de 50% de chacun des deux groupements méthyles (gris), et le marquage résidu et stéréo-spécifique du groupement méthyle Val- [ $^{13}\text{C}$ ]-proS (noir).



**FIGURE 2.6: Comparaison des deux marquages des groupements méthyles des valines et leucines de PhCpn** - Superposition des spectres 2D ( $^1\text{H},^{13}\text{C}$ ) HMQC de PhCpn avec un marquage équivalent des groupements méthyles [ $^{13}\text{C}$ ] proR et proS des valines et des leucines (gris) et avec un marquage résidu et stéréo-spécifique du groupement méthyle Val- $^{13}\text{C}$ -proS des valines (noir). L'acquisition des données a été réalisée à 75°C (Tampon  $^2\text{H}_2\text{O}$  : MES 25 mM (pH 6.5), KCl 100 mM, NaCl 50 mM et  $\text{MgCl}_2$  25 mM) sur un spectromètre opérant à une fréquence du proton de 850 MHz et équipé d'une sonde cryogénique.

Le marquage non-stéréospécifique des résidus valines et leucines correspond à 186 groupements méthyles avec de nombreux recouvrements entre les signaux rendant son exploitation impossible pour l'étude de PhCpn. A l'inverse, le marquage résidu et stéréo-spécifique des valines avec seulement 47 groupements méthyles permet une augmentation significative des signaux isolés pouvant être utilisés comme des sondes des modifications conformationnelles de PhCpn. Cette amélioration est particulièrement importante dans la zone entre les valines et les leucines où le marquage résidu spécifique a permis de supprimer de nombreux recouvrements (encadrée en rouge sur le spectre).

Ces améliorations permettent d'obtenir un spectre 2D ( $^1\text{H},^{13}\text{C}$ ) HMQC utilisable pour des études structurales et fonctionnelles avec 47 sondes RMN tout en limitant de manière raisonnable le nombre de recouvrement entre les signaux.

## 2.3 Attribution des groupements méthyles de protéines ou d'assemblage de haut poids moléculaire

Dans les parties précédentes, il a été montré qu'il est possible d'observer des spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC de PhCpn avec deux marquages de groupements méthyles malgré la taille de PhCpn (960 kDa) largement supérieure aux limitations de l'étude de protéine par RMN du liquide. Cependant, pour réaliser des études fonctionnelles, dynamiques ou structurales il va être indispensable d'attribuer les signaux de ces groupements méthyles.

La stratégie classique pour obtenir l'attribution de petite protéine par RMN repose sur l'enregistrement d'une série d'expériences RMN hétéro-nucléaire multi-dimensionnelle qui permettent d'obtenir de manière séquentielle l'attribution de la chaîne polypeptidique de la protéine et des chaînes latérales. La protéine monomérique de plus haut poids moléculaire ayant été attribuée par cette stratégie est la protéine MSG (82 kDa). Pour cette protéine, l'attribution des groupements méthyles a été transférée à partir de l'attribution de la chaîne polypeptidique (210). Cependant, pour des protéines d'une taille supérieure à 100 kDa cette stratégie ne va pas être applicable.

### 2.3.1 Stratégies d'attribution des groupements méthyles pour des protéines ou des assemblages de haut poids moléculaire

Avec l'étude de plusieurs protéines ou assemblages de plus de 100 kDa, durant les dernières années, différentes stratégies alternatives ont été développées pour permettre l'attribution des groupements méthyles des protéines d'une taille supérieure à 100 kDa.

Dans partie suivante, nous allons présenter ces différentes stratégies ainsi que leurs avantages et inconvénients. Pour chaque stratégie, un exemple d'application publié dans la littérature va être donné.

#### 2.3.1.1 Diviser pour conquérir

##### **Attribution par domaine pour les protéines multi-domaines :**

Cette stratégie s'applique à des protéines d'une taille supérieure aux limites de taille de la RMN du liquide mais qui peuvent être découpées en sous-domaines d'une taille accessible pour la RMN du liquide. Pour que cette méthode soit applicable, il est nécessaire que les

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA

---

domaines de la protéine puissent se replier indépendamment avec un repliement similaire à la forme native de la protéine. De plus, les spectres de la protéine et des sous-domaines devront être suffisamment proche pour que le transfert d'attribution soit possible.

Cette stratégie a été appliquée pour l'attribution de la protéine SecA (homo-dimère de 204 kDa) (195). Pour son attribution, la protéine SecA a été coupée en trois domaines qui ont pu être attribués séparément. L'attribution des domaines a ensuite été transférée à la forme native de la protéine avec une attribution presque complète des groupements méthyles. Les attributions manquantes ont été obtenues en utilisant des données nOe et par mutagenèse pour certains résidus.

### **Attribution par déconstruction d'une particule oligomérique :**

Cette stratégie consiste en la division d'une particule oligomérique en particules d'un degré d'oligomérisation inférieure qui pourront être attribuées par des méthodes d'attribution classique. Cependant, pour appliquer cette stratégie, il est nécessaire que le complexe natif puisse être scindé en sous-parties et que les spectres correspondant à ces sous-parties ne diffère pas trop du spectre du complexe natif. L'attribution de la sous partie du complexe est ensuite transférée au complexe natif.

Cette stratégie a permis l'attribution du protéasome un oligomère de 720 kDa (194). En utilisant des mutants, il a été possible de diviser la particule en deux et également d'obtenir le monomère de 20 kDa. Le monomère a ensuite été attribué avec des expériences RMN classiques. Cette attribution a été transférée du monomère à la demi particule puis finalement au complexe natif. Pour les attributions manquantes des données nOe ont été utilisées et les résidus n'ayant pas pu être attribués lors des étapes précédentes ont été attribués par mutagenèse.

Une des limitations majeures de cette stratégie est quelle nécessite de nombreuses étapes pour trouver les conditions expérimentales permettant de déstabiliser l'interface entre les sous-unités sans modifier de manière trop importante la structure du monomère.

### **2.3.1.2 Attribution des groupements méthyles par mutagenèse (SeSAM)**

Cette stratégie peut être appliquée à des protéines ou des assemblages de haut poids moléculaire. Le groupement méthyle de tous les résidus d'un type A va être marqué et dans un même temps un des résidus du type A va être muté en un type de résidu B, non

marqué, présentant des caractéristiques proches de A (196). En analysant, les spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC de la protéine de référence et du mutant, le signal du résidu muté ne sera plus présent et pourra être attribué.

Une des limitations de cette stratégie est que la mutation d'un résidu va entraîner une modification de l'environnement chimique des résidus voisins. Cela va pouvoir causer des déplacements chimiques secondaires (DCS) du signal de ces résidus qui vont rendre l'analyse des spectres complexe. Ainsi, l'attribution complète d'un type de résidu nécessitera d'analyser la librairie complète des mutants de ce type de résidu pour comprendre les effets des mutations.

### 2.3.2 Quelle stratégie utiliser pour l'attribution des groupements méthyles de PhCpn ?

Pour l'attribution des groupements méthyles de PhCpn deux stratégies étaient théoriquement possible : la déconstruction de la particule oligomérique ou l'attribution par mutagenèse. Cependant, l'utilisation de la stratégie de déconstruction de la particule oligomérique est difficilement applicable à PhCpn pour deux raisons :

(1) La masse moléculaire du monomère de PhCpn est de 60 kDa. Même si théoriquement l'attribution par RMN du liquide d'une protéine de 60 kDa est possible, cette taille est supérieure à la taille des protéines étudiées en routine par RMN. Par conséquent, le temps d'enregistrement et d'analyse des expériences RMN nécessaires pour l'attribution du monomère de PhCpn aurait été très long en comparaison du temps nécessaire pour une attribution par mutagenèse.

(2) Comme on peut l'observer avec la figure 2.7, les spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC du monomère et de la forme native de PhCpn, avec un marquage du groupement méthyle Met- $^{13}\text{CH}_3$ - $\epsilon$ , présentent de nombreuses différences. Ces différences auraient rendu complexe et peu fiable le transfert de l'attribution du monomère vers le complexe.

Pour ces raisons, nous avons choisi d'utiliser la stratégie d'attribution par mutagenèse pour l'attribution des groupements méthyles de PhCpn. Cette stratégie va présenter l'avantage de permettre d'utiliser PhCpn dans son état d'oligomérisation natif et également de nécessiter un temps beaucoup plus raisonnable en comparaison du temps nécessaire pour l'attribution d'une protéine de 60 kDa par RMN du liquide.

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA

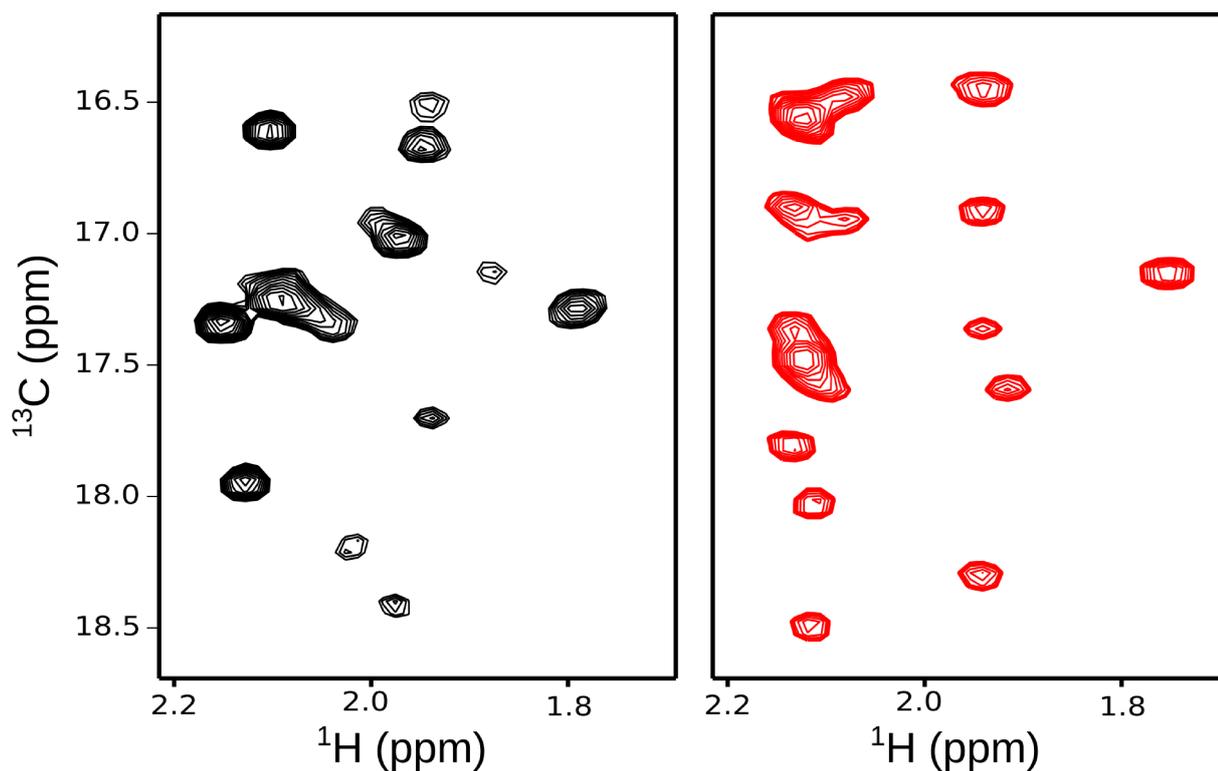


FIGURE 2.7: Comparaison des spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC du monomère et de la forme native de PhCpn avec un marquage du groupement méthyle Met- $^{13}\text{CH}_3$ - $\epsilon$  - Spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC du monomère et de la forme native de PhCpn avec un marquage du groupement méthyle des méthionines. L'acquisition des données a été réalisée à 50°C (Tampon  $^2\text{H}_2\text{O}$  : MES 25 mM (pH 6.5), KCl 100 mM, NaCl 50 mM et  $\text{MgCl}_2$  25 mM) sur un spectromètre opérant à une fréquence du proton de 600 MHz et équipé d'une sonde cryogénique.

## 2.4 Stratégie SeSAM pour l'attribution des groupements méthyles d'assemblage de haut poids moléculaire

La première utilisation de mutagenèse de résidus pour attribuer les signaux RMN d'une protéine remonte au début des années 80 (211, 212) et la première application de cette stratégie pour l'attribution de groupements méthyles a été publiée au milieu des années 90 (213).

Ce n'est qu'avec les premières études de gros assemblage, pour lesquels les techniques d'attributions classiques ne sont plus utilisables, que cette stratégie a commencé à être appliquée d'une manière plus fréquente. Plusieurs assemblages de haut poids moléculaire allant de 200 kDa à 700 kDa ont été attribués en utilisant une combinaison de la stratégie diviser pour conquérir avec une attribution par mutagenèse (ClpP (193), Protéasome (194), SecA (195), Aspartate Transcarbamoylase (214)). Cependant, pour toutes ces études l'attribution par mutagenèse n'a été utilisée que comme une méthode complémentaire pour permettre l'attribution de signaux qui n'avaient pas pu être attribués par la stratégie diviser pour conquérir.

Un des arguments avancés par Sprangers *et al.* (194) pour justifier l'impossibilité d'utiliser l'attribution par mutagenèse comme stratégie d'attribution principale est que pour une majorité de mutants le nombre important de déplacement chimique secondaire (DCS) va rendre impossible l'attribution non-ambigu d'un signal. Il est possible d'expliquer l'observation de nombreux DCS dans ces expériences par le fait qu'un échantillon avec un marquage de cinq groupements méthyles (Ile- $\delta$ 1, Val-proS, Val-proR, Leu-proS, Leu-proR) a été utilisé. En effet, le marquage de plusieurs groupements méthyles va avoir pour effet d'augmenter de manière très importante le nombre de DCS pour chaque mutation.

Théoriquement, il devrait être possible de diminuer le nombre de DCS par mutant en ne marquant qu'un seul type de groupement méthyle et ainsi de rendre beaucoup plus simple l'analyse des spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC des mutants.

La première application de la stratégie de mutagenèse avec le marquage d'un seul type de groupement méthyle a été publiée par Amero *et al.* en 2011 (196). Cette étude a permis de démontrer qu'en limitant le marquage à un seul type de résidu, il est possible d'attribuer par mutagenèse le groupement méthyle de tous les résidus alanines et isoleucines d'un complexe de 500 kDa. Cette étude a également permis de confirmer que le marquage

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA

---

d'un seul type de groupement méthyle permet de réduire les DCS avec environ 50% des mutants pour lesquels aucune modification significative du spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC n'était observable.

À notre connaissance, aucune étude qualitative n'a été publiée sur le lien entre la mutation d'un résidu et l'observation de DCS sur le spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC des mutants. Dans la partie suivante, une étude statistique sur le lien entre DCS et mutation de différents résidus de la protéine TET2 va être présentée.

### 2.4.1 Analyse statistique des déplacements chimiques secondaires causés par la mutation d'un résidu

Pendant ma thèse, l'analyse des effets de 100 mutations ponctuelles sur les spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC de la protéine TET2 a été réalisée par une étudiante de master dont j'ai assuré la co-supervision. Ces résultats présentent un intérêt particulier pour aider à mieux comprendre les prochaines parties. Par conséquent, nous avons choisi de les présenter ci-dessous.

Les mutants ponctuels de la protéine TET2 ont été produits et purifiés selon le protocole présenté dans le paragraphe 2.4.2. Le but de cette expérience ne va pas être d'attribuer les signaux des résidus de TET2 mais d'observer les DCS consécutifs à la mutation d'un résidu. Par conséquent, pour chaque série de mutant le type de résidu qui a été muté est différent du type de résidu qui a été marqué. Ainsi, toutes les modifications observées sur les spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC seront des DCS. Les trois séries de mutations et les marquages de groupements méthyles utilisés pour cette expérience sont résumés dans le tableau 2.2.

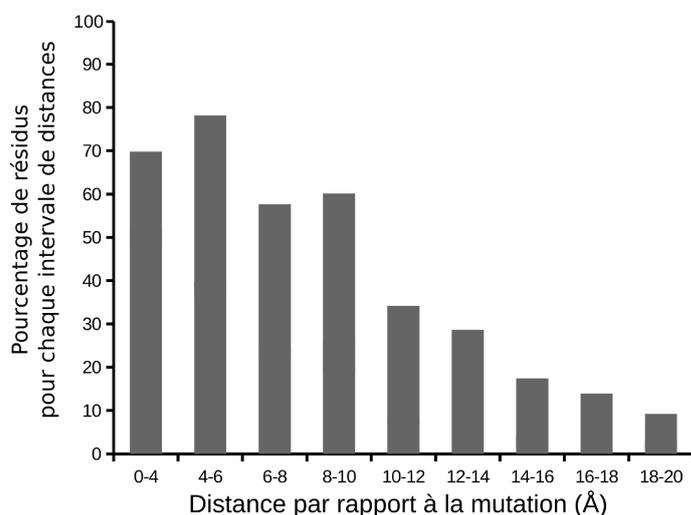
Mutation	Marquage
Valine $\rightarrow$ Alanine (37)	Isoleucine $\delta 1$
Alanine $\rightarrow$ Valine (30)	Isoleucine $\delta 1$
Isoleucine $\rightarrow$ Leucine (33)	Alanine $C\beta$

**TABLE 2.2:** Mutations et marquages utilisés pour l'analyse de l'effet des mutations ponctuelles sur les spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC

## 2.4 Stratégie SeSAM pour l'attribution des groupements méthyles d'assemblage de haut poids moléculaire

La structure de la protéine TET2 est connue (code PDB : 1Y0R). Par conséquent, il a été possible d'extraire les résidus compris dans une sphère entre 0 et 20 Å pour chacun des mutants. Ensuite, à partir de l'attribution des groupements méthyles Ile-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\delta 1$  et Ala-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\beta$  de TET2 (196), il a été possible d'observer si le signal de ces résidus est affecté ou non par la mutation.

Le pourcentage de résidu dont le signal est affecté par rapport au nombre de résidus pour plusieurs intervalles de distance est représenté dans la figure 2.8. Les pourcentages correspondent à la moyenne des effets observés pour les 100 mutants.



**FIGURE 2.8:** Analyse des effets de la mutation d'un résidu sur les signaux des résidus situés dans son environnement - Le graphique représente le pourcentage de résidus affectés par une mutation pour différents intervalles de distances par rapport au nombre de résidu dans chacun des intervalles de distance.

A partir de ce graphique, il est possible d'observer que le nombre de DCS est assez élevé pour les résidus proche de la mutation puis il diminue pour les résidus plus éloignés. De plus, jusqu'à 10 Å environ 60% de DCS peuvent être observés ce qui semble confirmer la valeur de 50% publié par Amero *et al.* (196).

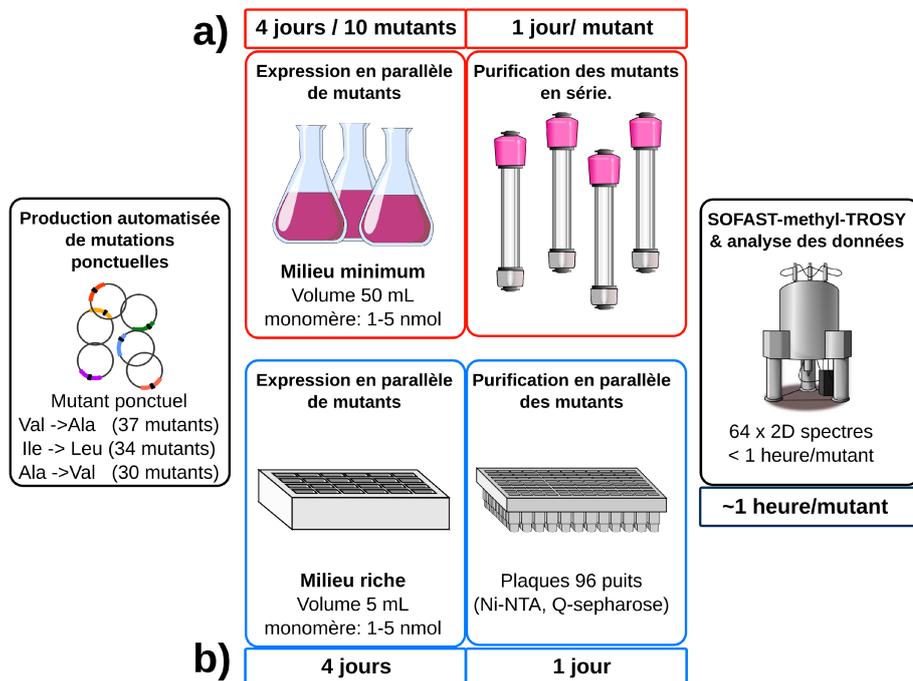
Ces résultats montrent que les DCS vont pouvoir être utilisés comme une méthode de confirmation de l'attribution par mutagenèse. Ils montrent également l'importance de limiter le nombre de résidus marqué lors d'une attribution par mutagenèse. En effet, d'après ces données on peut s'attendre à ce que le nombre de DCS augmente proportionnellement avec le nombre de résidus marqués en rendant très complexe l'attribution d'un mutant.

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA

### 2.4.2 Parallélisation et miniaturisation de la stratégie d'attribution par mutagenèse

La stratégie classique d'attribution par mutagenèse est représentée dans la figure 2.9(a). Avec cette stratégie, les mutants sont produits avec des volumes de culture de 50 mL qui représentent un coût important et impliquent de nombreuses manipulations qui peuvent être source d'inversion entre les mutants. De plus, la purification des mutants un par un va également demander un temps très important. Pour l'attribution de plusieurs dizaines de mutants, cette stratégie va donc être complexe et coûteuse à mettre en place.

Lors de ma thèse, j'ai été impliqué dans un projet dont l'objectif était de simplifier et optimiser cette stratégie d'attribution. Ces développements ont fait l'objet d'une publication qui est disponible en annexe 2 (215). Ma contribution à cette publication a été l'enregistrement et l'analyse des spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC des mutants pour l'attribution des groupements méthyles des valines de la protéine TET2.



**FIGURE 2.9: Comparaison de la stratégie classique d'attribution par mutagenèse avec la stratégie améliorée** - Schéma représentant les différentes étapes de l'attribution avec la stratégie SeSAM. La préparation des plasmides des mutants et l'enregistrement des spectres mutants sont des étapes communes aux deux protocoles. a) Stratégie classique d'attribution par mutagenèse (rouge) ; b) Stratégie améliorée d'attribution par mutagenèse (bleu)

## 2.4 Stratégie SeSAM pour l'attribution des groupements méthyles d'assemblage de haut poids moléculaire

---

Le protocole d'attribution par la stratégie améliorée est présenté dans la figure 2.9(b). Un des avantages de ce protocole est l'utilisation d'un milieu de culture "riche" qui permet d'augmenter la densité de cellule et ainsi de diminuer le volume des cultures. Un volume réduit, entre 5 et 10 mL, permet de simplifier la production des mutants en réalisant les cultures en parallèle avec des plaques 24 puits. Les mutants sont ensuite purifiés en parallèle avec des plaques 96 puits remplies avec des résines appropriées pour la purification de la protéine. Ces améliorations permettent la préparation des mutants en quelques jours plutôt que plusieurs semaines et de diminuer le coût en isotope par un facteur deux (215).

La sonde et les tubes RMN utilisés vont également avoir un effet important sur la quantité de protéines nécessaire pour chaque mutant et par conséquent sur le volume des cultures. Pour limiter les quantités d'échantillons, il va être nécessaire d'utiliser une sonde avec un petit diamètre qui permet de concentrer la protéine pour optimiser la quantité de spin présent dans le volume de détection.

Pour l'analyse des mutants de PhCpn, une micro-sonde cryogénique 1.7 mm adaptées au petit volume ( $\approx 35 \mu\text{L}$ ) a été utilisée. Cette sonde permet d'augmenter la sensibilité des expériences 2D ( $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ ) HMQC par un facteur deux et de réduire le volume de culture ( $\approx 10 \text{ mL}$  par mutant) en comparaison d'une sonde 5 mm. Combiné avec un système de passeur d'échantillon l'utilisation de cette sonde a permis d'enregistrer les spectres 2D ( $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ ) HMQC d'une librairie de plusieurs dizaines de mutants en un week-end.

### 2.5 Attribution des groupements méthyles Val-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]-proS et Met-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\epsilon$ de PhCpn

Pour obtenir l'attribution des groupements méthyles Val-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]-proS et Met-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\epsilon$  la librairie complète des mutations ponctuelles Méthionine  $\rightarrow$  Leucine et Valine  $\rightarrow$  Alanine a été produite et purifiée en utilisant une variation de la stratégie décrite dans la partie 2.4.2. Pour tous les mutants, l'acquisition des données a été réalisée à 75°C sur un spectromètre opérant à une fréquence du proton de 850 MHz et équipé d'une micro-sonde cryogénique 1.7 mm. Tampon  $^2\text{H}_2\text{O}$  : MES 25 mM (pH 6.5), KCl 100 mM, NaCl 50 mM et  $\text{MgCl}_2$  25 mM.

Comme cela a été montré précédemment pour l'application de la stratégie de mutagenèse, il va être très important de ne marquer qu'un seul type de groupement méthyle pour limiter la probabilité d'observer des DCS. Le marquage résidu et stéréospécifique des valines est ici particulièrement important car il va permettre de ne marquer qu'un seul groupement méthyle alors que l'utilisation du marquage non stéréospécifique des valines et des leucines aurait augmenté de manière significative les DCS rendant l'analyse des spectres extrêmement complexe.

Les spectres 2D ( $^1\text{H},^{13}\text{C}$ ) HMQC des mutants ont été divisés en trois catégories en fonction des effets plus ou moins importants des mutations sur les signaux des autres résidus.

(1) La mutation d'un résidu n'affecte que modérément les autres signaux permettant une attribution non ambiguë du signal du résidu muté.

(2) La mutation d'un résidu cause le déplacement de plusieurs autres signaux. Ces changements peuvent rendre plus complexe l'attribution du mutant et selon l'importance des modifications l'analyse de la librairie complète de mutants est nécessaire pour réaliser l'attribution.

(3) Dans les cas les plus complexes le signal d'un résidu va être dans une zone avec plusieurs recouvrements ou la mutation du résidu va entraîner des modifications trop importantes du spectre RMN 2D ( $^1\text{H},^{13}\text{C}$ ) HMQC pour conclure sur l'attribution d'un signal. Pour ces résidus, l'attribution va être obtenue en utilisant une expérience RMN NOESY méthyle-méthyle en combinaison avec l'analyse de la position de ces résidus dans le modèle de la

## 2.5 Attribution des groupements méthyles Val-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]-proS et Met-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\epsilon$ de PhCpn

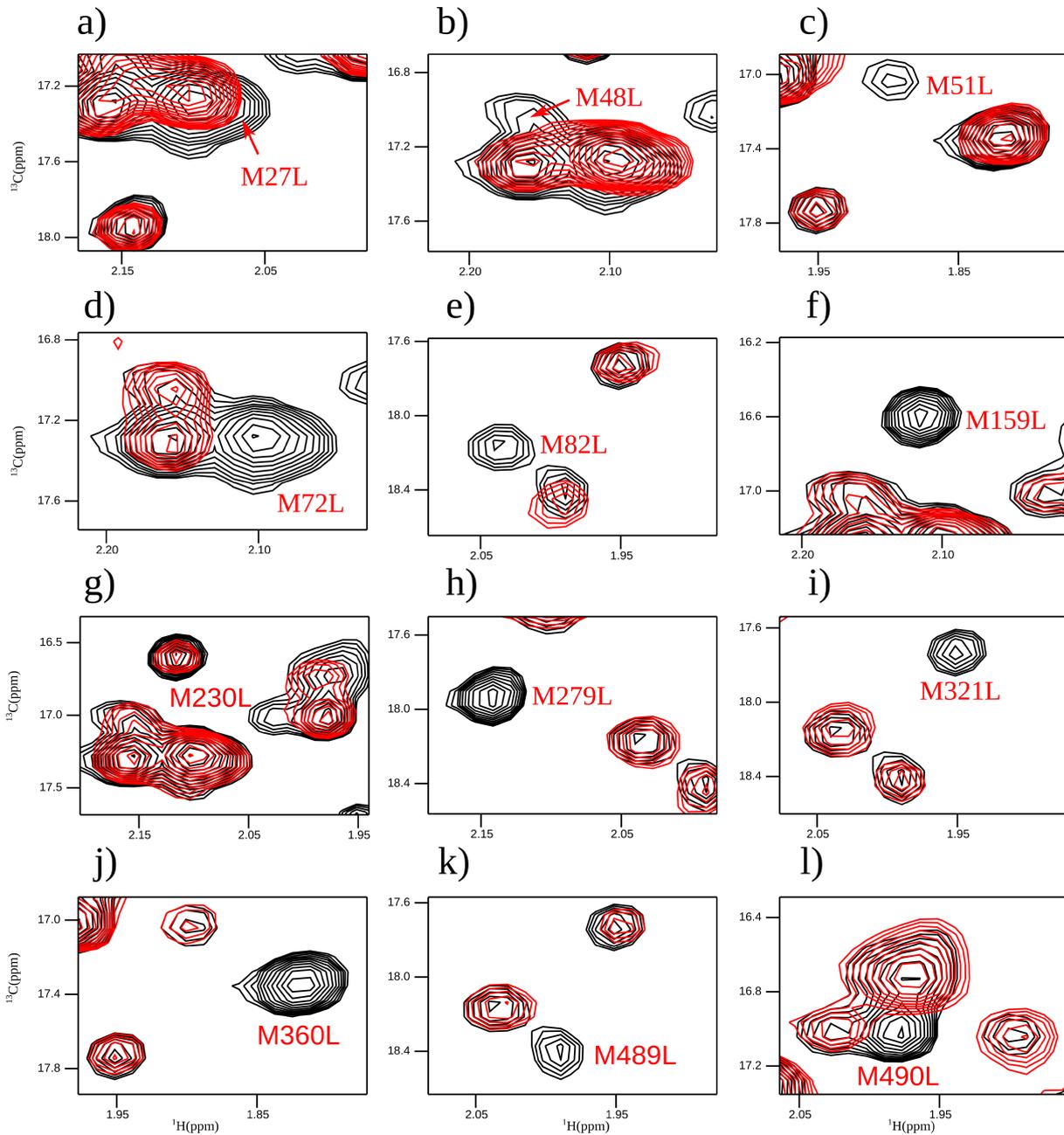
---

conformation ouverte de PhCpn.

### 2.5.0.1 Cas simple permettant l'attribution du signal du mutant

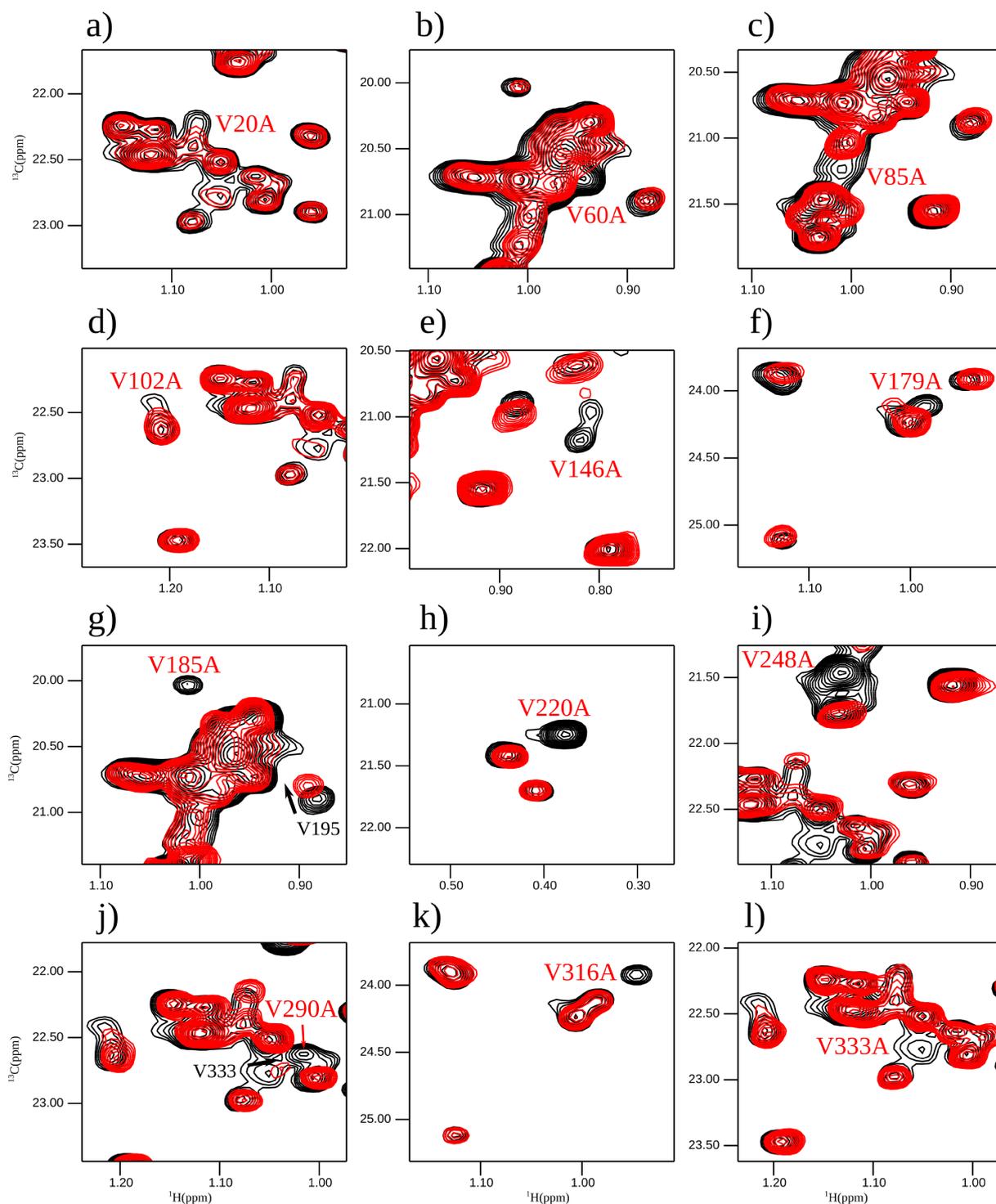
Les figures 2.10, 2.11, 2.12 présentent des zooms sur des spectres de mutants méthionines et valines (rouge) superposés sur la référence de PhCpn (noir). Ces mutants représentent les cas où l'attribution du résidu muté a pu être réalisée sans nécessiter des analyses complémentaires. L'attribution du signal correspondant au mutant est indiquée en rouge et si des signaux sont affectés par la mutation ils sont indiqués en noir avec une flèche noire pour montrer leur déplacement. Cette étape d'analyse a permis l'attribution des signaux de 75% des méthionines et 50% des valines.

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA



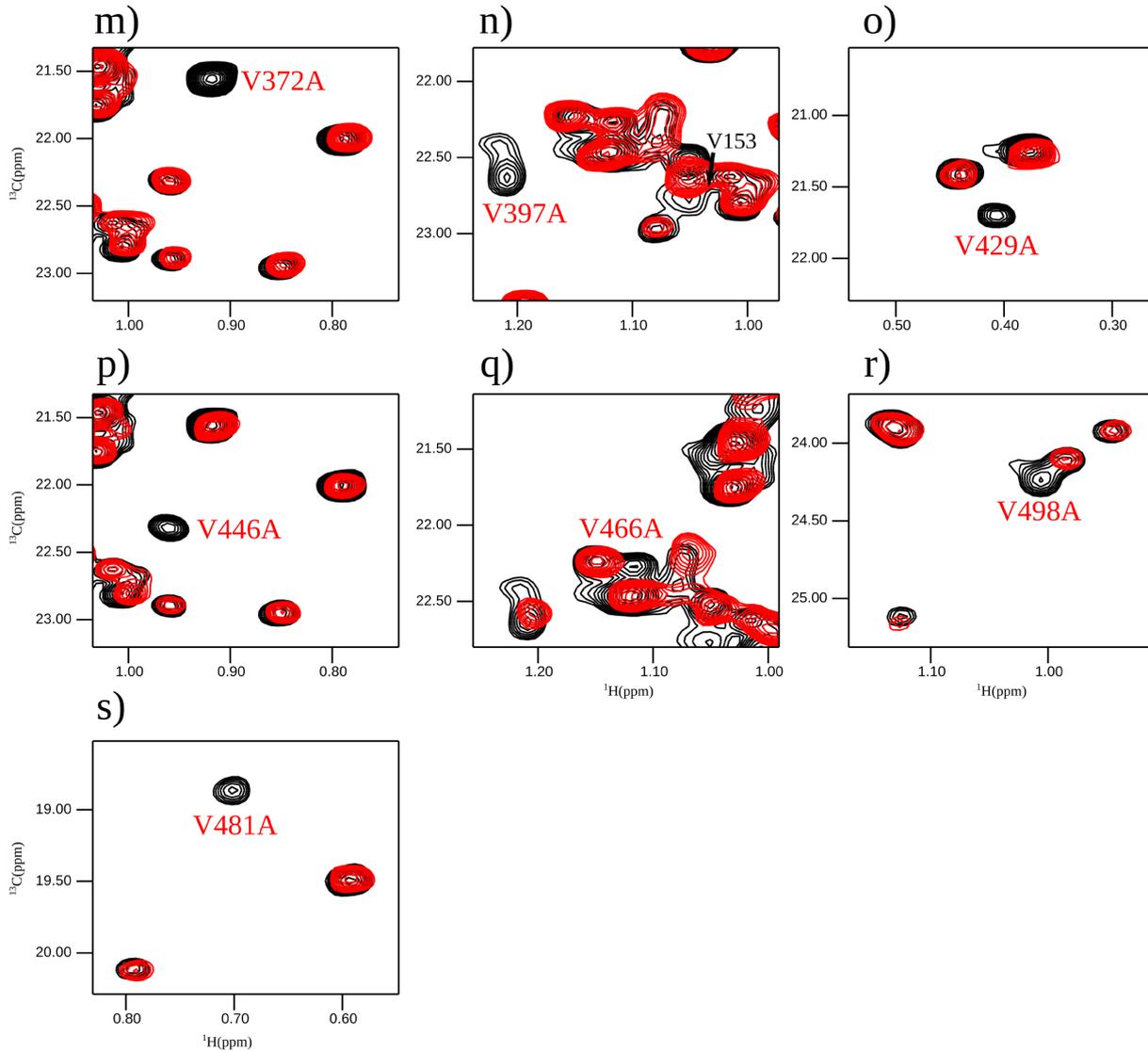
**FIGURE 2.10:** Spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC des mutants méthionines de PhCpn permettant une attribution direct du signal correspondant au mutant - Les spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC dans cette figure ont été enregistrés avec des échantillons de PhCpn U- $^{15}\text{N}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ , Met- $^{13}\text{CH}_3$ - $\epsilon$  (rouge). Chaque spectre de mutant est superposé avec le spectre de référence de la particule native (noir). Le signal correspondant à l'attribution de chaque mutant est indiqué en rouge. Les spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC des mutants de PhCpn ont été enregistrés en un temps d'une à deux heures en fonction de la concentration du mutant.

## 2.5 Attribution des groupements méthyles Val-[ $^{13}\text{C}$ ]-proS et Met-[ $^{13}\text{C}$ ]- $\epsilon$ de PhCpn



**FIGURE 2.11: Spectres 2D ( $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ ) HMQC des mutants valines de PhCpn permettant une attribution direct du signal correspondant au mutant (1/2) - Les spectres 2D ( $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ ) HMQC dans cette figure ont été enregistré avec des échantillons de PhCpn U- $^{15}\text{N}, ^{12}\text{C}, ^2\text{H}$ ], Val-[ $^{13}\text{C}$ ]-proS (rouge). Chaque spectre de mutant est superposé avec le spectre de référence de la particule native (noir). Le signal correspondant à l'attribution de chaque mutant est indiqué en rouge. Les spectres 2D ( $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ ) HMQC des mutants de PhCpn ont été enregistré en un temps de deux à trois heures en fonction de la concentration du mutant.**

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA



**FIGURE 2.12:** Spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC des mutants valines de PhCpn permettant une attribution direct du signal correspondant au mutant (2/2) - Les spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC dans cette figure ont été enregistrés avec des échantillons de PhCpn U- $^{15}\text{N}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ], Val- $^{13}\text{C}$ ]-proS (rouge). Chaque spectre de mutant est superposé avec le spectre de référence de la particule native (noir). Le signal correspondant à l'attribution de chaque mutant est indiqué en rouge. Les spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC des mutants de PhCpn ont été enregistrés en un temps de deux à trois heures en fonction de la concentration du mutant.

### 2.5.0.2 Modifications de plusieurs signaux qui n'empêchent pas de conclure sur l'attribution du mutant

Les spectres 2D ( $^1\text{H},^{13}\text{C}$ ) HMQC des mutants entraînant des modifications spectrales qui nécessitent une analyse plus complexe sont présentés dans la figure 2.13 et vont être analysés ci dessous. Pour cette analyse l'attribution partielle obtenue précédemment et le modèle de la conformation ouverte de PhCpn vont être utilisés dans le processus de confirmation des attributions.

On notera ici que l'analyse de ces mutants nécessite une vue d'ensemble de l'attribution de la librairie de mutants et que l'attribution d'un mutant  $i$  peut nécessiter des informations obtenues grâce au mutant  $i+1$ . Cependant, pour plus de clarté, les mutants vont être analysés dans un ordre séquentielle du résidu N-terminale au résidu C-terminale. .

#### **Attribution de la valine 39 (figure 2.13(a)) :**

La mutation de la valine 39 permet d'observer la disparition d'un signal de faible intensité entre deux signaux intenses. Ce signal pourrait correspondre à la valine 39, mais la présence des signaux intenses empêche de conclure sur l'attribution de cette valine seulement avec le spectre de son mutant.

L'observation du spectre du mutant de la valine 226 (figure 2.13(f)) montre qu'après la mutation d'un des deux résidus correspondant à un de ces signaux intenses, il est possible d'observer un signal à la position attendue pour le signal de la valine 39. Il a été également possible d'observer un pic de corrélation nOe entre la valine 39 et la valine 53 qui permet de confirmer l'attribution de la valine 39.

#### **Attribution de la valine 153 (figure 2.13(b)) :**

La mutation de la valine 153 affectent deux signaux mais un de ces signaux a déjà été attribué à la valine 333. L'autre signal qui n'est plus observable peut donc être attribué à la valine 153.

#### **Attribution de la valine 182 (figure 2.13(c)) :**

La mutation de la valine 182 semble causer la disparition d'un signal et le déplacement de plusieurs signaux. Les signaux qui sont déplacés ont été attribués et correspondent à des résidus situés à proximité de la valine 182. Le valine 182 peut donc être attribuée au signal qui n'est plus observable avec la mutation.

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA

---

### **Attribution de la valine 195 (figure 2.13(d)) :**

La mutation de la valine 195 entraîne la modification de trois signaux. Un de ces signaux n'est plus observable et les deux autres signaux semblent être déplacés par la mutation de la valine 195. Les deux signaux déplacés ont été attribués de manière non ambiguë aux valines 85 et 372. Le signal qui disparaît peut donc être attribué à la valine 195.

### **Attribution de la valine 219 (figure 2.13(e)) :**

Un signal n'est plus observable avec la mutation de la valine 219 et un autre signal semble être déplacé par la mutation de la valine 219. Le signal déplacé a été attribué à la valine 363 qui est située à proximité de la valine 219. Il est donc possible d'attribuer le signal qui disparaît à la valine 219.

### **Attribution de la valine 226 (figure 2.13(f)) :**

Avec la mutation de la valine 226, un signal n'est plus observable et deux autres signaux semblent être déplacés. Les deux signaux déplacés correspondent aux valines 20 et 333 qui ont été attribuées précédemment et sont situées à proximité de la valine 226. L'attribution de la valine 226 peut donc être confirmée pour le signal qui n'est plus observable avec la mutation.

### **Attribution des valines 286 et 355 (figure 2.13(g,h)) :**

L'analyse des mutants des valines 286 et 355 doit être réalisée en parallèle pour comprendre l'attribution des signaux de ces deux résidus.

Les signaux de ces deux valines sont superposés mais la mutation de chacun de ces résidus permet de distinguer la disparition d'un signal et de réaliser l'attribution de ces résidus. Ces attributions ont également pu être confirmées par l'observation de deux groupes de pics de corrélation nOe séparés pour ces résidus dans l'expérience NOESY.

### **Attribution de la valine 500 (figure 2.13(i)) :**

Plusieurs signaux sont affectés par la mutation de la valine 500. Cependant, ces signaux correspondent à des résidus proches de la valine 500 dans la structure et qui ont déjà été attribués. Par conséquent, on peut attribuer le signal restant à la valine 500.

### **Attribution des méthionines 81 et 514 (figure 2.13(j,l)) :**

Ces deux méthionines sont situées à proximité l'une de l'autre et correspondent à deux signaux superposés dans le spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC, ce qui va rendre complexe leur

## 2.5 Attribution des groupements méthyles Val-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]-proS et Met-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\epsilon$ de PhCpn

---

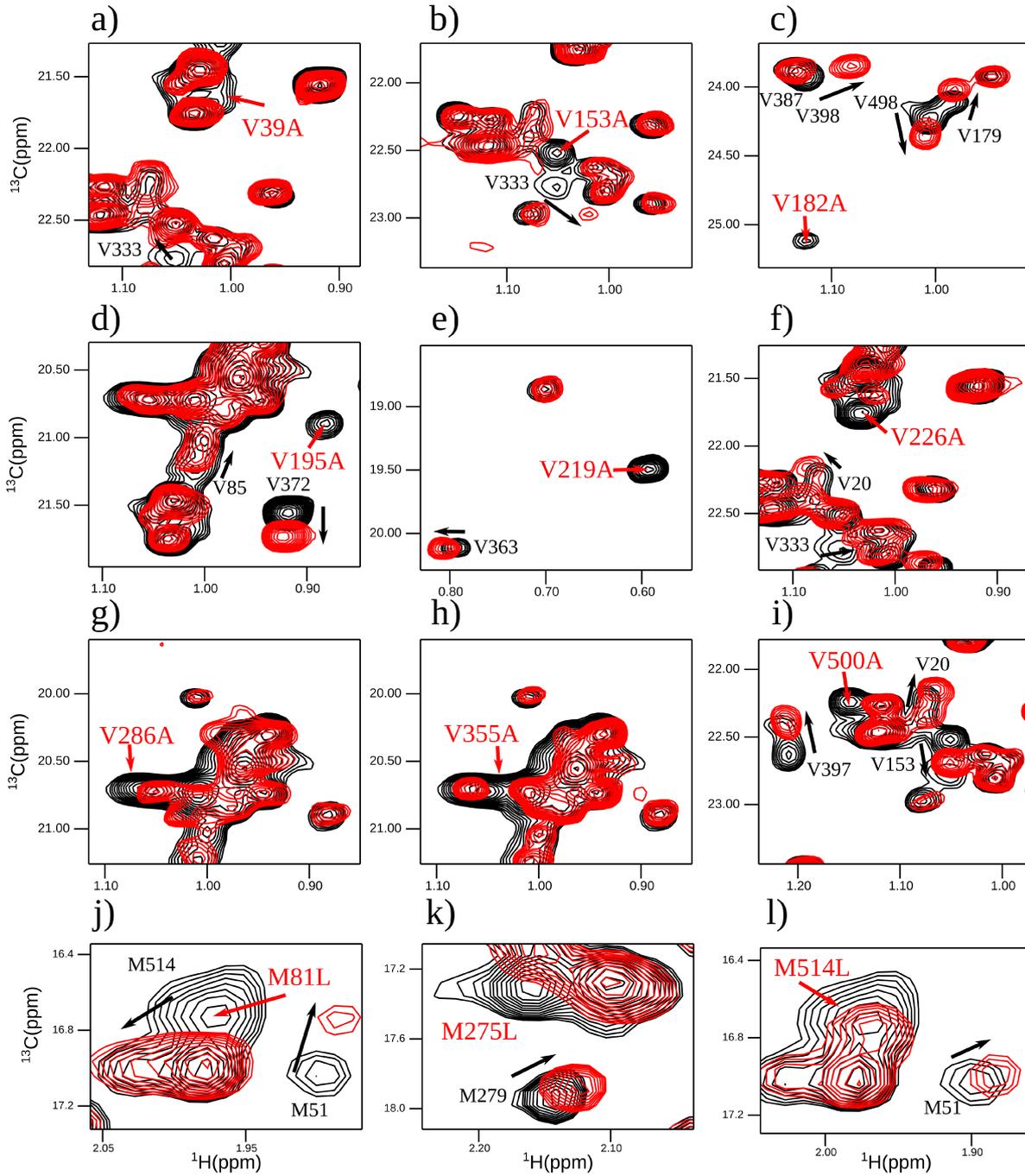
attribution. La mutation de chacune de ces méthionines déplace le signal de la méthionine 51 qui est située à proximité de ces méthionines et ce signal peut donc être écarté pour se concentrer sur les signaux correspondant aux deux autres méthionines.

Avec la mutation de la méthionine 81 un signal n'est plus observable. Cependant la mutation de la méthionine 514 semble indiquer que ce signal correspond à deux signaux superposés. En prenant en compte ce fait, il est possible d'observer que la mutation de la méthionine 81 déplace le signal de la méthionine 514. La combinaison de ces différents éléments permet de proposer une attribution pour ces deux méthionines.

### **Attribution de la méthionine 275 (figure 2.13(k)) :**

La mutation de la valine 275 entraîne la modification de deux signaux. Un de ces signaux correspond à la méthionine 279 qui est déplacée par la mutation de la méthionine 275. L'autre signal peut donc être attribué à la méthionine 275.

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA



**FIGURE 2.13: Spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC des mutants valines et méthionines de PhCpn avec des déplacements chimiques secondaires causés par la mutation** - Les spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC dans cette figure ont été enregistrés dans les mêmes conditions que les spectres des figures 2.10, 2.11, 2.12. L'attribution de chaque mutant est indiqué en rouge et les déplacements chimiques secondaires sont indiqués par des flèches noires avec l'attribution du signal déplacé en noir

### 2.5.0.3 Attribution des cas les plus complexes à l'aide de l'expérience 3D HMQC-NOESY méthyle-méthyle

Dans cette partie, nous allons traiter les mutants pour lesquels aucune attribution n'a été possible par la simple analyse des spectres 2D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) HMQC. A cette étape 70% de valines ont été attribuées et toutes les méthionines ont été attribuées. Il est possible d'utiliser les résidus non-attribués restant comme départ pour l'attribution.

Pour attribuer ces résidus nous allons combiner l'analyse des données de mutagenèse avec une expérience 3D HMQC-NOESY. Cette expérience a été enregistrée à 75°C en 90 heures avec un échantillon de PhCpn U-[<sup>15</sup>N, <sup>12</sup>C, <sup>2</sup>H], Met-[<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>]-ε, Val-[<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>]-proS à une concentration de 0.75 mM sur un spectromètre Bruker opérant à une fréquence du proton de 950 MHz et équipé d'une sonde cryogénique avec (128, 1370) points dans les dimensions (13C, 1H). Un temps de mélange nOe de 600 ms (qui correspond au temps de mélange nOe optimal déterminé à partir de l'intensité des pics de corrélation nOe pour une série de spectre 2D NOESY. Huit scans ont été enregistrés pour chaque FID avec un délai de recyclage de 1.8 sec.

À partir du volume de PhCpn, il est possible de prédire un  $\tau_c$  d'environ 300 ns à une température de 75°C. En théorie, on devrait pouvoir observer des pics de corrélation nOe jusqu'à une distance d'environ 7 à 8 Å qui devrait être suffisante pour attribuer/confirmer la majorité des résidus (188).

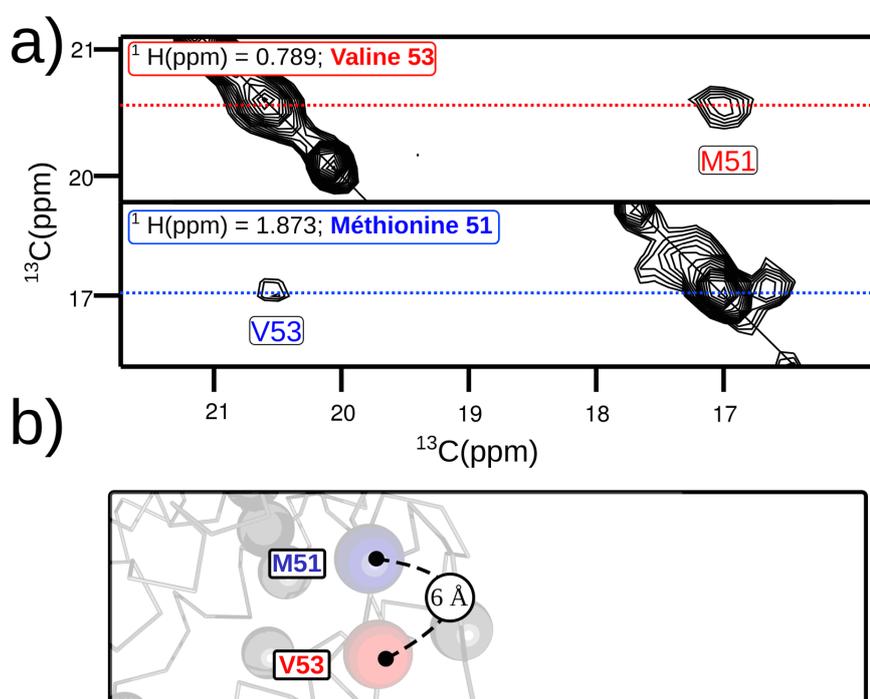
Comme dans la partie précédente, les résidus vont être traités de manière séquentielle mais chaque résidu est analysé en prenant en compte la totalité des informations obtenues grâce à la banque complète de mutants, des DCS et des nOes. Les figures 2.14 à 2.23 présentent des extraits 2D de l'expérience 3D HMQC-NOESY et la position des résidus correspondant dans le modèle de la conformation ouverte de PhCpn.

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA

### Attribution de la valine 53 (figure 2.14) :

Il n'y a qu'un résidu suffisamment proche de la valine 53 qui pourrait permettre d'observer un pic de corrélation nOe. Ce résidu est la méthionine 51 qui est située à 6 Å de la valine 53.

Le plan 2D de l'expérience NOESY correspondant au signal de la méthionine 51 permet d'observer un seul pic de corrélation nOe. Il correspond au déplacement chimique d'une valine et aucun autre résidu que la valine 53 n'est situé à proximité de la méthionine 51. Le signal correspondant peut donc être attribué à la valine 53.

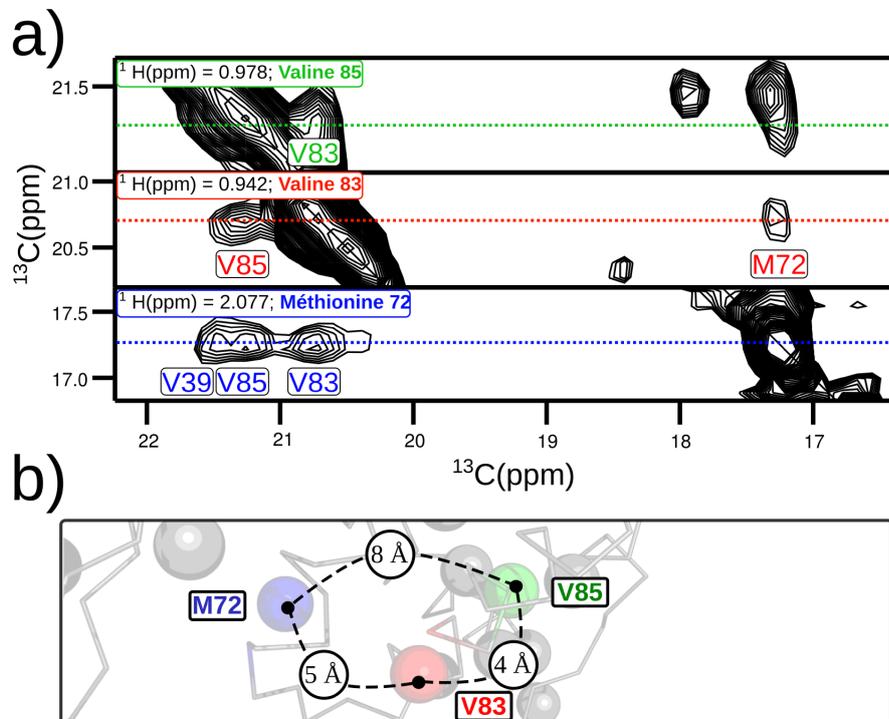


**FIGURE 2.14: Attribution de la valine 53** - a) Plans de l'expérience NOESY extrait à la fréquence du  $^1\text{H}$  correspondant à la valine 53 (rouge) et à la méthionine 51 (bleu) ; b) Zoom sur le modèle de la conformation ouverte de PhCpn avec le même code couleur qu'en (a)

**Attribution de la valine 83 (figure 2.15) :**

La valine 83 est entourée de deux résidus suffisamment proche pour permettre l'observation d'un pic de corrélation nOe : la méthionine 72 (5 Å) et la valine 85 (4 Å).

Les plan 2D de l'expérience NOESY correspondant aux signaux de la valine 85 et de la méthionine 72 permettent d'observer un pic de corrélation nOe au même déplacement chimique pour les deux résidus. Ce pic de corrélation correspond à un signal qui n'a pas été attribué. Le seul résidu qui est à une distance suffisamment proche de la valine 85 et de la méthionine 72 est la valine 83.



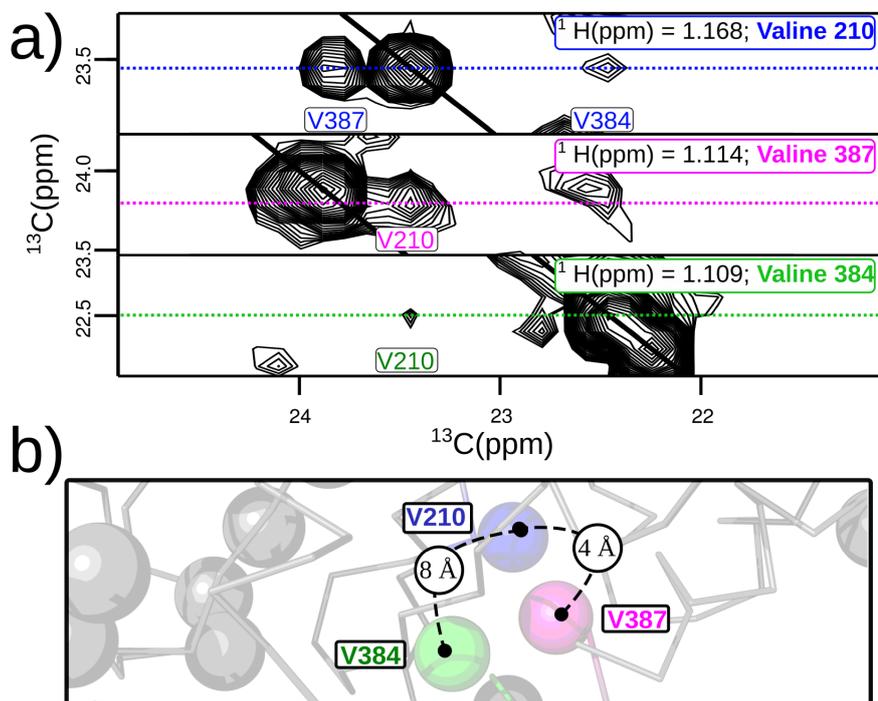
**FIGURE 2.15: Attribution de la valine 83** - a) Plans de l'expérience NOESY extrait à la fréquence du  $^1\text{H}$  correspondant à la valine 85 (vert), la valine 83 (rouge) et la méthionine 72 (bleu) ; b) Zoom sur le modèle de la conformation ouverte de PhCpn avec le même code couleur qu'en (a)

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA

### Attribution de la valine 210 (figure 2.16) :

La valine 210 est située à proximité de deux résidus : les valines 384 et 387.

Les plan 2D de l'expérience NOESY correspondant aux signaux des valines 384 et 387 permettent d'observer un pic de corrélation nOe au même déplacement chimique présent dans les deux plans. L'analyse de la structure montre que le résidu correspondant à ce signal ne peut être que la valine 210 qui est positionnée entre les deux résidus.

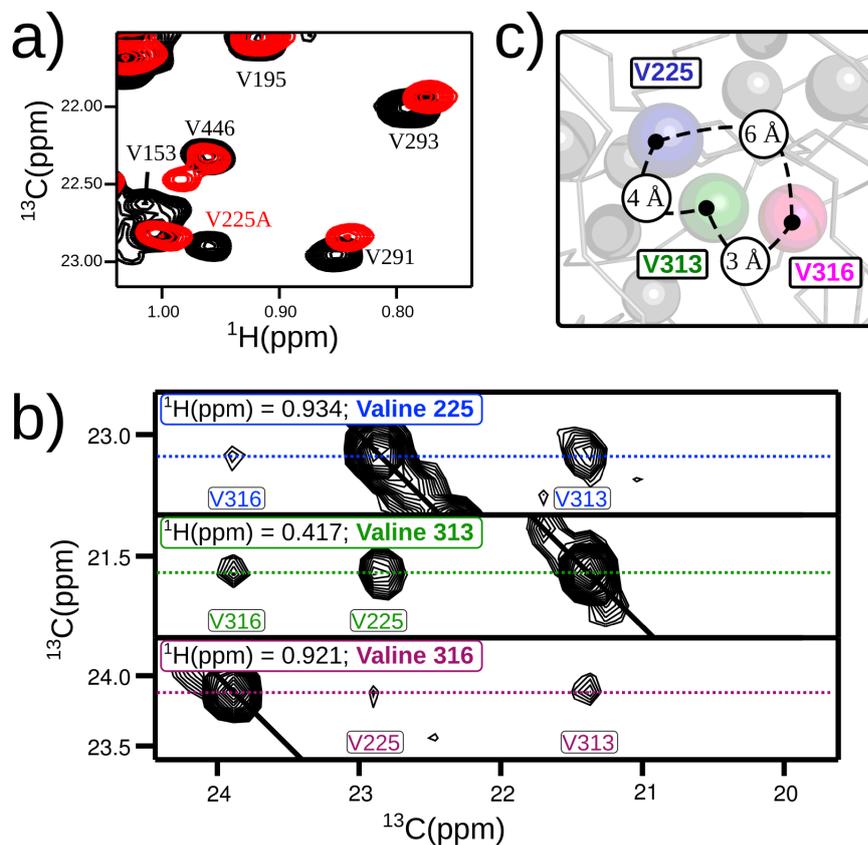


**FIGURE 2.16: Attribution de la valine 210** - (a) Plans de l'expérience NOESY extrait à la fréquence du  $^1\text{H}$  correspondant à la valine 210 (bleu), la valine 387 (rose) et la valine 384 (vert) ; b) Zoom sur le modèle de la conformation ouverte de PhCpn avec le même code couleur qu'en (a)

**Attribution de la valine 225 (figure 2.17) :**

De nombreux signaux sont affectés par la mutation de la valine 225. L'attribution de ces signaux semble montrer que les signaux observés sont des DCS causés par la mutation de la valine 225. Il est donc possible d'émettre l'hypothèse que le signal restant peut être attribué à la valine 225.

Cette valine est située à une distance suffisamment proche de deux résidus pour observer des pics de corrélation nOe : les valines 313 et 316. Le plan 2D de l'expérience NOESY correspondant au signal de la valine 225 permet d'observer des pics de corrélation nOe avec les valines 313 et 316. Il est donc possible de confirmer l'attribution de la valine 225.



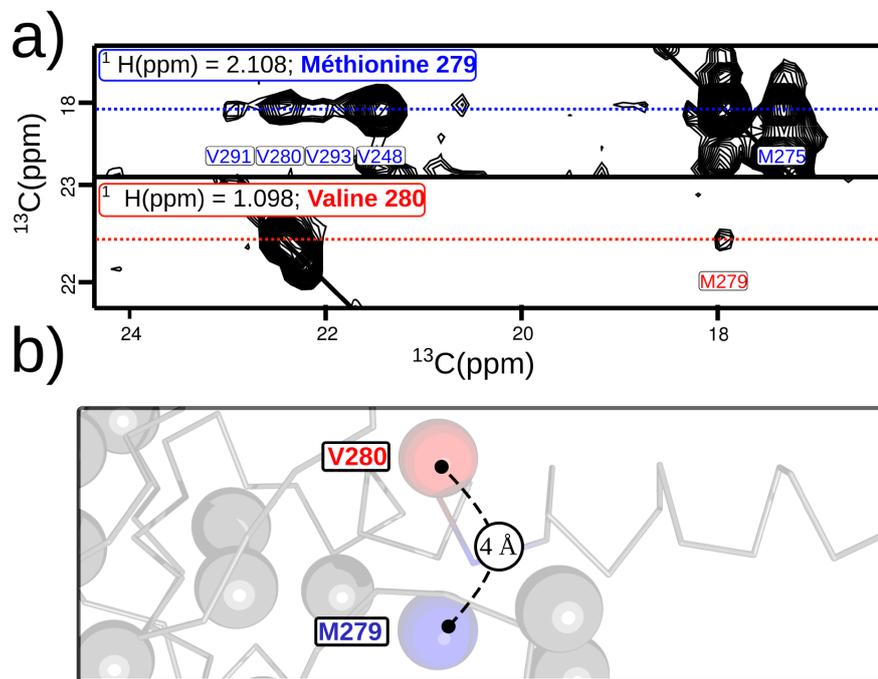
**FIGURE 2.17: Attribution de la valine 225** - a) Superposition des spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC du mutant V225A (rouge) et de l'état natif de PhCpn (noir) ; b) Plans de l'expérience NOESY extrait à la fréquence du  $^1\text{H}$  correspondant à la valine 225 (bleu), la valine 313 (rose) et la valine 316 (vert) ; c) Zoom sur le modèle de la conformation ouverte de PhCpn avec le même code couleur qu'en (a)

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA

### Attribution de la valine 280 (figure 2.18) :

Cette valine est isolée dans la structure avec seulement un résidu suffisamment proche pour observer un pic de corrélation nOe : la méthionine 279.

Le plan 2D de l'expérience NOESY correspondant au signal de la méthionine 279 permet d'observer quatre pics de corrélation nOe. Trois correspondent à des résidus déjà attribués et l'observation de la structure montre qu'il n'y a qu'un autre résidu qui peut avoir un pic de corrélation nOe avec la méthionine 279 : la valine 280.



**FIGURE 2.18: Attribution de la valine 280** - (a) Plans de l'expérience NOESY extrait à la fréquence du  $^1\text{H}$  correspondant à la méthionine 279 (bleu) et la valine 280 (rouge) ; b) Zoom sur le modèle de la conformation ouverte de PhCpn avec le même code couleur qu'en (a)

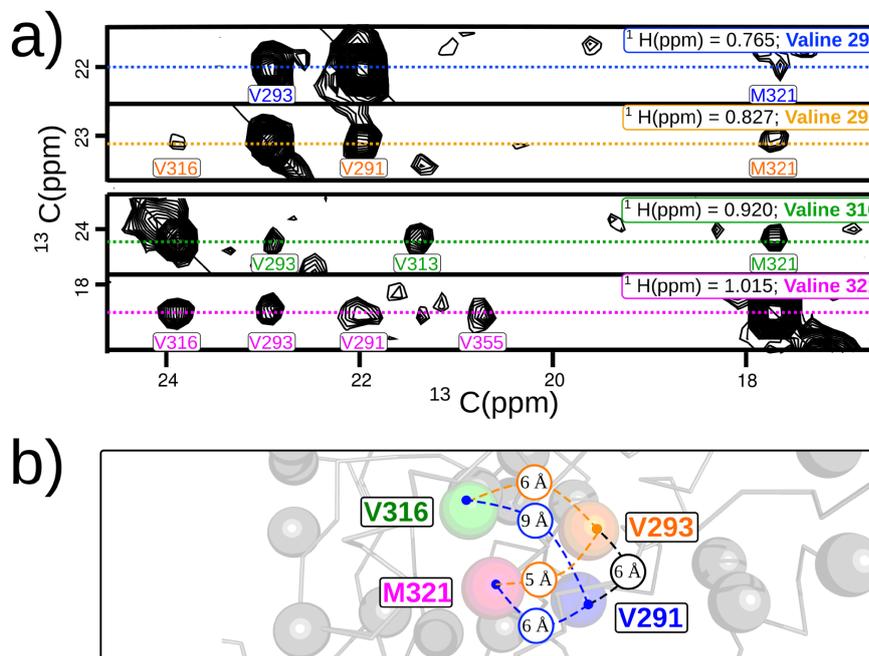
## 2.5 Attribution des groupements méthyles Val-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]-proS et Met-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\epsilon$ de PhCpn

### Attribution des valines 291 et 293 (figure 2.19) :

Les valines 291 et 293 sont situées à proximité l'une de l'autre mais également à proximité de deux autre résidus : la valine 316 et la méthionine 321.

Le plan 2D de l'expérience NOESY correspondant à la méthionine 321 permet d'observer deux pics de corrélation nOe qui correspondent à des signaux non attribués. Le plan 2D de l'expérience NOESY correspondant à ces deux signaux montrent des pics de corrélation nOe entre les deux signaux. Cela semble confirmer que ces signaux correspondent aux valines 291 et 293 mais sans permettre de distinguer quel signal correspond à quelle valine.

Le plan 2D de l'expérience NOESY correspondant à la valine 316 ne permet d'observer qu'un pic de corrélation nOe qui n'a pas été attribué et ce signal correspond à un des deux signaux observés précédemment. L'analyse du modèle de la conformation ouverte de PhCpn montre que la valine 316 est trop éloignée de la valine 291 pour avoir un pic de corrélation nOe. Par conséquent, ce signal ne peut correspondre qu'à la valine 293 qui est située à proximité de la valine 316.



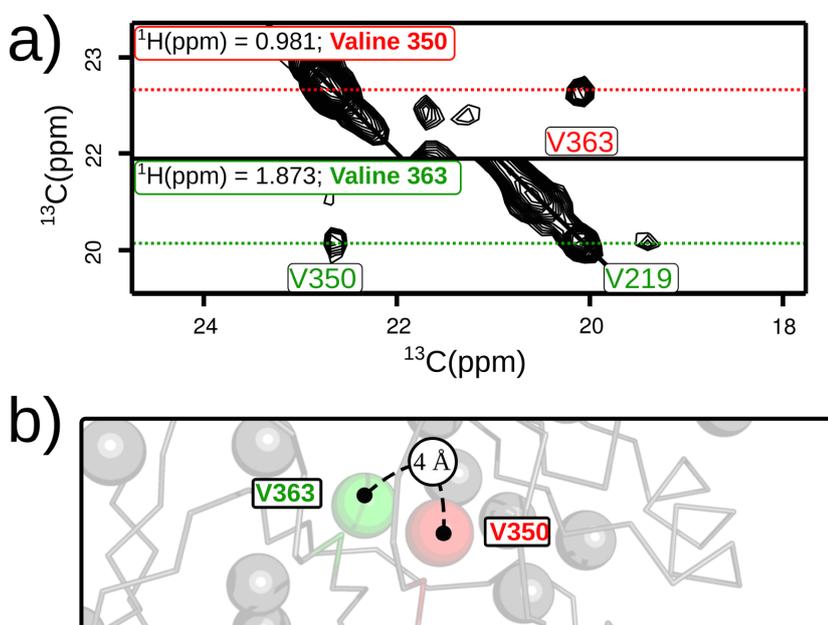
**FIGURE 2.19:** Attribution des valines 291 et 293 - a) Plans de l'expérience NOESY extrait à la fréquence du  $^1\text{H}$  correspondant à la valine 291 (bleu), la valine 293 (orange), la valine 316 (vert) et la méthionine 321 (rose); b) Zoom sur le modèle de la conformation ouverte de PhCpn avec le même code couleur qu'en (a)

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA

### Attribution de la valine 350 (figure 2.20) :

Cette valine est isolée dans la structure et n'est suffisamment proche que d'un résidu pour permettre l'observation d'un pic de corrélation nOe : la valine 363.

Le plan 2D de l'expérience NOESY correspondant au signal de la valine 363 permet d'observer deux pics de corrélation nOe. Un de ces pics correspond à la valine 219 et l'analyse de la structure montre que l'autre pic ne peut correspondre qu'au signal de la valine 350.



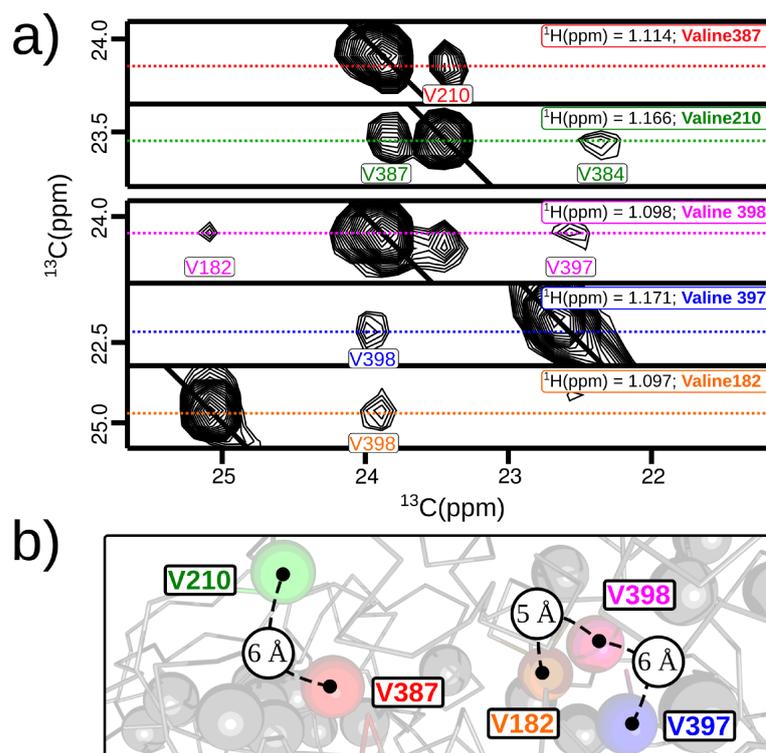
**FIGURE 2.20: Attribution de la valine 350** - a) Plans de l'expérience NOESY extrait à la fréquence du  $^1\text{H}$  correspondant à la valine 350 (rouge) et la valine 363 (vert); b) Zoom sur le modèle de la conformation ouverte de PhCpn avec le même code couleur qu'en (a)

**Attribution des valines 387 et 398 (figure 2.21) :**

Les mutations des valines 387 et 398 ont permis d'émettre une hypothèse sur l'attribution de ces valines avec deux signaux superposés. Ces deux résidus sont suffisamment séparés pour penser qu'il va être possible d'observer deux réseaux de pics de corrélation nOe pour confirmer leur attribution.

Les signaux attribués à ces valines sont suffisamment séparés dans la dimension  $^1\text{H}$  pour observer un plan 2D de l'expérience NOESY correspondant à chaque valine. Pour la valine 387 le plan 2D de l'expérience NOESY permet d'observer un pic de corrélation nOe avec la valine 210. Pour la valine 397 le plan 2D de l'expérience NOESY permet d'observer deux pics de corrélation nOe avec les valines 182 et 398.

L'observation de ces deux réseaux de pics de corrélation nOe permet de confirmer l'attribution de ces 2 résidus.



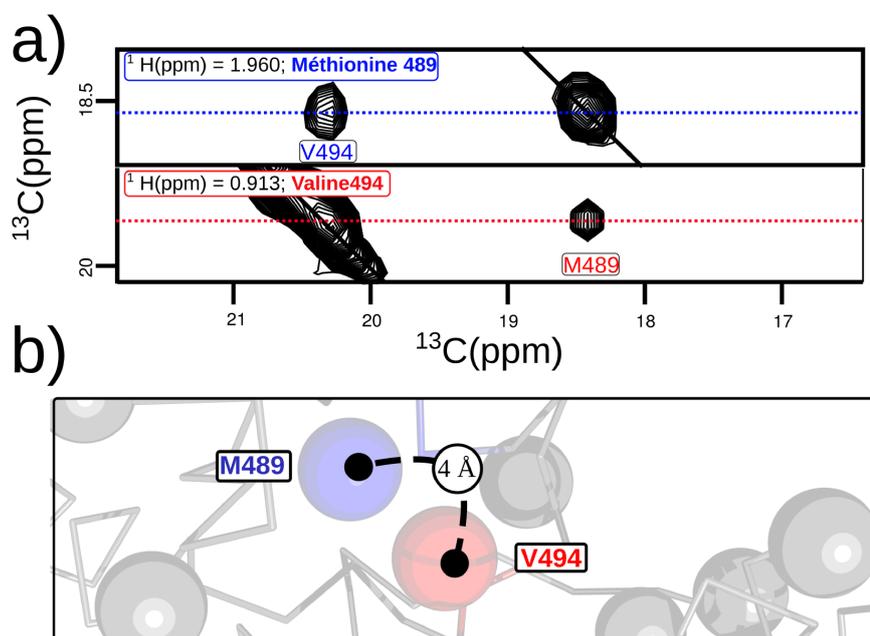
**FIGURE 2.21: Attribution des valines 387 et 398** - a) Plans de l'expérience NOESY extrait à la fréquence du  $^1\text{H}$  correspondant à la valine 387 (rouge), la valine 210 (vert), la valine 397 (bleu), la valine 398 (rose) et la valine 182 (orange) ; b) Zoom sur le modèle de la conformation ouverte de PhCpn avec le même code couleur qu'en (a)

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA

### Attribution de la valine 494 (figure 2.22) :

Cette valine est isolée dans la structure et n'est suffisamment proche que d'un résidu dont on connaît l'attribution : la méthionine 489.

Le plan 2D de l'expérience NOESY correspondant au signal de la méthionine 489 permet d'observer qu'il n'y a qu'un pic de corrélation nOe qui correspond à un signal qui n'est pas attribué. L'observation de la structure montre que ce signal ne peut correspondre qu'à la valine 494.

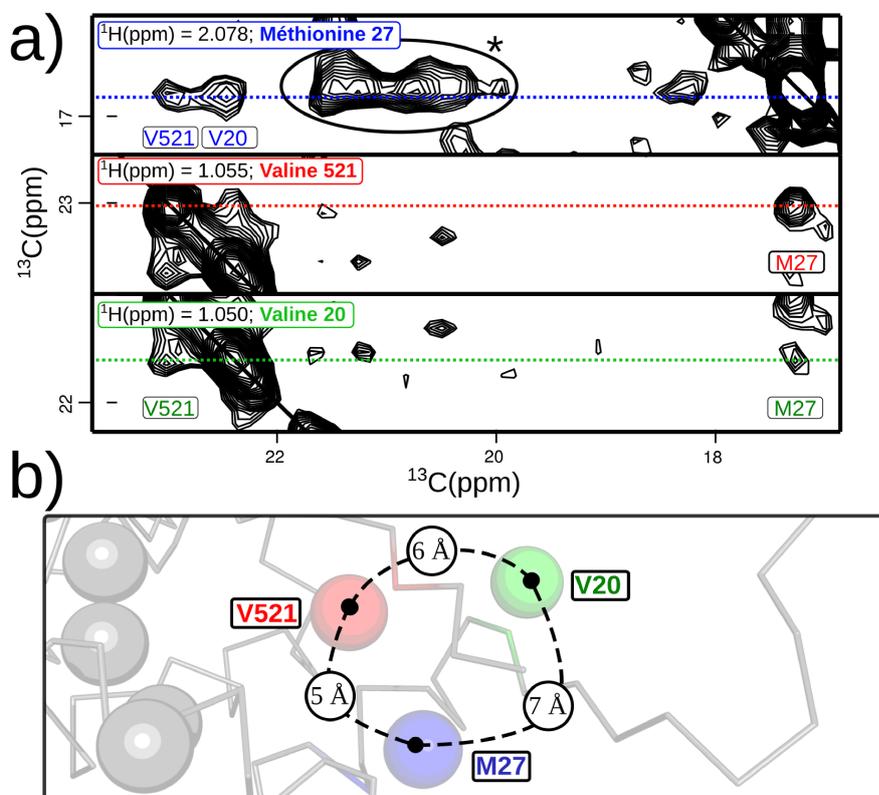


**FIGURE 2.22: Attribution de la valine 494** - (a) Plans de l'expérience NOESY extrait à la fréquence du  $^1\text{H}$  correspondant à la méthionine 489 (bleu) et la valine 494 (rouge).; b) Zoom sur le modèle de la conformation ouverte de PhCpn avec le même code couleur qu'en (a)

**Attribution de la valine 521 (figure 2.23) :**

La production du mutant de la valine 521 n'a pas permis d'obtenir PhCpn dans un état d'oligomérisation natif. Cependant, comme la valine 521 est située à proximité de 2 résidus isolés qui ont été attribués, il va tout de même être possible d'obtenir son attribution.

Les plans 2D de l'expérience NOESY correspondant aux signaux de ces deux résidus permet d'observer deux pics de corrélation nOe pour chacun des résidus. Les deux résidus partagent un pic de corrélation nOe qui correspond à un signal qui n'a pas été attribué. L'analyse de la structure montre que ce signal ne peut correspondre qu'à la valine 521.



**FIGURE 2.23: Attribution de la valine 521** - (a) Plans de l'expérience NOESY extrait à la fréquence du  $^1\text{H}$  correspondant à la méthionine 27 (bleu), la valine 521 (rouge) et la valine 20 (vert). Les pics de corrélation nOe entourés en noir et signalés par une étoile correspondent à des pics de corrélation nOe très intense de la méthionine 72 qui à un déplacement chimique proche de celui de la méthionine 27; b) Zoom sur le modèle de la conformation ouverte de PhCpn avec le même code couleur qu'en (a)

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA

---

### 2.5.0.4 Combinaison de l'utilisation des DCS et des nOe pour la confirmation des attributions

La confirmation des attributions obtenues par la stratégie de mutagenèse a été réalisée en utilisant d'une part l'observation de DCS pour le signal de chaque résidu et d'autre part l'observation de nOe entre les signaux des résidus.

#### **Confirmation de l'attribution avec les DCS :**

Pour confirmer les attributions obtenues par mutagenèse, nous avons suivi les modifications du signal de chaque résidu sur le spectre de tous les mutants. Il a été ainsi possible de calculer le nombre de mutants qui entraîne un DCS pour chaque résidu. Les valeurs qui ont été calculées sont données dans le tableau 2.3. Une étoile indique que le signal d'un résidu est dans une zone avec plusieurs superpositions et qu'il n'est pas possible, de manière non ambiguë, de caractériser les DCS pour ce signal. Pour chaque DCS, il a été vérifié que le résidu dont le signal est affecté se situe à une distance inférieure à 20 Å du mutant dans le modèle de la conformation ouverte de PhCpn.

Le nombre de DCS pour le signal de chaque résidu est en moyenne de 4 DCS pour les valines et 2 DCS pour les méthionines. La différence entre les deux marquages est cohérente avec le nombre de résidu correspondant à ces deux résidus. En effet, les résidus valines étant plus nombreux cela va favoriser l'observation d'un plus grand nombre de DCS pour chaque résidu. L'observation d'un nombre relativement important de DCS pour les deux marquages permet de confirmer l'attribution réalisée par mutagenèse.

#### **Confirmation de l'attribution avec l'expérience 3D HMQC-NOESY :**

Comme cela a été décrit précédemment, il va être intéressant de pouvoir confirmer l'attribution avec des données indépendantes provenant d'une expérience 3D HMQC-NOESY. L'utilisation d'un marquage combinatoire a été ici très importante pour augmenter le nombre de résidu suffisamment proche les uns des autres pour pouvoir observer un pic de corrélation nOe. Cela est d'autant plus vrai pour la confirmation de l'attribution du groupement méthyle Met-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\epsilon$  qui sans le marquage combinatoire avec le groupement méthyle Val-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]-proS ne permettraient d'observer que très peu de pic de corrélation nOe.

L'expérience 3D HMQC-NOESY a été analysée en comparant les pics de corrélation nOe avec la position des résidus dans le modèle de la conformation ouverte de PhCpn.

## 2.5 Attribution des groupements méthyles Val-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]-proS et Met-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\epsilon$ de PhCpn

Le tableau 2.3 montre qu'il est possible d'observer en moyenne 1,5 nOe par résidu pour les valines et les méthionines. Pour environ 17% des résidus aucun nOe n'a pu être observé, l'analyse de la position de ces résidus dans le modèle de la conformation ouverte de PhCpn montre qu'ils correspondent majoritairement à des résidus isolés. Pour les autres résidus, en prenant une limite maximum de 7 Å, il était attendu d'observer environ 106 pics de corrélation nOe et nous avons pu en observer 87. L'observation de 82% des pics de corrélation nOe prédit avec la structure permet d'apporter une seconde confirmation des attributions.

Met	DCS	nOe	Val	DCS	nOe	Val	DCS	nOe
27	2	2	20	4	2	291	3	2
48	1	0	39	*	1	293	5	3
51	3	1	53	3	1	313	6	2
72	2	3	60	*	0	316	6	4
81	2	2	83	*	2	333	5	3
82	2	1	85	3	2	350	2	1
159	1	0	146	3	1	355	*	2
230	2	0	153	2	2	363	6	2
275	1	3	179	6	1	372	2	2
279	1	5	182	7	1	384	*	1
321	1	4	185	5	2	387	3	1
360	1	2	195	4	1	397	2	1
489	2	1	210	3	2	398	6	2
490	1	3	219	6	2	429	*	0
514	2	0	220	6	3	446	5	0
			225	6	2	466	0	0
			226	2	0	481	3	0
			248	0	2	494	1	1
			280	*	1	498	6	1
			286	*	0	500	0	1
			290	6	1	521	3	2

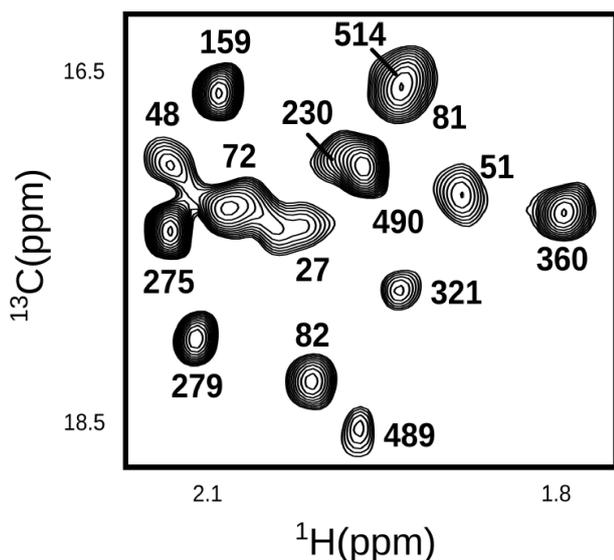
**TABLE 2.3:** Tableau résumant les DCS et les nOes observés pour les signaux des résidus valines et méthionines de PhCpn

### 2.5.1 Conclusion de l'attribution des groupements méthyles Val-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]-proS et Met-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\epsilon$ de PhCpn

#### 2.5.1.1 Attribution des groupements méthyles [ $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\epsilon$ des résidus méthionines de PhCpn

La stratégie d'attribution par mutagenèse a permis l'attribution de 100% des groupements méthyles [ $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\epsilon$  des méthionines de PhCpn. L'attribution du spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC est présentée sur la figure 2.24 et le déplacement chimique des signaux est reporté dans le tableau 2.4.

L'analyse de PhCpn par spectrométrie de masse a montré que la méthionine N-terminale (1) est coupée lors de la synthèse de la protéine et par conséquent aucun signal n'est observé pour cette méthionine.



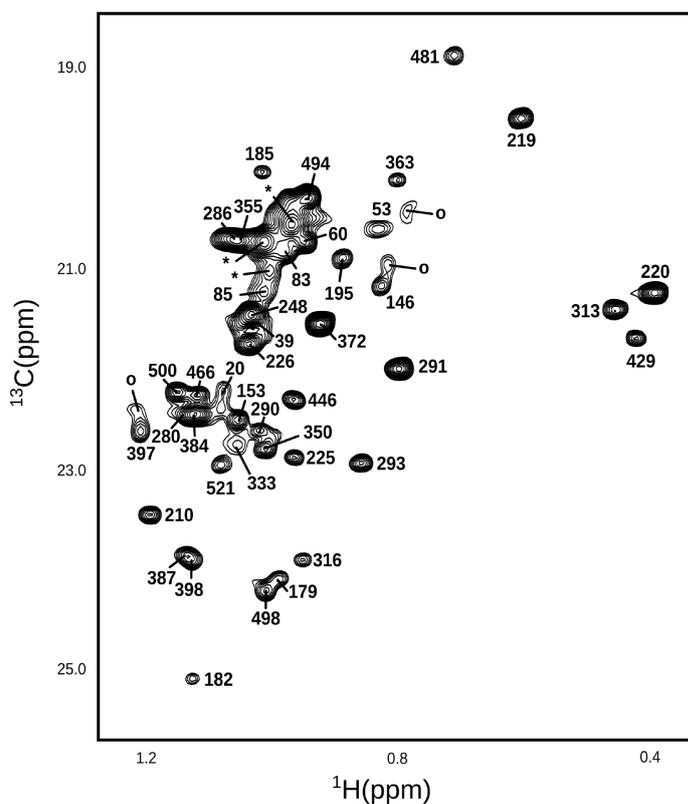
**FIGURE 2.24:** Attribution du groupement méthyle Met-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\epsilon$  de PhCpn. - Spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC de l'attribution du groupement méthyle des méthionines de PhCpn. L'acquisition des données a été réalisée à 75°C (Tampon  $^2\text{H}_2\text{O}$  : MES 25 mM (pH 6.5), KCl 100 mM, NaCl 50 mM et  $\text{MgCl}_2$  25 mM;) sur un spectromètre opérant à une fréquence du proton de 850 MHz et équipé d'une sonde cryogénique.

## 2.5 Attribution des groupements méthyles Val-[ $^{13}\text{C}_3$ ]-proS et Met-[ $^{13}\text{C}_3$ ]- $\epsilon$ de PhCpn

### 2.5.1.2 Attribution des groupements méthyles Val-[ $^{13}\text{C}_3$ ]-proS de PhCpn.

La stratégie d'attribution par mutagenèse a permis l'attribution de 92% des groupements méthyles Val-[ $^{13}\text{C}_3$ ]-proS de PhCpn. L'attribution du spectre 2D ( $^1\text{H},^{13}\text{C}$ ) HMQC est présentée sur la figure 2.25.

Les signaux indiqués par une étoile correspondent à des signaux qui n'ont pas pu être attribués en utilisant les mutants et qui ne permettent pas d'observer de pic de corrélation nOe dans l'expérience 3D NOESY méthyle-méthyle. Les signaux indiqués par un "o" correspondent à des signaux de faible intensité qui n'ont pas pu être attribués et pourrait correspondre à une forme minoritaire de certains résidus.



**FIGURE 2.25: Attribution des groupements méthyles Val-[ $^{13}\text{C}_3$ ]-proS de PhCpn.** - Spectres 2D ( $^1\text{H},^{13}\text{C}$ ) HMQC de l'attribution du groupement méthyle proS des valines de PhCpn. Les étoiles indiquent des signaux qui n'ont pas pu être attribués et les "o" des signaux avec une intensité trop faible. L'acquisition des données a été réalisée à 75°C (Tampon  $^2\text{H}_2\text{O}$  : MES 25 mM (pH 6.5), KCl 100 mM, NaCl 50 mM et  $\text{MgCl}_2$  25 mM) sur un spectromètre opérant à une fréquence du proton de 850 MHz et équipé d'une sonde cryogénique

Le déplacement chimique des signaux est reporté dans le tableau 2.4, et les quatre valines qui n'ont pas pu être attribuées sont indiquées par des "X". La mutation de ces valines n'a pas permis d'obtenir une attribution et ces résidus sont isolés dans la structure ce qui empêche l'utilisation de l'expérience NOESY méthyle-méthyle pour obtenir leur attribution.

## 2. DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE D'UNE MACHINERIE DE 1 MDA

Met	H( $\epsilon$ )	C( $\epsilon$ )	Val	H(proS)	C( proS)	Val	H(proS)	C(proS)
27	2.044	17.311	20	1.056	22.389	291	0.765	21.979
48	2.135	16.841	39	0.994	21.509	293	0.826	22.916
51	1.868	17.060	53	0.791	20.574	313	0.417	21.379
72	2.078	17.245	60	0.920	20.696	316	0.922	23.883
81	1.945	16.654	83	0.950	20.754	333	1.026	22.746
82	2.000	18.153	85	0.984	21.232	350	0.980	22.765
159	2.084	16.599	101	X	X	355	1.027	20.693
230	1.975	16.957	102	X	X	363	0.768	20.092
275	2.130	17.333	146	0.796	21.177	372	0.894	21.536
279	2.107	17.932	153	1.027	22.478	383	X	X
321	1.918	17.705	179	0.966	24.094	384	1.095	22.410
360	1.774	17.269	182	1.099	25.078	387	1.113	23.842
489	1.958	18.441	185	0.987	20.013	397	1.183	22.627
490	1.950	17.021	195	0.857	20.875	398	1.097	23.894
514	1.942	16.539	210	1.168	23.439	429	0.385	21.680
			219	0.568	19.452	446	0.933	22.297
			220	0.354	21.213	464	X	X
			225	0.935	22.876	466	1.090	22.264
			226	1.009	21.721	481	0.672	18.820
			248	1.005	21.444	494	0.913	20.296
			280	1.108	22.449	498	0.982	24.152
			286	1.046	20.697	500	1.122	22.267
			290	0.990	22.630	521	1.054	22.929

**TABLE 2.4:** Tableau résumant l'attribution des groupements méthyles Val-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]-proS et Met-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\epsilon$  de PhCpn.

## Chapitre 3

# Étude du cycle fonctionnel du thermosome de *Pyrococcus horikoshii* par RMN

### 3.1 Production et purification du thermosome de *Pyrococcus horikoshii* (PhCpn)

#### 3.1.1 Production de PhCpn

Le génome des archées du genre *Pyrococcus* ne contiennent qu'un gène codant pour une chaperonine par génome (216). Le gène codant pour le thermosome de *Pyrococcus horikoshii* OT3 (PhCpn) a été cloné dans un vecteur d'expression pET41c et la protéine sur-exprimée, par induction à l'IPTG, dans des bactéries *Escherichia coli* de souche BL21 DE3 RIL. Les cultures de bactéries ont été réalisées en milieu minimum M9  $^1\text{H}_2\text{O}$  ou milieu minimum M9  $^2\text{H}_2\text{O}$ . À l'exception du rendement final en protéine, aucune différence n'a été observée entre la production en  $^1\text{H}_2\text{O}$  et en  $^2\text{H}_2\text{O}$ . Les résultats présentés ci-dessous correspondent à la purification de PhCpn sur-exprimé en milieu minimum M9  $^2\text{H}_2\text{O}$ .

Le protocole de purification permet d'obtenir la particule native de PhCpn avec des rendements de l'ordre de 40 mg par litre de culture en milieu minimum M9  $^1\text{H}_2\text{O}$  et 20 mg par litre de culture en milieu minimum M9  $^2\text{H}_2\text{O}$ . Les protocoles de production et de purification sont donnés en annexe.

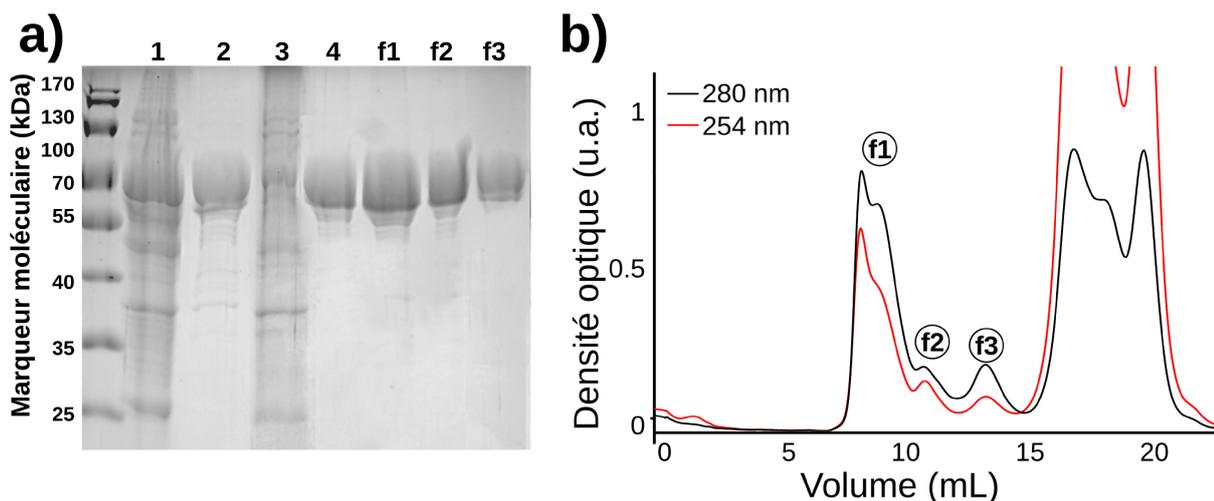
### 3. ÉTUDE DU CYCLE FONCTIONNEL DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII* PAR RMN

#### 3.1.2 Purification de PhCpn

La purification de PhCpn doit permettre de le séparer des protéines contaminantes d'*E. coli* mais également d'isoler PhCpn dans son état d'oligomérisation natif, sous la forme d'une particule homo-oligomérique composée de seize sous-unités assemblées en deux anneaux (181).

##### 3.1.2.1 Purification de PhCpn (Étape 1) :

Après avoir lysé les cellules d'*E. coli* par sonication, la première étape de purification est un traitement à 80°C pendant 30 minutes. Cette étape va conduire à la précipitation de la majorité des protéines d'*E. coli* alors que PhCpn, provenant d'une archée hyperthermophile, ne va pas être affecté par la température. La centrifugation de l'échantillon permet ensuite de séparer la fraction soluble de la fraction insoluble. Le gel SDS-PAGE de la figure 3.1(a) permet d'observer dans la fraction soluble (puits 2) une bande majoritaire à environ 60 kDa qui correspond à la masse moléculaire du monomère de PhCpn et dans la fraction insoluble (puits 3) la majorité des contaminants protéiques. Pour séparer PhCpn des contaminants protéiques restants, une étape de chromatographie échangeuse d'anions (CeA) est utilisée. Le puits 4 du gel SDS-PAGE de la figure 3.1(a) montre qu'après la CeA, aucun contaminant protéique n'est observable.



**FIGURE 3.1: Étape 1 du protocole de purification de PhCpn** - a) gel SDS-PAGE à 12.5% poly-acrylamide : 1 : Extrait total ; 2 : Fraction soluble après le choc thermique ; 3 : Fraction insoluble après le choc thermique ; 4 : Échantillon purifié sur CeA ; f1, f2, f3 : fractions correspondant à la CE (b) ; b) Chromatogramme de l'injection de l'échantillon 4 chargé sur une CE Superdex 200 Increase 10/300 GE.

### 3.1 Production et purification du thermosome de *Pyrococcus horikoshii* (PhCpn)

---

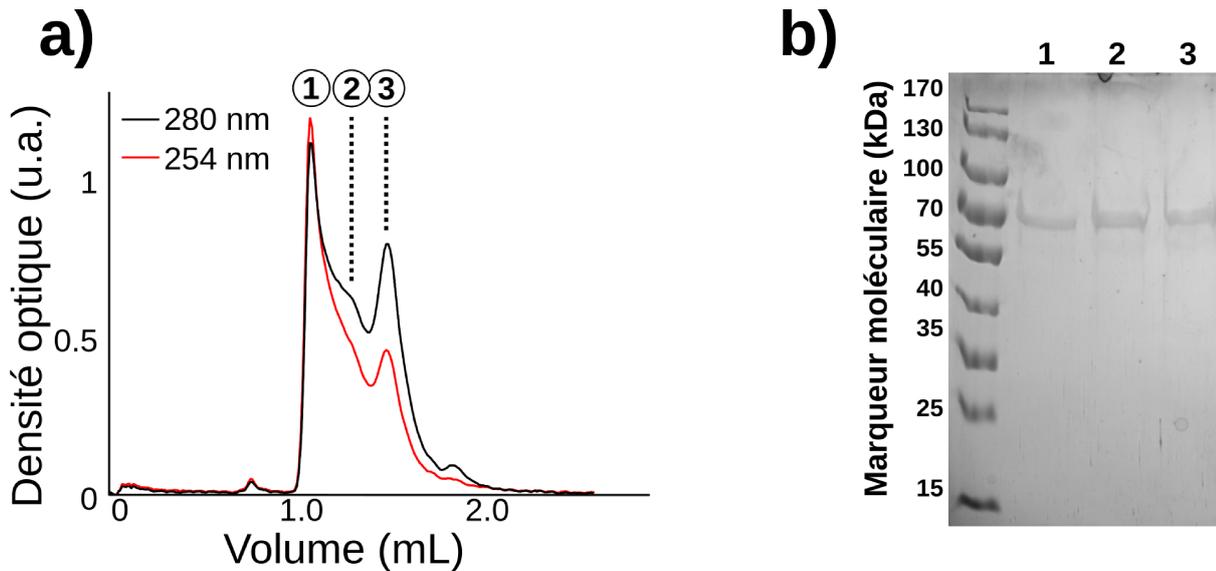
Même si ces étapes de purification permettent d'obtenir PhCpn sans contaminant protéique, il a été nécessaire d'utiliser une chromatographie d'exclusion stérique (CE) pour caractériser l'état d'oligomérisation de PhCpn. Pour cela, nous avons injecté l'échantillon de PhCpn sur une colonne de CE (Superdex 200 Increase 10/300 GE) qui a été utilisée lors de la purification de thermosomes dans plusieurs études (125, 140, 180, 182, 217). Le chromatogramme de la figure 3.1(b) permet d'observer trois espèces majoritaires correspondant à des protéines (f1, f2 et f3). Ces espèces sur un gel SDS-PAGE (figure 3.1(a)), migrent avec une masse moléculaire d'environ 60 kDa, qui correspond à celle du monomère de PhCpn. Les signaux observables à partir d'un volume d'élution de 15 mL ne correspondent pas à des protéines mais à des acides nucléiques ( $DO(254nm) > DO(280nm)$ ). La calibration de la colonne de CE donne une masse moléculaire d'environ 70 kDa pour le signal f3 et d'environ 140 kDa pour le signal f2. Ces espèces pourraient donc correspondre respectivement à un monomère et un dimère de PhCpn.

L'analyse du signal f1 est plus complexe. Comme on peut l'observer, ce signal correspond à la superposition de deux signaux qui ne peuvent pas être séparés en utilisant cette colonne de CE. De plus, le volume d'élution de ces signaux correspond au volume mort de la colonne, ce qui rend impossible l'estimation d'une masse moléculaire pour ces particules de PhCpn. Les données publiées dans la littérature sur la purification de thermosomes permettent d'observer la purification de la forme native de thermosomes dans le volume mort de colonnes de CE similaire à la colonne de CE (Superdex 200 Increase 10/300 GE) (217). Par conséquent, un de ces signaux pourrait correspondre à la particule native de PhCpn.

Une colonne de CE analytique (Agilent Sec-5A) permettant de séparer des espèces de haut poids moléculaire a été utilisée pour caractériser les espèces dans la fraction correspondant au signal f1. Le chromatogramme de la figure 3.2(a) permet d'observer que cette fraction est composée d'au moins trois constituants. L'analyse des fractions correspondant à chacune des espèces sur gel SDS-PAGE montre une migration similaire avec une masse moléculaire d'environ 60 kDa (figure 3.2(b)).

D'après la calibration de la colonne, l'espèce un sort dans le volume mort de la colonne analytique, la deuxième correspond à une espèce de haut poids moléculaire et la troisième à une particule d'une masse moléculaire proche d'environ 700 kDa.

### 3. ÉTUDE DU CYCLE FONCTIONNEL DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII* PAR RMN



**FIGURE 3.2: Étape 1 du protocole de purification de PhCpn** - a) Chromatogramme de l'injection de la fraction f1 de la CE 3.1(b) sur une colonne de CE Agilent Bio SEC-5A 500 Å ; b) gel SDS-PAGE à 12.5% de polyacrylamide : les numéros correspondent aux fractions de la CE.

Cette dernière espèce semble donc être celle qui se rapproche le plus d'une particule de la taille attendue pour la forme native de PhCpn. Les masses moléculaires très importantes des deux autres espèces suggèrent qu'elles correspondent à des agrégats de haut poids moléculaire. L'absorption à 254 nm très élevée de l'espèce un indique également une possible contamination par des acides nucléiques associés à PhCpn.

Ce type de contamination par des acides nucléiques (ARN) a déjà été rencontrée dans la littérature (218) :

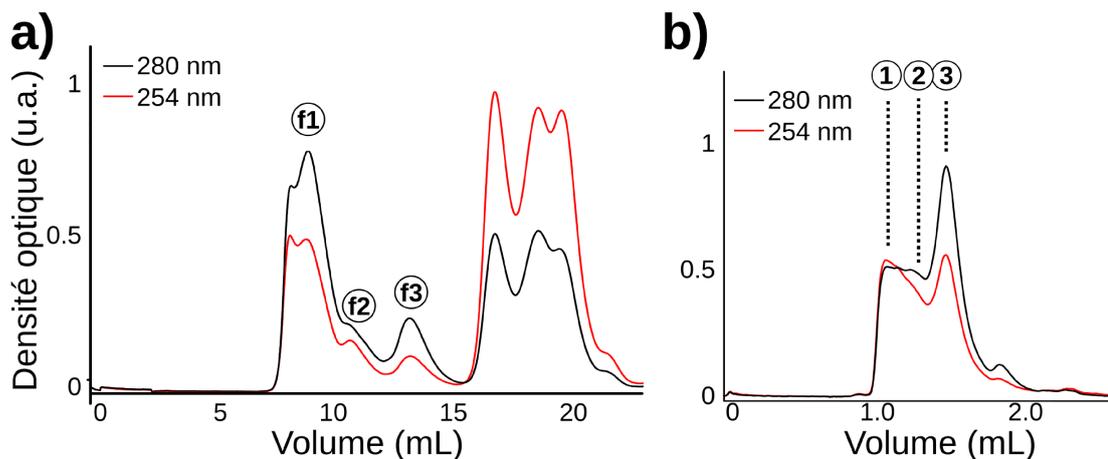
*"In the course of the purification procedure, we noticed that the chaperonin consistently carried over a nucleic acid component, which seemed to be physically associated with the protein complex"* (218)

Une telle interaction pourrait expliquer l'observation d'une DO élevée à 254 nm pour les espèces de haut poids moléculaire de PhCpn.

#### 3.1.2.2 Purification de PhCpn (Étape 2) :

En utilisant des DNases et des RNases lors de la purification, dans cette hypothèse, il devrait donc être possible de diminuer cette contamination. Un mélange de DNases et RNases a été ajouté avant l'étape de lyse par sonication des cellules d'*E. coli*. Cela devrait permettre de couper les acides nucléiques en petits fragments et de les précipiter lors du choc thermique.

Comme le montre le chromatogramme de la CE (Superdex 200 Increase 10/300 GE) présenté sur la figure 3.3(a), l'ajout de DNases et de RNases au début de la purification permet d'inverser le ratio entre la forme supposée native de PhCpn et les contaminants (signal f1). La figure 3.3(b) montre que l'analyse de la fraction correspondant au signal f1 avec la CE analytique permet également d'observer une diminution de l'intensité des deux signaux correspondant aux formes de haut poids moléculaires associés à des contaminants.



**FIGURE 3.3: Étape 2 du protocole de purification de PhCpn - a)** Chromatogramme de l'injection de l'échantillon sur une CE (Superdex 200 Increase 10/300 GE), traité avec des DNases et RNases, après l'étape de CeA ; **b)** Chromatogramme de l'injection de la fraction f1 de la CE (a) sur une CE analytique (Agilent Bio SEC - 5 500 Å). Les deux chromatogrammes peuvent être comparés avec le chromatogramme (b) de la figure 3.1 et le chromatogramme (a) de la figure 3.2, qui présente la purification sans DNases et RNases.

Cependant, la quantité de contaminants reste importante par rapport à celle de la forme supposée native de PhCpn. Il a donc été nécessaire de trouver une solution pour séparer la forme native de PhCpn des contaminants.

### 3. ÉTUDE DU CYCLE FONCTIONNEL DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII* PAR RMN

---

La séparation de la forme supposée native de PhCpn nécessite l'utilisation d'un système qui permet d'une part de séparer la forme supposée native de PhCpn de deux particules de faible poids moléculaire (monomère et dimère) et d'autre part de la séparer des deux particules de très haut poids moléculaire correspondant entre autres aux "contaminations" par des acides nucléiques.

La solution classique qui permet de résoudre ce problème est de réaliser deux étapes de purification avec deux colonnes de CE différentes : une colonne qui permet de séparer la forme supposée native de PhCpn des particules de faible poids moléculaire et une deuxième colonne qui permet de séparer la forme native de PhCpn des particules de haut poids moléculaires. Pour simplifier le protocole de purification et éviter la multiplication d'étapes coûteuses en protéine, nous avons utilisé un montage de deux colonnes de CE connectées en série (Superdex 200 16/60 et Sephacryl 500 HiPrep 16/60) qui permettent respectivement de séparer des particules de faible poids moléculaire et de haut poids moléculaire.

Le chromatogramme correspondant à ce montage en série de CE est présenté dans la figure 3.4(a) avec trois espèces principales dont les fractions migrent sur un gel SDS-PAGE (figure 3.4(c)) à une masse moléculaire correspondant à un monomère de PhCpn. Pour caractériser l'état d'oligomérisation de PhCpn, les fractions correspondantes ont été analysées sur un gel non dénaturant qui permet de préserver l'état d'oligomérisation des particules (figure 3.4(d)).

**Signal numéro 1 :** La DO à 254 nm de ce signal montre qu'il correspond à un mélange des deux espèces de haut poids moléculaire observées avec la CE analytique. Le fait que la fraction correspondant à ce signal ne migre pas sur le gel non dénaturant est en accord avec la présence d'agrégats de haut poids moléculaire.

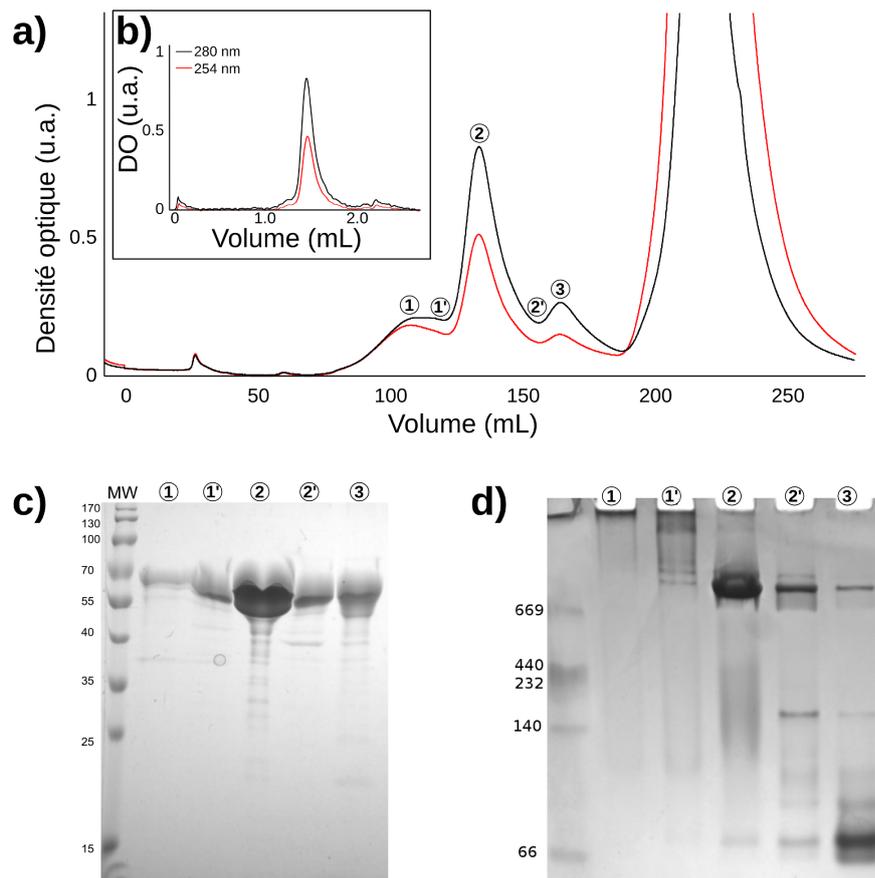
**Signal numéro 2 :** La fraction correspondant à ce signal migre sur le gel non-dénaturant avec une taille de l'ordre de 700 kDa qui pourrait correspondre à la forme native de PhCpn.

**Signal numéro 3 :** Les protéines correspondant à ce signal migrent comme un mélange de particules de tailles d'environ 60 kDa. Cela signal semble donc correspondre au monomère de PhCpn.

Ces résultats montrent que l'utilisation du montage en série de deux colonnes de CE permet de séparer la forme supposée native de PhCpn des formes de haut poids moléculaire

### 3.1 Production et purification du thermosome de *Pyrococcus horikoshii* (PhCpn)

et de celle de faible poids moléculaire. Pour confirmer ce résultat, la fraction correspondant au deuxième signal a ensuite été analysée avec la colonne de CE analytique (Agilent BIO SEC5). Le chromatogramme de la CE analytique est présenté sur la figure 3.4(b). Une seule espèce est observée qui correspond à la forme supposée native de PhCpn.



**FIGURE 3.4: Purification du PhCpn : Séparation de la forme supposée native de PhCpn des contaminants de haut poids moléculaire** - a) Chromatogramme de l'injection sur un montage en série de deux colonnes de CE (Superdex 200 16/60 et Sephacryl 500 HiPrep 16/60) de l'échantillon après un traitement avec des DNases et des RNases et l'étape de CeA ; b) Chromatogramme de l'injection de la fraction du signal 2 sur une colonne de CE analytique (Agilent Bio SEC - 5 500 Å) ; c) gel SDS-PAGE à 12.5% de poly-acrylamide : Les numéros correspondent aux fractions du chromatogramme (a) ; d) gel non-dénaturant avec un gradient de 25% à 15% de poly-acrylamide : Les numéros correspondent aux fractions du chromatogramme(a).

À cette étape, les résultats obtenus suggèrent que la particule purifiée avec ce protocole de purification correspond à la forme native de PhCpn. Pour confirmer cela, nous avons analysé cet échantillon par microscopie électronique.

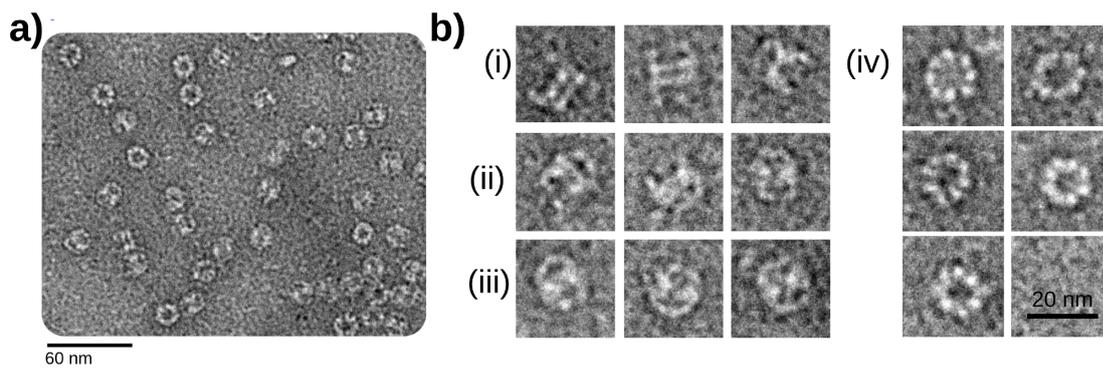
### 3. ÉTUDE DU CYCLE FONCTIONNEL DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII* PAR RMN

---

#### 3.1.2.3 Analyse par microscopie électronique de l'échantillon de PhCpn

L'échantillon a été analysé par microscopie électronique avec une coloration négative et par cryo-microscopie électronique. Les expériences de microscopie électronique ont été réalisées sur la plate-forme de microscopie électronique de l'IBS (C. Moriscot / G. Schoehn).

Un cliché de microscopie électronique avec une coloration négative de l'échantillon de PhCpn est présenté dans la figure 3.5(a), ainsi que des zooms sur des particules isolées (figure 3.5(b)). On peut observer des particules assemblées en deux anneaux constitués chacun de huit sous-unités. Ces résultats confirment que la particule de PhCpn purifiée correspond à la forme native décrite dans la publication de Okochii *et al.* (181).



**FIGURE 3.5: Caractérisation de la forme native de PhCpn** - a) Clichés de microscopie électronique avec une coloration négative (49000X) ; b) Zooms sur des particules isolées de l'hexadécamère de PhCpn correspondant à la forme native. Vue de coté : (i) Conformations ouvertes, (ii) Conformations mixtes ouvertes-fermées, (iii) conformations fermées. Vue de dessus (iv). Microscope électronique Phillips CM12. L'échantillon est observé avec une coloration négative (Molybdate d'ammonium 2%) et préparé par la technique de flottaison du carbone. La concentration de PhCpn est de  $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

L'analyse des vues de coté des particules montre plusieurs conformations de PhCpn avec des conformations ouvertes, mixte ouvertes-fermées et fermées. La même observation a pu être faite pour les clichés de cryo-microscopie électronique (données non montrées).

L'observation par microscopie électronique de plusieurs conformations pour la forme apo de thermosomes a déjà été reportée dans la littérature par Schoehn *et al.* pour le thermosome de *Sulfobus shibatae* (151, 152) (cryo-microscopie électronique) et par Waldmann

### 3.1 Production et purification du thermosome de *Pyrococcus horikoshii* (PhCpn)

---

*et al.* pour le thermosome de *Thermoplasma acidophilum* (179) (microscopie électronique avec une coloration négative) .

Une des explications données par Schoehn *et al.* (151) est que ce mélange de conformations serait un artefact lié à la préparation des échantillons à température ambiante :

*"It should be noted, however, that the cryo EM grid preparation involves vitrification from room temperature, and the observed distribution of complexes may reflect this non-physiological temperature"* (152)

Cet artefact ne nous permet pas de conclure quant à la conformation ouverte ou fermée de la particule native de PhCpn. Cependant, les données publiées dans la littérature pour des expériences biochimiques et biophysiques (135, 136, 137, 138, 139, 140) vont dans le sens d'une conformation ouverte pour la forme apo des thermosomes.

#### 3.1.2.4 Purification du PhCpn : Résumé du protocole permettant d'obtenir la particule native de PhCpn

Le protocole de purification de PhCpn peut être résumé en trois étapes :

- (1) : Choc thermique à 80°C qui permet de séparer PhCpn de la majorité des protéines d'*E. coli*.
- (2) : Chromatographie échangeuse d'anions pour séparer PhCpn des contaminants protéiques encore présents après le choc thermique.
- (3) : Chromatographie d'exclusion stérique pour isoler la forme native de PhCpn des particules avec un degré d'oligomérisation inférieur et des "agrégats" de PhCpn avec des acides nucléiques.

### 3. ÉTUDE DU CYCLE FONCTIONNEL DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII* PAR RMN

## 3.2 Détermination des conditions optimales pour l'étude de PhCpn

Après avoir obtenu PhCpn dans un état d'oligomérisation natif, l'étape suivante a été de mettre en place les conditions optimales pour son étude. La définition des conditions optimales pour l'étude d'une protéine peut prendre en compte différents paramètres comme sa stabilité, la stabilité d'un état oligomérique ou son activité enzymatique. Pour l'étude de PhCpn, deux paramètres semblent particulièrement importants : l'activité enzymatique d'hydrolyse de l'ATP (activité ATPase) et l'état d'oligomérisation.

Tout d'abord, nous allons faire varier différents paramètres pour trouver des conditions optimales pour PhCpn puis nous allons tester la stabilité de l'état d'oligomérisation de la forme native de PhCpn.

### 3.2.1 Optimisation des conditions de l'activité ATPase de PhCpn

Le tableau 3.1 rassemble les données décrites dans la littérature sur l'activité ATPase de différents thermosomes en fonction de plusieurs paramètres importants comme le pH, la température ou la concentration en cations ( $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ).

Organisme	Activité	Température	KCl	MgCl <sub>2</sub>	Autres	pH	Références
<i>Sulfolobus shibatae</i>	27.2	75°C	5 mM	2.5 mM		7.5	(175)
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	96.1	80°C	10 mM	0.5 mM		8	(177)
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	3.6	58°C	50 mM	5 mM		7.5	(179)
<i>Thermococcus strain KS-1</i>	$\alpha : 38.4, \beta : 72$	$\alpha : 70^\circ\text{C}, \beta : > 90^\circ\text{C}$	300 mM	1 mM		7.2	(178)
<i>Pyrococcus kodakaraensis KOD1</i>	$\alpha : 8, \beta : 12.5$	80°C	4.5 mM	1.5 mM		7.2	(219)
<i>Methanopyrus kandleri</i>	129.6	100°C	0 mM	2 mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6.5	(180)
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	40.3	90°C	150 mM	1 mM		7.5	(181)
<i>Aeropyrum pernix K1</i>	288	90°C	100 mM	5 mM		5.5	(182)
<i>Pyrococcus Furiosus</i>	62.4	90°C	300 mM	10 mM	MnCl <sub>2</sub> , CoCl <sub>2</sub>	7	(183)
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	19.2	80°C	150 mM	1 mM		7.5	(184)

**TABLE 3.1: Activité ATPase de différents thermosomes** - Données publiées dans la littérature pour l'activité ATPase de différents thermosomes d'archées hyper-thermophiles. Activité en mole d'ATP/minute/mole de thermosome(particule).

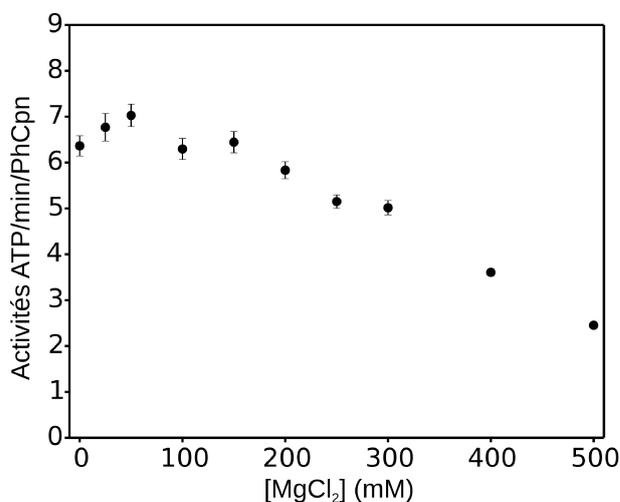
L'activité ATPase de PhCpn a été testée en fonction de la concentration en différents ions, du pH et de la température. Pour ces différentes conditions, nous avons utilisé le même protocole, hormis exception indiquée dans le texte. PhCpn a été incubé avec de l'ATP pendant 30 minutes à une température de 80°C ( $[PhCpn] = 0.7 \mu\text{M}$  et  $[ATP] = 10 \text{ mM}$ ), puis la réaction a été stoppée par ajout du réactif de dosage du phosphate inorganique

## 3.2 Détermination des conditions optimales pour l'étude de PhCpn

(220). La mesure de l'activité ATPase a été réalisée par test colorimétrique "malachite green" (220) qui permet de doser la quantité de phosphate inorganique libérée lors de l'hydrolyse de l'ATP en ADP. À haute température, l'ATP va également pouvoir subir une hydrolyse spontanée. Par conséquent, la quantité de phosphate inorganique libérée en absence de PhCpn dans les mêmes conditions a été soustraite à la valeur obtenue en présence de PhCpn pour calculer l'activité ATPase.

### 3.2.1.1 Effet de la concentration de différents cations sur l'activité ATPase de PhCpn

**MgCl<sub>2</sub>** : La présence de cations divalents est indispensable pour l'activité de nombreuses ATPases (183). De plus, la présence d'un cation Mg<sup>2+</sup> a été observée dans le site actif de GroEL, où il forme une coordination octaédrique avec les trois phosphates de l'ATP, deux résidus et une molécule d'eau (221). Nous avons également pu observer que le Mg<sup>2+</sup> est important pour maintenir l'état d'oligomérisation de PhCpn (données non montrées), en accord avec les données de Yoshida *et al.* (178) pour un autre thermosome.



**FIGURE 3.6: Activité ATPase de PhCpn en fonction de la concentration en MgCl<sub>2</sub>** - Activité ATPase en fonction de la concentration en MgCl<sub>2</sub> dans un tampon MES 25 mM (pH 6.5), KCl 100 mM et NaCl 50 mM. Chaque point est la valeur moyenne pour trois expériences.

L'activité ATPase est peu sensible à la concentration en MgCl<sub>2</sub> jusqu'à 50 mM. Au delà, on observe une importante diminution de l'activité. Cependant, il est important de noter qu'il n'est pas possible de purifier PhCpn sans MgCl<sub>2</sub>. Par conséquent, même si pour le point 0 mM de MgCl<sub>2</sub> le tampon de réaction ne contient pas de MgCl<sub>2</sub>, il est très probable que du MgCl<sub>2</sub> soit déjà présent dans le site actif de PhCpn.

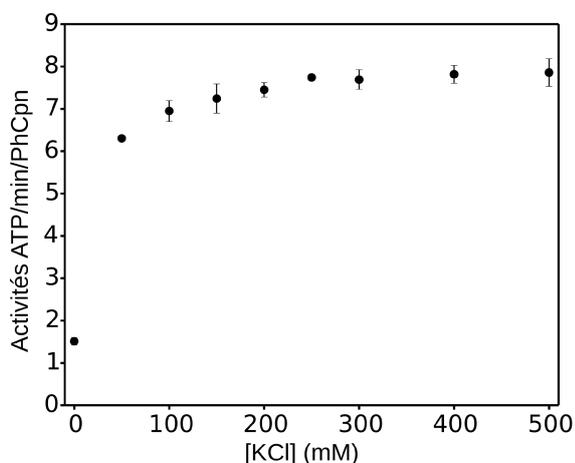
Bien que la concentration en MgCl<sub>2</sub> affecte peu l'activité ATPase de PhCpn et compte tenu de l'importance du MgCl<sub>2</sub> pour le maintien de l'état d'oligomérisation de PhCpn, nous avons décidé de conserver une concentration minimale en MgCl<sub>2</sub> de 25 mM. Cette

### 3. ÉTUDE DU CYCLE FONCTIONNEL DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII* PAR RMN

---

concentration en  $\text{MgCl}_2$  est cinq à dix fois supérieure à celles décrites dans le tableau 3.1, mais nous l'avons choisi pour être en excès de  $\text{MgCl}_2$  lors des études RMN.

**KCl :** Des études citées dans le tableau 3.1 rapportent l'importance du KCl pour l'activité ATPase des thermosomes. De plus, l'étude précédemment citée (221) a montré que dans le site actif de GroEL se trouve un ion  $\text{K}^+$  qui forme un complexe de coordination polyédrique distordu avec le phosphate  $\alpha$  de l'ATP, deux résidus et quatre molécules d'eau.



**FIGURE 3.7: Activité ATPase de PhCpn en fonction de la concentration en KCl** - Activité ATPase en fonction de la concentration en KCl dans un tampon MES 25 mM (pH 6.5),  $\text{MgCl}_2$  25 mM et NaCl 50 mM. Chaque point est la valeur moyenne pour trois expériences.

La figure 3.7 illustre l'influence de la concentration en KCl. L'augmentation de la concentration en KCl de 0 à 100 mM permet une augmentation d'environ un facteur quatre de l'activité qui est ensuite stable jusqu'à 500 mM.

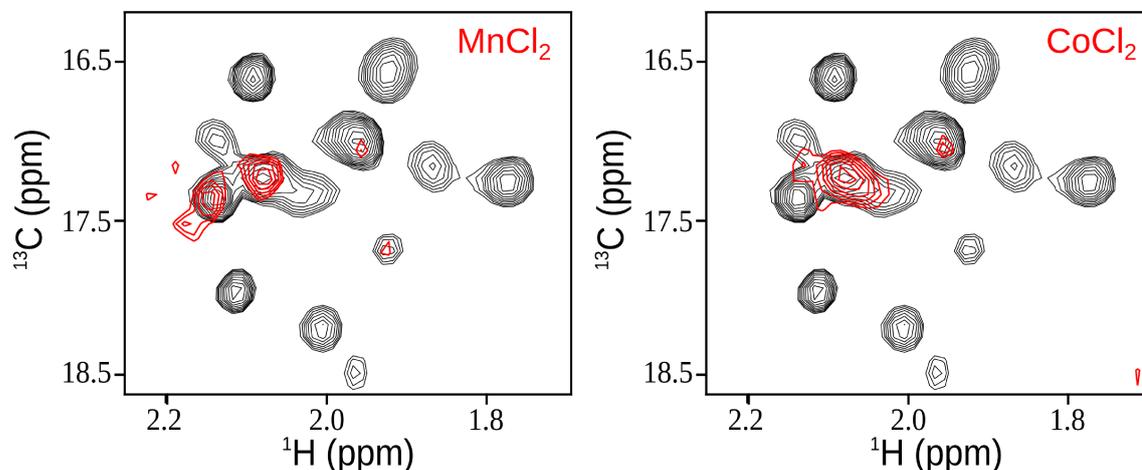
Nous nous sommes donc placés à la concentration de 100 mM. D'une part une concentration supérieure n'apporte qu'une très faible augmentation de l'activité ATPasique et d'autre part l'augmentation de la force ionique d'une solution pose des problèmes pour la sensibilité des expériences RMN.

**$\text{MnCl}_2$  et  $\text{CoCl}_2$  :** Plusieurs études ont montré une augmentation de l'activité ATPase en remplaçant le  $\text{Mg}^{2+}$  par du  $\text{Mn}^{2+}$  ou du  $\text{Co}^{2+}$  (183, 185). Nous avons pu observer un effet similaire, bien que plus modéré, pour PhCpn. Cependant, l'utilisation de cations  $\text{Mn}^{2+}$  ou  $\text{Co}^{2+}$  n'est pas compatible avec une étude par RMN de PhCpn. En effet, des ions paramagnétiques vont diminuer de manière importante sur la sensibilité des expériences RMN.

Pour tester l'effet de ces ions, des spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC de PhCpn-Met- $\epsilon$  ont été enregistrés. Ils sont présentés dans la figure 3.8. Les deux spectres permettent d'observer

## 3.2 Détermination des conditions optimales pour l'étude de PhCpn

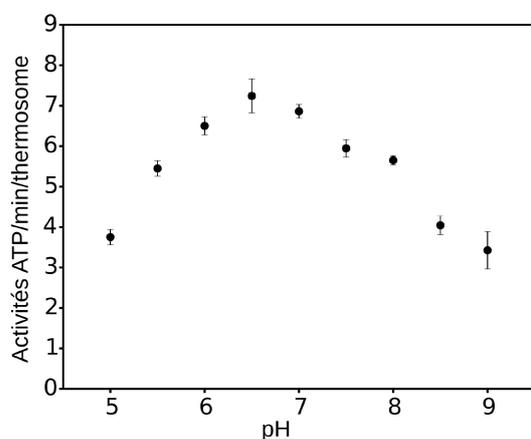
que la majorité des signaux ne sont plus observables lorsque l'on remplace le  $\text{MgCl}_2$  (noir) par du  $\text{MnCl}_2$  ou du  $\text{CoCl}_2$  (rouge).



**FIGURE 3.8:** Comparaison de l'effet des ions paramagnétiques  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  sur le spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC de PhCpn-Met- $\epsilon$  - Superposition des spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC de PhCpn-Met- $\epsilon$  avec 25 mM  $\text{MgCl}_2$  (noir) ou en remplaçant le  $\text{MgCl}_2$  par 10 mM  $\text{MnCl}_2$  (a) ou 10 mM de  $\text{CoCl}_2$  (b) (rouge). L'acquisition des données a été réalisée à 75°C sur un spectromètre opérant à une fréquence du proton de 850 MHz et équipé d'une sonde cryogénique. (Conditions expérimentales :  $[\text{PhCpn}] = 6.25 \mu\text{M}$ ).

### 3.2.1.2 Effet du pH sur l'activité ATPase de PhCpn

Les études présentées dans le tableau 3.1 montrent une variation du pH pour l'étude des thermosomes avec des pH entre 5 et 8. Pour certaines études, l'activité ATPase a été testée pour différents pH avec l'observation de pH optimaux de 5.5 (182), 6.5 (180) et 7 (183).



**FIGURE 3.9:** Activité ATPase de PhCpn en fonction du pH - L'activité a été mesurée dans un tampon MES 25 mM,  $\text{MgCl}_2$  25 mM, KCl 100 mM et NaCl 50 mM en faisant varier le pH de 5.5 à 9.0. Chaque point est la valeur moyenne pour trois expériences.

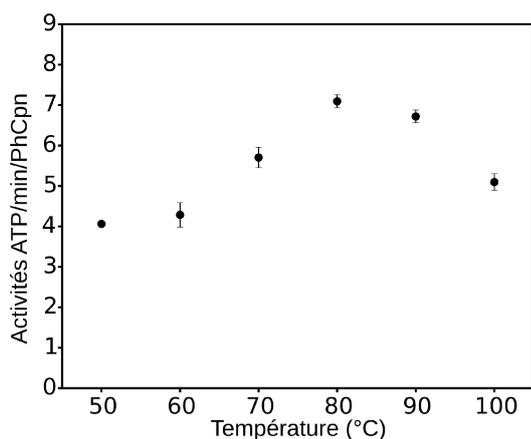
### 3. ÉTUDE DU CYCLE FONCTIONNEL DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII* PAR RMN

---

La figure 3.9 illustre la variation de l'activité ATPase de PhCpn en fonction du pH. L'activité augmente d'environ un facteur deux jusqu'à un pH de 6.5. Au delà, elle diminue jusqu'à atteindre à pH 9 la même valeur qu'à pH 5. Ces résultats confirment que l'activité ATPase de PhCpn est dépendante du pH et montrent que l'activité est optimale à un pH de 6.5.

#### 3.2.1.3 Effet de la température sur l'activité ATPase de PhCpn

*Pyrococcus horikoshii* est une archée hyper-thermophile pouvant se développer à des températures supérieures à 100°C (222). Théoriquement, l'on s'attend donc à ce que l'activité de PhCpn soit dépendante de la température. Les études présentées dans le tableau 3.1 permettent d'observer des températures d'activité de 70°C à plus de 100°C pour les thermosomes de différentes espèces.



**FIGURE 3.10: Activité ATPase de PhCpn en fonction de la température** - L'activité a été mesurée à différentes températures comprises entre 50 et 100°C dans un tampon MES 25 mM (pH 6.5), MgCl<sub>2</sub> 25 mM, KCl 100 mM et NaCl 50 mM. Chaque point est la valeur moyenne pour trois expériences.

La figure 3.10 montre la variation d'activité de PhCpn en fonction de la température. L'activité augmente significativement entre 50° et 80°C. Elle reste ensuite constante entre 80°C et 90°C et commence à diminuer faiblement au delà. Ces résultats confirment que l'activité ATPase de PhCpn est influencée par la température avec une température optimale d'activité située entre 80 et 90°C.

#### 3.2.1.4 Quelles sont les conditions optimales pour l'activité ATPase de PhCpn ?

La finalité de ce travail étant l'étude de PhCpn par RMN, il est nécessaire de prendre en compte les limitations imposées par cette technique pour le choix des conditions optimales.

## 3.2 Détermination des conditions optimales pour l'étude de PhCpn

---

**Concentration en ions :** Comme indiqué précédemment, même si le  $\text{Co}^{2+}$  et le  $\text{Mn}^{2+}$  augmentent l'activité de PhCpn, il n'est pas possible d'utiliser des ions paramagnétiques qui diminuent la sensibilité des expériences RMN. La concentration totale en ions devra également être limitée car une concentration trop élevée sera défavorable pour la sensibilité des expériences RMN.

**Température :** La température est également un facteur à prendre en compte avec une limitation de  $75^{\circ}\text{C}$  imposée par les caractéristiques techniques des cryo-sondes des spectromètres RMN de l'institut. Cependant, pour PhCpn cette température est très proche de la température optimale d'activité ATPase et ne va pas représenter une limitation.

En conclusion, les résultats présentés ci-dessus et les limitations de la technique nous conduisent à choisir comme conditions expérimentales dans notre étude une température de  $75^{\circ}\text{C}$ , un pH de 6.5 et un tampon de composition 25 mM de MES, 100 mM de KCl, 50 mM de NaCl et 25 mM de  $\text{MgCl}_2$ . Tous les expériences présentées dans les chapitres 3 et 4 ont été enregistrées avec ce tampon.

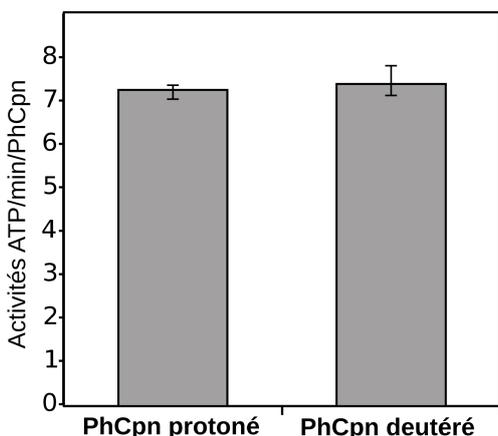
Pour limiter les effets de l'importante concentration en ions de notre tampons, nous avons utilisé des tubes RMN 1.7 mm, shigemi 3 mm, ou shigemi 5 mm adaptés pour les fortes concentrations en ions.

### 3. ÉTUDE DU CYCLE FONCTIONNEL DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII* PAR RMN

---

#### 3.2.1.5 Activité ATPase de PhCpn deutéré

Les expériences d'optimisation des conditions d'activité ATPase de PhCpn ont été réalisées en milieu  $^1\text{H}_2\text{O}$  et avec une particule protonée. Pour les expériences RMN, nous allons utiliser un tampon  $^2\text{H}_2\text{O}$  et PhCpn avec un marquage U- $^{15}\text{N}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ . La deutération d'une protéine pouvant affecter son activité enzymatique et sa stabilité, nous avons vérifié dans ces conditions l'activité ATPase de PhCpn n'est pas affectée.



**FIGURE 3.11: Activité ATPase de PhCpn deutéré en milieu  $^2\text{H}_2\text{O}$**  - Comparaison de l'activité ATPase de PhCpn protoné et deutéré à  $80^\circ\text{C}$ . PhCpn a été incubé avec de l'ATP pendant 30 minutes à une température de  $80^\circ\text{C}$  puis la réaction a été stoppée par ajout du réactif de dosage du phosphate inorganique. Chaque point est la valeur moyenne pour trois expériences.

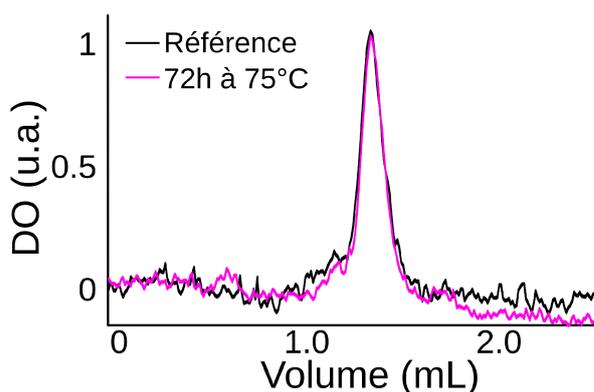
L'activité de PhCpn protoné en tampon  $^1\text{H}_2\text{O}$  et l'activité de PhCpn deutéré en tampon  $^2\text{H}_2\text{O}$  sont représentées dans la figure 3.11. L'observation d'une activité équivalente dans les deux conditions indique que l'activité ATPase n'est pas modifiée par la présence de deutérium que ce soit dans le tampon ou dans la protéine.

#### 3.2.1.6 Stabilité de la particule native de PhCpn dans les conditions optimales pour l'activité ATPase

Les conditions d'activité ATPase optimales de PhCpn ont été définies lors d'expériences biochimiques sur des périodes de temps relativement courtes ( $\approx 30$  minutes). En comparaison, des expériences RMN peuvent nécessiter quelques heures pour des expériences bi-dimensionnelles et jusqu'à plusieurs jours pour des expériences tri-dimensionnelles. Par conséquent, nous avons vérifié que la forme native PhCpn ne subissait pas de dégradation, desoligomérisation ou d'agrégation sur ces échelles de temps.

Pour analyser sa stabilité, PhCpn marqué U- $^{15}\text{N}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$  a été placé pendant 90 heures à  $75^\circ\text{C}$  à une concentration de  $44 \mu\text{M}$  en monomère (Tampon  $^2\text{H}_2\text{O}$  : MES 25 mM (pH 6.5), KCl 100 mM, NaCl 50 mM et  $\text{MgCl}_2$  25 mM).

## 3.2 Détermination des conditions optimales pour l'étude de PhCpn



**FIGURE 3.12: Stabilité de PhCpn deutéré en milieu  $^2\text{H}_2\text{O}$  à  $75^\circ\text{C}$  -** Chromatogramme d'une colonne de CE analytique (Agilent Bio SEC-5A  $500\text{\AA}$ ). Le chromatogramme noir correspond à la référence de l'échantillon de PhCpn et celui en magenta l'échantillon de PhCpn incubé pendant 90 heures à  $75^\circ\text{C}$ .

Un aliquot de l'échantillon a été prélevé et dilué 10 fois au début et à la fin de l'expérience. Les aliquots ont été injectés sur une colonne de CE analytique (Agilent Bio SEC - 5  $500\text{\AA}$ ). Les chromatogrammes correspondant à ces deux expériences sont présentés dans la figure 3.12. Le volume d'élué et l'intensité du signal de la particule native de PhCpn sont les mêmes au début et à la fin de l'expérience. Cela démontre que dans ces conditions d'activité optimales, la forme native de PhCpn est stable sans agrégation ou desoligomérisation après 90 heures. Il va donc être possible d'enregistrer des expériences RMN pour au moins 90 heures tout en gardant la particule de PhCpn native intacte.

### 3.2.1.7 Activité ATPase de PhCpn et données publiées dans la littérature

Comme cela a déjà pu être noté dans le chapitre précédent l'activité ATPase de différents thermosomes publiés dans la littérature est très variable entre les différentes espèces d'archées hyper-thermophiles. Des données sur l'activité ATPase de PhCpn ont été obtenues à deux reprises : une par Okochii *et al.* (181) et l'autre par Kim *et al.* (184).

La température d'activité optimale que nous avons mesuré est proche des températures publiées par ces deux études :  $90^\circ\text{C}$  et  $80^\circ\text{C}$ . L'activité ATPase est dépendante de plusieurs facteurs comme les différences de concentrations (PhCpn, ATP, ions, ... etc), le pH ou la température. Par conséquent, la valeur de l'activité ATPase ne peut être comparée que pour des conditions équivalentes. Pour des conditions équivalentes à de nos expériences, Kim *et al.* (184) ont mesuré une activité d'environ 8 mole d'ATP/minute/mole de PhCpn(particule) qui est très proche de la valeur de 7 mole d'ATP/minute/mole de PhCpn(particule) qui a été mesurée dans les parties précédentes.

## 3.3 Identification des signaux RMN des conformations ouvertes et fermées de PhCpn

Comme nous l'avons indiqué précédemment, un seul signal a été observé pour chacun des groupements méthyles Val-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]-proS et Met-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\epsilon$  de PhCpn (chapitre 2). Cela suggère que dans la forme apo de PhCpn à 75°C, les sous-unités sont soit toutes dans le même état conformationnel, soit en échange rapide à l'échelle de temps d'une expérience RMN. Les données publiées dans la littérature conduisent à favoriser la première hypothèse où la forme apo de PhCpn serait dans une conformation ouverte (135, 136, 137, 138, 139, 140).

Dans les modèles du cycle conformationnel des chaperonines du groupe II, (présenté dans l'introduction), la liaison et/ou l'hydrolyse de l'ATP induisent le passage des particules d'une conformation ouverte à une conformation fermée, puis a un retour vers la conformation ouverte après l'hydrolyse de l'ATP. En présence d'ATP, on s'attend donc à observer des signaux RMN correspondant au mélange des conformations ouvertes et fermées, qui vont rapidement évoluer avec l'hydrolyse de l'ATP. La première étape de l'étude par RMN du cycle conformationnel va donc être d'identifier les signaux correspondant à chaque conformation.

Une stratégie couramment utilisée pour identifier ces différents états est l'utilisation d'analogues non-hydrolysables de l'ATP. Ces analogues simulent l'effet de la liaison de l'ATP tout en conservant la chaperonne dans un état conformationnel stable.

Pour appliquer cette stratégie, il a fallu choisir parmi les deux marquages de groupements méthyles ( Val-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]-proS ou Met-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\epsilon$ ) qui ont été présentés dans le chapitre 2.

Il est nécessaire d'avoir un nombre suffisant de sondes de l'état conformationnel de PhCpn réparties de préférence de façon homogène dans la structure. Toutefois, un trop grand nombre de sondes risque d'entraîner de nombreux recouvrements entre les signaux si plusieurs conformations sont présentes. De plus, il va falloir utiliser un marquage permettant d'obtenir une sensibilité et une résolution suffisantes avec un temps d'enregistrement des expériences 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC de l'ordre de quelques minutes.

Le marquage du groupement méthyle Met-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\epsilon$  représente un bon compromis par rapport à ces différents critères. Le nombre de méthionines est inférieur à celui des valines mais ces résidus sont repartis de manière homogène dans les différents domaines

### 3.3 Identification des signaux RMN des conformations ouvertes et fermées de PhCpn

---

de PhCpn. De plus, le nombre plus faible de signaux devrait limiter les recouvrements possibles en cas d'hétérogénéité conformationnelle.

Les premières expériences conduites avec un échantillon de PhCpn marqué U-[ $^{15}\text{N}$ , $^{12}\text{C}$ , $^2\text{H}$ ], Met-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\epsilon$  à une concentration de 31 à 47  $\mu\text{M}$ , ont montré qu'avec ce marquage, il est possible d'enregistrer des spectres 2D ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ) HMQC en quelques minutes avec une sensibilité et une résolution suffisante sur un spectromètre opérant à une fréquence du proton de 850 MHz et équipé d'une sonde cryogénique.

Pour ces raisons, nous avons donc choisi d'utiliser ce marquage de PhCpn que nous abrégerons par la suite en PhCpn-Met- $\epsilon$ .

#### 3.3.1 Conditions d'étude de l'interaction entre PhCpn et un analogue de l'ATP (AppNHp)

Comme indiqué dans l'introduction, il n'a pas encore pu être établi si la liaison de l'ATP ou son hydrolyse sont responsables de la fermeture de l'anneau. Une possibilité envisageable étant que le mécanisme serait différent selon les espèces.

Parmi les chaperonines du groupe II, il existe un consensus quant au mécanisme de fermeture du thermosome de *Thermococcus strain KS1* qui serait lié à la liaison de l'ATP. Comme la séquence protéique de la sous-unité  $\beta$  de ce thermosome partage 90% d'identité de séquence avec celle de PhCpn, on peut s'attendre à un comportement équivalent de PhCpn et du thermosome de *Thermococcus strain KS1*.

Pour confirmer cela, nous avons utilisé un analogue non-hydrolysable de l'ATP : l'AppNHp qui a été montré comme permettant d'entraîner la fermeture du thermosome de *Thermococcus strain KS1*. Cet analogue présente une structure similaire à celle de l'ATP, ce qui lui permet de se lier au site de liaison de l'ATP. L'oxygène de la liaison phosphodiester entre les phosphates  $\beta$  et  $\gamma$  est toutefois remplacé par un azote, ce qui rend cette liaison "non-hydrolysable".

Différentes études ont montré qu'il existe seulement des différences mineures entre la forme apo des chaperonines du groupe II et la forme liée à l'ADP ; ces deux conformations étant ouvertes (135, 136, 137, 138, 139, 140). L'étude de PhCpn en présence d'ADP devrait permettre de caractériser l'influence de la liaison d'un nucléotide dans le site actif sans

### 3. ÉTUDE DU CYCLE FONCTIONNEL DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII* PAR RMN

---

modifications conformationnelles autres.

Enfin, il a été montré par Gutsche *et al.* (139) que les changements conformationnels induits par l'ATP chez les chaperonines du groupe II sont dépendants de la température et ont lieu à une température proche de la température physiologique.

*"This work highlights the importance of precise temperature control when assessing structural changes in proteins originating from thermophilic organisms."* (139).

Par conséquent, les expériences d'interactions entre ces deux nucléotides et PhCpn ont été enregistrées à 75°C pour être proche de la température physiologique de PhCpn.

#### 3.3.2 Interactions de PhCpn avec l'ADP et l'AppNHp

##### 3.3.2.1 Interaction de PhCpn avec l'ADP

La superposition des spectres 2D ( $^1\text{H},^{13}\text{C}$ ) HMQC de PhCpn-Met- $\epsilon$  sans (noir) et avec l'ADP (rouge) montre que peu de différences sont observables après l'ajout de l'ADP (figure 3.13(a)). L'observation d'un nombre de signaux équivalent sans et avec l'ADP permet de confirmer que la liaison de l'ADP n'entraîne pas de modifications conformationnelles importantes.

Trois signaux sont déplacés par la liaison de l'ADP. Deux de ces signaux correspondent aux méthionines 159 et 490 qui sont situées dans le voisinage du site actif. Le troisième signal correspond à la méthionine 82 qui n'est pas située à proximité du site actif dans une sous-unité. Elle est toutefois située à proximité du site actif de la sous-unité voisine et la variation de son signal pourrait donc également être due à la liaison de l'ADP.

Deux signaux de faibles intensités ne sont plus observables après la liaison de l'ADP : méthionines 48 et 489. Ces deux méthionines sont également situées à proximité du site actif. Cependant, sans l'attribution de la forme liée à l'ADP de PhCpn, il n'est pas possible de conclure sur le déplacement de ces signaux.

#### 3.3.2.2 Interactions de PhCpn avec l'AppNHp

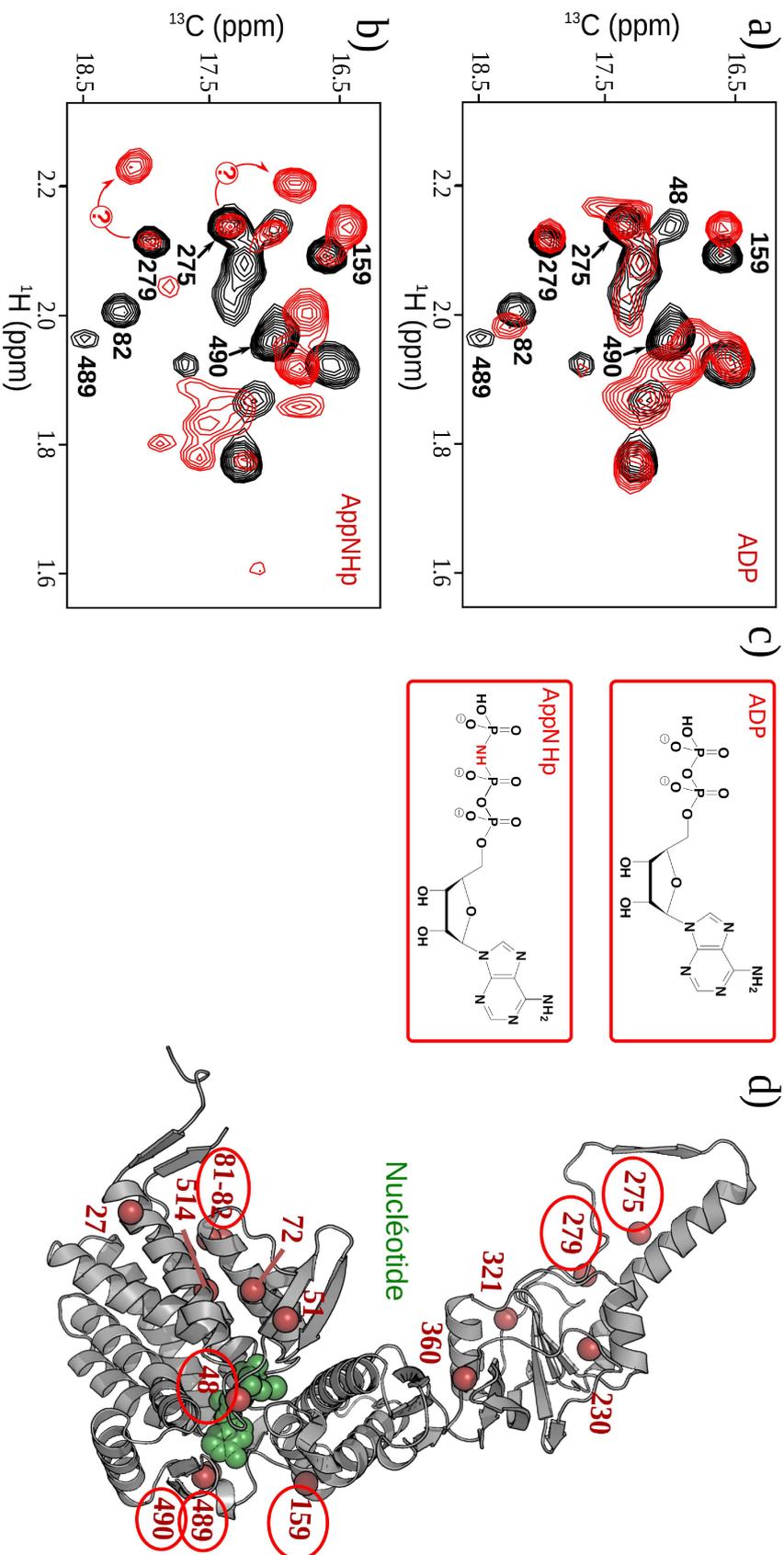
A l'inverse, le spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC de PhCpn-Met- $\epsilon$  en présence d'AppNHp (rouge) (figure 3.13(b)) montre de nombreuses différences avec celui de la forme apo. En particulier, le nombre de signaux augmente par rapport à la forme apo de PhCpn, ce qui suggère dans ce cas l'existence de plus d'une conformation de PhCpn en échange lent.

Comme pour la liaison de l'ADP, les signaux des méthionines 82, 159, 489 et 490 sont déplacés, ce qui est cohérent si le déplacement de ces signaux correspond à la liaison d'un nucléotide dans le site actif. Le signal de la méthionine 48 n'est pas affecté par contre par la liaison de l'AppNHp alors qu'il l'est par celle de l'ADP.

Par rapport au spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC de PhCpn lié à l'ADP, deux signaux supplémentaires sont présents dans celui de PhCpn lié à AppNHp. L'apparition de ces signaux étant concomitantes avec la forte diminution des signaux des méthionines 275 et 279, on peut faire l'hypothèse que ces deux signaux correspondent à ces méthionines dans la forme liée à l'AppNHp.

Pour confirmer cela, il a fallu attribuer le spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC de PhCpn-Met- $\epsilon$  lié à l'AppNHp en appliquant la même stratégie de mutagenèse que pour la forme apo du PhCpn-Met- $\epsilon$ .

### 3. ÉTUDE DU CYCLE FONCTIONNEL DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII* PAR RMN



**FIGURE 3.13:** Interaction de PhCpn avec l'ADP et l'AppNHp - Superposition des spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC de PhCpn-Met- $\epsilon$  dans sa forme apo (noir) et avec de l'ADP (a) ou de l'AppNHp(b) (rouge). L'acquisition des données a été réalisée à 75°C sur un spectromètre opérant à une fréquence du proton de 850 MHz et équipé d'une sonde cryogénique; c) Structure de l'ADP et de l'AppNHp; d) Modèle de la conformation ouverte de PhCpn. (Conditions expérimentales : [PhCpn] = 12.5  $\mu\text{M}$ , [AppNHp] = 2 mM ou [ADP] = 2 mM).

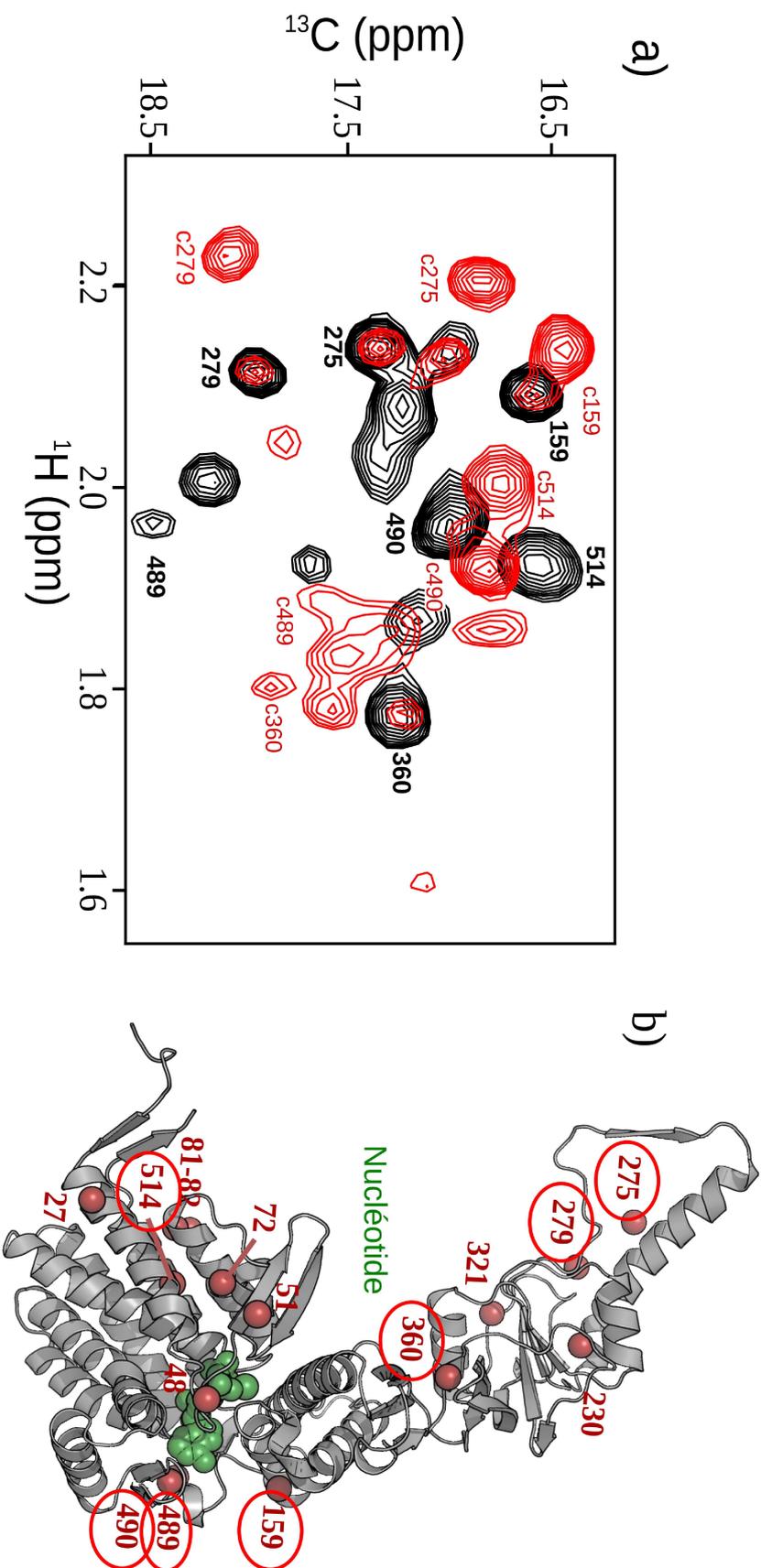
#### 3.3.2.3 Attribution des groupements méthyles Met-[ $^{13}\text{C}\text{H}_3$ ]- $\epsilon$ de PhCpn lié à l'AppNHp

L'attribution complète des signaux de la forme de PhCpn-Met- $\epsilon$  liée à l'AppNHp n'a pu être réalisée en raison de la présence de plusieurs conformations qui entraîne de nombreuses superpositions. Sept résidus méthionines ont pu toutefois être attribués dans la forme liée à l'AppNHp. En particulier, les deux signaux supplémentaires correspondent effectivement aux méthionines 275 et 279. La figure 3.14(a) présente l'attribution partielle du spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC de PhCpn-Met- $\epsilon$  lié à l'AppNHp superposé avec le spectre de la forme apo.

Ces sept méthionines sont réparties de façon homogène dans la structure de PhCpn et pourront donc servir de sonde pour les différents domaines de PhCpn 3.14(b). La modification du signal de ces sept méthionines par l'AppNHp en fonction de leur position dans le modèle de la conformation ouverte de PhCPn va être analysé ci dessous.

Pour les méthionines 159, 275, 279 et 490, le rapport des intensités des signaux de la forme apo et de la forme liée permet d'accéder aux populations de ces formes (En émettant l'hypothèse que les vitesses de relaxation longitudinale et transversale des méthionines dans les deux états sont similaires).

### 3. ÉTUDE DU CYCLE FONCTIONNEL DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII* PAR RMN



**FIGURE 3.14: Attribution du groupement méthyle Met-[ $^{13}\text{C}$ CH $_3$ ]- $\epsilon$  de PhCpn dans la forme liée à l'AppNHp - a) Superposition du spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC de PhCpn-Met- $\epsilon$  dans la forme apo (noir) et dans la forme liée à l'AppNHp (rouge). Les signaux attribués dans la forme liée à l'AppNHp sont indiqués sur le spectre en rouge. ; b) Modèle de la conformation ouverte de PhCpn. L'acquisition des données a été réalisée à 75°C sur un spectromètre opérant à une fréquence du proton de 850 MHz et équipé d'une sonde cryogénique. (Conditions expérimentales : [PhCpn] = 12.5  $\mu\text{M}$ , [AppNHp] = 2 mM).**

### 3.3 Identification des signaux RMN des conformations ouvertes et fermées de PhCpn

---

**Méthionine 159 :** Ce résidu est situé à proximité du site actif ( $\approx 10 \text{ \AA}$ ) et nous avons pu observer que l'AppNHp ainsi que l'ADP modifient la position de ce signal. Toutefois le déplacement du signal est différent selon le nucléotide présent dans le site actif (figure 3.13(b)). Nous nous baserons donc sur le signal de cette méthionine pour caractériser la liaison des nucléotides dans le site actif et en particulier faire la distinction entre la liaison de l'AppNHp et celle de l'ADP. Notons que l'AppNHp à une concentration de 2 mM n'entraîne pas un déplacement complet vers la forme liée. Dans ces conditions, les signaux correspondent à un équilibre forme apo : forme liée 24% ( $\pm 1.9$ ) : 76% ( $\pm 3.1$ ).

**Méthionines 275 et 279 :** Les signaux de ces résidus ne sont pas modifiés par la liaison de l'ADP. Étant situés dans le domaine apical, ils vont donc pouvoir être utilisés comme des sondes de la transition entre les conformations ouvertes et fermées de PhCpn. De plus, l'AppNHp ne semble pas permettre le passage complet de la conformation ouverte vers la conformation fermée avec environ 40% ( $\pm 2.5$ ) de conformation ouverte toujours observable.

**Méthionine 360 :** La méthionine 360 est située à la base du domaine apical à l'interface avec le domaine intermédiaire. Cependant, le signal de cette méthionine dans l'état lié est confondu avec un autre signal intense ce qui va rendre son analyse complexe, voir impossible.

**Méthionine 489 :** La méthionine 489 comme la méthionine 159 est située à proximité du site actif. Cependant, la faible intensité du signal de cette méthionine semble rendre difficile son utilisation pour des études en temps réel. De plus, dans la forme liée à l'AppNHp le signal de cette méthionine est situé dans une zone avec de nombreux recouvrements qui rendent complexe son analyse.

**Méthionine 490 :** La méthionine 490, comme la méthionine 159, est située à proximité du site de liaison des nucléotides et se comporte d'une manière équivalente à la méthionine 159. Elle va pouvoir être utilisée comme une sonde de la liaison des nucléotides à PhCpn.

#### 3.3.3 Modifications conformationnelles de PhCpn induites par l'AppNHp en fonction de la température

Gutsche *et al.* ont montré que les modifications conformationnelles induites par l'ATP et l'AppNHp sont dépendantes de la température (139). Nous avons donc étudié l'influence de la température sur les modifications conformationnelles de PhCpn induites par l'AppNHp.

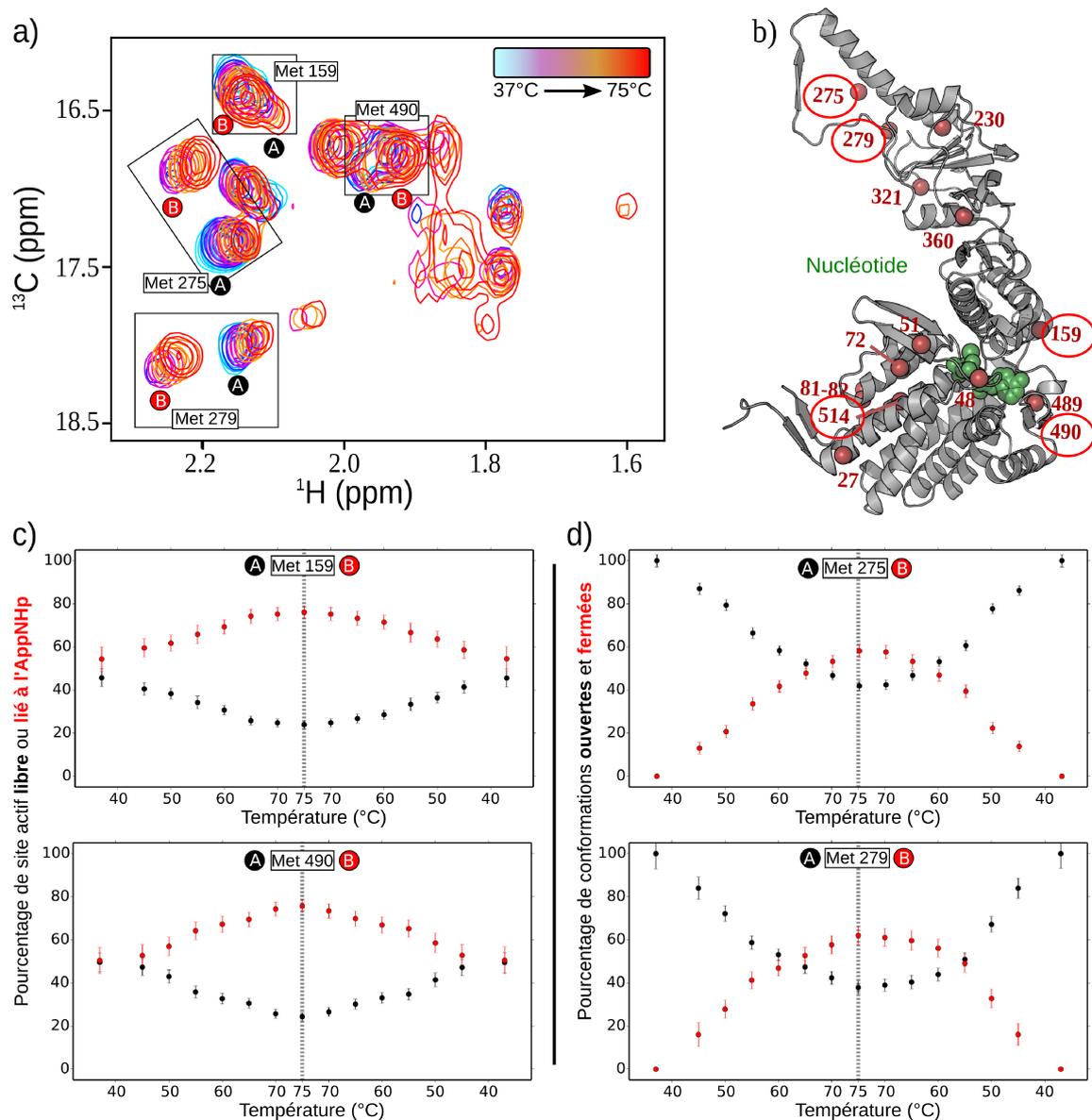
La figure 3.15(a) présente l'évolution des spectres 2D ( $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ ) HMQC de PhCpn-Met- $\epsilon$  avec 2mM d'AppNHp à différentes températures entre 37 et 75°C. Pour analyser ces spectres nous avons utilisé les sondes de la liaison du nucléotide et des modifications conformationnelles de PhCpn que nous mis en évidence grâce à l'attribution de la forme lié à l'AppNHp. L'évolution du rapport de l'intensité des signaux des méthionines 159, 275, 279, et 490 est présentée dans la figure 3.15(b).

Dans cette analyse, il est important de prendre en compte le fait que l'augmentation de la température va également avoir un effet sur le signal RMN par la diminution du  $\tau_c$  de la particule. Par conséquent, il n'est pas possible de se baser sur l'évolution de l'intensité du signal d'une méthionine particulière en fonction de la température. Pour analyser les modifications de PhCpn-Met- $\epsilon$ , l'équilibre entre états libre et lié a été évalué à une température d'après le rapport d'intensité des signaux des méthionines en supposant que les vitesses de relaxations longitudinale et transversale des méthionines dans les différentes conformations de PhCpn sont similaires.

**Liaison de l'AppNHp au site actif :** Le rapport des signaux des états libres et liés montre un comportement assez similaire pour les méthionines 159 et 490. L'équilibre entre les deux états est proche de 50% à 37°C. Cet équilibre est déplacé vers l'état lié avec la température et atteint à 75°C un rapport état lié : état libre de 76% ( $\pm 3.1$ ) : 24% ( $\pm 3.1$ ). Cette augmentation peut s'expliquer d'un point de vue thermodynamique par l'augmentation de l'affinité avec la température.

**Équilibre entre conformations ouvertes et fermées de PhCpn :** Les signaux des méthionines 275 et 279 correspondant à la conformation fermée ne sont pas observables à 37°C. Ils n'apparaissent qu'à partir de 50°C et vont ensuite augmenter proportionnellement avec la température jusqu'à atteindre environ 60% ( $\pm 3.6$ ) de conformations fermées à 75°C.

### 3.3 Identification des signaux RMN des conformations ouvertes et fermées de PhCpn



**FIGURE 3.15:** Comparaison des modifications conformationnelles de PhCpn induites par l'AppNHp à différentes températures - a) Superposition des spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC de PhCpn-Met- $\epsilon$  avec de l'AppNHp pour des températures entre 37°C et 75°C; b) Modèle de la structure de la conformation ouverte de PhCpn; c) Liaison de l'AppNHp au site actif (Méthionines 159 et 490); d) Équilibre entre les conformations ouvertes et fermées (Méthionines 275 et 279). À partir de la ligne en pointillée la température redescend jusqu'à 37°C par palier de température équivalente; L'acquisition des données a été réalisée à différentes température entre 37°C et 75°C, sur un spectromètre opérant à une fréquence du proton de 850 MHz et équipé d'une sonde cryogénique. (Conditions expérimentales :  $[\text{PhCpn}] = 12.5 \mu\text{M}$ ,  $[\text{AppNHp}] = 2 \text{ mM}$ ).

### **3. ÉTUDE DU CYCLE FONCTIONNEL DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII* PAR RMN**

---

En utilisant l'AppNHp pour simuler la liaison de l'ATP, il a été possible d'observer un effet de thermo-activation des thermosomes similaire à celui décrit par Gutsche *et al.* (139). De plus, grâce aux différentes sondes, nous avons pu séparer les modifications de PhCpn avec d'une part l'évolution de la liaison du nucléotide au site actif et d'autre part l'évolution entre les conformations ouvertes et fermées. Nous avons également pu observer que cet effet est réversible pour tous les résidus (figure 3.15(b)).

#### **3.3.4 Observation de l'équilibre entre les conformations ouvertes et fermées de PhCpn par microscopie électronique**

Les résultats présentés précédemment, suggèrent que la liaison de l'AppNHp à PhCpn conduit à haute température au passage de la conformation ouverte vers la conformation fermée de PhCpn. Même si de nombreux éléments vont dans le sens de cette hypothèse, nous avons décidé de la confirmer par une autre technique biophysique.

La microscopie électronique est une technique adaptée pour observer directement la structure d'une particule de la taille de PhCpn. Il devrait être possible d'observer une variation des conformations ouvertes et fermées en présence d'AppNHp ou d'ATP même si un artefact de la technique conduit à l'observation de plusieurs conformations de la forme apo de PhCpn.

##### **Préparation des échantillons de microscopie électronique :**

Le passage de la conformation ouverte vers la conformation fermée étant dépendant de la température les échantillons ont été chauffés à 75°C, pendant 10 minutes, avant d'être fixés dans le colorant et déposés sur la grille de microscopie électronique.

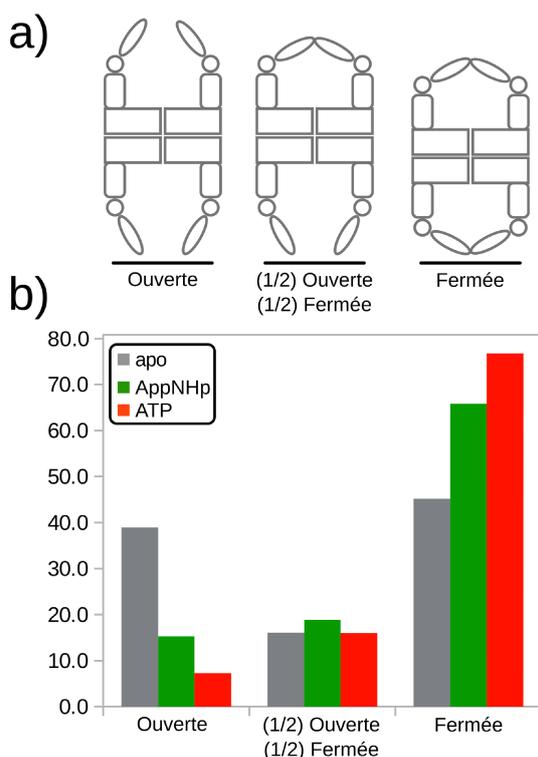
Le refroidissement de l'échantillon lors du dépôt sur la grille pourrait affecter l'équilibre entre les conformations ouvertes et fermées, toutefois il est probable que la fixation par le colorant soit suffisamment rapide pour figer l'échantillon avant son refroidissement complet.

##### **Analyse des clichés de microscopie électronique, en coloration négative, des formes apo, AppNHp et ATP de PhCpn :**

L'équilibre entre les différentes conformations en présence d'AppNHp ou d'ATP a été évalué d'après une analyse statistique, pour chaque condition, de 10 clichés de microscopie électronique. Sur ces clichés, 1074 particules ont été utilisées pour la forme apo dont 44%

### 3.3 Identification des signaux RMN des conformations ouvertes et fermées de PhCpn

en vue de côté et 56% en vue de dessus ; pour la forme liée à de l'AppNHp, 849 particules dont 47% en vue de côté et 53% en vue de dessus et pour la forme liée à l'ATP, 446 particules dont 34% en vue de côté et 66% en vue de dessus. Seules les vues de côtés ont été utilisées pour déterminer les conformations de PhCpn dans ces différentes conditions.



**FIGURE 3.16: Statistiques sur l'équilibre entre les conformations de PhCpn avec et sans nucléotide - a) Schéma représentant les trois conformations de PhCpn observables par microscopie électronique ; b) Pourcentage des différentes conformations de PhCpn observées par microscopie électronique avec une coloration négative (PhCpn apo (gris), PhCpn-AppNHp (vert), PhCpn-ATP (rouge)). (Conditions expérimentales : [PhCpn] = 0.1  $\mu$ M, [ATP] = 10 mM ; [AppNHp] = 10 mM ; Tampon  $^2\text{H}_2\text{O}$  : MES 25 mM (pH 6.5), KCl 100 mM, NaCl 50 mM et  $\text{MgCl}_2$  25 mM).**

La répartition des conformations pour les trois conditions est présentée dans la figure 3.16(b). Les pourcentages de la conformation (1/2)ouvertes-(1/2)fermées n'évoluent pas entre les trois conditions et ne semblent donc pas être affectés par la présence des nucléotides. Par contre, nous observons des différences significatives en présence d'ATP ou d'AppNHp. Autant l'AppNHp que l'ATP déplacent l'équilibre d'une majorité de conformations ouvertes vers une majorité de conformations fermées. Il est également possible d'observer un pourcentage de conformations fermées plus important avec l'ATP en comparaison de l'AppNHp.

Ces résultats confirment l'hypothèse proposée précédemment d'une fermeture de PhCpn due à la liaison de l'AppNHp. L'effet similaire de l'ATP est en faveur d'une conformation fermée correspondant à un état fonctionnel de PhCpn. Les modifications de PhCpn induites par la liaison de l'ATP vont être étudiées en détails dans la partie suivante.

## **3.4 Observation de l'activité ATPase de PhCpn en temps réel par RMN**

Dans la partie précédente, PhCpn a été étudié à l'équilibre dans la forme apo et dans la forme lié à l'AppNHP. Il a été possible d'identifier des signaux qui peuvent être utilisés comme des sondes de la liaison de nucléotides au site actif et du passage entre les conformations ouvertes et fermées de PhCpn. Ces différentes sondes vont être utilisées pour suivre l'évolution de PhCpn pendant son cycle fonctionnel, et plus particulièrement lors de l'hydrolyse de l'ATP.

Deux types d'expériences RMN ont été utilisées ; d'une part des expériences 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC pour suivre les modifications conformationnelles de PhCpn et d'autre part des expériences 1D  $^{31}\text{P}$  pour suivre l'hydrolyse de l'ATP.

En enregistrant ces expériences de manière alternée, il va être possible d'observer en parallèle les modifications conformationnelles de PhCpn et la cinétique d'hydrolyse de l'ATP. Ces expériences ont été enregistrées à deux températures et les résultats sont présentés ci dessous.

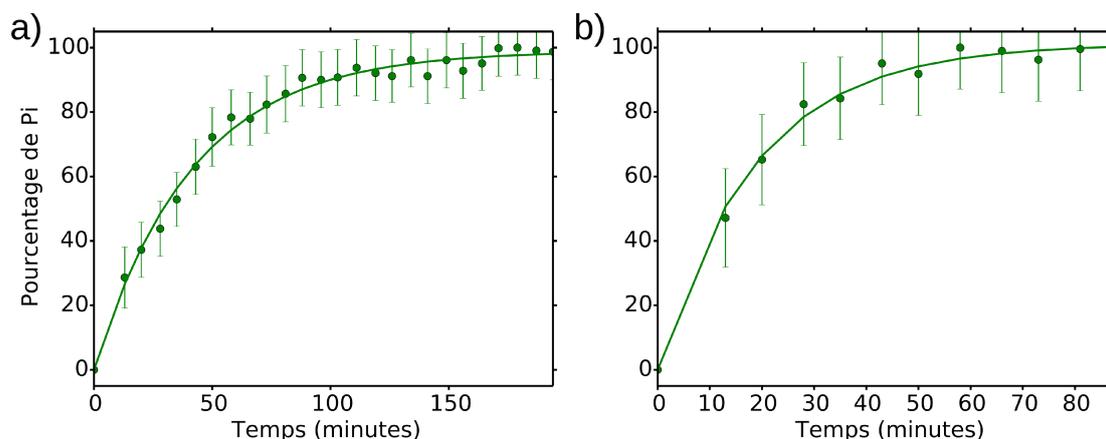
### **3.4.1 Activité ATPase de PhCpn**

#### **3.4.1.1 Comparaison de l'activité ATPase à différentes température par RMN**

Les graphiques de la figure 3.17 présentent l'évolution du pourcentage de phosphate inorganique (Pi) à deux températures : 65°C et 75°C.

Pour les deux températures, après une première phase d'augmentation rapide du signal du Pi, la quantité de Pi libéré par minute diminue jusqu'à pratiquement s'annuler. Cela pourrait être dû à la déplétion en substrat (ATP) d'une part et d'autre part à la compétition avec les produits de la réaction (ADP, Pi).

### 3.4 Observation de l'activité ATPase de PhCpn en temps réel par RMN



**FIGURE 3.17: Activités ATPase de PhCpn suivi par RMN à 65°C et 75°C -** Les deux graphiques représentent l'évolution du phosphate inorganique (Pi) en fonction du temps à 65°C (a) et à 75°C; b). Le pourcentage de Pi a été extrait à partir d'une série d'expériences 1D ( $^{31}\text{P}$ ) en suivant l'intensité du signal du Pi et en considérant l'état final comme correspondant à 100%. L'acquisition des données a été réalisée à 65°C et 75°C. (Conditions expérimentales :  $[\text{PhCpn}] = 26.3 \mu\text{M}$  et  $[\text{ATP}] = 10 \text{ mM}$ ).

La vitesse initiale d'hydrolyse de l'ATP peut être calculée à partir de la diminution du signal de l'ATP pour les deux températures (figure 3.18(e)). Le tableau 3.2 rassemble les valeurs d'activités ATPase mesurées par RMN et les valeurs obtenues par les tests biochimiques. Ces résultats montrent que l'activité ATPase dans les conditions de l'étude par RMN est équivalente à celle mesurée lors des tests biochimiques.

Activité ATPase	65°C	75°C
RMN	4.5	7.3
Biochimie	4.3	7.1

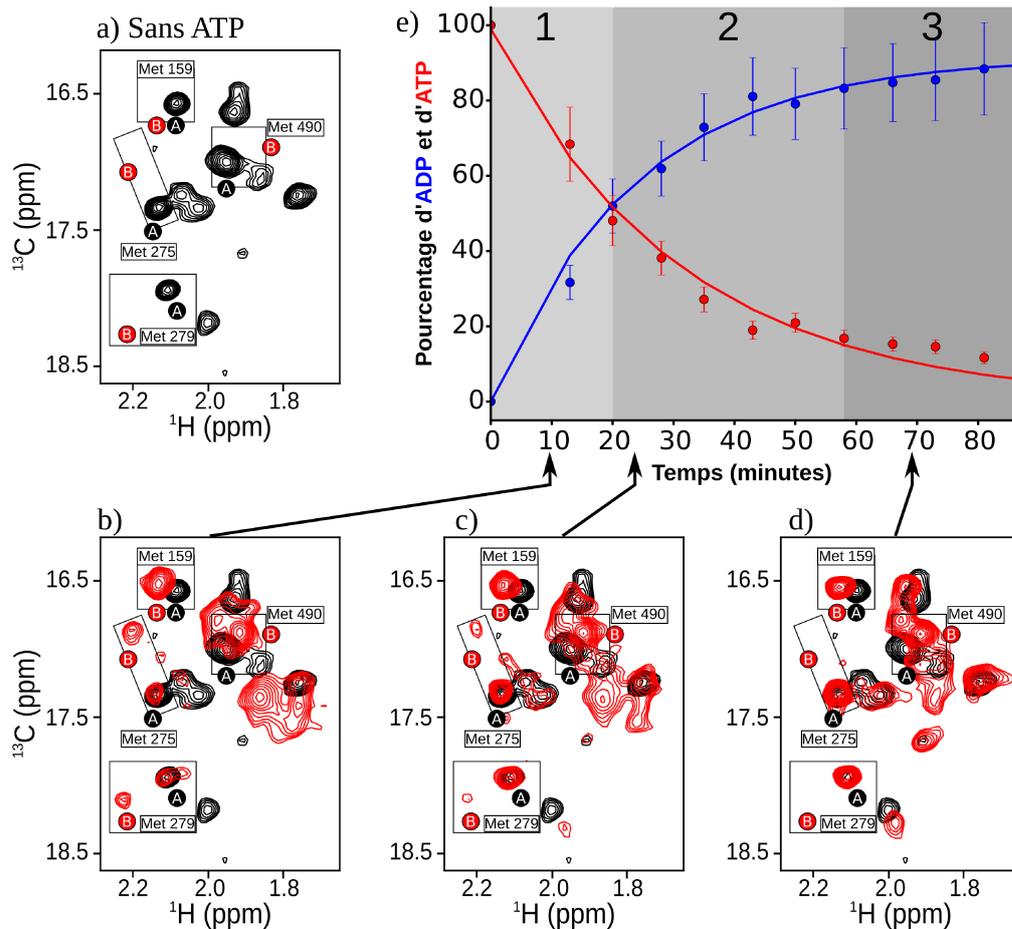
**TABLE 3.2: Activité ATPase de PhCpn à différentes températures -** Activité ATPase en mole d'ATP/minute/mole de PhCpn(particule). (RMN) L'activité ATPase a été calculée à partir de la diminution du signal de l'ATP avec PhCpn moins la diminution du signal de l'ATP due à l'hydrolyse spontanée de l'ATP dans les mêmes conditions sans PhCpn; (Biochimie) Les valeurs d'activités sont tirées de la figure 3.10.

Les modifications étant similaires à 65°C et 75°C, elles ne seront discutées que pour la température de 75°C la plus proche de la température physiologique de PhCpn.

### 3. ÉTUDE DU CYCLE FONCTIONNEL DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII* PAR RMN

#### 3.4.1.2 Modifications conformationnelles de PhCpn à 75°C avec de l'ATP

Comme indiqué précédemment, nous avons suivi les modifications de PhCpn en même temps que son activité ATPase (figure 3.18).



**FIGURE 3.18:** Modifications conformationnelles de PhCpn pendant son activité ATPase à 75°C - (a, b, c, d) Superposition des spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC de PhCpn-Met- $\epsilon$  avec la référence sans ATP en noir et à différents temps après l'ajout de l'ATP en rouge. e) Graphique représentant l'évolution de l'ATP et l'ADP en fonction du temps. Le pourcentage d'ATP et d'ADP a été extrait à partir d'une série d'expérience 1D ( $^{31}\text{P}$ ) en suivant l'intensité des signaux.

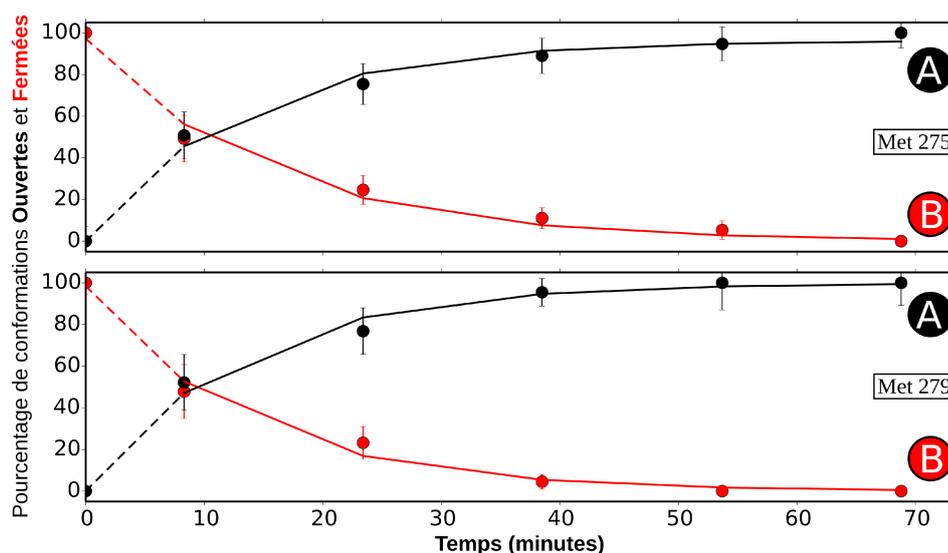
De nombreuses modifications du spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC de PhCpn sont observables après ajout de l'ATP (figure 3.18(b)). Les signaux des méthionines 159, 275, 279 et 490 ont un déplacement chimique en présence d'ATP (signaux encadrés dans les spectres) similaires à ceux en présence d'AppNHp. Cette observation est importante car elle confirme

### 3.4 Observation de l'activité ATPase de PhCpn en temps réel par RMN

que l'AppNHp simule effectivement la liaison de l'ATP. Il semble également que l'hydrolyse de l'ATP ne semble pas induire des modifications supplémentaires du spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC par rapport à sa liaison.

Les signaux des méthionines 159 et 490 sont totalement déplacés dans un état correspondant au site actif occupé par un nucléotide. Cependant le signal ne correspond ni au déplacement chimique attendu pour la liaison de l'ADP ou de l'AppNHp mais à une position située entre les deux signaux.

L'évolution de l'équilibre entre les conformations ouvertes et fermées (figure 3.19) peut être caractérisée d'après le rapport des signaux des méthionines 275 et 279 dans ces conformations.



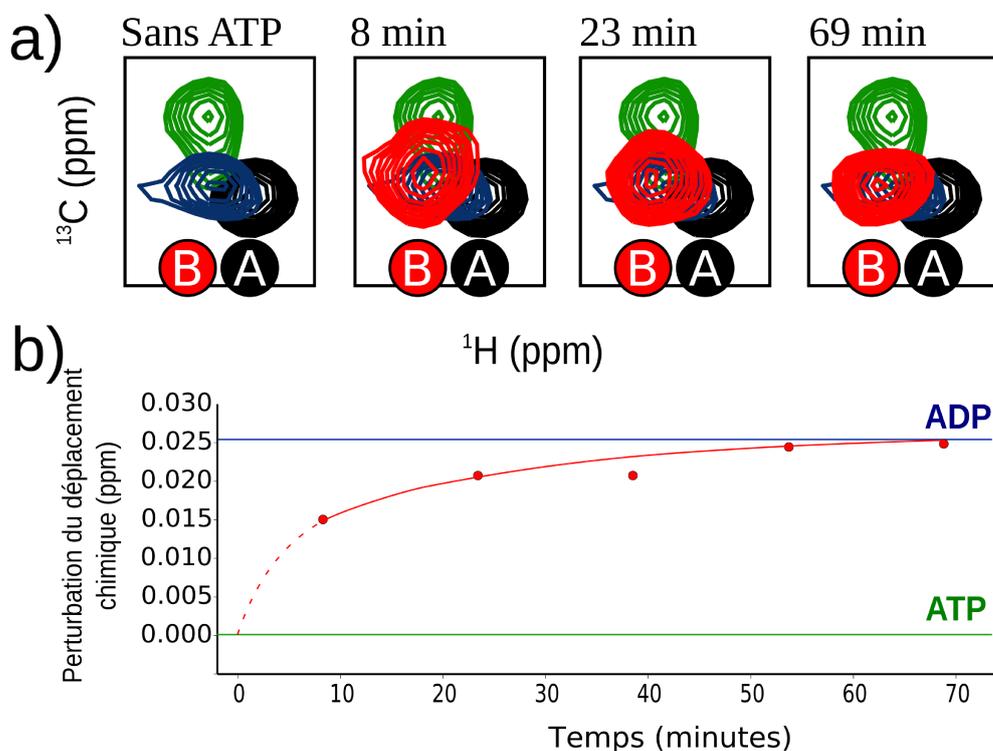
**FIGURE 3.19: Équilibre entre les conformations ouvertes et fermées de PhCpn avec de l'ATP** - Les deux graphiques représentent l'évolution en fonction du temps de l'équilibre entre les conformations ouvertes (noir) et fermées (rouge) de PhCpn. Le pourcentage des deux populations est obtenues à partir du rapport de l'intensité des signaux correspondant aux deux conformations dans les spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC. Les lignes représentent un lissage des données expérimentales pour permettre une lecture plus facile des graphiques.

La valeur de l'équilibre entre les conformations ouvertes et fermées obtenue à partir du premier spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC de PhCpn est d'environ 50% et non majoritairement déplacé vers la conformation fermée. Il est important de noter que ce spectre ne correspond pas à la conformation directement après l'ajout de l'ATP mais seulement à celle

### 3. ÉTUDE DU CYCLE FONCTIONNEL DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII* PAR RMN

atteinte sept minutes après. La concentration en ADP ( $\approx 30\%$ ) est déjà très importante et peut avoir un effet inhibiteur sur les modifications de PhCpn. De fait, la diminution de la concentration en ATP et l'augmentation de la concentration en ADP conduit à un retour de l'équilibre vers la conformation ouverte.

L'analyse des résidus du site actif est plus compliquée car un seul signal est observé pour chacune des méthionines, alors que deux signaux sont attendus en présence d'ATP et d'ADP. Effectivement, les résidus situés dans le site actif devraient avoir des déplacements chimiques différents en fonction du nucléotide lié comme cela a été observé pour l'ADP et l'AppNHp.



**FIGURE 3.20: Évolution du signal de la méthionine 159, correspondant au site actif, avec de l'ATP - a)** Zoom sur les spectres 2D ( $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ ) HMQC de la figure 3.18 correspondant au signal de la méthionine 159. Le spectre de référence sans ATP est en noir, celui du site actif lié à l'ATP en vert (partie 3.4.2 dans un tampon différent et avec un système de régénération de l'ATP) et à l'ADP en bleu (correspondant à la fin de la réaction), les spectres en rouge correspondent à l'expérience au temps indiqué au dessus du spectre ; **b)** Évolution du déplacement chimique du signal de la méthionine 159 cours du temps. La ligne représente un lissage des données expérimentales pour permettre une lecture plus facile du graphique.

### 3.4 Observation de l'activité ATPase de PhCpn en temps réel par RMN

---

Le déplacement chimique du signal de la méthionine 159 correspond à une position intermédiaire entre celles des signaux des états liés à l'ATP (partie 3.4.2 avec un système de régénération de l'ATP) et de l'ADP (figure 3.18(d)). De plus, ce signal évolue avec le temps et l'augmentation de la concentration en ADP vers la position de l'état lié à l'ADP (correspondant à la fin de la réaction).

Après que tout l'ATP a été hydrolysé ( $\approx 60$  min), il n'est plus possible d'observer de changements. Le spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC correspond à celui de PhCpn lié à l'ADP dans une conformation ouverte.

#### **Limitations de l'étude de PhCpn dans les conditions de la RMN :**

Comme on a pu l'observer la diminution de la concentration en ATP et l'augmentation rapide de la concentration en ADP va avoir un effet d'inactivation sur PhCpn dès les premières minutes de l'expérience. Cette diminution rapide de la concentration en ATP est due à la forte activité ATPasique liée aux concentrations élevées en PhCpn nécessaires à une étude par RMN.

Pour les études biochimiques, la concentration en chaperonine est 100 à 10000 fois inférieure et à une concentration initiale en ATP équivalente, le système va rester actif pour une période de temps beaucoup plus longue. Il serait théoriquement possible d'augmenter la concentration en ATP jusqu'à sa limite de solubilité ( $\approx 100$  mM) mais même dans ces conditions, le système ne serait actif que pour une période de temps relativement courte et l'inactivation par l'ADP serait toujours présente.

Dans les cellules, les concentrations en ATP et ADP sont finement régulées par différents systèmes enzymatiques qui permettent de maintenir à un niveau constant les concentrations en ATP et en ADP. Il pourrait être intéressant d'observer PhCpn dans des conditions similaires où la concentration en ATP serait maintenue constante pendant l'expérience.

D'un point de vue expérimental, il faudrait maintenir PhCpn dans un état actif, sans phénomène d'inactivation, afin d'enregistrer des expériences sur une plus longue durée. Cela devrait permettre de suivre des paramètres structuraux ou fonctionnels comme par exemple le repliement d'une protéine par PhCpn.

### 3. ÉTUDE DU CYCLE FONCTIONNEL DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII* PAR RMN

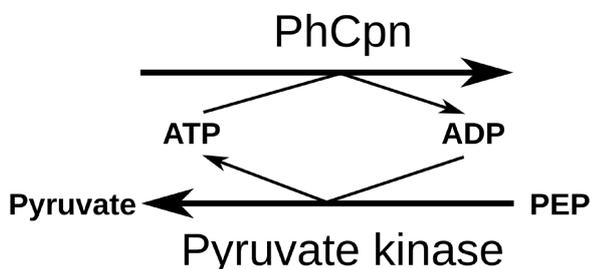
---

#### 3.4.2 Activité ATPase de PhCpn avec un système de régénération de l'ATP

Des systèmes de régénération de l'ATP ont déjà été décrits comme par exemple pour la synthèse de protéine *in vitro*. Cependant, dans le cas de l'étude de PhCpn il a été nécessaire de développer un système spécifiquement adapté pour nos conditions expérimentales.

En effet, les systèmes enzymatiques qui permettent la phosphorylation d'une molécule d'ADP en ATP sont limités à des températures de fonctionnement comprises entre 4°C et 50°C (223, 224), ce qui n'est pas suffisamment élevé pour l'étude de PhCpn (75°C). Parmi les enzymes, la pyruvate kinase qui phosphoryle de l'ADP en ATP à partir de phosphoénolpyruvate (PEP) est classiquement utilisée.

La solution que nous avons adoptée a été de remplacer cette enzyme par une enzyme équivalente provenant d'un organisme thermophile : la pyruvate kinase de *Bacillus stearothermophilus* qui est active à haute température et est la plus thermostable des pyruvates kinases connues (225).



**FIGURE 3.21: Schéma du système de régénération de l'ATP** - Schéma représentant la régénération de l'ATP par la pyruvate kinase à partir du Phosphoénolpyruvate (PEP).

Avant de pouvoir utiliser ce système de régénération de l'ATP, il va être nécessaire de prendre en compte plusieurs facteurs pour l'adapter aux conditions expérimentales de l'étude de PhCpn.

#### Conditions d'activité de la pyruvate kinase :

Les caractéristiques fonctionnelles et structurales de la pyruvate kinase de *Bacillus stearothermophilus* sont connues. Le pH optimal pour l'activité de cette enzyme est compris entre 6.5 et 7.0, le tampon est proche du tampon utilisé pour l'étude de PhCpn comme les concentrations de 50 mM en KCl et 10 mM en MgCl<sub>2</sub>. La température d'activité maximale de cette enzyme est de 60°C mais elle est active au moins jusqu'à 70°C. D'après ces données, la pyruvate kinase de *Bacillus stearothermophilus* devrait être donc active dans les conditions expérimentales de PhCpn. Cependant, les tests d'activités ont

### 3.4 Observation de l'activité ATPase de PhCpn en temps réel par RMN

été réalisés pendant 30 minutes maximum et il faudra tester le comportement de cette enzyme sur des périodes de temps nécessaires à l'étude de PhCpn.

#### Activité enzymatique de la pyruvate kinase :

Pour que le système de régénération soit suffisamment efficace, il est nécessaire que la phosphorylation de l'ADP en ATP par la pyruvate kinase soit plus rapide que l'hydrolyse de l'ATP en ADP par PhCpn. L'activité de la pyruvate kinase est d'environ 240000 mole de pyruvate/min/mole de pyruvate kinase à 60°C, ce qui est largement supérieur à l'activité de PhCpn d'environ 7 mole d'ATP/min/mole de PhCpn(particule). Par conséquent, l'activité de la pyruvate kinase est suffisante pour maintenir la concentration en ATP constante.

#### Concentration en ions et sensibilité des expériences RMN :

La régénération d'une mole d'ATP hydrolysée par PhCpn entraîne la consommation d'une mole de PEP par la pyruvate kinase. Il est possible de calculer le temps de fonctionnement théorique de la pyruvate kinase pour différentes concentrations de PEP à partir de l'activité ATPase de PhCpn (tableau 3.3).

Temps (min)	60	120	240	480
[PEP] mM	12	24	48	96

**TABLE 3.3: Temps de fonctionnement théorique du système de régénération de l'ATP en fonction de la concentration en PEP** - La consommation de PEP a été calculée avec une hydrolyse de 0.2 mM d'ATP par minute qui correspond aux conditions théoriques suivantes : 75°C, [PhCpn] = 26.3  $\mu$ M et [ATP]=10 mM

Notre système contient déjà une concentration en ions assez importante et l'ajout de plusieurs dizaines de mM de PEP va être d'autant plus défavorable pour la sensibilité des expériences RMN. Pour compenser cet effet, nous allons utiliser des tubes Shigemi 5 mm spéciaux (226) qui permettent de préserver la sensibilité malgré des concentrations en ions importantes.

Les caractéristiques de ces tubes shigemi sont présentées dans la figure 3.22. La forme de ces tubes permet de limiter la conductivité dans les zones les plus sensibles à la diffusion des ions et de concentrer l'échantillon dans la zone centrale du tube.

### 3. ÉTUDE DU CYCLE FONCTIONNEL DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII* PAR RMN

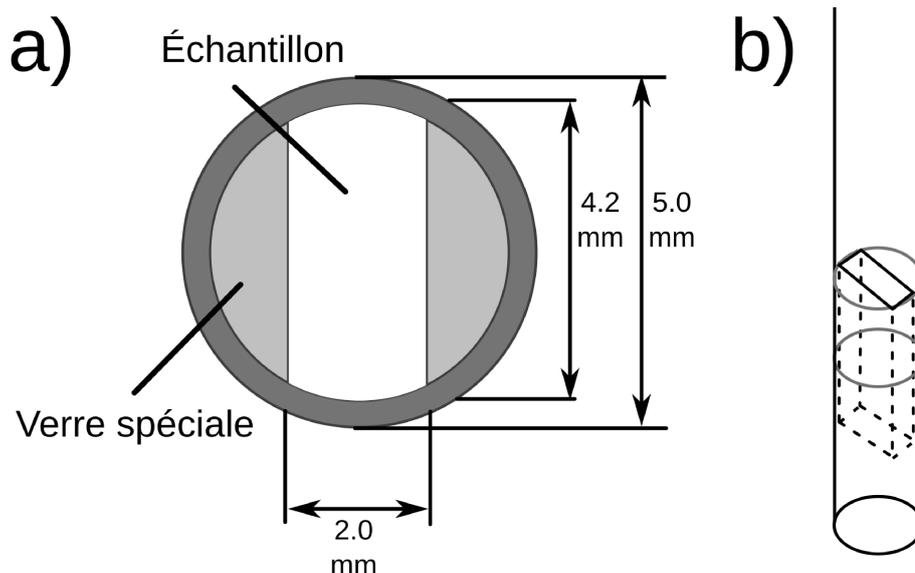


FIGURE 3.22: Schéma d'un tube shigemi adapté pour les concentrations élevées en ions - a) Vue de dessus du tube avec la position de l'échantillon en blanc ; b) Vue de côté du tube avec la position de l'échantillon en pointillé. Schéma adapté de Takeda *et al.* (226).

#### Acidification du milieu de réaction par la libération de pyruvate :

Le fonctionnement de la pyruvate kinase produit une mole de pyruvate par mole d'ATP régénérée. L'augmentation de la concentration en pyruvate va avoir pour effet de modifier le pH de la solution, et donc, comme nous l'avons démontré (partie 3.9), l'activité de PhCpn.

#### Composition du système de régénération de l'ATP :

En prenant en compte une concentration en [PhCpn] de  $26.3 \mu\text{M}$  et en [ATP] de  $10 \text{ mM}$ , les conditions déterminées pour le système de régénération de l'ATP sont données dans le tableau 3.4. Pour compenser l'acidification du milieu nous avons également modifié le tampon d'activité de PhCpn en augmentant la concentration en MES de  $25 \text{ mM}$  à  $100 \text{ mM}$ .

Pyruvate kinase	[PEP]	[Ribulose-5-Phosphate]
3 unités	220 mM	0.1 mM

TABLE 3.4: Composition du système de régénération de l'ATP - La concentration en pyruvate kinase est donnée en unités selon les normes du fabricant (Une unité de pk permet de convertir  $1 \mu\text{mole}$  de PEP en pyruvate par minute à pH 7.2 à  $30^\circ$ ). Le Ribulose-5-Phosphate est un activateur de la pyruvate kinase.

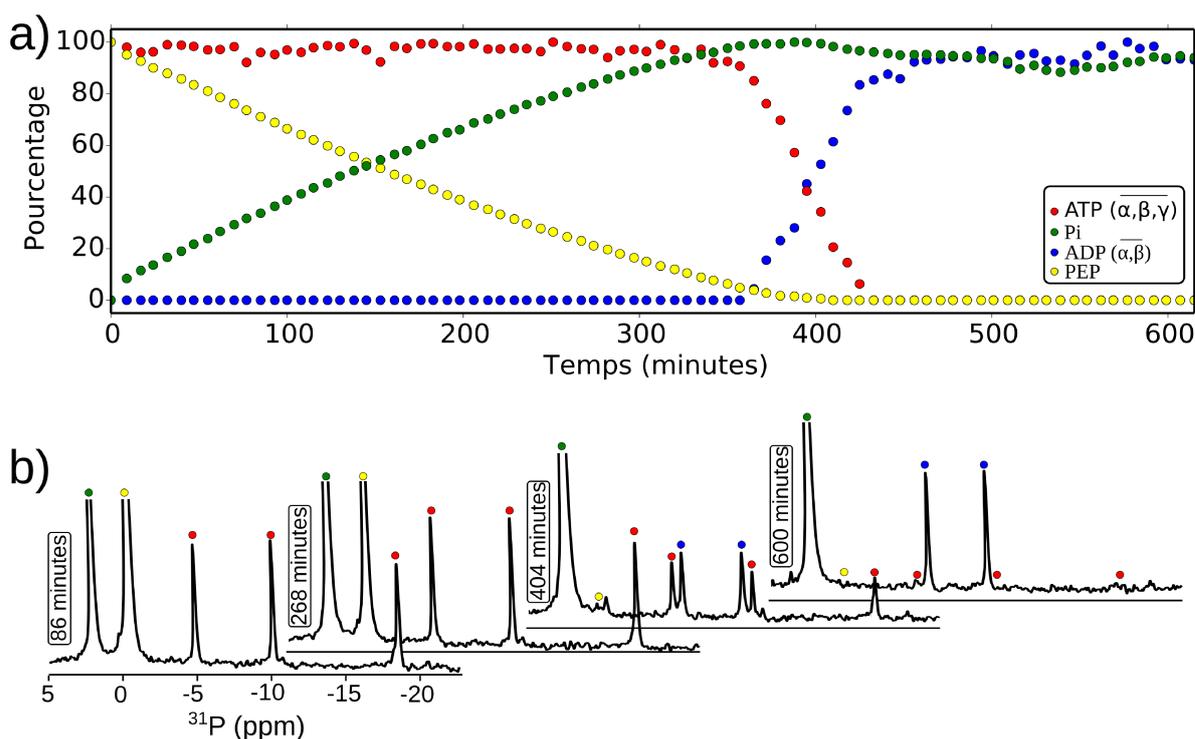
### 3.4 Observation de l'activité ATPase de PhCpn en temps réel par RMN

#### 3.4.2.1 Activité ATPase de PhCpn avec le système de régénération de l'ATP

Pour vérifier que le système de régénération est fonctionnel et stable aux températures d'activité de PhCpn deux expériences ont été enregistrées avec PhCpn à 65°C et à 75°C. Si le système de régénération fonctionne, PhCpn va hydrolyser l'ATP en ADP qui va être régénéré en ATP par la pyruvate kinase à partir du PEP. Par conséquent, le signal de l'ATP devrait rester constant et le signal du PEP diminuer de manière linéaire avec une augmentation proportionnelle du Pi.

##### Système de régénération à 65°C :

L'évolution du pourcentage d'ATP, d'ADP, de Pi et de PEP en fonction du temps est présentée dans la figure 3.23 et les spectres 1D ( $^{31}\text{P}$ ) à différents temps de l'expérience à 65°C sont présentés dans la figure 3.23.



**FIGURE 3.23: Activité ATPase de PhCpn avec le système de régénération de l'ATP à 65°C** - a) Le graphique représente le pourcentage de phosphate inorganique (Pi), de phosphoénol pyruvate (PEP), d'ATP et d'ADP en fonction du temps à 65°C ; b) Spectres 1D ( $^{31}\text{P}$ ) à différents temps de l'expérience à 65°C. L'acquisition des données a été réalisée à 65°C sur un spectromètre opérant à une fréquence du proton de 700 MHz et équipé d'une sonde cryogénique. (Conditions expérimentales :  $[\text{PhCpn}] = 26.3 \mu\text{M}$ ,  $[\text{ATP}] = 10 \text{ mM}$  et  $[\text{PEP}] = 220 \text{ mM}$ ).

### 3. ÉTUDE DU CYCLE FONCTIONNEL DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII* PAR RMN

---

On peut séparer l'expérience en trois phases. Pendant la première phase, la concentration en ATP est stable, le Pi augmente et le PEP diminue de manière linéaire jusqu'à disparaître au bout de 350 minutes. Ensuite, tout le PEP ayant été consommé, le système de régénération n'est plus actif. On retrouve ce qui a pu être observé sans système de régénération avec une diminution de l'ATP et une augmentation proportionnelle de l'ADP. Cette phase dure environ 80 minutes. La dernière phase correspond à l'hydrolyse complète de l'ATP et par conséquent aucune variation n'est observable.

Le maintien pendant 350 minutes d'une concentration en ATP stable confirme que le système de régénération est fonctionnel à une température de 65°C. De plus, l'observation d'une diminution linéaire pour le PEP montre que la pyruvate kinase est stable pendant cette période et que PhCpn hydrolyse l'ATP d'une manière constante malgré les possibles modifications du milieu réactionnel (sans ATP la diminution du PEP n'est que de 5% sur la même période de temps). L'activité ATPase pendant la phase 2 correspond à ce qui a pu être observé dans la partie précédente pour l'activité ATPase de PhCpn à 65°C avec une hydrolyse de la concentration initiale d'ATP en environ 80 minutes.

#### Systeme de régénération à 75°C :

La figure 3.24 montre l'évolution du pourcentage d'ATP, d'ADP, de Pi et de PEP en fonction du temps à 75°C. La même variation qu'à 65°C des différentes concentrations se produit, ce qui montre que le système de régénération est fonctionnel à cette température. La seule différence notable entre les deux températures est le temps nécessaire pour consommer tout le PEP (ici environ 250 minutes) qui est directement lié à l'activité de PhCpn plus élevée à 75°C.

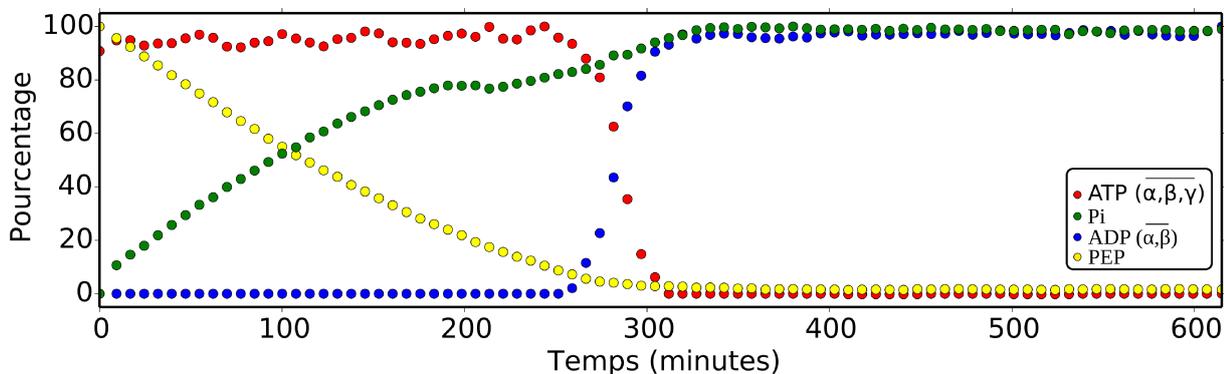


FIGURE 3.24: Activité ATPase de PhCpn avec le système de régénération de l'ATP à 75°C - Le graphique représente le pourcentage de phosphate inorganique (Pi), de phosphoénol pyruvate (PEP), d'ATP et d'ADP en fonction du temps à 75°C.

### 3.4 Observation de l'activité ATPase de PhCpn en temps réel par RMN

La concentration en ATP étant stable avec le système de régénération, il n'est pas possible d'utiliser le signal de l'ATP pour calculer l'activité ATPase. Cette activité a donc été calculée à partir de la diminution du pourcentage PEP en présence de PhCpn, corrigée de la diminution due à l'hydrolyse spontanée du PEP dans les mêmes conditions sans ATP. À chacune des deux températures, l'activité ATPase de PhCpn est augmentée d'environ un facteur 5 en comparaison des expériences sans système de régénération (tableau 3.5).

Activité ATPase	65°C	75°C
SANS régénération de l'ATP	4.5	7.3
AVEC régénération de l'ATP	25.0	38.4

**TABLE 3.5: Activité ATPase de PhCpn à différentes températures sans et avec le système de régénération de l'ATP** - L'activité ATPase est donnée en mole d'ATP/minute/mole de PhCpn(particule).

Il est possible d'expliquer cette différence d'activité par le fait que la concentration en ADP est maintenue à un niveau proche de zéro grâce au système de régénération de l'ATP. Cela semble confirmer l'hypothèse de l'inactivation de PhCpn par l'ADP sans le système de régénération de l'ATP. De plus, on peut observer que la suppression de l'ADP permet d'obtenir une activité ATPase équivalente à celle publiée par Okochi *et al.* (181).

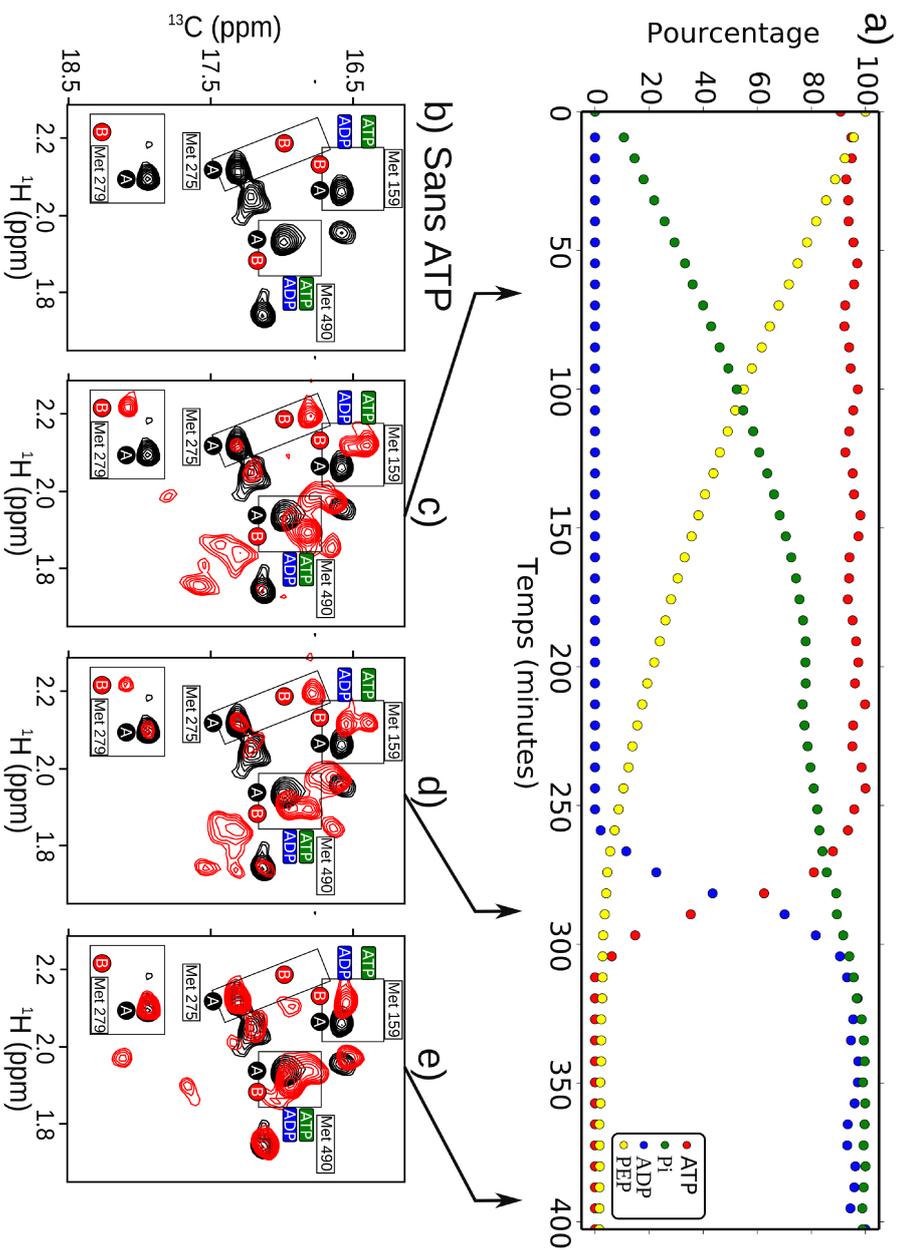
Le résultat des expériences étant similaires à 65°C et à 75°C, nous ne présenterons que les résultats obtenus pour la température de 75°C qui est la plus proche de la température physiologique de PhCpn.

#### 3.4.2.2 Modifications conformationnelles avec le système de régénération de l'ATP à 75°C

Comme nous venons de le voir, le système peut se décrire en trois phases. La première phase avec le système de régénération de l'ATP actif (0 à 250 minutes), la deuxième phase avec la diminution de l'activité (250 à 310 minutes), et la troisième phase stationnaire où tout l'ATP a été consommé (après 310 minutes).

Les spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC dans chaque phase de l'expérience sont présentés dans la figure 3.25(c). Les évolutions des conformations ouvertes et fermées de PhCpn (Met275 et 279) et de l'occupation du site actif par l'ATP et l'ADP (Met159 et 490) sont représentées dans les figures 3.26 et 3.27.

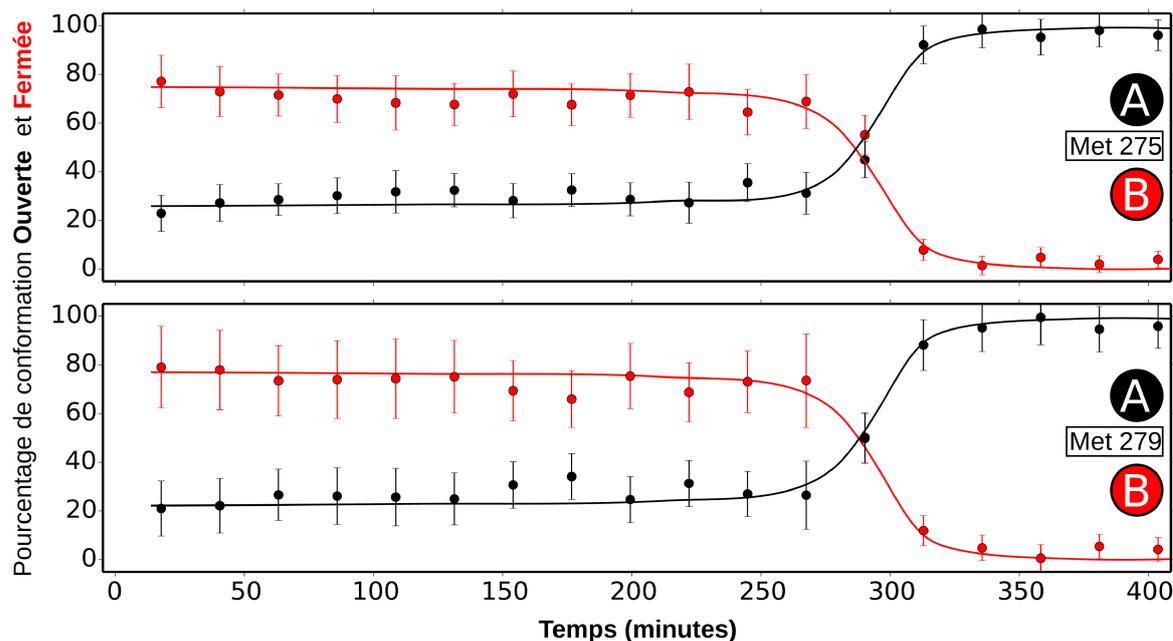
### 3. ÉTUDE DU CYCLE FONCTIONNEL DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII* PAR RMN



**FIGURE 3.25: Modifications conformationnelles de PhCpn pendant son activité ATPase avec le système de régénération de l'ATP à 75°C - a)** Le graphique représente l'évolution du phosphate inorganique (Pi), du phosphoénol pyruvate (PEP), de l'ATP et l'ADP en fonction du temps à 75°C; (b, c, d, e) Superposition des spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC de PhCpn-Met- $\epsilon$  avec la référence avant l'ajout d'ATP en noir et à différents temps après l'ajout de l'ATP en rouge. L'acquisition des données a été réalisée à 65°C sur un spectromètre opérant à une fréquence du proton de 700 MHz et équipé d'une sonde cryogénique. (Conditions expérimentales :  $[\text{PhCpn}] = 26.3 \mu\text{M}$ ,  $[\text{ATP}] = 10 \text{ mM}$  et  $[\text{PEP}] = 220 \text{ mM}$ ).

### 3.4 Observation de l'activité ATPase de PhCpn en temps réel par RMN

Lorsque le système de régénération est actif, les signaux des méthionines 275 et 279 montrent que PhCpn est majoritairement dans une conformation fermée. L'équilibre entre les conformations fermées et ouvertes est stable tout au long de cette période avec une proportion respective d'environ 75% de conformations fermées et 25% de conformations ouvertes.

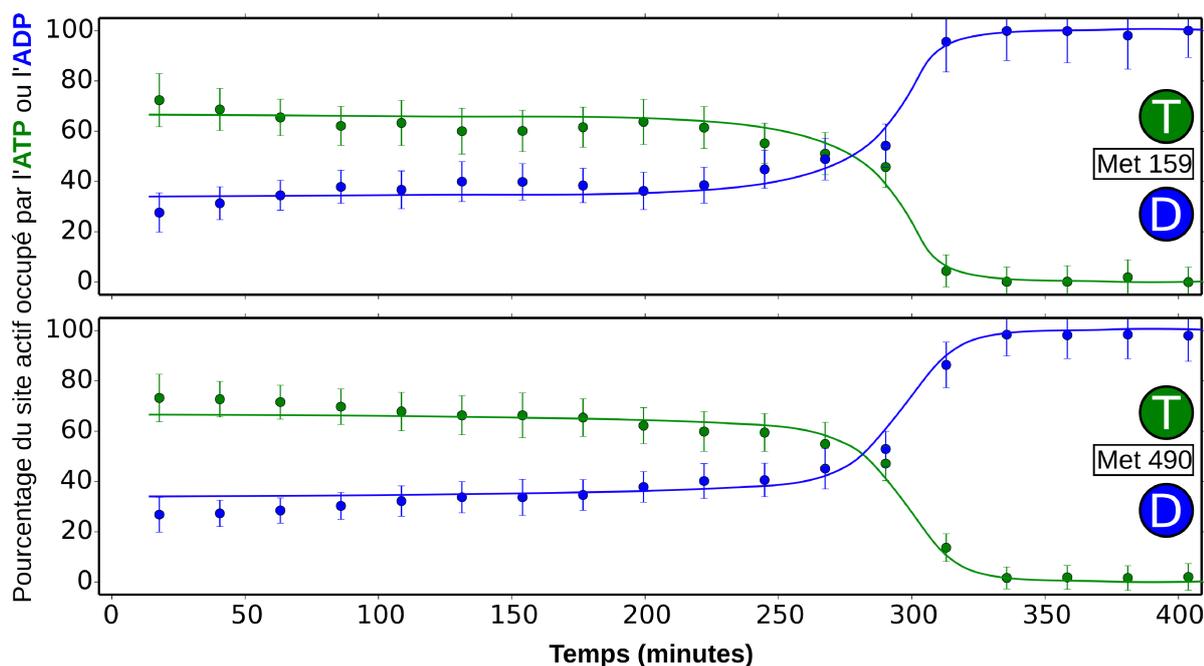


**FIGURE 3.26: Évolution des conformations ouvertes et fermées de PhCpn pendant l'activité ATPase avec le système de régénération de l'ATP** - Les deux graphiques représentent l'évolution en fonction du temps de l'équilibre entre les conformations ouvertes (noir) et fermées (rouge) de PhCpn. Le pourcentage des deux conformations est obtenu à partir du rapport de l'intensité des signaux correspondant aux deux conformations, dans les spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC, pour chaque résidu. Les lignes représentent un lissage des données expérimentales pour permettre une lecture plus facile des graphiques.

L'évolution des signaux des méthionines 159 et 490 permet d'observer un équilibre au début de l'expérience également de l'ordre de 75% :25% entre forme liée à l'ATP et forme liée à l'ADP. Par contre, au cours du temps, la proportion de forme liée à l'ATP décroît lentement au profit de celle liée à l'ADP d'environ 5 à 10% lorsqu'on se rapproche de 200 minutes.

Nous observons, malgré l'absence d'ADP en solution, un équilibre entre des états liés à l'ATP et à l'ADP sans aucun signal attribuable à un état où le site actif serait libre. Ceci

### 3. ÉTUDE DU CYCLE FONCTIONNEL DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII* PAR RMN



**FIGURE 3.27: Évolution du site actif pendant l'activité ATPase avec le système de recyclage de l'ATP** - Les deux graphiques représentent l'évolution en fonction du temps de l'équilibre entre les deux états du site actif lié à l'ATP ou à l'ADP. Le pourcentage des deux états est obtenu à partir du rapport de l'intensité des signaux correspondant aux deux états, dans les spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC, pour chaque résidu. Les lignes représentent un lissage des données expérimentales pour permettre une lecture plus facile des graphiques.

suggère que l'ADP reste présent dans l'anneau après l'hydrolyse de l'ATP. De plus, les pourcentage de site actif lié à l'ATP et à l'ADP sont équivalents aux pourcentages de conformations fermées et ouvertes. Cela confirme que l'état lié à l'ATP correspond à la conformation fermée et l'état lié à l'ADP à la conformation ouverte.

Dans la deuxième phase, la concentration en ATP diminue rapidement avec une augmentation concomitante de la concentration en ADP. L'ATP est hydrolysé à 75°C en une soixantaine de minutes comme ce qui a été observé sans système de régénération de l'ATP. Pendant cette phase les signaux des méthionines 159 et 490 montrent un passage du site actif dans un état lié à l'ADP et l'équilibre entre les conformations ouvertes et fermées est déplacé vers 100% de conformations ouvertes d'après l'intensité des signaux des méthionines 275 et 279.

Enfin, la phase stationnaire est similaire à ce qui a été observée sans système de régénération de l'ATP avec un site actif lié à l'ADP et une conformation ouverte de PhCpn.

### 3.4.3 Cycle fonctionnel avec et sans protéine cliente

Les données que nous avons présentées dans cette partie ont trait au cycle fonctionnel de PhCpn en l'absence de protéine cliente. Un modèle du cycle fonctionnel dans ces conditions sera présenté dans le chapitre 5. Cependant, d'après la littérature, le cycle fonctionnel de GroEL est modifié de manière importante en présence d'une protéine dépliée. Même si peu de données sont disponibles sur ce sujet pour les chaperonines du groupe II, il est probable que leur cycle fonctionnel puisse également être affecté par la présence d'une protéine cliente.

Dans la prochaine partie, nous allons étudier l'influence de la présence d'une telle protéine sur PhCpn dans un premier temps à l'équilibre et ensuite sur son cycle fonctionnel.

### 3. ÉTUDE DU CYCLE FONCTIONNEL DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII* PAR RMN

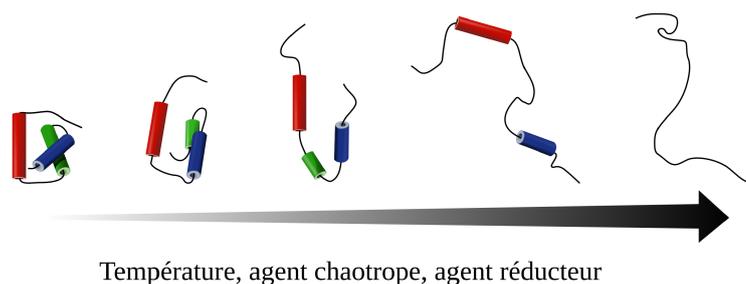
---

# Chapitre 4

## Interaction de PhCpn avec une protéine modèle : le lysozyme

### 4.1 Validation du lysozyme comme protéine cliente de PhCpn

Dans le modèle actuellement admis du repliement d'une protéine par une chaperonine, l'interaction de la protéine cliente avec la chaperonine n'est possible que si la protéine cliente est dépliée (chapitre introduction). Ainsi, pour observer cette interaction, il va être tout d'abord nécessaire de placer la protéine cliente dans les conditions permettant son dépliement.



**FIGURE 4.1: Dépliement d'une protéine** - Schéma représentant le dépliement d'une protéine en fonction de différents facteurs comme la température, la présence d'agents chaotropes ou d'agents réducteurs

Le dépliement d'une protéine peut être obtenu en utilisant différentes conditions qui favorisent sa déstabilisation comme des agents dénaturants (urée, guanidine, DTT ...etc) ou des paramètres physiques comme la pression ou la température.

## 4. INTERACTION DE PHCPN AVEC UNE PROTÉINE MODÈLE : LE LYSOZYME

---

Les chaperonines issues d'archées hyper-thermophiles sont stables jusqu'à des températures comprises entre 70 et 100°C. Par conséquent, l'utilisation de températures élevées est le paramètre le plus adapté pour permettre de déplier des protéines clientes et étudier leur interaction avec des chaperonines.

Les protéines clientes utilisées dans les études d'interactions avec des chaperonines sont très variées de par leur taille, leur état oligomérique et leur espèces d'origine. Si l'on s'intéresse plus particulièrement à l'étude des thermosomes, une protéine cliente revient dans plusieurs études : le lysozyme (123, 177, 183, 227).

En effet, cette protéine est bien adaptée à ce type d'étude car, sa température de fusion étant d'environ 70°C (228), elle est stable à des températures proches de la température d'activité de PhCpn.

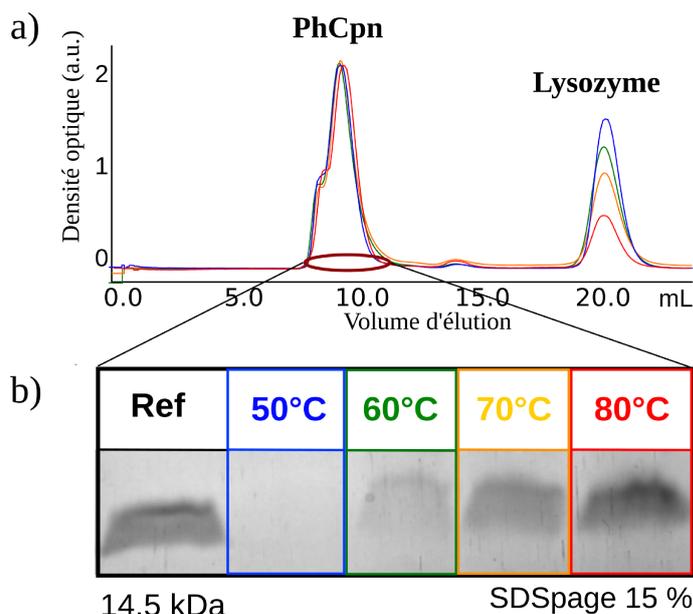
### 4.1.1 Attachement du lysozyme à la forme apo de PhCpn à différentes températures

Comme nous l'avons indiqué précédemment, dans le modèle de l'interaction d'une protéine cliente avec une chaperonine, l'interaction n'est possible que si la protéine est dépliée. Par conséquent, il est attendu qu'à basse température le lysozyme n'interagisse pas avec PhCpn. Par contre, en approchant de la température de 70°C, le lysozyme devrait se déplier et se lier à PhCpn.

Nous avons donc suivi la formation du complexe entre la forme apo de PhCpn et le lysozyme en fonction de la température. Un mélange de PhCpn avec deux équivalents de lysozyme par particule a été incubé à plusieurs températures comprises entre 50 à 80°C. Après 30 minutes d'incubation, l'échantillon a été injecté sur une colonne de CE pour séparer le lysozyme libre du lysozyme lié à PhCpn. La fraction de la CE correspondant au volume d'éluion de PhCpn a ensuite été analysée sur gel SDS-PAGE.

La figure 4.2 résume les étapes de cette expérience. Les chromatogrammes de la CE à différentes températures montrent que le signal du lysozyme diminue lorsque la température augmente. Cela peut s'expliquer soit par la formation d'un complexe entre PhCpn et le lysozyme, soit par l'agrégation du lysozyme avec la température qui va causer une diminution de son signal.

## 4.1 Validation du lysozyme comme protéine cliente de PhCpn



**FIGURE 4.2: Formation du complexe entre la forme apo de PhCpn et le lysozyme - a)** Chromatogramme de la CE (Superdex 200 Increase 10/300 GE) avec des couleurs de courbe correspondant aux températures d'incubation indiquées en (b); b) Zoom sur la région, d'un gel SDS-PAGE à 15% de poly-acrylamide, correspondant à la masse moléculaire du lysozyme. Le premier puits correspond à la référence pour le lysozyme.

L'analyse de la fraction correspondant au volume d'élution de PhCpn sur un gel SDS page montre qu'à 50°C aucune bande correspondant au lysozyme n'est observable. Cependant, avec l'augmentation de la température, une bande correspondant au lysozyme apparaît et l'intensité de cette bande augmente de manière proportionnelle à la température.

Ces résultats indiquent que PhCpn et le lysozyme forment un complexe et que la formation de ce complexe dépend de la température puisque la quantité de lysozyme lié à PhCpn augmente avec la température. Il est probable que le pourcentage de lysozyme déplié augmente en fonction de la température, ce qui favorise sa liaison à PhCpn.

### 4.2 Production et purification du lysozyme en système d'expression *Escherichia coli*

#### 4.2.1 Production et purification du lysozyme recombinant de *Gallus gallus*

Le lysozyme utilisé dans la partie précédente était du lysozyme commercial. Pour étudier l'interaction du lysozyme avec PhCPn par RMN, il a été nécessaire de sur-exprimer la forme recombinante du lysozyme avec un marquage compatible pour son étude par RMN. Comme le lysozyme va se comporter comme une particule de 1 MDa dès lors qu'il est lié à PhCpn, un marquage uniformément deutéré à l'exception de certains méthyles est indispensable pour ce type d'étude. Par conséquent, la première étape a été de mettre en place un protocole de production de la forme deutérée du lysozyme avec un marquage des groupements méthyles.

#### **Production du lysozyme recombinant de *Gallus gallus* chez *Escherichia coli* :**

Un protocole pour la production du lysozyme en système d'expression *E. coli* a été publié en 2005 par Schlörb *et al* (229). Nous avons adapté ce protocole pour la production du lysozyme en milieu minimum  $^2\text{H}_2\text{O}$  avec un marquage des groupements méthyles Ile- $^{13}\text{CH}_3$ - $\delta 1$ , Val- $^{13}\text{CH}_3$ -proS et Leu- $^{13}\text{CH}_3$ -proS.

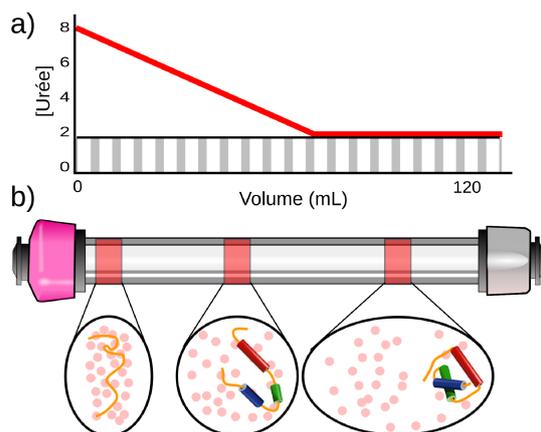
#### **Purification du lysozyme recombinant de *Gallus gallus* :**

Le protocole de purification a également été adapté de celui publié par Schlörb *et al* (229). Le lysozyme dans sa forme native présente quatre ponts disulfures. Lors de sa sur-expression chez *E. coli*, ces ponts ne sont pas formés et la protéine va s'accumuler sous forme insoluble dans des corps d'exclusions. La première étape de la purification consiste donc à extraire le lysozyme des corps d'exclusion dans cet état déplié.

Pour le repliement du lysozyme sous forme native, le protocole de dilution rapide proposé par Schlörb *et al* (229) n'a pas pu être reproduit. Par conséquent, nous avons utilisé un protocole de repliement alternatif qui est présenté dans la partie suivante.

### 4.2.2 Repliement du lysozyme sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique

Pour le repliement du lysozyme, nous avons utilisé le protocole proposé par Gu *et al.* (230). Le principe de ce protocole est résumé dans la figure 4.3 et peut être décrit en quatre étapes :



**FIGURE 4.3: Schéma du repliement du lysozyme sur colonne de CE** a) - Concentration en urée autour de la protéine pendant sa migration sur la colonne de CE ; b) Schéma de la colonne de CE avec l'évolution du repliement théorique d'une protéine avec la diminution de la concentration en urée pendant sa migration.

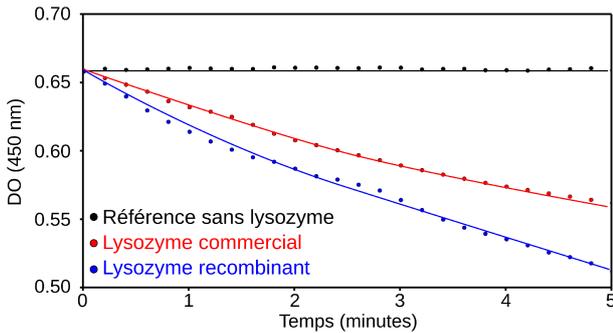
- (1) Le lysozyme est totalement déplié et réduit avec 8 M d'urée et 0.1 M de DTT.
- (2) Le lysozyme déplié est injecté sur une colonne de CE équilibrée avec un tampon TRIS 25 mM (pH 8.7), NaCl 50 mM, urée 2 M et GSH/GSSG (10/1). Le maintien d'une concentration minimale en urée va permettre d'éviter une transition trop rapide du lysozyme de 8 M d'urée à 0 M d'urée, qui conduirait à son agrégation. Le ratio entre le GSH et le GSSG va permettre l'inter-conversion des ponts disulfures du lysozyme si des ponts disulfures non-natifs sont formés de manière transitoire pendant le repliement.
- (3) La masse moléculaire du lysozyme est beaucoup plus importante que celle des agents dénaturants, il va donc migrer plus rapidement dans la colonne de CE. Par conséquent, la concentration locale en urée autour du lysozyme va diminuer de manière progressive. Cela va favoriser le repliement natif du lysozyme avec la formation des ponts disulfures.
- (4) Le lysozyme replié peut ensuite être placé dans les mêmes conditions de tampon que PhCpn.

Le rendement de purification est d'environ 5 mg de lysozyme par litre de production en milieu minimum  $^2\text{H}_2\text{O}$ . Après l'étape de repliement, ce rendement est d'environ 2.5 mg de lysozyme replié par litre de culture.

## 4. INTERACTION DE PHCPN AVEC UNE PROTÉINE MODÈLE : LE LYSOZYME

### 4.2.3 Test d'activité du lysozyme recombinant

Le lysozyme a comme activité enzymatique l'hydrolyse du peptidoglycane des bactéries à gram-positifs. Cette activité enzymatique n'existe que si le lysozyme est correctement replié. Nous avons donc mesuré cette activité d'hydrolyse en suivant la diminution de la DO à 450 nm d'une solution de cellules de *Micrococcus lysodeikticus*.



**FIGURE 4.4: Activité enzymatique du lysozyme** - La DO à 450nm a été mesurée avec un spectromètre Cary 100 UV-Vis à 25°C pour les trois échantillons.

La variation de la DO à 450 nm en absence de lysozyme, ou en présence de lysozyme commercial et de lysozyme recombinant est présentée dans la figure 4.4. Comme l'illustre cette figure, la DO à 450 nm diminue d'une manière équivalente en présence du lysozyme recombinant comme en présence de lysozyme commercial.

	Lysozyme commercial	Lysozyme recombinant
Activité U/min/mg	34514	42442

**TABLE 4.1: Activité enzymatique du lysozyme** - L'activité a été calculée à partir de la variation de la DO, avec et sans lysozyme, entre 0 et 5 minutes. Une unité (U) d'activité correspond à une variation de DO de 0.01.

Les activités enzymatiques de ces deux lysozymes sont présentées dans le tableau 4.1. Le lysozyme recombinant a une activité équivalente voire légèrement supérieure à celle du lysozyme commercial. Cette différence d'activité peut s'expliquer par un degré de pureté inférieur du lysozyme commercial qui est seulement de 90%.

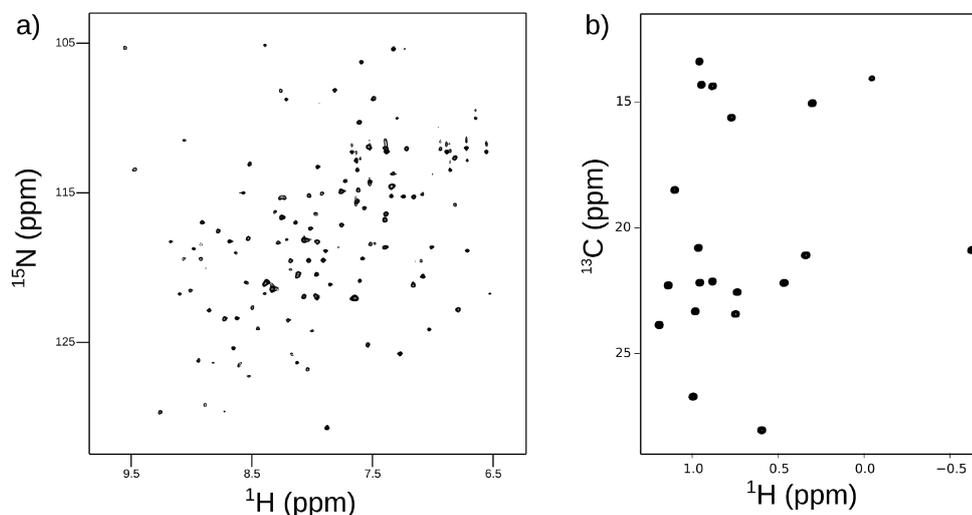
La présence d'une activité enzymatique du lysozyme recombinant démontre déjà que le repliement est correct. Cependant, il n'est pas possible avec ce test d'exclure la présence d'une certaine proportion de protéines mal-repliées ou possédant des appariements non-natifs des ponts disulfures.

#### 4.2.4 Confirmation du repliement du lysozyme recombinant par RMN

Nous avons ensuite analysé le lysozyme recombinant par RMN. Les spectres RMN vont permettre d'une part de confirmer le repliement grâce à la dispersion des signaux et d'autre part d'observer si le repliement est homogène en comparant le nombre de signaux observés avec le nombre de résidus.

Pour ces expériences, nous avons enregistré des spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) HSQC et 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC du lysozyme recombinant dans le tampon d'activité de PhCpn.

Ces spectres sont présentés dans la figure 4.5. La dispersion des signaux observée dans chacun des spectres est caractéristique d'une protéine repliée. De plus, pour le spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC, 20 signaux sont observables ce qui correspond au nombre de signaux attendus pour les isoleucines, valines et leucines. Ces données confirment donc à la fois le repliement du lysozyme recombinant et la présence d'une seule conformation fonctionnelle.



**FIGURE 4.5:** Spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) HSQC et 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC du lysozyme - a) Spectre RMN 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) HSQC du lysozyme avec un marquage U- $^{15}\text{N}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ; b) Spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC du lysozyme avec un marquage U- $^{15}\text{N}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ , Val- $^{13}\text{CH}_3$ -proS, Leu- $^{13}\text{CH}_3$ -proS, Ile- $^{13}\text{CH}_3$ - $\delta 1$ . L'acquisition des données a été réalisée à 50°C (Tampon  $^1\text{H}_2\text{O}$  pour (a) et  $^2\text{H}_2\text{O}$  pour (b)) sur un spectromètre opérant à une fréquence du proton de 850 MHz et équipé d'une sonde cryogénique. (Conditions expérimentales : [Lysozyme] = 250  $\mu\text{M}$ ) (a) et [Lysozyme] = 31  $\mu\text{M}$ ) (b).

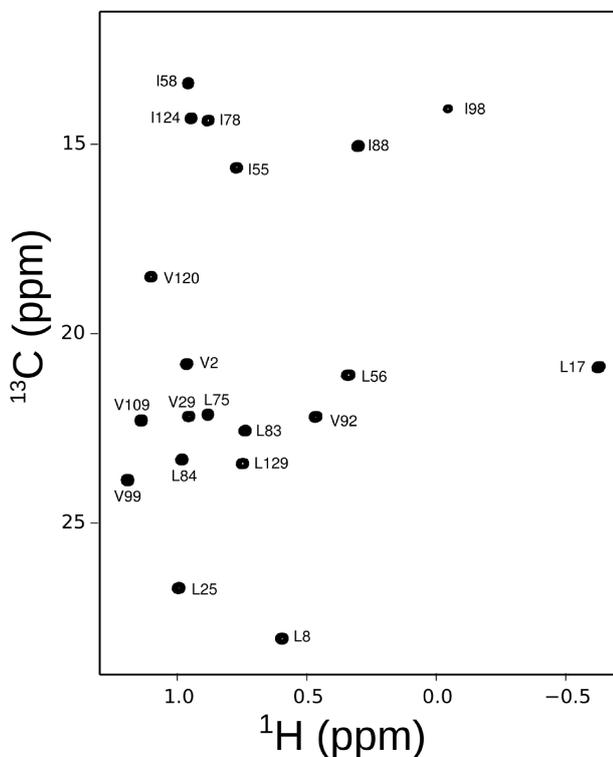
## 4. INTERACTION DE PHCPN AVEC UNE PROTÉINE MODÈLE : LE LYSOZYME

### 4.2.5 Attribution des groupements méthyles Val-[ $^{13}\text{C}$ ] $\text{CH}_3$ ]-proS, Leu-[ $^{13}\text{C}$ ] $\text{CH}_3$ ]-proS et Ile-[ $^{13}\text{C}$ ] $\text{CH}_3$ ]- $\delta 1$ du lysozyme

Dans les prochaines parties de ce chapitre, nous allons utiliser les différents méthyles Val-[ $^{13}\text{C}$ ] $\text{CH}_3$ ]-proS, Leu-[ $^{13}\text{C}$ ] $\text{CH}_3$ ]-proS et Ile-[ $^{13}\text{C}$ ] $\text{CH}_3$ ]- $\delta 1$  comme sondes locales pour l'étude des interactions du lysozyme et de PhCpn. Par conséquent, il a été nécessaire de réaliser l'attribution des signaux dans le spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC de ces différents méthyles.

L'attribution des groupements méthyles du lysozyme a été publiée par Wang *et al.* (231). Malgré les différences de tampons et de pH, le faible nombre de signaux a permis un transfert direct de l'attribution de tous les signaux par une simple comparaison des spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC (figure 4.6).

Cette attribution a été confirmée de manière indépendante en utilisant une expérience 3D HMQC-NOESY, qui pour une protéine de 14.5 kDa, permet de corrélérer des groupements méthyles jusqu'à une distance d'environ 10 Å (188, 232). La structure du lysozyme étant connue, il a été possible de directement comparer les pics de corrélation nOe observés avec la position des résidus dans la structure.



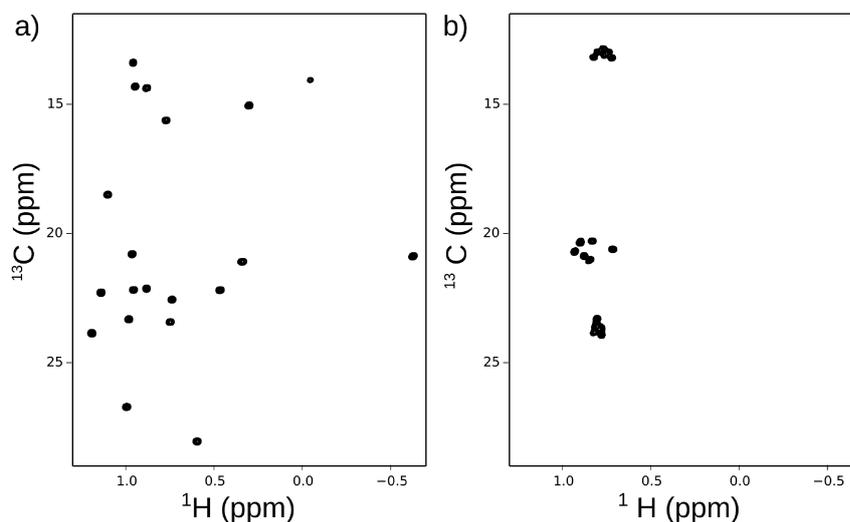
**FIGURE 4.6:** Attribution des groupements méthyles Val-[ $^{13}\text{C}$ ] $\text{CH}_3$ ]-proS, Leu-[ $^{13}\text{C}$ ] $\text{CH}_3$ ]-proS et Ile-[ $^{13}\text{C}$ ] $\text{CH}_3$ ]- $\delta 1$  du lysozyme - Spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC du lysozyme avec un marquage U-[ $^{15}\text{N}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ], Val-[ $^{13}\text{C}$ ] $\text{CH}_3$ ]-proS, Leu-[ $^{13}\text{C}$ ] $\text{CH}_3$ ]-proS et Ile-[ $^{13}\text{C}$ ] $\text{CH}_3$ ]- $\delta 1$ . L'acquisition des données a été réalisée à 50°C sur un spectromètre opérant à une fréquence du proton de 850 MHz et équipé d'une sonde cryogénique. (Conditions expérimentales : [lysozyme] = 31  $\mu\text{M}$ ).

## 4.3 Effet de la température sur le dépliement du lysozyme

### 4.3.1 Dépliement du lysozyme à 75°C

Dans la partie 4.1.1, nous avons montré qu'il est possible à une température de 80°C d'observer la formation d'un complexe entre PhCpn et le lysozyme. Nous avons émis l'hypothèse que cette interaction est due au fait qu'à cette température, le lysozyme est dans un état déplié qui peut interagir avec PhCpn.

Pour confirmer cette hypothèse, deux spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC du lysozyme ont été enregistrés à 50°C (a) et 75°C (b) (figure 4.7).



**FIGURE 4.7: Dépliement du lysozyme à 75°C** - Spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC du lysozyme avec un marquage U- $^{15}\text{N}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ], Val- $^{13}\text{CH}_3$ ]-proS, Leu- $^{13}\text{CH}_3$ ]-proS et Ile- $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\delta 1$  à 50°C (a) et à 75°C (b). L'acquisition des données a été réalisée sur un spectromètre opérant à une fréquence du proton de 850 MHz et équipé d'une sonde cryogénique. (Conditions expérimentales : [lysozyme] = 31  $\mu\text{M}$ )

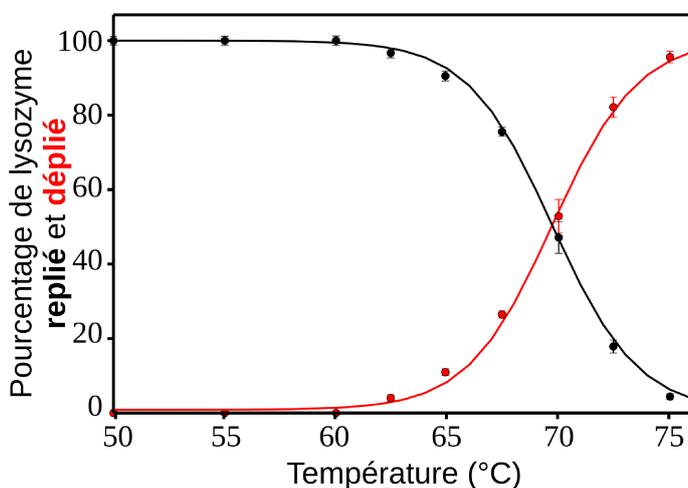
La comparaison des spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC à 50°C et à 75°C montre que les signaux correspondant à l'état replié ne sont plus visibles à 75°C. Par contre, de nouveaux signaux apparaissent qui n'étaient pas présents à 50°C. Ces signaux sont regroupés de plus dans une zone réduite de la fenêtre spectrale, ce qui est caractéristique des signaux attendus pour une protéine dépliée. Nous pouvons donc conclure que le lysozyme est effectivement dans un état majoritairement déplié à la température de 75°C.

## 4. INTERACTION DE PHCPN AVEC UNE PROTÉINE MODÈLE : LE LYSOZYME

### 4.3.2 Dépliement du lysozyme à différentes températures

De même, l'interaction entre PhCpn et le lysozyme apparaît comme dépendante de la température (partie 4.1.1). Cela suggère que l'équilibre en les états repliés et dépliés du lysozyme est déplacé par la température vers l'état déplié qui peut alors interagir avec PhCpn.

Pour confirmer cette hypothèse, des spectres 2D ( $^1\text{H},^{13}\text{C}$ ) HMQC du lysozyme ont été enregistrés pour des températures de 50 à 75°C. Les pourcentages d'états dépliés et repliés sont présentés dans la figure 4.8.



**FIGURE 4.8: Dépliement du lysozyme à différentes température entre 50°C et 75°C** - Le graphique représente l'évolution des états repliés et dépliés du lysozyme à différentes températures entre 50°C et 75°C. Le pourcentage des deux états a été extrait à partir du ratio entre l'intensité des signaux des états repliés et dépliés. Un échantillon différent a été utilisé pour chaque température. (Conditions expérimentales :  $[\text{lysozyme}] = 31 \mu\text{M}$ ).

Comme l'illustre la figure 4.8 l'état replié du lysozyme est stable jusqu'à environ 60°C. Par la suite, le pourcentage d'état replié diminue avec l'augmentation de la température jusqu'à s'approcher de 0% à 75°C. Cette observation permet de confirmer l'hypothèse que nous avons émis sur la formation du complexe entre PhCpn et le lysozyme déplié.

Il est possible de déterminer une température de fusion ( $T_m$ ) du lysozyme de 69.4°C. Dans des conditions équivalentes en pH et en ions, une  $T_m$  de 71°C a été publiée par Blumlein *et al.* (233). La  $T_m$  étant dépendante de nombreux facteurs comme la concentration ou la deutération de la protéine, un écart de moins de 2°C indique que le lysozyme recombinant se comporte d'une manière équivalente au lysozyme commercial.

### 4.3.3 Caractérisation de l'échange entre les états dépliés et repliés du lysozyme

L'observation de deux ensembles de signaux pour les états repliés et dépliés du lysozyme montre qu'ils sont en échange lent. En fonction de la cinétique de cet échange, il peut être possible de caractériser une constante d'échange en utilisant une expérience RMN de type EXchange SpectroscopY (EXSY) (234).

Les expériences EXSY ont été enregistrées sur un spectromètre Bruker opérant à une fréquence du proton de 700 MHz et équipé d'une sonde cryogénique. 12 incréments ont été enregistrés pour chaque FID, avec un temps d'acquisition total de 30 minutes par spectre et un délai de recyclage de 1 sec. Des temps de mélange compris entre 0.001 s et 1.3 s ont été utilisés. Les expériences ont été enregistrées à 71°C avec un échantillon U-[<sup>15</sup>N, <sup>12</sup>C, <sup>2</sup>H], Val-[<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>]-proS, Leu-[<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>]-proS, Ile-[<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>]-δ1 à une concentration de 61 μM.

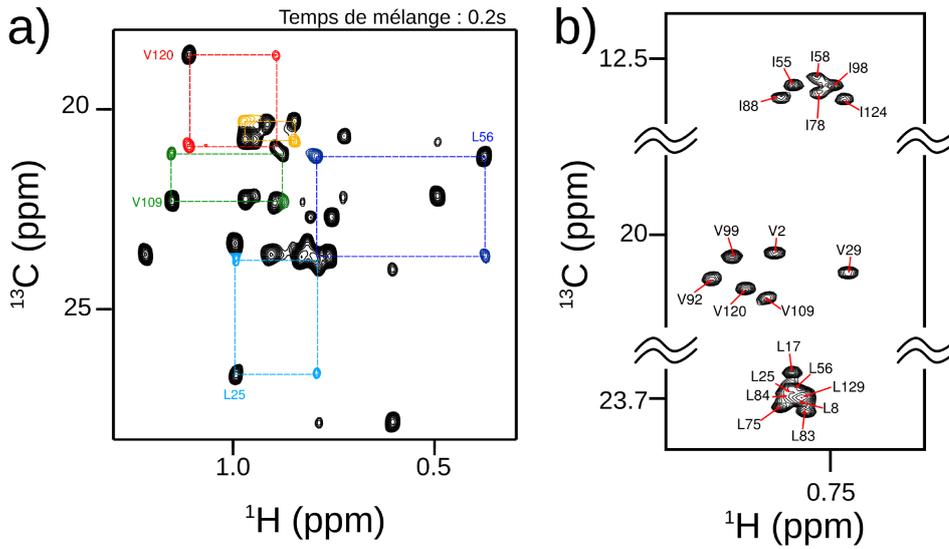
Pour chaque expérience EXSY, en plus des signaux diagonaux (états repliés et dépliés), il est possible d'observer deux pics de corrélation EXSY entre les états repliés et dépliés du lysozyme (figure 4.9(a)). Tout d'abord, nous avons utilisé les pics de corrélation EXSY pour transférer l'attribution de l'état replié vers l'état déplié du lysozyme. Ensuite, à partir des expériences avec différents temps de mélange, il a été possible de déterminer les constantes d'échange entre les états dépliés et repliés.

#### 4.3.3.1 Transfert de l'attribution de l'état replié vers l'état déplié du lysozyme

Pour le transfert de l'attribution nous avons utilisé le temps de mélange qui permet d'obtenir les pics de corrélation EXSY les plus intenses. La figure 4.9(a) illustre quelques exemples de transfert de l'attribution de signaux de l'état déplié à partir de l'état replié. Pour chaque résidus, les pics de corrélation EXSY sont colorés avec la même couleur et des traits en pointillés permettent de connecter le signal de l'état replié avec le signal de l'état déplié.

Il a été possible de transférer la totalité des attributions de l'état replié vers l'état déplié et l'attribution de cet état est donnée dans la figure 4.9(b). On notera cependant que la superposition entre les signaux des leucines ne permet pas de séparer tous les signaux attribués.

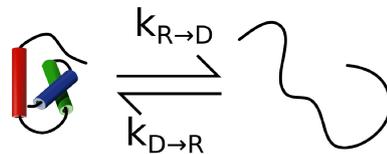
## 4. INTERACTION DE PHCPN AVEC UNE PROTÉINE MODÈLE : LE LYSOZYME



**FIGURE 4.9:** Attribution des groupements méthyles Val- $[^{13}\text{CH}_3]$ -proS, Leu- $[^{13}\text{CH}_3]$ -proS et Ile- $[^{13}\text{CH}_3]$ - $\delta 1$  de l'état déplié du lysozyme - Attribution du spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC du lysozyme déplié avec un marquage U- $[^{15}\text{N}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ], Val- $[^{13}\text{CH}_3]$ -proS, Leu- $[^{13}\text{CH}_3]$ -proS, Ile- $[^{13}\text{CH}_3]$ - $\delta 1$ . a) Exemples de transfert de l'attribution de signaux de l'état replié vers l'état les signaux de l'état déplié. Les pics de corrélation EXSY sont dans la même couleur que l'attribution du signal du résidu replié. Les traits en pointillés permettent de connecter les signaux repliés et dépliés avec les deux pics de corrélation EXSY ; b) Attribution du lysozyme déplié à  $75^\circ\text{C}$ . (Conditions expérimentales :  $[\text{lysozyme}] = 61 \mu\text{M}$ )

### 4.3.3.2 Échange entre les états repliés et dépliés du lysozyme

Dans l'hypothèse d'un modèle avec un échange entre deux états, l'échange entre les états dépliés et repliés peut être décrit avec trois équations (234) :



$$I_{RR}(t) = P_R(P_R + P_D \exp(-k_{ex}t)) \exp(-R_1t) \quad (4.1)$$

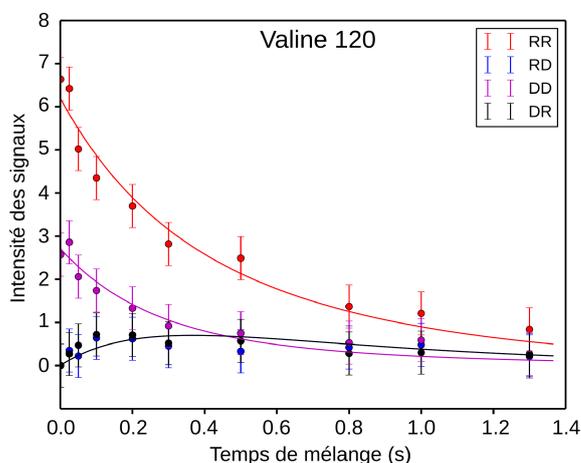
$$I_{DD}(t) = P_D(P_D + P_R \exp(-k_{ex}t)) \exp(-R_1t) \quad (4.2)$$

$$I_{RD}(t) = I_{DR}(t) = P_R P_D (1 - \exp(-k_{ex}t)) \exp(-R_1t) \quad (4.3)$$

### 4.3 Effet de la température sur le dépliement du lysozyme

avec  $P_R$  = pourcentage d'état replié,  $P_D$  = pourcentage d'état déplié,  $k_{ex} = k_{R \rightarrow D} + k_{D \rightarrow R}$ ,  $t$  = temps de mélange et  $R_1$  correspond à la relaxation longitudinal (en assumant que  $R_{1R} = R_{1D}$ ).

Les recouvrements entre les signaux de l'état déplié et certains pics de corrélation EXSY réduit fortement le nombre de résidus pour lesquels l'intensité des quatre signaux (RR, DD, R-D, D-R) peut être extraite. Cependant, il a tout de même été possible d'extraire ces quatre intensités pour deux résidus : l'isoleucine 88 et la valine 120. L'exemple de la valine 120 est montré dans la figure 4.10.



**FIGURE 4.10:** Intensité des quatre signaux de la valine 120 aux différents temps de mélange - RR = signal de l'état replié, DD = signal de l'état déplié, RD = pic de corrélation entre les états repliés et dépliés et DR = pic de corrélation entre les états dépliés et repliés. (Conditions expérimentales : [lysozyme] = 61  $\mu$ M).

L'ajustement des courbes par la méthode des moindres carrés non linéaires a permis de déterminer les constantes d'échanges entre les états repliés (R) et dépliés (D) (tableau 4.2).

$k_{D \rightarrow R}$	$k_{R \rightarrow D}$	$k_{ex}$
$0.9 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$	$2.0 \pm 0.4 \text{ s}^{-1}$	$2.9 \pm 0.4 \text{ s}^{-1}$

**TABLE 4.2:** Constantes d'échanges entre les états repliés et dépliés du lysozyme - Les valeurs d'erreurs ont été estimées par une analyse monte-carlo de l'erreur lors de l'ajustement des données

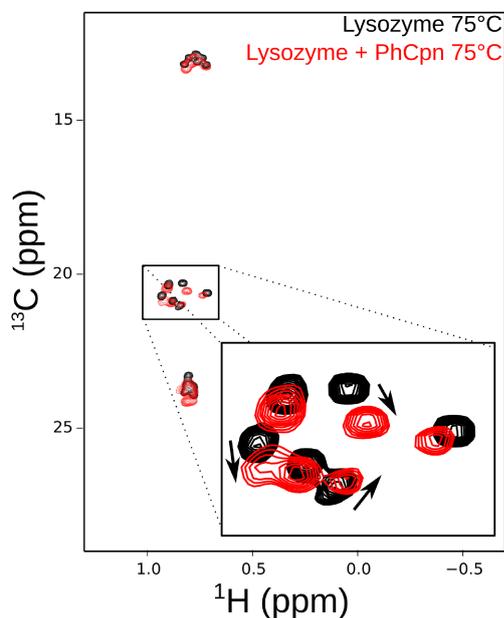
La constante d'échange obtenue est de  $2.9 \pm 0.4 \text{ s}^{-1}$  entre les états dépliés et repliés du lysozyme en accord avec un échange lent entre ces états. Nous reviendrons plus en détail sur la valeur de cette constante d'échange en rapport au  $K_D$  de l'interaction entre PhCpn et le lysozyme dans le chapitre 5.

### 4.4 Effet « holdase » de la forme apo de PhCpn

#### 4.4.1 Interaction du lysozyme avec PhCpn à 75°C

Nous avons montré précédemment que le lysozyme est dans un état majoritairement déplié à 75°C. L'interaction entre PhCpn et le lysozyme se faisant avec l'état déplié du lysozyme, nous avons caractérisé par RMN les modifications induites par la présence de PhCpn sur cet état. Nous avons utilisé un ratio de deux lysozymes pour une particule de PhCpn, dans l'hypothèse que cela permettra de saturer les deux anneaux de PhCpn.

La superposition des spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC du lysozyme seul (noir) et du lysozyme avec PhCpn (rouge) à 75°C est montrée dans la figure 4.11. En présence de PhCpn, les signaux du lysozyme présentent les caractéristiques d'une protéine dépliée. Toutefois, la majorité des signaux sont déplacés par l'interaction avec PhCpn. L'analyse des signaux montre également une diminution de leurs intensités dans ces conditions ainsi qu'une augmentation de la largeur de raie, ce qui indique le lysozyme en présence de PhCpn se comporte comme une protéine de plus haut poids moléculaire.



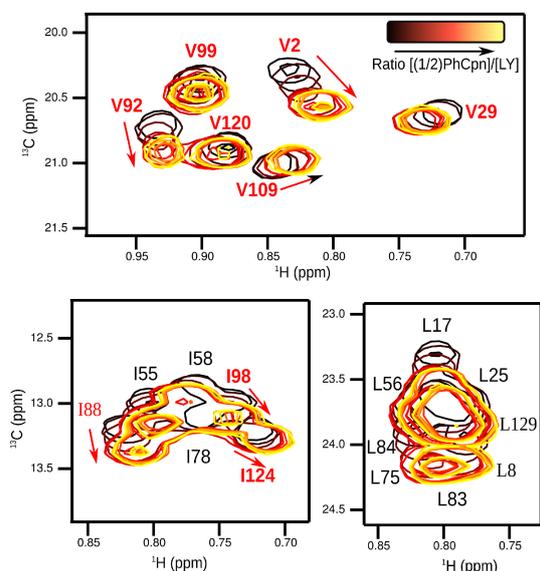
**FIGURE 4.11: Interaction entre le lysozyme déplié et PhCpn à 75°C** - Superposition des spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC du lysozyme avec un marquage U- $^{15}\text{N}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ], Val- $^{13}\text{CH}_3$ ]-proS, Leu- $^{13}\text{CH}_3$ ]-proS, Ile- $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\delta 1$  à 75°C sans PhCpn (noir) et avec PhCpn (rouge). L'acquisition des données a été réalisée sur un spectromètre opérant à une fréquence du proton de 850 MHz et équipé d'une sonde cryogénique. (Conditions expérimentales :  $[\text{PhCpn}] = 15 \mu\text{M}$  et  $[\text{lysozyme}] = 31 \mu\text{M}$ )

Ces modifications du spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC du lysozyme permettent de confirmer l'hypothèse que nous avons émise sur l'interaction entre le lysozyme et PhCpn à 75°C.

### 4.4.2 Détermination de l'affinité de l'interaction entre PhCpn et le lysozyme

Nous avons ensuite mesuré l'affinité de l'interaction entre ces deux protéines par RMN. Pour cela, nous avons titré l'une des protéines (Lysozyme) par l'autre protéine (PhCpn). Pour cette expérience, une sonde cryogénique petit-volume a été utilisée, ce qui permet d'utiliser un échantillon pour chaque ratio PhCpn/Lysozyme et ainsi d'éviter les problèmes de dilution.

Les spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC à  $75^\circ\text{C}$  du lysozyme avec un marquage U- $^{15}\text{N}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ], Val- $^{13}\text{CH}_3$ -proS, Leu- $^{13}\text{CH}_3$ -proS, Ile- $^{13}\text{CH}_3$ - $\delta 1$  pour différents ratio  $(1/2)\text{PhCpn}/\text{Lysozyme}$  sont présentés dans la figure 4.12.



**FIGURE 4.12: Interaction entre PhCpn et le lysozyme dépliée** - Spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC du lysozyme à  $75^\circ\text{C}$  avec différentes concentrations de PhCpn. L'attribution est indiquée pour chaque signal et les attributions en rouge correspondent aux signaux suffisamment résolus pour être utilisés pour le titrage. Les flèches rouges montrent un déplacement significatif d'un signal avec l'augmentation de la concentration en PhCpn.

Parmi les signaux des vingt résidus marqués, neuf sont suffisamment résolus pour suivre leur déplacement chimique en fonction de la concentration en PhCpn. Six de ces signaux présentent une variation de  $\Delta\delta$  supérieure à 0.05 ppm et ont donc été utilisés. L'analyse des données a été faite dans un modèle où chaque anneau de PhCpn est un site d'interaction indépendant et où la liaison du lysozyme à un anneau ne modifie pas l'affinité de l'autre anneau. L'interaction peut être décrite comme une interaction entre deux protéines avec une constante d'affinité ( $K_D$ ) :

$$K_D = \frac{[P][L]}{[PL]} \quad (4.4)$$

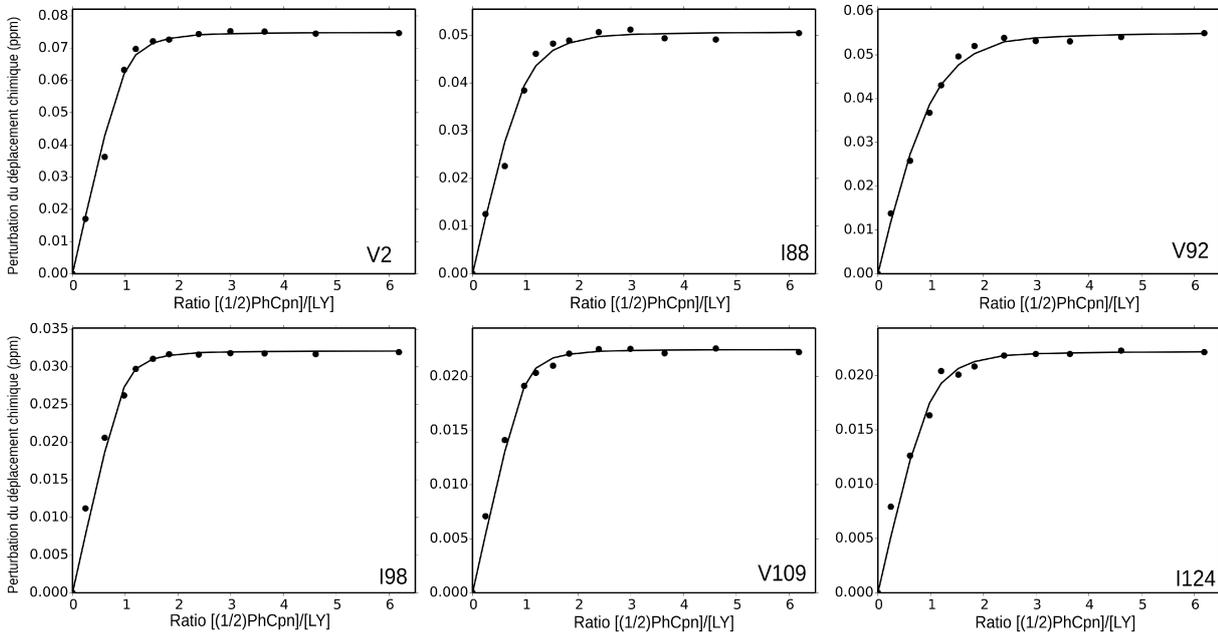
où  $[P]$  correspond à la concentration en anneau de PhCpn ( $(1/2)\text{PhCpn}$ ),  $[L]$  la concentration en lysozyme et  $[PL]$  la concentration du complexe  $(1/2)\text{PhCpn}$ -Lysozyme.

## 4. INTERACTION DE PHCPN AVEC UNE PROTÉINE MODÈLE : LE LYSOZYME

Les courbes de perturbations chimiques ( $\Delta\delta$ ) de ces signaux ont été ajustées par la méthode des moindres carrés non linéaires avec l'équation 4.5 et le résultat de cet ajustement est présenté dans la figure 4.13 :

$$\Delta\delta = \frac{\Delta\delta_{max}}{2} \left[ \left( 1 + \frac{[P]_0}{[L]_0} + \frac{K_D}{[L]_0} \right) - \sqrt{\left( 1 + \frac{[P]_0}{[L]_0} + \frac{K_D}{[L]_0} \right)^2 - 4 \frac{[P]_0}{[L]_0}} \right]$$

(4.5)



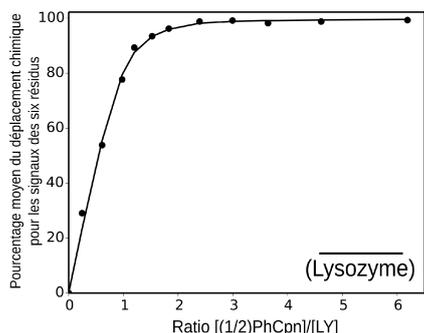
**FIGURE 4.13:** Ajustement de la perturbation du déplacement chimique pour déterminer le  $K_D$  de l'interaction entre PhCpn et le lysozyme déplié - Le déplacement chimique des signaux a été extrait des spectres 2D ( $^1H$ ,  $^{13}C$ ) HMQC présentés dans la figure 4.12.

Les valeurs des constantes d'affinités obtenues pour les six résidus sont données dans le tableau 4.3.

	V2	I88	V92	I98	V109	I124	Moyenne
$k_D$ ( $\mu M$ )	$1.1 \pm 0.7$	$2.1 \pm 0.9$	$4.8 \pm 1.6$	$0.7 \pm 0.24$	$0.8 \pm 0.3$	$2.9 \pm 0.6$	$1.6 \pm 0.4$

**TABLE 4.3:** Affinité de l'interaction (1/2)PhCpn - lysozyme - Les valeurs d'erreurs ont été estimées par une analyse monte-carlo de l'erreur lors de l'ajustement des données.

Les constantes d'affinité obtenues sont de l'ordre du  $\mu\text{M}$  avec une variation entre 0.74 et 4.84  $\mu\text{M}$ . Ces valeurs sont relativement similaires ce qui permet de montrer que même si il existe plusieurs sites d'interactions sur le lysozyme ils ont des affinités équivalentes. Ainsi, il est possible de décrire l'interaction avec un  $K_D$  obtenu à partir de l'ajustement par la méthode des moindres carrés non linéaires du pourcentage moyen de déplacement chimique des six résidus. Un  $K_D$  de  $1.6 \pm 0.36 \mu\text{M}$  a été déterminé pour l'interaction entre PhCpn et le lysozyme déplié (figure 4.14).



**FIGURE 4.14: Ajustement du pourcentage de variation du déplacement chimique moyen pour déterminer le  $K_D$  de l'interaction** - Le pourcentage du déplacement chimique moyen correspond à la valeur moyenne pour les six résidus : V2, I88, V92, I98, V109 et I124.

Peu de données sur l'affinité d'une chaperonine et d'une protéine cliente ont été publiées. De plus, toutes les études que nous avons pu trouver correspondent à l'étude de l'interaction entre GroEL et des protéines clientes. Par conséquent, notre étude semble être la première à permettre de caractériser l'affinité entre une chaperonine du groupe II et une protéine dépliée.

Chaperonine	Protéine cliente	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )	référence
GroEL	Barnase (10 kDa)	0.05	(235)
GroEL	MDH (70 kDa)	0.01	(236)
GroEL	SH3 (10 kDa)	7-50	(237)

**TABLE 4.4: Constante d'affinité entre GroEL et plusieurs protéines**

Le tableau 4.4 rassemble les affinités de GroEL avec trois protéines clientes. Ces valeurs varient de 0.01  $\mu\text{M}$  à 7-50  $\mu\text{M}$ . La comparaison avec l'affinité entre PhCpn et le lysozyme montre une valeur dans le même ordre de grandeur que celle de GroEL et SH3 (237). Il est possible que l'affinité de l'interaction soit dépendante des propriétés de la protéine (taille, charge ...etc) et le mécanisme d'interaction pourrait également être différents entre les chaperonines des groupes I et II. Cependant, le nombre limité d'études ne permet pas vraiment de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

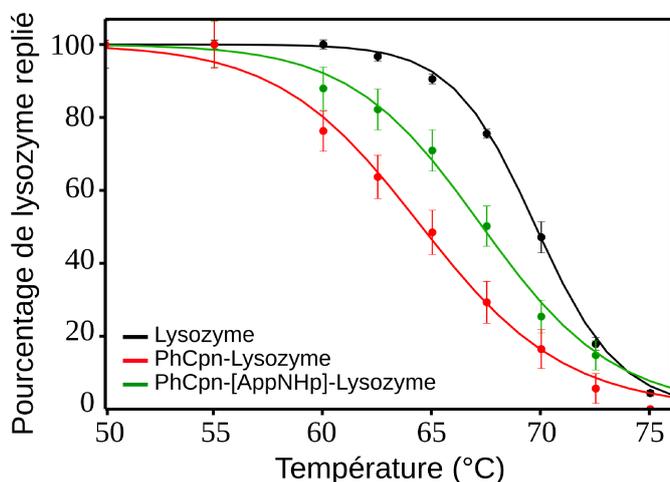
## 4. INTERACTION DE PHCPN AVEC UNE PROTÉINE MODÈLE : LE LYSOZYME

### 4.4.3 Étude de l'influence de la température sur l'interaction entre PhCpn et le lysozyme

L'interaction entre PhCpn et le lysozyme apparaît comme dépendante de la température ; l'augmentation de température induisant une plus grande proportion d'état déplié. L'équilibre entre les états repliés et dépliés du lysozyme devrait également être affecté par cette interaction.

Nous avons analysé le comportement de deux échantillons où l'équilibre entre les états repliés/dépliés du lysozyme devrait être modifié par rapport à ce qui a été observé avec le lysozyme seul (partie 4.3.2). Le premier consiste en un mélange de lysozyme et de PhCpn et le second le même mélange mais en présence d'AppNHp qui a pour effet de figer PhCpn dans une conformation partiellement fermée (chapitre 3).

Le pourcentage des états dépliés et repliés du lysozyme a été déterminé d'après les spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC enregistrés à plusieurs températures comprises entre 50 et 75°C (figure 4.15). Ce pourcentage est mesuré comme le rapport de l'intensité des signaux des états repliés et dépliés du lysozyme



**FIGURE 4.15: Dépliement du lysozyme entre 50°C et 75°C sans et avec PhCpn** - Le graphique représente l'évolution du pourcentage d'état replié du lysozyme à différentes températures entre 50°C et 75°C sans (noir) et avec PhCpn (rouge) ou PhCpn-AppNHp (vert). Un échantillon a été utilisé pour chaque température. (Conditions expérimentales : (1)  $[\text{PhCpn}] = 15 \mu\text{M}$  et  $[\text{lysozyme}] = 31 \mu\text{M}$ ; (2) +  $[\text{AppNHp}] = 2 \text{mM}$ ).

**Lysozyme + PhCpn (courbe rouge de la figure 4.8) :**

À 50°C, aucun état déplié n'est présent que ce soit en absence ou en présence de PhCpn. Comme observée précédemment (4.3.2), l'état déplié apparaît avec l'augmentation de la température. En présence de PhCpn, le pourcentage d'état déplié est beaucoup plus important que pour le lysozyme seul. Par exemple, à 67°C, l'état déplié est peuplé à plus de 70% avec PhCpn alors que sans PhCpn il y a environ 20% d'état déplié.

**Lysozyme + PhCpn + AppNHp (courbe verte de la figure 4.8) :**

En présence d'AppNHp, l'évolution du pourcentage de lysozyme replié en fonction de la température est intermédiaire entre ce qui est observé pour le lysozyme seul et le lysozyme + PhCpn. Ce résultat confirme que la fermeture partielle de PhCpn permet de diminuer le nombre de site d'interactions et que le lysozyme n'interagit qu'avec la conformation ouverte de PhCpn.

À partir de l'ajustement des courbes par la méthode des moindres carrés non linéaire avec l'équation 4.6 (238), la température de fusion ( $T_m$ ), l'enthalpie ( $\Delta H$ ) et l'entropie ( $\Delta S$ ) de l'équilibre entre les états dépliés et repliés du lysozyme (tableau 4.5) ont pu être déterminés.

$$\frac{[D]}{([R] + [D])} = \frac{\exp(T\Delta S - \Delta H)/RT}{1 + \exp(T\Delta S - \Delta H)/RT} \quad (4.6)$$

	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (J/mol-degK)	$T_m$ (°C)
Lysozyme	121,3 ± 4.1	354.6 ± 12.1	69.4
Lysozyme + PhCpn	68,5 ± 4.5	203.4 ± 13.2	64.2

**TABLE 4.5: Détermination de la  $T_m$ , de l'enthalpie et de l'entropie de l'équilibre entre les états dépliés et repliés du lysozyme sans et avec PhCpn** - Les valeurs d'erreurs ont été estimées par une analyse monte-carlo de l'erreur lors de l'ajustement des données.

Les valeurs de la  $T_m$  en absence et en présence de PhCpn confirment que l'interaction avec PhCpn déplace l'équilibre entre les états dépliés et repliés du lysozyme. La diminution de la  $T_m$  est de 5.2°C.

#### 4. INTERACTION DE PHCPN AVEC UNE PROTÉINE MODÈLE : LE LYSOZYME

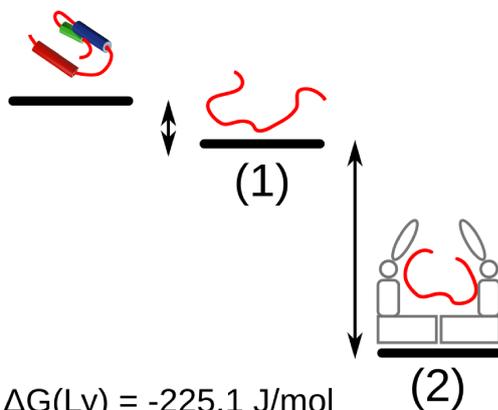
---

Nous observons également une forte diminution de la valeur du  $\Delta S$  en présence de PhCpn. Il est vraisemblable que le confinement du lysozyme déplié dans la cavité de PhCpn diminue l'espace conformationnel accessible par rapport au lysozyme déplié en solution. De même, le  $\Delta H$  diminue pratiquement de moitié, ce qui correspond à une stabilisation de l'état déplié dans la cavité de PhCpn, par rapport à l'état déplié en solution. Cette stabilisation pourrait s'expliquer par une interaction entre les surfaces hydrophobes de PhCpn et de l'état déplié du lysozyme.

Il est possible de représenter l'effet de PhCpn sur le lysozyme en calculant l'enthalpie libre ( $\Delta G$ ) de l'équilibre entre les états repliés et dépliés du lysozyme à une température de 70°C avec l'équation 4.7.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4.7)$$

La différence d'enthalpie libre  $\Delta G$  de l'équilibre en présence ou en absence de PhCpn entre les états repliés et dépliés du lysozyme à une température de 70°C est illustrée par la figure 4.16.



**FIGURE 4.16: Enthalpie libre de l'équilibre entre les états dépliés et repliés du lysozyme à 70°C** - Schéma représentant le  $\Delta G$  de l'équilibre entre les états dépliés et repliés du lysozyme à une température de 70°C. (1) Lysozyme, (2) Lysozyme + PhCpn.

L'enthalpie libre de l'équilibre entre les états dépliés et repliés diminue fortement en présence de PhCpn. Cela confirme que l'état déplié du lysozyme est stabilisé par l'interaction avec PhCpn.

Le mode d'action de la forme apo de PhCpn peut donc être décrit comme celui d'une "holdase" qui permet la stabilisation de l'état déplié du lysozyme par un effet enthalpique plus important que l'effet entropique de confinement dans la cavité. Ainsi, l'état déplié va être protégé de l'agrégation mais sans ATP, PhCpn ne va pas intervenir dans le processus de repliement du lysozyme.

#### 4.4.4 Observation de la formation du complexe entre le lysozyme déplié et PhCpn

L'affinité de l'interaction entre l'état déplié du lysozyme et PhCpn (partie 4.4.2) est de  $1.6 \pm 0.4 \mu\text{M}$ . Par conséquent, la stabilité du complexe entre les deux protéines devrait être suffisamment importante pour observer une modification du coefficient de diffusion translationnel du lysozyme déplié lié à PhCpn.

La prédiction des coefficients de diffusions théoriques du lysozyme et de PhCpn avec le logiciel HYDRONmr (239) donne un facteur 20 de différence entre les deux protéines (tableau 4.6). Si le lysozyme forme un complexe stable avec PhCpn, on peut s'attendre à ce que son coefficient de diffusion s'approche alors de celui de PhCpn. De plus, la position des signaux des états dépliés et repliés du lysozyme étant différente, il sera possible de caractériser l'interaction de chacune de ces formes avec PhCpn.

	Lysozyme	PhCpn
65°C	$2.27 \times 10^{-6} \text{ cm/s}^2$	$4.69 \times 10^{-7} \text{ cm/s}^2$
75°C	$3.13 \times 10^{-6} \text{ cm/s}^2$	$6.48 \times 10^{-7} \text{ cm/s}^2$

**TABLE 4.6: Coefficient de diffusion théorique ( $\text{cm/s}^2$ ) du lysozyme et de PhCpn**  
 - Les coefficients de diffusions ont été prédits avec le logiciel HYDRONmr (239) pour des températures de 65°C et 75°C en utilisant la structure du lysozyme (code PDB : 6LYZ) et le modèle de la conformation ouverte de PhCpn (chapitre 1).

Pour pouvoir séparer les signaux du lysozyme de ceux de PhCpn, les groupements méthyles dans chacune des deux protéines ont été marquées de façon à ne pas avoir de recouvrement. Deux échantillons ont été utilisés pour ces expériences : (1)  $[\text{lysozyme}] = 92 \mu\text{M}$  et (2)  $[\text{lysozyme}] = 92 \mu\text{M} + [\text{PhCpn}] = 46 \mu\text{M}$ .

Lysozyme	U- $^{15}\text{N}, ^{12}\text{C}, ^2\text{H}$ ], Val- $^{13}\text{CH}_3$ ]-proS, Leu- $^{13}\text{CH}_3$ ]-proS, Ile- $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\delta 1$
PhCpn	U- $^{15}\text{N}, ^{12}\text{C}, ^2\text{H}$ ], $^{13}\text{CH}_3$ ]-Met- $\epsilon$

Les coefficients de diffusion translationnelle du lysozyme et de PhCpn ont été déterminés avec des expériences 3D DOSY-TROSY (Diffusion-Ordered SpectroscopY) (240). Les paramètres pour la diffusion DOSY sont :  $\Delta = 100 \text{ ms}$ ,  $\delta = 4 \text{ ms}$ ,  $\tau = 0.2 \text{ ms}$  et un délai de recyclage de 1 sec. La puissance du gradient varie de 0.963 à 47.187 G/cm ( $2 * 8$  points).

## 4. INTERACTION DE PHCPN AVEC UNE PROTÉINE MODÈLE : LE LYSOZYME

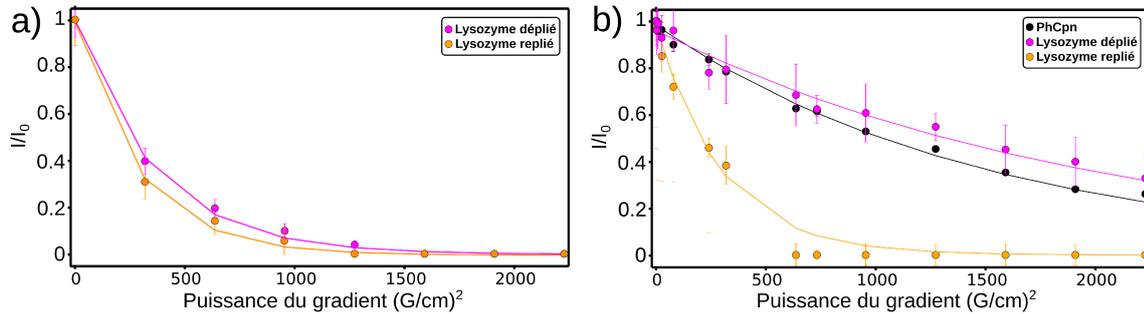
Les expériences ont été enregistrées à des températures de 65°C et 75°C pour chacun des échantillons. Les valeurs des coefficients de diffusion obtenus à partir de l'ajustement des courbes expérimentales par la méthode des moindres carrés non linéaires avec l'équation 4.8 sont donnés dans les tableaux 4.7 et 4.8.

$$\frac{I}{I_0} = \exp\left(-D\gamma^2 g^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} - \frac{\tau}{2}\right)\right) \quad (4.8)$$

### Formation du complexe à 65°C (figure 4.17) :

L'expérience de référence ( lysozyme seul) montre que les états dépliés et repliés ont des coefficients de diffusion équivalents. De plus, ces coefficients sont dans le même ordre de grandeur que les valeurs théoriques obtenues avec HYDROnmr.

En présence de PhCpn à 65°C, l'équilibre entre les états dépliés et repliés du lysozyme est de 50% pour chaque état.



**FIGURE 4.17:** Observation de la formation du complexe entre le lysozyme et PhCpn à 65°C - Expériences DOSY pour le lysozyme (a) et le lysozyme avec PhCpn (b). Les courbes ont été ajustées avec l'équation 4.8.

	Lysozyme R	Lysozyme D	PhCpn
Sans PhCpn	$3.10 \pm 0.11 \times 10^{-6} \text{ cm/s}^2$	$2.47 \pm 0.62 \times 10^{-6} \text{ cm/s}^2$	X
Avec PhCpn	$3.01 \pm 0.22 \times 10^{-6} \text{ cm/s}^2$	$4.39 \pm 0.23 \times 10^{-7} \text{ cm/s}^2$	$5.84 \pm 0.31 \times 10^{-7} \text{ cm/s}^2$

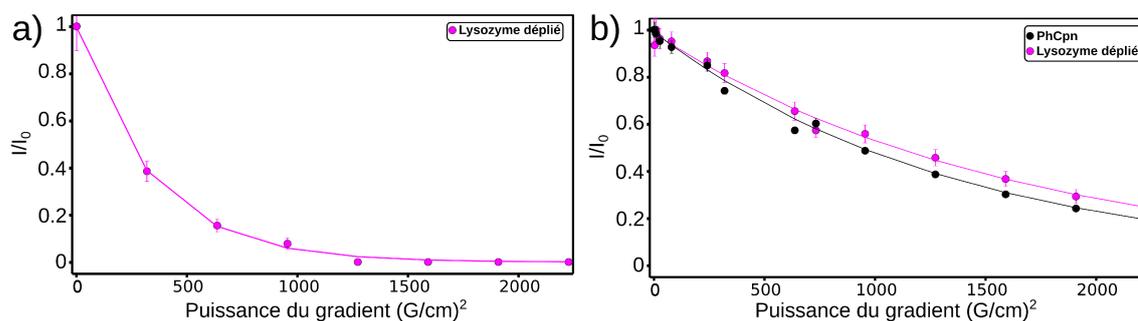
**TABLE 4.7:** Coefficient de diffusion ( $\text{cm/s}^2$ ) du lysozyme déplié (D), replié (R) et de PhCpn à 65°C - Les valeurs d'erreurs ont été estimées par une analyse monte-carlo de l'erreur lors de l'ajustement des données

Le coefficient de diffusion de l'état déplié du lysozyme est multiplié par un facteur 5 avec une valeur proche de celle de PhCpn. Ce résultat confirme donc la stabilité du complexe

formé entre cet état et PhCpn. A l'inverse, le coefficient de diffusion du lysozyme replié n'est pas modifié par la présence de PhCpn. Ce qui confirme l'absence d'interaction entre PhCpn et l'état replié du lysozyme.

#### Formation du complexe à 75°C (figure 4.18) :

A 75°C, le lysozyme seul est majoritairement déplié et son coefficient de diffusion est dans le même ordre de grandeur que la valeur théorique calculée avec HYDRONmr.



**FIGURE 4.18: Observation de la formation du complexe entre le lysozyme et PhCpn à 75°C** - Expériences DOSY pour le lysozyme (a) et le lysozyme avec PhCpn (b). Les courbes ont été ajustées avec l'équation 4.8

	Lysozyme D	PhCpn
Sans PhCpn	$2.62 \pm 0.31 \times 10^{-6} \text{ cm/s}^2$	X
Avec PhCpn	$5.52 \pm 0.20 \times 10^{-7} \text{ cm/s}^2$	$6.49 \pm 0.23 \times 10^{-7} \text{ cm/s}^2$

**TABLE 4.8: Coefficient de diffusion ( $\text{cm/s}^2$ ) du lysozyme déplié (D) et de PhCpn à 75°C** - Les valeurs d'erreurs ont été estimées par une analyse monte-carlo de l'erreur lors de l'ajustement des données

En présence de PhCpn, le coefficient de diffusion du lysozyme déplié est également multiplié par un facteur 5 avec une valeur proche de celle de PhCpn. Cela démontre à 75°C, l'existence d'une interaction du complexe entre PhCpn et le lysozyme déplié comme nous l'avions observé à 65°C.

### 4.4.5 Identification de la surface d'interaction entre PhCpn et le lysozyme déplié

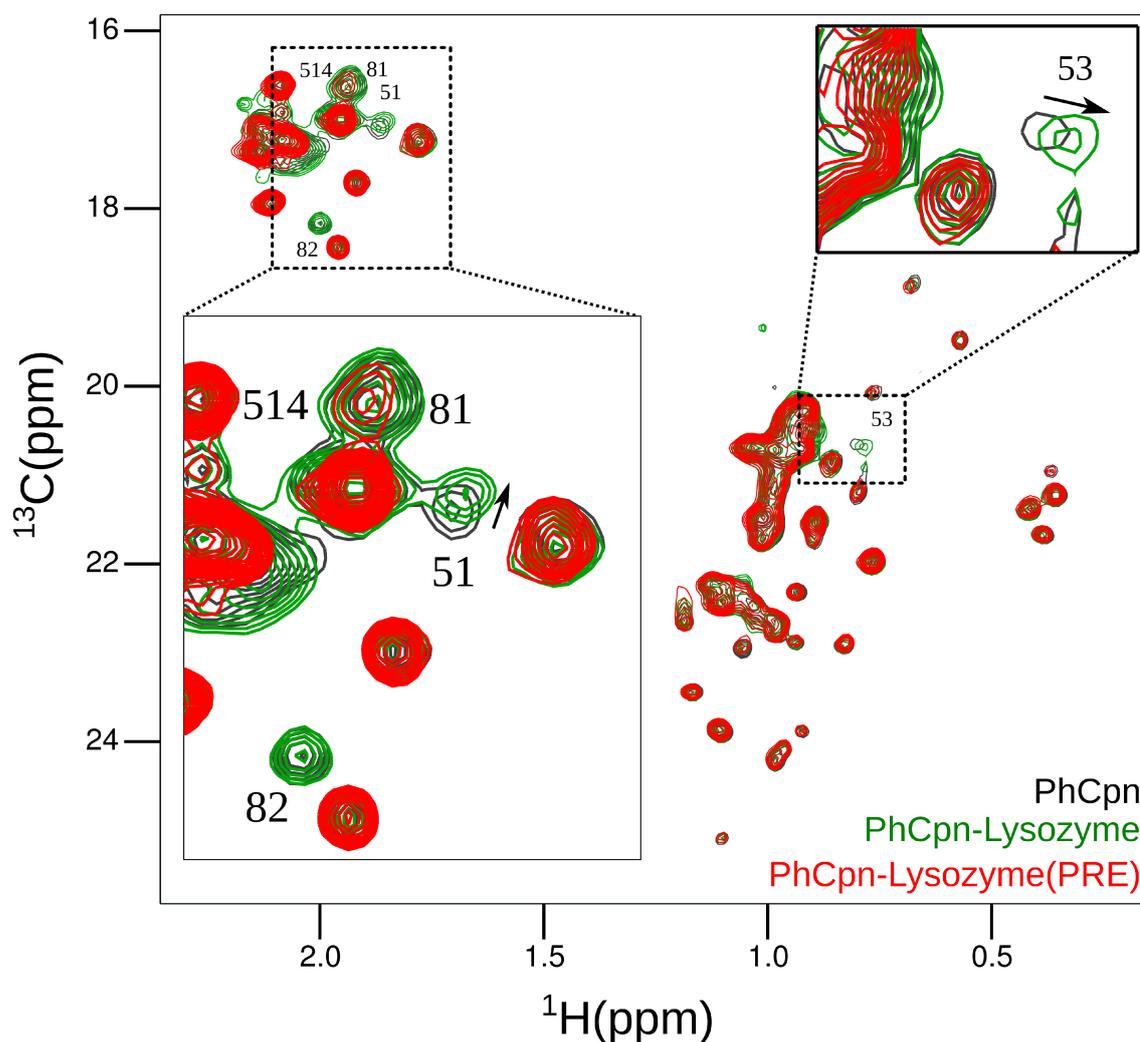
Peu d'informations structurales sont disponibles sur les sites d'interactions d'un complexe entre une chaperonine et des protéines clientes. En effet, la nature dynamique de ces complexes rend difficile leurs caractérisations par des techniques de biologie structurale comme la cristallographie de rayons X. L'étude de PhCpn en solution par RMN, va permettre de déterminer le(s) site(s) d'interaction(s) de PhCpn avec le lysozyme sans figer le complexe dans un état non fonctionnel.

Pour cette expérience, nous avons utilisé un ratio de deux lysozymes par PhCpn (particule), pour saturer les deux anneaux de PhCpn. Nous avons également choisi une température de 75°C pour totalement déplier le lysozyme. En marquant PhCpn avec un marquage U-[<sup>15</sup>N, <sup>12</sup>C, <sup>2</sup>H], Val-[<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>]-proS, Met-[<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>]-ε nous disposerons de soixante et une sondes réparties de manière homogène dans les domaines de PhCpn pour caractériser l'interaction.

#### **Effet du lysozyme déplié sur le spectre 2D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) HMQC de PhCpn :**

Les spectres 2D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) HMQC à 75°C de PhCpn enregistrés en absence de (noir) et en présence du lysozyme (vert) ne présentent que très peu de différences (figure 4.19). Les seuls changements observables sont ceux des signaux de la méthionine 51 et de la valine 53. Ces deux résidus sont situés dans la "boucle de détection" qui a déjà été proposée comme une zone d'interaction entre les chaperonines et leurs protéines clientes (155, 156, 157).

Cependant, la faible intensité de ces signaux et la faible amplitude des déplacements rend complexe l'interprétation de ces modifications. Le déplacement du signal de seulement deux des soixante et un résidus peut s'expliquer par la taille relativement faible du lysozyme par rapport à la taille de la cavité de PhCpn. En effet, avec une telle différence de taille le lysozyme ne va affecter qu'une partie des sous-unités de PhCpn avec un effet assez faible attendu sur le spectre 2D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) HMQC de PhCpn.



**FIGURE 4.19:** Superposition des spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC à 75°C de PhCpn-Met $\epsilon$ -Val-proS sans, avec le lysozyme et avec le lysozyme avec un marquage paramagnétique - PhCpn (noir), PhCpn-lysozyme (vert), PhCpn-lysozyme(PRE) (rouge). Des zoom sur les zones où des modifications du spectre sont observables sont montrés dans le spectre. L'acquisition des données a été réalisée à 75°C sur un spectromètre opérant à une fréquence du proton de 700 MHz et équipé d'une sonde cryogénique. (Conditions expérimentales : (PhCpn) [PhCpn] = 16  $\mu\text{M}$ ; (PhCpn + Lysozyme) [PhCpn] = 16  $\mu\text{M}$  et [lysozyme] = 32  $\mu\text{M}$ ; (PhCpn + Lysozyme(PRE)) [PhCpn] = 16  $\mu\text{M}$  et [lysozyme] = 32  $\mu\text{M}$ ).

#### Effet du lysozyme déplié avec un marquage paramagnétique sur le spectre 2D ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ) HMQC de PhCpn :

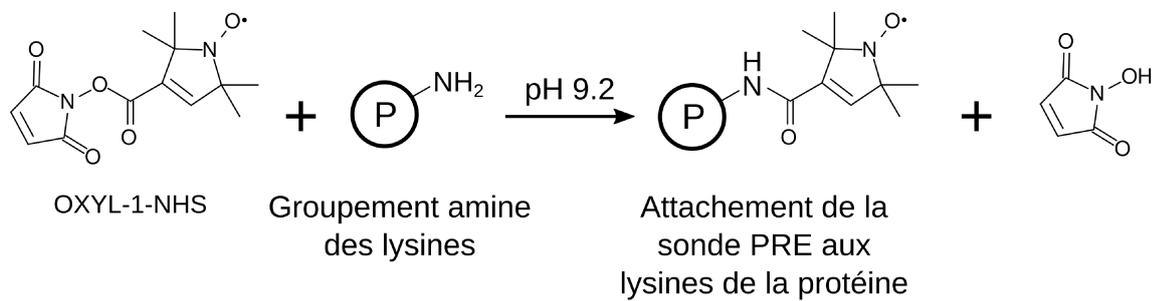
Nous avons donc introduit un marquage paramagnétique sur le lysozyme. Ce marquage va avoir pour effet d'augmenter les propriétés de relaxation des signaux des résidus situés à moins de 15 Å des sondes paramagnétiques. Ainsi, un résidu de PhCpn situé à une

## 4. INTERACTION DE PHCPN AVEC UNE PROTÉINE MODÈLE : LE LYSOZYME

---

distance de moins de 15 Å de l'interface d'interaction va voir l'intensité de son signal dans le spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC diminuer proportionnellement avec la distance entre ce résidu et le lysozyme.

Le marquage paramagnétique du lysozyme a été réalisé selon le protocole publié par Hartl *et al.* (241). Ce protocole permet un marquage paramagnétique aléatoire des résidus lysines exposés à la surface de la protéine. Le réaction permettant de marquer les lysines avec l'OXYL-1-NHS est présentée dans la figure 4.20.



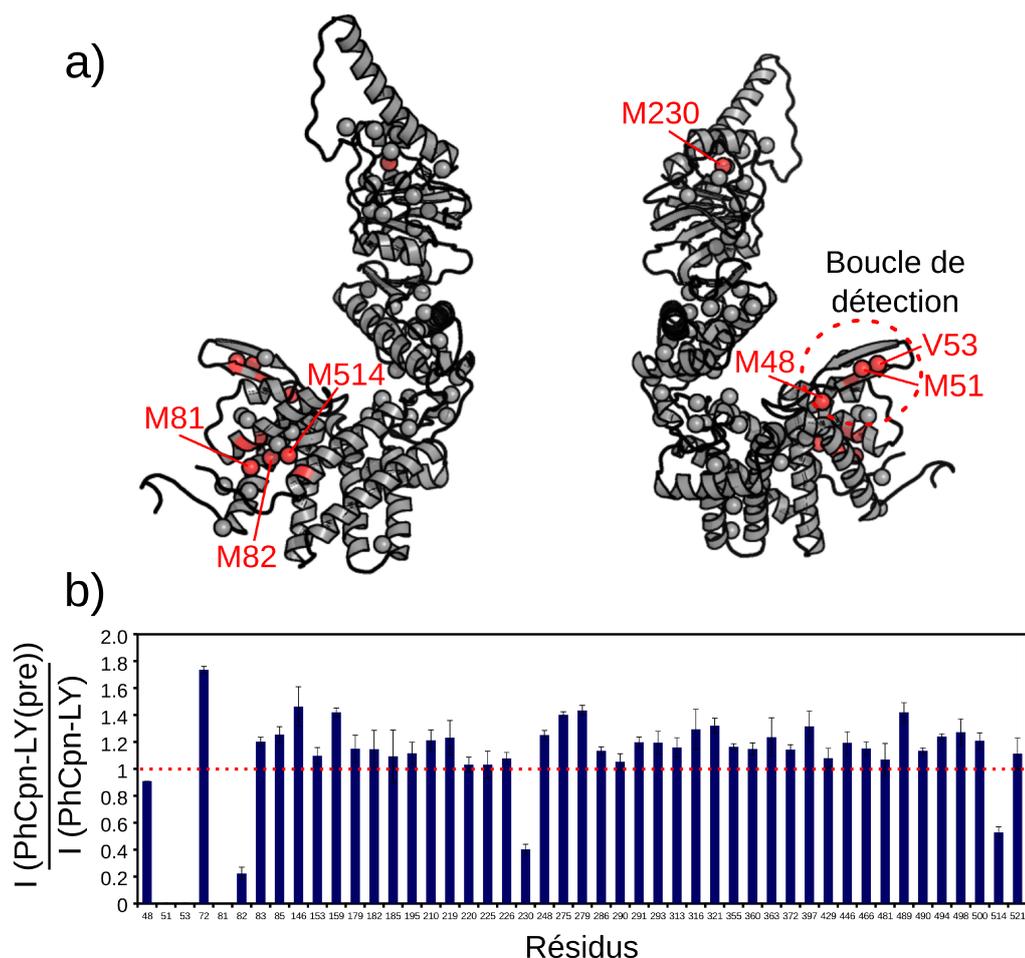
**FIGURE 4.20:** Réaction chimique du marquage des lysines avec l'OXYL-1-NHS

La comparaison des spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC de PhCpn en absence (noir) et en présence de lysozyme avec un marquage paramagnétique (rouge) permet maintenant d'observer des effets beaucoup plus importants que sans ce marquage. Les signaux de la valine 53 et de la méthionine 51 disparaissent totalement, ce qui confirme les observations sans marquage paramagnétique. De plus, deux autres signaux des méthionines 81 et 82 sont fortement affectés.

Le rapport de l'intensité des signaux avec du lysozyme "paramagnétique" divisé par l'intensité des signaux avec du lysozyme est présenté dans la figure 4.21 avec la position des résidus correspondant aux signaux les plus affectés dans le modèle de la conformation ouverte de PhCpn.

La majorité des résidus affectés se situe dans le domaine équatorial. Cela montre que le lysozyme déplié interagit avec l'intérieur de la cavité de PhCpn. Tous les résidus affectés dans le domaine équatorial correspondent à des résidus de la boucle de détection (M51, V53) ou des résidus en contact avec la boucle de détection dans la sous-unité voisine (M81, M82, M514). D'une manière surprenante un seul résidu est affecté dans le domaine apical alors que dans le modèle de l'interaction des protéines dépliés avec des chaperonines cette zone est considérée comme la zone d'interaction principale. Cependant, il est important

de noter que l'interaction entre le lysozyme et PhCpn est un processus dynamique. Nos données permettent de décrire l'interaction avec un site d'interaction majoritaire mais il n'est pas possible d'exclure des interactions transitoires avec d'autres parties de PhCpn dont l'effet n'est pas observable.



**FIGURE 4.21: Cartographie de la surface d'interaction entre PhCpn et le lysozyme** - a) Modèle de la conformation ouverte de PhCpn avec les résidus (rouge) dont une diminution du signal a été observée avec le lysozyme paramagnétique; b) Rapport de l'intensité des signaux avec du lysozyme "paramagnétique" divisé par l'intensité des signaux avec du lysozyme.

### 4.5 Observation du repliement du lysozyme par PhCpn

Dans les parties précédentes, nous avons caractérisé l'activité de "holdase" de la forme apo de PhCpn avec le lysozyme déplié. Cependant, les cellules contiennent des concentrations d'ATP de l'ordre du mM et il est peu probable que PhCpn reste durant une longue période sans ATP. Nous allons donc étudier maintenant l'évolution de l'interaction entre PhCpn et le lysozyme avec de l'ATP.

Pour définir les conditions pour l'observation du repliement du lysozyme par PhCpn, nous avons utilisé les données obtenues dans ce chapitre sur l'interaction entre le lysozyme et PhCpn, et dans le chapitre 3 sur l'activité ATPase de PhCpn sans protéine cliente.

(1) Les expériences ont été conduites à une température de 65°C afin de se placer à un équilibre entre les populations initiales des états dépliés et repliés du lysozyme d'environ 50%.

(2) Un ratio de deux lysozymes par particule de PhCpn a été utilisé pour permettre la saturation des deux anneaux par le lysozyme ( $[\text{PhCpn}] = 15 \mu\text{M}$  et  $[\text{lysozyme}] = 30 \mu\text{M}$ ).

(3) Le système de régénération de l'ATP a été utilisé pour maintenir PhCpn actif avec une concentration constante en ATP ( $[\text{ATP}] = 10 \text{ mM}$  et  $[\text{PEP}] = 129 \text{ mM}$ ).

(4) Pour suivre l'évolution du repliement du lysozyme et des modifications conformationnelles de PhCpn en même temps, les deux protéines ont été marquées avec des marquages différents des groupements méthyles qui ne présentent pas de recouvrement entre leurs signaux.

---

Lysozyme	U- $^{15}\text{N}$ , $^{12}\text{C}$ , $^2\text{H}$ ], Val- $^{13}\text{CH}_3$ ]-proS, Leu- $^{13}\text{CH}_3$ ]-proS, Ile- $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\delta 1$
PhCpn	U- $^{15}\text{N}$ , $^{12}\text{C}$ , $^2\text{H}$ ], $^{13}\text{CH}_3$ Met- $\epsilon$

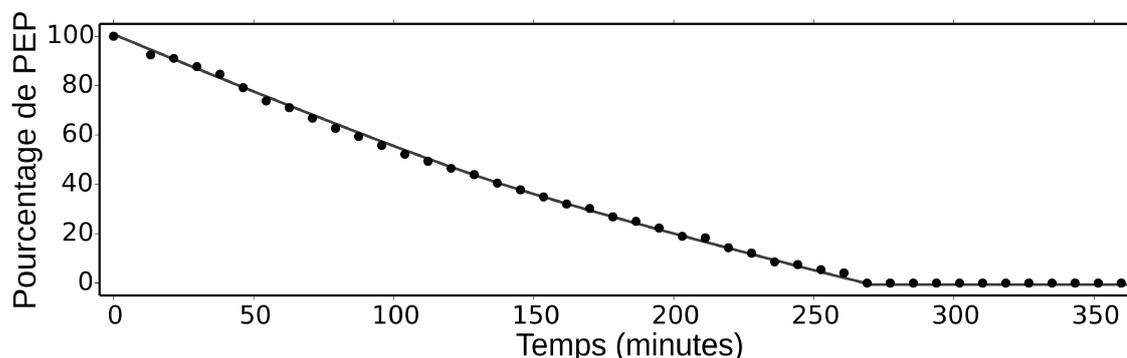
---

Le repliement du lysozyme et les modifications conformationnelles de PhCpn ont été suivis grâce à des expériences 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC. L'hydrolyse de l'ATP a été suivi grâce à des expériences 1D  $^1\text{H}$ . Ces deux expériences ont été enregistrées de manière alternée sur un échantillon ce qui a permis d'observer en parallèle le repliement du lysozyme, les modifications conformationnelles de PhCpn et la cinétique d'hydrolyse de l'ATP.

### 4.5.1 Activité ATPase de PhCpn avec le lysozyme

Dans le chapitre 3, nous avons utilisé l'évolution du signal du phosphate du PEP, avec des expériences  $^{31}\text{P}$  1D, pour calculer l'activité ATPase de PhCpn. La série d'expériences présentée ci-dessous a été enregistrée avec un spectromètre RMN ne permettant pas d'observer le  $^{31}\text{P}$ . Par conséquent, nous avons utilisé les signaux des deux protons du groupement éthyle du PEP en utilisant des expériences  $^1\text{H}$  1D pour calculer l'activité ATPase de PhCpn.

La figure 4.22 montre l'évolution de la concentration relative de PEP mesurée d'après les signaux du PEP dans ces expériences  $^1\text{H}$  1D. À partir de la diminution du pourcentage avec le temps, il est possible de calculer une activité de 39.1 mole d'ATP/min/PhCpn(particule). En comparaison, sans protéine cliente, l'activité ATPase de PhCpn à 65°C est de 25.0 mole d'ATP/min/PhCpn(particule). La présence du lysozyme déplié induit donc une augmentation de l'activité ATPase de PhCpn.



**FIGURE 4.22: Activités ATPase de PhCpn avec du lysozyme à 65°C** - Le graphique montre l'évolution du pourcentage de phosphoénol pyruvate (PEP) en fonction du temps à 65°C. Le pourcentage de PEP a été extrait à partir d'une série d'expérience 1D ( $^1\text{H}$ ) avec les deux signaux du PEP. La ligne représente un lissage des données expérimentales pour permettre une lecture plus facile du graphique.

Le système de régénération est actif pendant environ 250 minutes comme cela peut être observé sur la figure 4.22. Cette période est suffisamment longue pour observer par RMN l'évolution de l'équilibre entre les états dépliés et repliés du lysozyme et les modifications conformationnelles de PhCpn.

## 4. INTERACTION DE PHCPN AVEC UNE PROTÉINE MODÈLE : LE LYSOZYME

### 4.5.2 Repliement du lysozyme par PhCpn à 65°C

Avant l'ajout de l'ATP, l'équilibre entre les états dépliés et repliés du lysozyme en présence de PhCpn est de 50% pour chaque état (partie 4.4.3.1). Par contre, après l'ajout d'ATP, l'équilibre est fortement perturbé avec 75% d'états repliés et 25% d'états dépliés (figure 4.23) comme le montre le premier spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC enregistré après l'ajout de l'ATP.

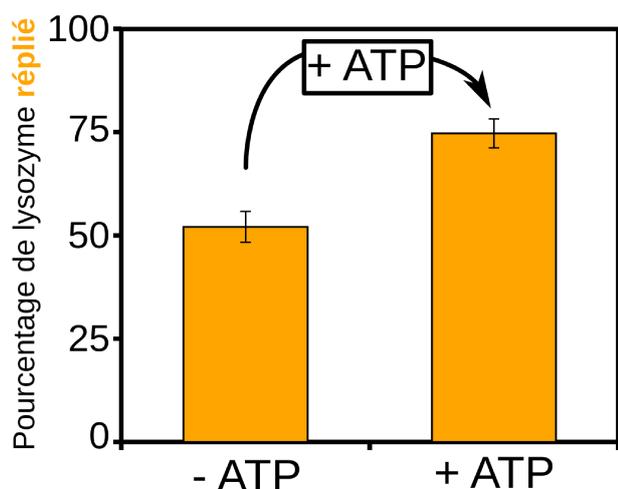


FIGURE 4.23: Repliement du lysozyme par PhCpn à 65°C - Comparaison du pourcentage d'états repliés du lysozyme avec PhCpn avant et 30 minutes après l'ajout d'ATP.

Il est intéressant de noter que l'équilibre après l'ajout de l'ATP correspond à la valeur observée pour le lysozyme sans PhCpn à 65°C. Cela montre que l'activité de PhCpn en présence d'ATP permet de replier le lysozyme à une vitesse suffisante pour compenser l'activité "holdase" de PhCpn.

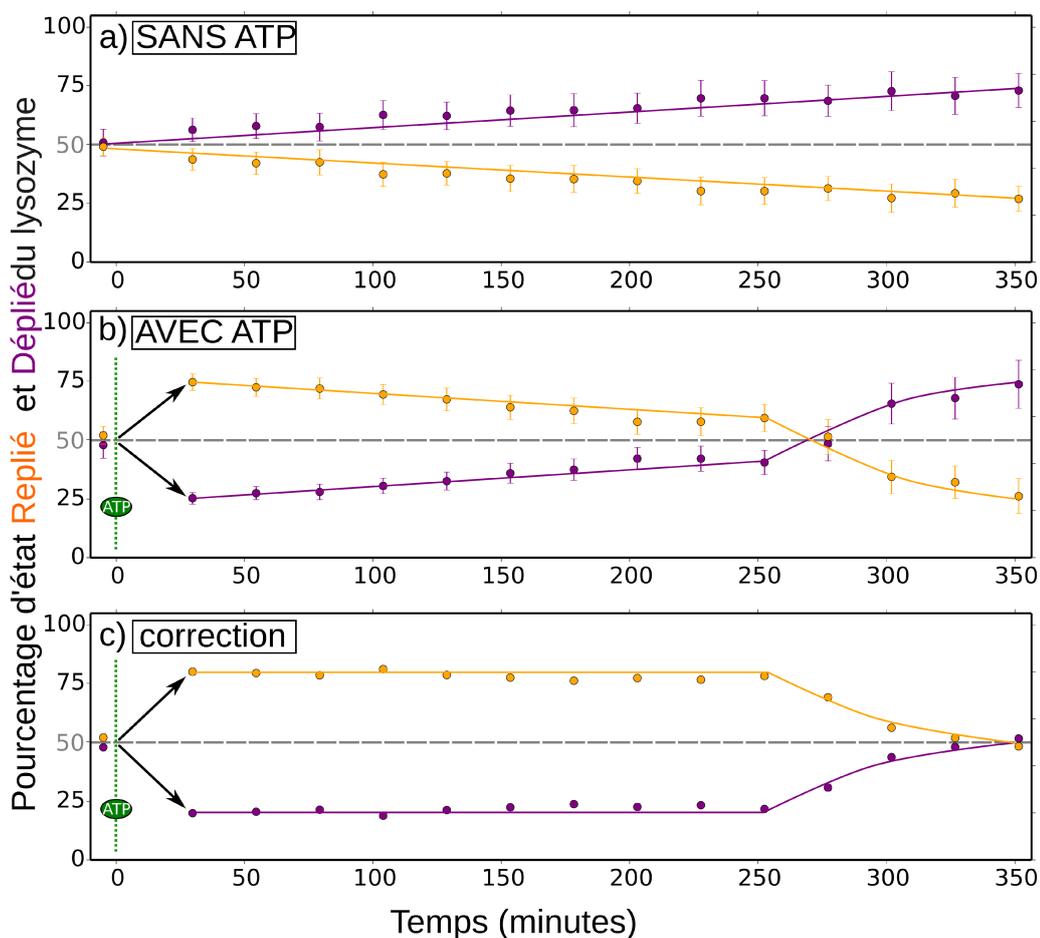
#### Évolution de l'équilibre entre les états dépliés et repliés du lysozyme :

La figure 4.24(a) montre l'évolution en fonction du temps de l'équilibre entre les états dépliés et repliés du lysozyme en présence de PhCpn mais en absence d'ATP à 65°C. Comme vu précédemment, les pourcentages des états repliés et dépliés sont équivalents. Toutefois, au cours du temps, l'équilibre se déplace progressivement vers l'état déplié jusqu'à atteindre une proportion 25% : 75% replié/déplié au bout de 250 minutes.

Ce même phénomène est observable en présence d'ATP (figure 4.24(b)), la proportion des états initiaux et finaux étant toutefois différents (de 75%/25% replié/déplié à pratiquement égale au bout de 250 minutes). Cette évolution de l'équilibre vers l'état déplié peut s'interpréter par un dépliement irréversible du lysozyme au cours du temps dans ces deux conditions. Cependant, en présence d'ATP, l'activité de PhCpn permet de maintenir un équilibre avec une majorité d'états repliés.

## 4.5 Observation du repliement du lysozyme par PhCpn

En corrigeant le pourcentage des états repliés et dépliés en présence d'ATP par les pourcentages attribuables à ce dépliement irréversible (calculées comme l'écart entre le pourcentage initiale des deux états et la variation du pourcentage observée au cours du temps sans ATP) on observe qu'en présence d'ATP l'équilibre entre les états repliés et dépliés reste stable et égal à la valeur initiale jusqu'à la fin du fonctionnement du système de régénération (figure 4.24(c)). Ensuite, l'équilibre revient à la situation initiale en absence d'ATP avec 50% environ d'états repliés et dépliés.

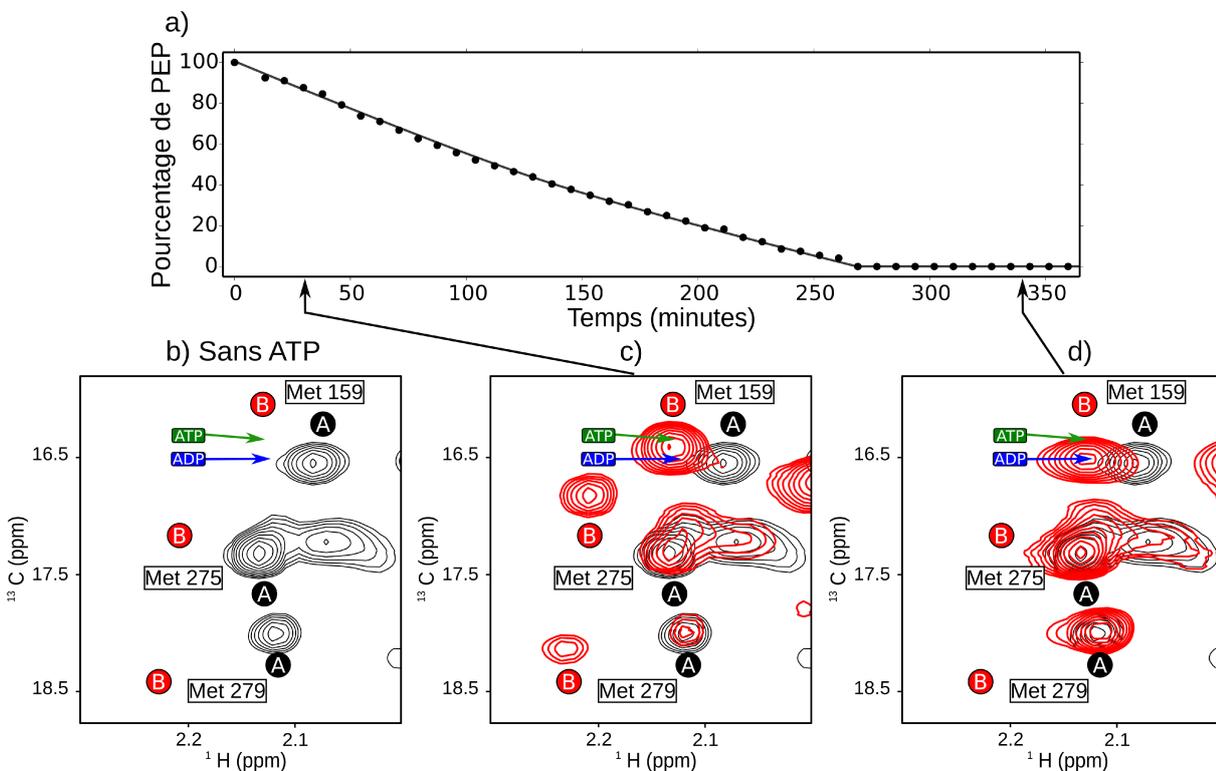


**FIGURE 4.24:** Évolution des états repliés et dépliés du lysozyme avec PhCpn à 65°C - Les deux graphiques représentent l'évolution en fonction du temps de l'équilibre entre les états repliés et dépliés du lysozyme extrait du ratio des intensités des deux états. a) sans ATP ; b) Avec 10 mM d'ATP et système de régénération ; c) Correction des données avec l'ATP en soustrayant le dépliement irréversible du lysozyme sans ATP. Les lignes représentent un lissage des données expérimentales pour permettre une lecture plus facile des graphiques.

## 4. INTERACTION DE PHCPN AVEC UNE PROTÉINE MODÈLE : LE LYSOZYME

### 4.5.3 Modifications conformationnelles de PhCpn avec le lysozyme

Comme au chapitre 3, nous avons utilisé les spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC pour suivre l'équilibre entre les conformations ouvertes et fermées de PhCpn et celui entre le site actif lié à l'ATP et à l'ADP. La figure 4.25 montre des extraits des spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC correspondant aux signaux des groupements méthyles Met- $^{13}\text{CH}_3$ - $\epsilon$  de PhCpn en particulier dans la phase où le système de régénération est actif (figure 4.25(c)) et inactif (figure 4.25(d))



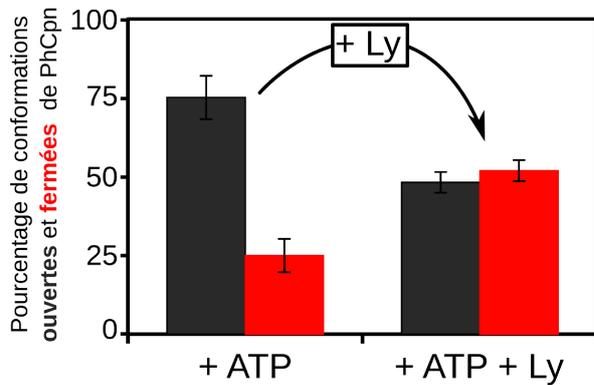
**FIGURE 4.25: Modifications conformationnelles de PhCpn avec le lysozyme à 65°C** - a) Graphique représentant le pourcentage de phosphoénol pyruvate (PEP) en fonction du temps à 65°C (figure 4.22) ; (b, c, d) Superposition des spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC de PhCpn-Met- $\epsilon$  avec la référence sans ATP en noir et à différents temps après l'ajout de l'ATP en rouge. L'acquisition des données a été réalisée à 65°C sur un spectromètre opérant à une fréquence du proton de 850 MHz et équipé d'une sonde cryogénique.

#### Équilibre entre les conformations ouvertes et fermées de PhCpn :

La quantification des signaux observés dans la figure précédente permet la mesure des différents équilibres au cours du temps. Dans la figure 4.26 sont rassemblées les valeurs de l'équilibre entre les conformations ouvertes et fermées de PhCpn après l'ajout d'ATP en

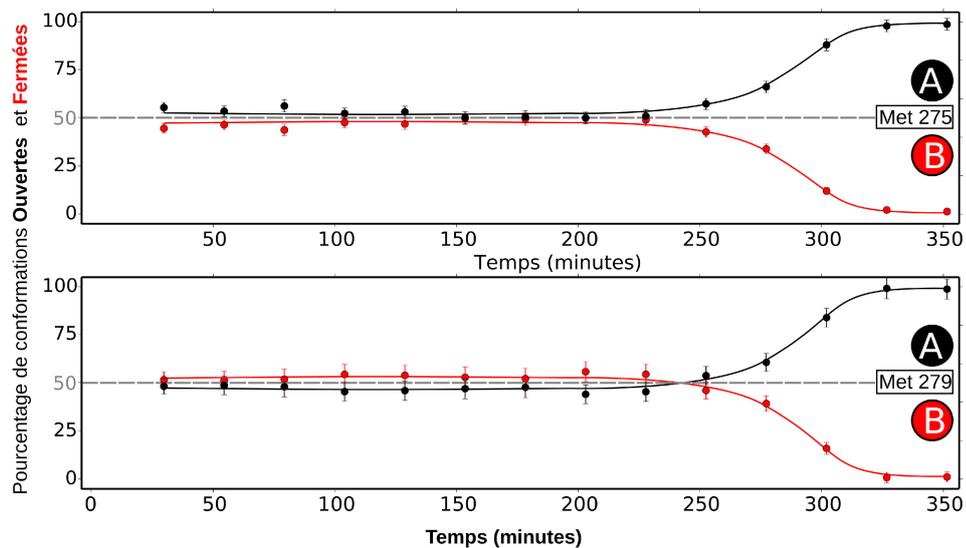
## 4.5 Observation du repliement du lysozyme par PhCpn

absence ou en présence de lysozyme. En l'absence de lysozyme, le pourcentage de conformations fermées est de 75% alors que le lysozyme induit un déplacement de l'équilibre vers les conformations ouvertes (50% :50%).



**FIGURE 4.26: Conformations ouvertes et fermées de PhCpn avec et sans le lysozyme à 65°C** - Comparaison du pourcentage de conformations ouvertes et fermées de PhCpn avec et sans lysozyme à 65°C. Le pourcentage des deux conformations est obtenu à partir du rapport de l'intensité des signaux de méthionines 275 et 279 dans les deux états.

La figure 4.27 montre l'évolution de cet équilibre au cours du temps mesuré par l'intensité des signaux des méthionines 275 et 279. Tant que le système de régénération de l'ATP est actif, l'équilibre est stable avec 50% des deux conformations. Par contre, PhCpn revient très majoritairement vers une conformation ouverte dès que la concentration en ATP revient à zéro.



**FIGURE 4.27: Évolution des conformations ouvertes et fermées de PhCpn avec le lysozyme** - Les deux graphiques représentent l'évolution en fonction du temps de l'équilibre entre les conformations ouvertes (noir) et fermées (rouge) de PhCpn. Les lignes représentent un lissage des données expérimentales pour permettre une lecture plus facile des graphiques.

## 4. INTERACTION DE PHCPN AVEC UNE PROTÉINE MODÈLE : LE LYSOZYME

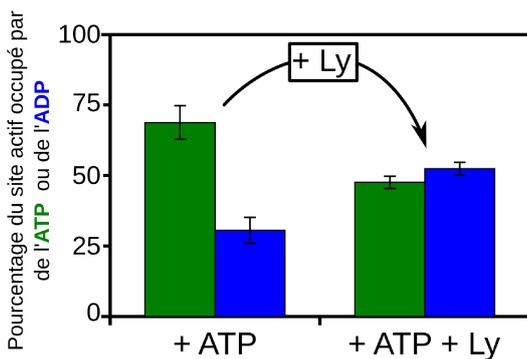
---

Ces données montrent qu'en présence du lysozyme, avec le maintien d'une concentration constante en ATP, l'équilibre entre les conformations ouvertes et fermées reste stable avec environ 50% des deux conformations. La présence du lysozyme déplié induit donc des modifications conformationnelles importantes de PhCpn en présence d'ATP à 65°C.

### Occupation du site actif par l'ATP et l'ADP avec le lysozyme :

Comme ce qui a été observé dans le chapitre 3, après l'ajout d'ATP, les signaux correspondant au site actif sont totalement déplacés dans un état correspondant au site actif occupé. Cependant, la résolution des spectres obtenus n'est pas suffisante pour séparer les signaux d'un site actif lié à l'ATP de celui lié à l'ADP (Met 159 et Met490). Il sera nécessaire pour quantifier les occupations par de l'ADP ou de l'ATP de re-enregistrer cette expérience avec une résolution équivalente à celle des expériences décrites dans le chapitre 3.

En attendant d'obtenir de nouvelles données, il a été possible d'extraire l'intensité des signaux de la méthionine 159 dans les états liés à l'ATP et à l'ADP en réalisant une déconvolution de ces signaux à partir du signal observé pour la méthionine 159. La position de ces signaux est connue grâce aux expériences du chapitre 3 (figure 3.26), en utilisant une position et une largeur de raie fixe nous avons réalisé un fit avec le script du logiciel nmrPipe (242) pour extraire l'intensité des deux signaux. Les résultats ainsi obtenus sont présentés dans la figure 4.28.

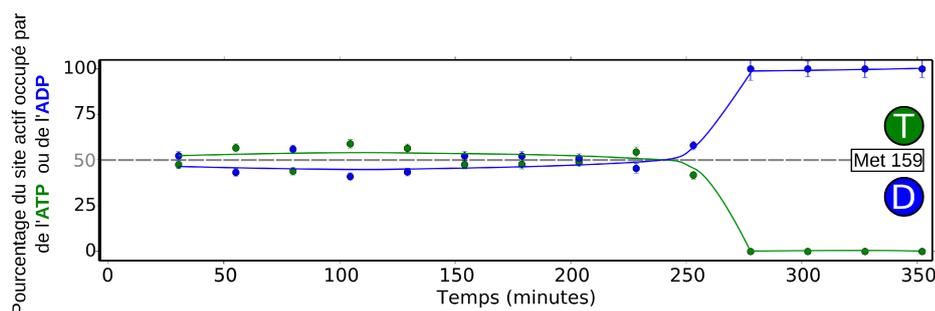


**FIGURE 4.28: Pourcentage de site actif lié à l'ATP et à l'ADP sans et avec le lysozyme à 65°C** - Comparaison du pourcentage de site actif lié à l'ATP et à l'ADP sans et avec le lysozyme à 65°C. Le pourcentage correspond au ratio de l'intensité des signaux de la méthionine 159 dans les deux états.

L'équilibre est d'environ 50% de liaison de l'ATP et 50% de liaison de l'ADP alors que l'équilibre est de 75% : 25% en absence de lysozyme. Ces données confirment l'effet observé du lysozyme déplié sur l'équilibre des conformations ouvertes et fermées de PhCpn. De plus, le pourcentage de conformations fermées correspond au pourcentage de sites liés à l'ATP et le pourcentage de conformation ouvertes correspond au pourcentage de sites liés à l'ADP comme cela avait déjà été observé en absence de lysozyme (chapitre 3).

## 4.5 Observation du repliement du lysozyme par PhCpn

La figure 4.29 montre l'évolution de l'équilibre du site actif lié à l'ATP et du site actif lié à l'ADP en présence du lysozyme. Comme pour l'équilibre entre les conformations ouvertes et fermées, l'équilibre reste stable tant que le système de régénération de l'ATP est actif. Le taux d'occupation est égal entre l'ATP et l'ADP dans la phase active du système de régénération. Dès que celui-ci s'arrête, au bout de 250 minutes, la concentration en ATP diminue jusqu'à atteindre 0 et PhCpn est uniquement lié à de l'ADP.



**FIGURE 4.29: Évolution de la liaison au site actif de l'ATP et de l'ADP** - Le graphique représente l'équilibre entre le site actif lié à l'ATP et le site actif lié à l'ADP en fonction du temps. Les pourcentages correspondent au ratio de l'intensité des signaux de la méthionine 159 dans les deux états. Les lignes représentent un lissage des données expérimentales pour permettre une lecture plus facile des graphiques.

### 4.5.4 Cycle fonctionnel avec une protéine dépliée

Dans le chapitre 3, nous avons étudié le cycle fonctionnel de PhCpn sans protéine cliente et nous avons émis l'hypothèse que la présence d'une protéine cliente pourrait entraîner des modifications du cycle. Les données présentées dans ce chapitre ont montré que la présence d'une protéine cliente permet d'augmenter l'activité ATPase de PhCpn. De plus, les équilibres entre les conformations ouvertes et fermées de PhCpn et le pourcentage d'occupation du site actif par l'ATP ou l'ADP sont également modifiés par la présence du lysozyme déplié.

Dans la prochaine partie, nous allons proposer un modèle du cycle fonctionnel de PhCpn sans et avec protéine dépliée. Les données sur l'interaction entre la forme apo de PhCpn et le lysozyme vont également permettre de proposer un modèle de l'interaction entre PhCpn et une protéine dépliée.

#### 4. INTERACTION DE PHCPN AVEC UNE PROTÉINE MODÈLE : LE LYSOZYME

---

## Chapitre 5

# Discussion et Conclusion : Modèle du fonctionnement du thermosome de *Pyrococcus Horikoshii*, un exemple de chaperonine du groupe II

Dans le chapitre 2, nous avons présenté les outils de marquages isotopiques qui permettent d'observer une chaperonine de 1 MDa par RMN du liquide. Grâce à ces outils, il a été possible d'étudier PhCpn à l'équilibre ou en action lorsque que la machinerie est engagée dans son cycle fonctionnel sans et avec une protéine dépliée (chapitre 3 et 4).

Dans ce chapitre, après avoir rappelé les précautions à prendre pour interpréter quantitativement les données obtenues par RMN, nous discuterons les modèles du cycle fonctionnel qui ont été proposés pour les chaperonines (chapitre 1) à la lumière des résultats obtenus par RMN au cours de cette thèse.

### 5.1 Limites et possibilités offertes par la RMN pour la caractérisation des différents états fonctionnels de PhCpn

Avant de pouvoir donner une description du modèle du cycle fonctionnel de PhCpn, il est nécessaire de revenir sur la méthode que nous avons utilisé pour déterminer l'équilibre entre les différents états conformationnels de PhCpn.

## 5. DISCUSSION ET CONCLUSION : MODÈLE DU FONCTIONNEMENT DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII*, UN EXEMPLE DE CHAPERONINE DU GROUPE II

---

En utilisant la forme apo de PhCpn et celle liée à un analogue non hydrolysable de l'ATP, nous avons pu obtenir des signatures spectrales des conformations ouvertes ou fermées et somme en mesure d'identifier l'état d'occupation et la nature du nucléotide dans le site actif. Pour ces types de changements lents ( $>$  secondes), l'analyse quantitative des populations de chaque états a été réalisée en utilisant la rapport de l'intensité du signal des méthionines dans les deux états. Il est possible de considérer ce rapport comme représentant l'équilibre entre les populations en faisant l'hypothèse que les vitesses de relaxation longitudinale et transversale des méthionines dans les deux états sont équivalentes.

### 5.1.1 Vitesse de relaxation transversale

Des expériences préliminaires effectuées avec un échantillon de PhCpn lié à l'AppNHp (à 75°C) ont permis de confirmer que les vitesses de relaxation transversale sont similaires dans les conformations ouvertes et fermées dans les deux états des méthionines 159, 490 et 275, 279 (tableau 5.1).

Méthionines	159	275	279	490
$R_2$ PhCpn (apo)	14.1 s <sup>-1</sup> ( $\pm$ 2.1)	13.6 s <sup>-1</sup> ( $\pm$ 2.2)	11.4 s <sup>-1</sup> ( $\pm$ 2)	14.9 s <sup>-1</sup> ( $\pm$ 4.4)
$R_2$ PhCpn (AppNHp)	12.5 s <sup>-1</sup> ( $\pm$ 2.6)	14.8 s <sup>-1</sup> ( $\pm$ 4.1)	12.6 s <sup>-1</sup> ( $\pm$ 2.3)	15.1 s <sup>-1</sup> ( $\pm$ 3.7)

**TABLE 5.1: Temps de relaxation transversale des méthionines 159, 275, 279, 490 à 75°C** - Les valeurs de  $R_2$  correspondent au temps de relaxation apparent d'une cohérence C+H+ évoluant pendant une expérience HMQC. L'acquisition des données a été réalisée à 75°C sur un spectromètre opérant à une fréquence du proton de 700 MHz et équipé d'une sonde cryogénique. Les valeurs d'erreurs ont été estimées par une analyse monte-carlo de l'erreur lors de l'ajustement des données.

### 5.1.2 Vitesse de relaxation longitudinale

Les vitesses de relaxation longitudinale pouvant être différentes entre les deux états d'un résidu, elles peuvent également influencer la quantification des populations. De plus, les spectres 2D ont été enregistrés avec des expériences SOFAST-Methyl-TROSY (243) optimisées pour le gain en sensibilité ( $d1 = 0.4$  s et angle d'impulsion 40°). Avec ces expériences, une différence dans les vitesses de relaxation longitudinale entre différents états pourrait avoir des effets importants sur la quantification des signaux.

## 5.1 Limites et possibilités offertes par la RMN pour la caractérisation des différents états fonctionnels de PhCpn

---

Une méthode alternative d'acquisition des données pourrait en théorie permettre de s'affranchir des effets d'une différence de vitesse de relaxation longitudinale entre les deux états de PhCpn. Pour cela, il faudrait enregistrer des expériences avec un délais de recyclage très long (i.e.  $> 10$  s), pour être certain que dans chaque état l'aimantation des résidus soit revenue à l'équilibre de Boltzmann. Cependant, ce type d'acquisition aurait pour effet d'augmenter drastiquement le temps d'acquisition des spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC et comme nous l'avons vu au chapitre 3 PhCpn n'est actif et stable que pour environ 250 minutes ( $75^\circ\text{C}$  avec le système de régénération de l'ATP). Par conséquent, pour un temps expérimental donné, l'augmentation importante du délais de recyclage aurait un effet critique sur le rapport signal/bruit des expériences. La sensibilité des expériences étant le facteur limitant des expériences pour cette machinerie de 1 MDa ( $[\text{PhCpn}] \approx 10 - 30 \mu\text{M}$ ), le gain en exactitude des mesures se ferait au prix d'une perte de précision.

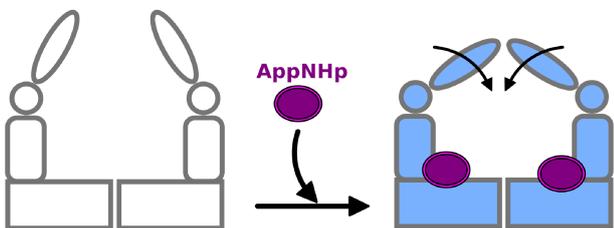
Il n'a pas encore été possible de mesurer la vitesse de relaxation longitudinale de ces résidus faute d'une quantité d'échantillon suffisante avant la rédaction de cette thèse. Toutefois, il est déjà possible d'apporter des éléments de réponse en considérant les résultats obtenus. En effet, à partir des données expérimentales présentées dans les chapitres 3 et 4, il est possible de confirmer de manière indirecte que le rapport de l'intensité des signaux des méthionines dans les différents états permet de représenter cet équilibre. Autant pour la liaison au site actif que pour l'équilibre entre les conformations ouvertes/fermées, nous avons obtenu des résultats comparables en utilisant différentes méthionines comme sonde pour chacun des équilibres (sondes du site actif : 159 ou 490 et sondes des conformations ouvertes/fermées : 275 ou 279). Si la vitesse de relaxation longitudinale était changée dans les différents états, il semble peu probable que ce changement soit équivalent pour tous les résidus. En effet, la vitesse de relaxation longitudinale est plus sensible aux variations des mouvements locaux rapide des chaînes latérales qu'au phénomène global de translation rotationnelle.

Dans la suite de ce chapitre, nous considérerons que les vitesses de relaxation transversale et longitudinale des groupements méthyles ont peu d'effet sur la quantification des états conformationnels. Une étude expérimentale supplémentaire sera cependant nécessaire pour valider cette hypothèse pour la relaxation longitudinale.

## 5. DISCUSSION ET CONCLUSION : MODÈLE DU FONCTIONNEMENT DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII*, UN EXEMPLE DE CHAPERONINE DU GROUPE II

### 5.1.3 AppNHp un modèle pour la liaison de l'ATP ?

Les expériences avec l'AppNHp ont été essentielles car elles nous ont permis d'identifier le spectre 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC caractéristique de la conformation fermée de PhCpn en comparaison avec la conformation ouverte. Par ailleurs, puisque cet analogue non hydrolysable de l'ATP entraîne la fermeture des anneaux, il permet clairement d'établir que le mécanisme de fermeture de PhCpn est dû à la liaison du nucléotide et non pas à son hydrolyse (figure 5.1). Cela confirme également l'hypothèse que le mécanisme de fermeture de PhCpn est similaire à celui du thermosome de *Thermococcus strain KS-1* (140, 142, 143, 144, 145).



**FIGURE 5.1: Mécanisme de fermeture de l'anneau de PhCpn par la liaison avec l'AppNHp** - Un anneau de PhCpn est représenté dans la conformation ouverte (apo) ou dans conformation fermée (lié à l'AppNHp).

L'analyse des données avec l'AppNHp (tableau 5.2) semble montrer des résultats contradictoires par rapport à un modèle simplifié où chacun des anneaux de PhCpn se comporte indépendamment l'un de l'autre. En effet, avec des conditions de saturation en AppNHp on s'attend à observer une particule à 100% liée à l'AppNHp et avec 100% de conformations fermées. Cependant, il n'a pas été possible de saturer le site actif à plus de 76% et d'obtenir plus de 60% de conformations fermées de PhCpn (tableau 5.2).

<b>Conformations</b>	Ouvertes : 39.9% ( $\pm 2.5$ )	Fermées : 60.1% ( $\pm 3.6$ )
<b>Occupation du site actif</b>	apo : 24.1% ( $\pm 1.9$ )	AppNHp : 75.9% ( $\pm 3.1$ )

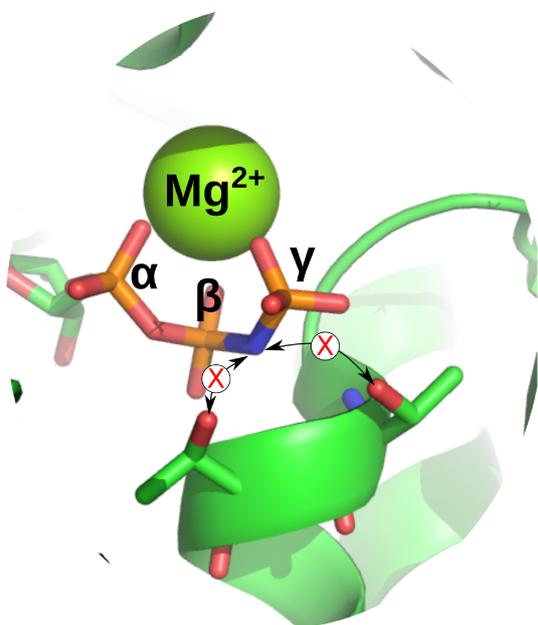
**TABLE 5.2: Extraction des populations des conformations ouvertes et fermées de PhCpn, et du pourcentage de site actif lié à l'AppNHp** - Les expériences ont été enregistrées à 75°C en présence d'un excès d'AppNHp (2 mM) par rapport à PhCpn (12.5  $\mu\text{M}$ ).

Une explication possible pour cette différence pourrait venir du fait que l'AppNHp n'est qu'un analogue de l'ATP. En effet, même si l'AppNHp permet de reproduire la liaison de l'ATP les différences entre les structures des deux molécules risquent de modifier l'interaction avec PhCpn (affinité de l'attachement, modification du site actif, interactions non spécifiques). L'AppNHp diffère de l'ATP par un oxygène remplacé par un NH entre les atomes phosphores  $\beta$  et  $\gamma$ . Étant donné que l'absence du troisième phosphate empêche

## 5.1 Limites et possibilités offertes par la RMN pour la caractérisation des différents états fonctionnels de PhCpn

la fermeture de l'anneau, il est possible de penser que cette liaison est importante d'un point de vue fonctionnel.

La structure cristallographique du thermosome de *Thermococcus strain KS1* co-cristallisé avec l'AppNHp (figure 5.2) montre que le NH substitué à l'oxygène dans l'AppNHp est à proximité de deux thréonines avec lesquelles l'oxygène peut former des liaisons hydrogènes alors que ces liaisons ne sont pas possibles avec le NH.



**FIGURE 5.2: AppNHp dans le site actif du thermosome de *Thermococcus Strain-KS1*** - Zoom sur le site actif du thermosome de *Thermococcus Strain KS1* lié à l'AppNHP (code PDB : 1Q3Q). Il est possible d'observer que le NH qui substitue un oxygène dans l'AppNHp est à proximité de deux résidus thréonines. Avec un oxygène ces résidus peuvent former une liaison hydrogène alors qu'avec un NH cela n'est pas possible. Les flèches avec des croix rouges représentent les liaisons hydrogènes qui ne sont pas possibles avec l'AppNHP.

Cela semble montrer que remplacer l'oxygène de la liaison phosphodiester par un NH va pouvoir modifier l'interaction avec PhCpn. Néanmoins, avec les modèles proposés et les données expérimentales, il n'est pas possible actuellement d'expliquer pourquoi un pourcentage de 100% de saturation de PhCpn par l'AppNHp n'est pas observable ? Ou pourquoi il existe une différence entre le pourcentage de fixation de l'AppNHp et le pourcentage de conformations fermées de PhCpn ?

Différentes hypothèses peuvent être formulées pour répondre à ces questions comme la présence d'un phénomène d'allostérie négative entre les deux anneaux en présence d'AppNHp ; différentes stœchiométries de liaison PhCpn/nucléotide entre l'ATP et l'AppNHp ; l'effet du KCl sur l'affinité de l'AppNHp pour PhCpn (145). Mais aucune des hypothèses n'est complètement satisfaisante.

## 5. DISCUSSION ET CONCLUSION : MODÈLE DU FONCTIONNEMENT DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII*, UN EXEMPLE DE CHAPERONINE DU GROUPE II

---

D'autres expériences seront nécessaires pour lever ces paradoxes. Tout d'abord, il va falloir reproduire ces données avec de nouveaux lots de PhCpn et d'AppNHp. Il pourrait aussi être intéressant d'observer si avec une concentration en KCl inférieure l'ajout d'AppNHp permet d'obtenir un pourcentage de conformations fermées plus élevé. Il va également être possible de tester l'effet de différents analogues de l'ATP pas/peu hydrolysables et d'observer si ils permettent d'obtenir des équilibres différents en fonction de leurs similitudes avec la structure de l'ATP.

En conclusion, même si l'AppNHp montre des différences par rapport à l'ATP l'utilisation de cet analogue a permis de confirmer que pour PhCpn la liaison de l'ATP est suffisante pour entraîner le passage entre les conformations ouvertes et fermées. De plus, l'utilisation de l'AppNHp a été indispensable pour permettre de réaliser l'attribution partielle des groupements méthyles Met-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\epsilon$  dans la conformation fermée de PhCpn en stabilisant la particule dans une conformation partiellement fermée. En effet, même avec le système de régénération de l'ATP, il aurait été complexe d'enregistrer tous les spectres des mutants avec PhCpn dans un état actif stable pour une durée relativement courte.

En l'absence de données supplémentaires, nous ne pouvons pas interpréter plus les données obtenues avec cet analogue. Dans les prochaines parties, nous allons limiter notre analyse aux expériences enregistrées dans des conditions plus « physiologiques » entre PhCpn et l'ATP en présence d'un système de régénération de l'ATP.

## 5.2 Modèle du cycle fonctionnel de PhCpn sans et avec une protéine dépliée

Dans le chapitre 1, nous avons présenté deux modèles de cycle fonctionnel possible pour les chaperonines du groupe I avec un fonctionnement alterné (“bullet cycle”) ou synchronisé (“football cycle”) des anneaux. Nous allons nous baser sur ces modèles pour décrire le cycle fonctionnel des chaperonines du groupe II. Les données présentées dans cette partie correspondent aux expériences à 65°C qui permettent de comparer le cycle fonctionnel sans (partie 3.4.2) et avec (partie 4.5) une protéine dépliée.

### 5.2.1 Cycle fonctionnel sans une protéine dépliée

En présence d’ATP, le site actif est totalement déplacé dans un état lié aux nucléotides. Cela montre que les étapes correspondant au site actif vide sont négligeables en comparaison des autres étapes du cycle fonctionnel. Grâce à l’utilisation du système de régénération de l’ATP, nous avons pu observer que pour le site actif il est possible de séparer la liaison de l’ATP de celle de l’ADP. De plus, l’observation du site actif lié à l’ADP, en présence du système de régénération de l’ATP, montre que l’ADP reste lié pour une période suffisamment longue du cycle pour que l’effet de sa liaison soit détectable.

Nous avons également pu observer que les populations des conformations ouvertes et fermées de PhCpn correspondent respectivement à celle du site actif lié à l’ADP et lié à l’ATP. Cela indique que PhCpn-ADP correspond à la conformation ouverte et PhCpn-ATP à la conformation fermée (tableau 5.3).

<b>Conformations</b>	Ouvertes : 23.3% ( $\pm$ 6.5)	Fermées : 76.7% ( $\pm$ 6.6)
<b>Occupation du site actif</b>	ADP : 25.3% ( $\pm$ 3.3)	ATP : 74.7% ( $\pm$ 3.0)

**TABLE 5.3: Équilibre sans protéine dépliée entre les conformations ouvertes et fermées, et du pourcentage de site actif lié à l’ADP ou à l’ATP** - Les expériences RMN ont été enregistrées à 65°C avec le système de régénération de l’ATP (Conditions expérimentales : [PhCpn] = 26.3  $\mu$ M et [ATP] = 10mM).

En l’absence de protéine dépliée (partie 3.4.2), et avec une concentration d’ATP de l’ordre du mM, PhCpn peut dépasser l’équilibre correspondant à 50% de chaque conformations. Par conséquent, le modèle “bullet cycle” (figure 1.10) pour lequel on a à tout instant un

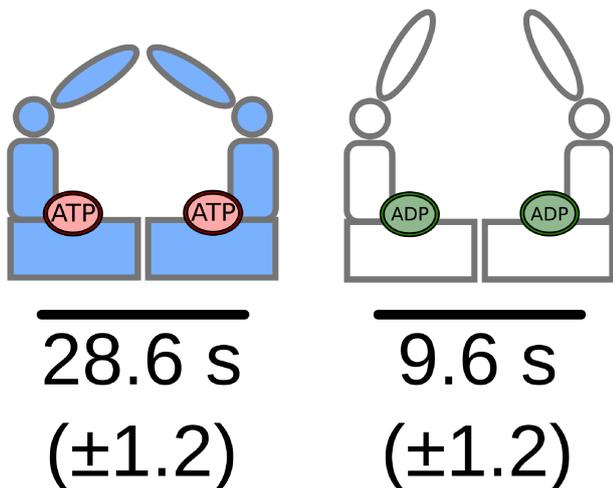
## 5. DISCUSSION ET CONCLUSION : MODÈLE DU FONCTIONNEMENT DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII*, UN EXEMPLE DE CHAPERONINE DU GROUPE II

---

anneau ouvert et l'autre fermé n'est pas applicable. Par contre, le modèle "football cycle" (figure 1.11) permet d'expliquer ce déséquilibre entre les conformations ouvertes et fermées.

Contrairement aux résultats avec l'AppNHp, où nous avons interprété les distributions entre les différents états comme correspondant à des états figés de PhCpn, en présence d'ATP les équilibres entre les différents états doivent être interprétés comme une moyenne temporelle entre ces états qui sont régulés par l'hydrolyse de l'ATP. Ainsi, il est possible de décrire le cycle fonctionnel avec une conformation fermée de PhCpn pendant 76.7% ( $\pm 6.6$ ) du cycle et ouverte pendant 23.3% ( $\pm 6.5$ ) du cycle.

L'activité ATPase sans protéine dépliée à 65°C est de 25.5 mole d'ATP/min/mole de PhCpn(particule). Si l'on émet l'hypothèse qu'un cycle fonctionnel correspond à l'hydrolyse de 16 ATP (8 ATP par fermeture d'anneau), on peut calculer une durée de 38.2 secondes par cycle. En admettant que pendant chaque cycle, il n'y ait qu'une seule transition entre les conformations ouvertes et fermées de chaque anneau de PhCpn on peut calculer une durée moyenne de 28.6 s ( $\pm 1.2$ ) pour la conformation fermée, tandis que la conformation ouverte à une durée moyenne de 9.6 s ( $\pm 1.2$ ) (figure 5.3).



**FIGURE 5.3: Durées caractéristiques des conformations ouvertes et fermées de PhCpn pendant le cycle fonctionnel sans protéine cliente -** Un anneau de PhCpn est représenté dans la conformation fermée (lié à l'ATP) ou dans la conformation ouverte (lié à l'ADP). La durée des conformations est calculée à partir des populations correspondant à chaque conformations et de la vitesse d'hydrolyse d'ATP (avec le système de régénération de l'ATP à 65°C)

Dans ce modèle, l'étape limitante correspond au passage de la conformation fermée à la conformation ouverte. L'hydrolyse de l'ATP ou la libération du Pi va servir de minuteur pour le passage entre les différentes étapes du cycle.

## 5.2 Modèle du cycle fonctionnel de PhCpn sans et avec une protéine dépliée

Pour confirmer que l'étape d'hydrolyse est l'étape limitante du cycle, il serait possible d'utiliser des analogues de l'ATP qui sont hydrolysables mais avec une vitesse d'hydrolyse 10 à 20 fois inférieure. Dans ces conditions, l'équilibre entre les conformations ouvertes et fermées devrait être déplacé avec une valeur proche de 100% de conformations fermées et une augmentation de la durée de l'étape limitante du cycle.

### 5.2.2 Cycle fonctionnel avec le lysozyme déplié

En présence du lysozyme déplié, nous avons pu observer plusieurs modifications du cycle fonctionnel. L'équilibre entre les conformations ouvertes et fermées est modifié et les pourcentages de site actif lié à l'ATP ou l'ADP sont également modifiés (tableau 5.4).

<b>Conformations</b>	Ouvertes : 51.9% ( $\pm$ 3.3)	Fermées : 48.1% ( $\pm$ 3.3)
<b>Occupation du site actif</b>	ADP : 52.4% ( $\pm$ 2.3)	ATP : 47.6% ( $\pm$ 2.2)

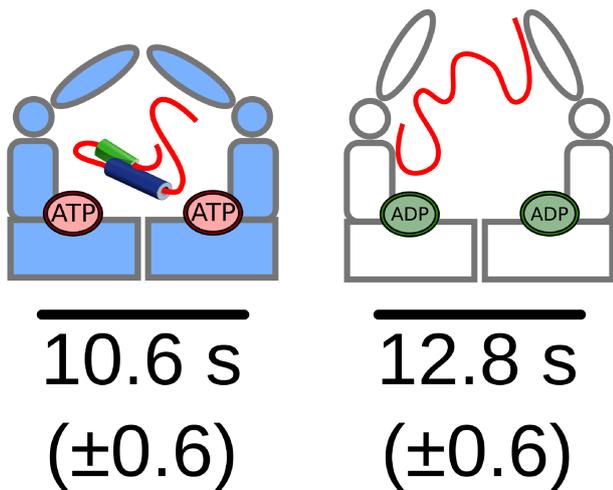
**TABLE 5.4: Équilibre avec le lysozyme déplié entre les conformations ouvertes et fermées, et du pourcentage de site actif lié à l'ATP ou à l'ADP** - Les expériences RMN ont été enregistrées à 65°C avec le système de régénération de l'ATP( Conditions expérimentales : [PhCpn] = 15  $\mu$ M, [lysozyme] = 30  $\mu$ M et [ATP] = 10mM).

Le cycle fonctionnel peut être décrit avec une conformation fermée de PhCpn pendant 48.1% (+/- 3.3) du cycle et ouverte pendant 51.9% (+/- 3.3) du cycle. Nous avons également montré que l'ajout du lysozyme dépliée permet d'augmenter l'activité ATPase de PhCpn à 39.1 mole d'ATP/min/mole de PhCPn(particule) ce qui correspond à une augmentation d'environ 150% de l'activité (partie 3.4.2.1).

Comme nous l'avons fait précédemment, si l'on émet l'hypothèse qu'un cycle fonctionnel correspond à l'hydrolyse de 16 ATP (ou 8 ATP par fermeture de chaque anneau), on peut calculer une durée de 24.4 secondes par cycle. Avec les pourcentages données ci-dessus, la conformation fermée correspond à 11.6 s (+- 0.6) et la conformation ouverte à 12.8 s (+- 0.6) (figure 5.4).

La comparaison de la durée de chaque étape par rapport au cycle sans une protéine dépliée permet de montrer que l'étape (1) d'hydrolyse de l'ATP est accélérée par environ un facteur trois et l'étape (2) n'est que peu modifiée. De plus, en présence du lysozyme déplié l'hydrolyse de l'ATP n'est plus l'étape limitante avec un temps équivalent pour les deux étapes du cycle.

## 5. DISCUSSION ET CONCLUSION : MODÈLE DU FONCTIONNEMENT DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII*, UN EXEMPLE DE CHAPERONINE DU GROUPE II



**FIGURE 5.4:** Durées caractéristiques des conformations ouvertes et fermées de PhCpn pendant le cycle fonctionnel avec le lysozyme déplié - Un anneau de PhCpn est représenté dans la conformation fermée (lié à l'ATP) et dans la conformation ouverte (lié à l'ADP). La durée des conformations est calculée à partir des populations correspondant à chaque conformations et de la vitesse d'hydrolyse d'ATP (avec le système de régénération de l'ATP à 65°C).

### 5.2.3 Cycle fonctionnel des chaperonines du groupe II

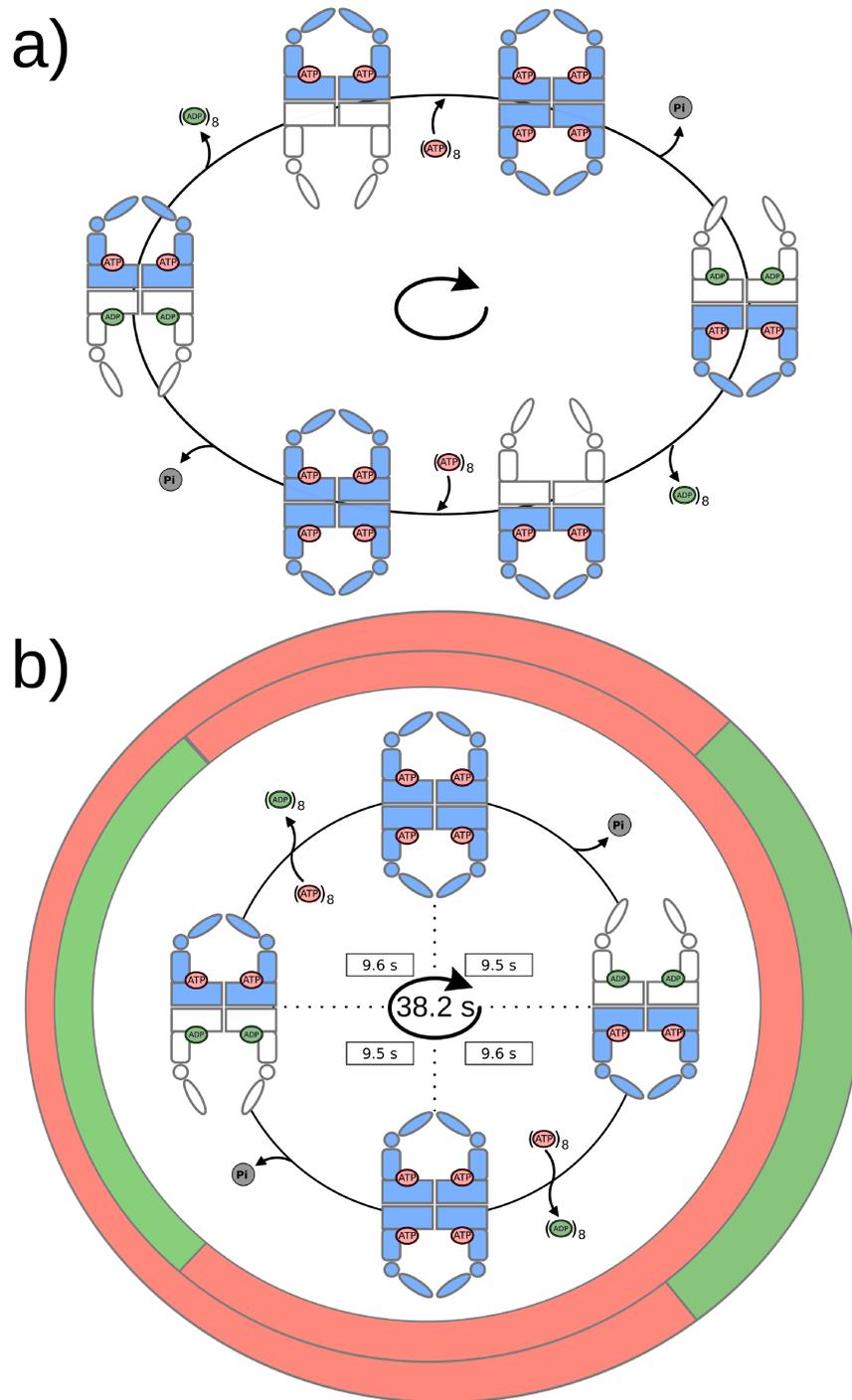
À partir des durées caractéristiques des différentes conformations de PhCpn, il est possible de proposer des modèles du cycle fonctionnel de PhCpn en l'absence et en présence d'une protéine dépliée.

#### 5.2.3.1 Modèle du cycle fonctionnel de PhCpn en l'absence de protéine dépliée

Avec plus de 50% de conformations fermées en l'absence de protéine dépliée le modèle « bullet cycle » n'est pas envisageable mais le modèle « football cycle » va permettre d'expliquer cet équilibre. Pour représenter le modèle du cycle fonctionnel de PhCpn, nous avons adapté la figure (1.11) en remplaçant GroEL/ES par PhCpn (figure 5.5(a)). Comme indiqué dans le paragraphe sur l'AppNHp, dans ce modèle la liaison de l'ATP à un anneau est responsable de sa fermeture.

De plus, nos données montrent également que le site actif libre n'est pas observable en présence d'ATP. Il est donc possible de considérer cette étape comme négligeable par rapport aux particules liées à l'ATP et à l'ADP et de simplifier le modèle précédent en supprimant les particules avec un anneau sans nucléotide. Dès lors, le cycle fonctionnel peut être décrit avec l'équilibre entre quatre particules et l'étape limitante qui correspond à l'hydrolyse de l'ATP (figure 5.5(b)).

## 5.2 Modèle du cycle fonctionnel de PhCpn sans et avec une protéine dépliée



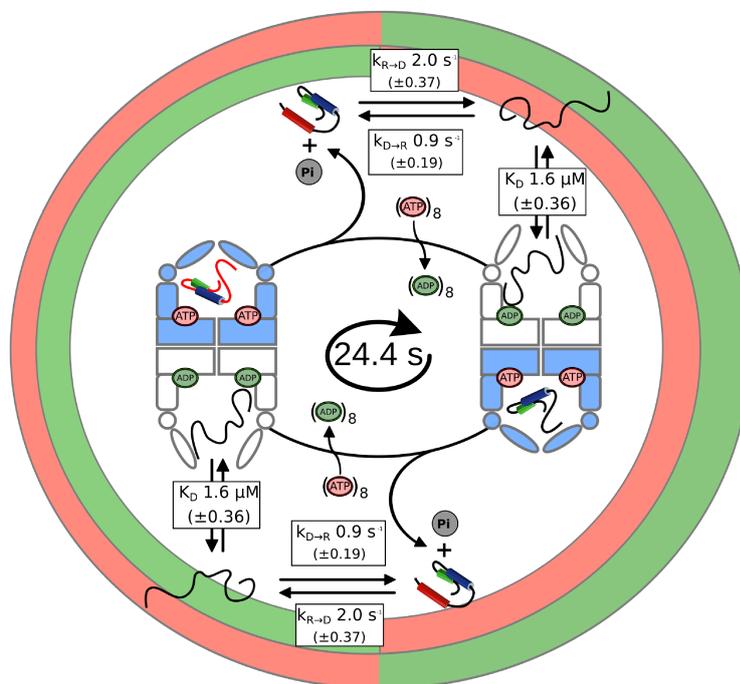
**FIGURE 5.5: Modèle du cycle fonctionnel de PhCpn en l'absence de protéine dépliée** - Pour les deux cycles l'anneau actif est représenté en bleu. a) Modèle adapté de la figure 1.11 du modèle « football cycle » de GroEL/ES ; b) Modèle simplifié du cycle fonctionnel de PhCpn en l'absence de protéine cliente. Les cercles rouges et verts indiquent l'état d'occupation du site actif par de l'ATP (rouge) ou de l'ADP (vert). Le cercle extérieur correspond à l'anneau supérieur et le cercle intérieur correspond à l'anneau inférieur.

## 5. DISCUSSION ET CONCLUSION : MODÈLE DU FONCTIONNEMENT DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII*, UN EXEMPLE DE CHAPERONINE DU GROUPE II

### 5.2.3.2 Modèle du cycle fonctionnel de PhCpn avec une protéine dépliée

En présence du lysozyme déplié, nous avons vu au paragraphe 5.2.2 que la durée du cycle totale est diminuée par un facteur 1,5 et que les populations des conformations ouvertes et fermées s'équilibrent autour de 50%. En comparaison du cycle en l'absence d'une protéine dépliée, la durée de la conformation ouverte est peu modifiée (12.8 s au lieu de 9.8 s), tandis que celle de la conformation fermée est accélérée par un facteur proche de 3 (11.6 s au lieu de 28.6 s).

À partir de ces observations, il est possible de conclure que l'hydrolyse de l'ATP dans un anneau correspond à une durée équivalente à la libération de l'ADP dans l'autre anneau. Ainsi, la diminution de la durée de la conformation fermée permet de considérer la conformation doublement fermée comme négligeable et de proposer un modèle « bullet cycle » avec une conformation majoritaire qui correspond à une conformation de PhCpn (1/2)ouverte-(1/2)fermée en présence d'une protéine dépliée. PhCpn passant d'une conformation ouverte/fermée à fermée/ouverte avec un temps caractéristique de chaque étape de l'ordre de 12 s (figure 5.6).



**FIGURE 5.6:** Modèle du cycle fonctionnel de PhCpn avec une protéine dépliée - Le modèle du cycle fonctionnel est décrit dans le texte. Le code couleur correspond à celui de la figure 5.5. Les constantes d'échanges et d'affinités pour le lysozyme correspondent respectivement aux parties 4.3.3 et 4.4.2.

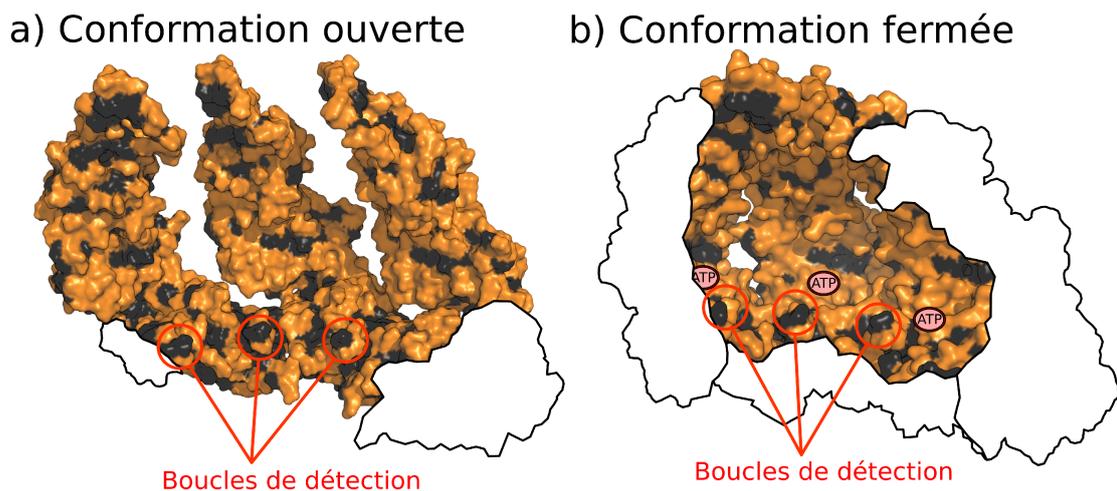
### 5.2.4 Repliement du lysozyme et modifications du cycle fonctionnel par le lysozyme déplié

Dans cette partie, nous allons discuter les mécanismes possibles pour expliquer le repliement du lysozyme par PhCpn et l'accélération du cycle fonctionnel de PhCpn en présence du lysozyme déplié.

#### 5.2.4.1 Repliement du lysozyme dans la cavité de PhCpn

À la fin du chapitre 4 (partie 4.5), nous avons montré qu'en présence d'ATP PhCpn permet le repliement du lysozyme. Grâce aux données sur l'interaction entre le lysozyme déplié et la conformation ouverte de PhCpn, il est possible de proposer une hypothèse sur le processus de repliement du lysozyme dans PhCpn.

Les paramètres thermodynamiques de l'interaction entre le lysozyme et PhCpn (partie 4.4.3) nous ont permis de montrer que la stabilisation de l'état déplié du lysozyme par PhCpn peut être expliqué comme étant majoritairement due aux interactions hydrophobes entre les résidus hydrophobes de la cavité et le lysozyme dépliée. En effet, dans la conformation ouverte les interactions hydrophobes par un effet enthalpique permettent de stabiliser l'état déplié du lysozyme ( $\Delta\Delta H = -52.8$  kJ/mol).



**FIGURE 5.7:** Comparaison de la composition en résidus hydrophiles/hydrophobes de la cavité de PhCpn dans les conformations ouvertes et fermées - Modèles des conformations ouvertes (a) et fermées (b) de PhCpn (voir chapitre 1). Trois sous-unités de chaque anneau sont représentées et les contacts avec les autres sous-unités de l'anneau sont montrées en blanc.

## 5. DISCUSSION ET CONCLUSION : MODÈLE DU FONCTIONNEMENT DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII*, UN EXEMPLE DE CHAPERONINE DU GROUPE II

---

La figure 5.7 permet de comparer les résidus hydrophobes exposés dans les conformations ouvertes et fermées de PhCpn. la majorité des résidus hydrophobes qui sont exposés dans la conformation ouverte sont repositionnés à l'interface entre les sous-unités lors du passage à la conformation fermée avec une diminution importante du nombre de résidus hydrophobes accessibles. Ces modifications de la cavité dans la conformation fermée permettent de proposer un mécanisme pour le repliement du lysozyme :

(1) La majorité des résidus hydrophobes n'étant plus accessibles dans la conformation fermée, le lysozyme déplié doit être libéré dans la cavité de PhCpn.

(2) Le lysozyme déplié va être confiné dans une cavité de  $130\,000\text{ \AA}^3$  (244) (2.5 fois le volume du lysozyme déplié) où il va pouvoir évoluer isolé sans risque de former des agrégats avec d'autres protéines dépliées.

(3) Le mécanisme du repliement dans PhCpn reste mal compris. Différents facteurs peuvent intervenir : effets entropique défavorable à l'état déplié en milieu confiné ; changements conformationnels de PhCpn stabilisant l'état replié ; rôle de l'hydrolyse de l'ATP.

(4) La constante de vitesse du repliement du lysozyme libre (en solution sans PhCpn) est de  $0.9\text{ s}^{-1}$  ( $\pm 0.19$ ), ce qui est compatible avec un repliement dans PhCpn puisque la cavité reste fermée pendant une douzaine de secondes.

Ce modèle n'est qu'une hypothèse et aucune preuve directe du repliement dans la cavité de PhCpn n'a pu être observée dans nos expériences. Cependant, de par la nature hautement dynamique du lysozyme dans la cavité de PhCpn, il était attendu de ne pas pouvoir observer de modifications de ses signaux RMN dans les conditions de nos expériences.

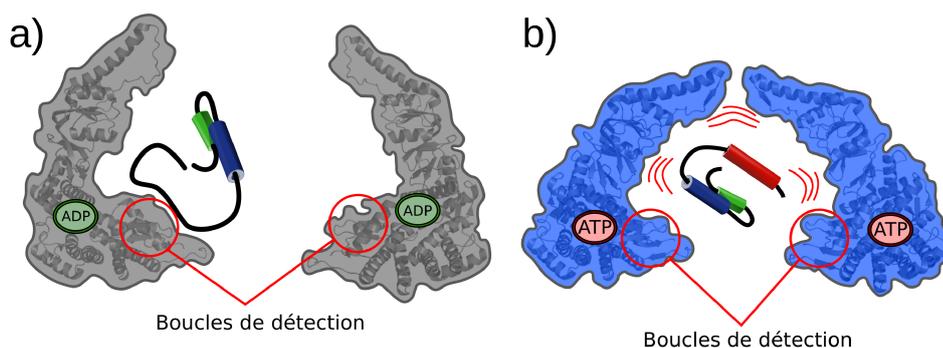
Afin de pouvoir valider cette hypothèse, il faudrait pouvoir isoler une conformation fermée de PhCpn stable ayant encapsulée le lysozyme à l'intérieur de l'une des cavités. Alternativement pour confirmer cette l'hypothèse, il serait possible de réaliser un marquage PRE de PhCpn qui devrait permettre d'observer des modifications des signaux RMN du lysozyme replié si il est présent dans la cavité de PhCPN. De plus, l'utilisation d'analogue de l'ATP dont l'hydrolyse est plus lente devrait également permettre d'augmenter la durée de la conformation fermée et de faciliter l'observation de l'effet de la cavité sur le lysozyme en repliement.

## 5.2 Modèle du cycle fonctionnel de PhCpn sans et avec une protéine dépliée

### 5.2.4.2 Accélération du cycle fonctionnel en présence du lysozyme déplié

L'étape du cycle conformationnel affectée par la présence du lysozyme est l'étape (1) d'hydrolyse de l'ATP. Par conséquent, il est possible d'émettre l'hypothèse que ce sont des interactions du lysozyme avec la cavité qui vont être responsables de l'accélération de cette étape. Au chapitre 4, nous avons montré que la constante d'affinité de l'interaction entre le lysozyme et la conformation ouverte de PhCpn est de  $1.6 \mu\text{M}$  ( $\pm 0.36$ ) à  $75^\circ\text{C}$  et que cette interaction se fait majoritairement au niveau de la boucle de détection du domaine équatorial dans la cavité de PhCpn (figure 4.21).

Deux mécanismes peuvent être proposés pour décrire l'accélération de l'étape d'hydrolyse de l'ATP en présence du lysozyme déplié. Ces mécanismes ne s'excluent pas l'un l'autre et leurs effets peuvent être combinés pour expliquer l'action du lysozyme déplié.



**FIGURE 5.8: Interactions entre le lysozyme et PhCpn dans les conformations ouvertes et fermées** - Modèle des conformations ouvertes (a) et fermées (b) de PhCpn (chapitre 1) avec deux sous unités représentées par anneau. Dans la conformation ouverte, la partie dépliée du lysozyme interagit majoritairement avec la boucle de détection (partir 4.4.5). Dans la conformation fermée, le lysozyme est relâché dans la cavité et pourrait interagir avec différentes parties de la cavité.

#### (1) Interaction avec la boucle de détection :

La figure 5.7(b) montre que la boucle de détection reste accessible dans la conformation fermée. Ainsi, il est toujours possible que le lysozyme interagisse avec cette boucle. La boucle de détection est située dans le domaine équatorial à proximité du site actif. Par conséquent, il est possible de penser que l'interaction avec la boucle de détection va avoir un effet sur le site actif et permettre de modifier l'activité d'hydrolyse de l'ATP. Cette hypothèse a également été proposée par Munoz *et al.* (155) pour l'interaction entre la tubuline et CCT.

## 5. DISCUSSION ET CONCLUSION : MODÈLE DU FONCTIONNEMENT DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII*, UN EXEMPLE DE CHAPERONINE DU GROUPE II

---

### (2) Déstabilisation de la conformation fermée par le lysozyme dans la cavité :

La présence d'une protéine dépliée ou en repliement dans la cavité pourrait avoir un effet sur la stabilité de la conformation fermée de PhCpn. Par conséquent, en déstabilisant la conformation fermée le lysozyme pourrait accélérer le passage dans la conformation ouverte de l'anneau.

Pour confirmer ces mécanismes, il serait possible d'utiliser des analogues hydrolysables de l'ATP qui vont ralentir l'activité ATPase en maintenant PhCpn dans une conformation fermée pour une période plus longue. En utilisant du lysozyme avec un marquage PRE, il devrait être possible d'observer des effets du lysozyme sur la cavité et ainsi de définir des zones d'interactions dans la conformation fermée.

### 5.3 Conclusions et perspectives

L'étude d'une chaperonine de 1 MDa représentait un défi autant par rapport à la taille de cette particule pour une étude par RMN du liquide, que par la complexité du mécanisme d'action de cette machinerie.

Le choix d'un marquage des groupements méthyles Met-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\epsilon$  adaptés à la taille de PhCpn nous a permis dans un premier temps d'avoir un aperçu de la faisabilité de l'observation de cette machinerie par RMN du liquide. Ensuite, grâce au développement d'un marquage des groupements méthyles Val-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]-proS, il a été possible de multiplier par quatre le nombre de sondes de l'état conformationnel de PhCpn par rapport au simple marquage des groupements méthyles Met-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\epsilon$ .

Cependant, l'observation de spectres 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) HMQC ne permet d'accéder qu'à un nombre de paramètres très limité et il a donc été nécessaire de réaliser l'attribution de ces signaux pour accéder à des informations structurales. Toutefois, les techniques classiquement utilisées pour l'attribution de protéines par RMN du liquide n'était pas utilisable pour l'attribution d'une particule de 1 MDa. Par conséquent, nous avons combiné l'utilisation d'une stratégie de mutagenèse modifiée avec celle d'une micro-sonde cryogénique 1.7 mm pour permettre l'attribution des groupements méthyles Met-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\epsilon$  et Val-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]-proS de PhCpn.

Avant d'étudier PhCpn pendant son cycle fonctionnel, nous avons utilisé un analogue de l'ATP qui nous a permis d'isoler des états conformationnels stables de PhCpn. Ces états conformationnels ont permis d'identifier les signaux RMN des différentes conformations fonctionnelles de PhCpn. Cet analogue de l'ATP a également permis de démontrer un mécanisme de fermeture de PhCpn par la liaison de l'ATP et non son hydrolyse comme proposé pour d'autres chaperonines du groupe II.

Le développement d'un système de régénération de l'ATP, fonctionnel à haute température, nous a ensuite permis de stabiliser PhCpn dans un état actif pendant plusieurs heures. Qui plus est, en utilisant ce système de régénération, il a été possible de corréler l'occupation du site actif de PhCpn par l'ADP et l'ATP avec les conformations ouvertes et fermées de PhCpn. La combinaison de différentes expériences RMN nous a permis de caractériser la durée des différentes étapes du cycle fonctionnel et ainsi de proposer des modèles du cycle fonctionnel pour les chaperonines du groupe II sans et avec une protéine dépliée. D'une manière similaire aux chaperonines du groupe I, nous avons montré que le cycle fonctionnel des chaperonines du groupe II est modifié par la présence d'une protéine dépliée. En effet l'ajout d'une protéine dépliée entraîne une augmentation de l'activité ATPase et un déplacement des équilibres entre les conformations ouvertes et fermées de PhCpn.

L'aspect dynamique des interactions entre les chaperonines et des protéines dépliées rend leur caractérisation complexe par les techniques de biologie structurale. La RMN du liquide s'est ici révélée être une technique particulièrement adaptée pour permettre d'étudier le complexe entre PhCpn et le lysozyme déplié. En effet, il a été possible de caractériser plusieurs paramètres de l'interaction comme l'affinité de l'interaction, l'observation de la formation du complexe à différentes températures et d'apporter une première estimation des paramètres thermodynamiques du dépliement du lysozyme en présence de PhCpn. Il a été également possible de caractériser une zone d'interaction à l'intérieur de la cavité de PhCpn qui confirme les observations obtenues grâce à la structure de CCT avec la tubuline (155). On notera ici, que sans le marquage des groupements méthyles Val-[ $^{13}\text{CH}_3$ ]-proS, il n'aurait pas été possible d'obtenir un nombre de sondes RMN suffisantes pour une caractérisation de cette zone d'interaction.

Ce travail a permis d'apporter les premiers éléments pour une meilleure compréhension du cycle fonctionnel des chaperonines du groupe II et de l'interaction avec une protéine dépliée. Cependant, cette description du cycle fonctionnel reste partielle et de nombreux

## 5. DISCUSSION ET CONCLUSION : MODÈLE DU FONCTIONNEMENT DU THERMOSOME DE *PYROCOCCUS HORIKOSHII*, UN EXEMPLE DE CHAPERONINE DU GROUPE II

---

éléments reste encore mal compris pour permettre une unification des différents résultats. Dans ce chapitre, plusieurs expériences ont été proposées pour permettre d'approfondir ces points et permettre de lever ces ambiguïtés. De plus, les modèles que nous avons mis en place pourront également permettre de proposer différentes idées qui pourraient permettre d'aller plus loin dans la description des chaperonines du groupe II. Deux exemples qui nous semble particulièrement intéressants sont donnés ci dessous :

(1) Le nombre d'étude sur l'interaction entre des protéines dépliées et des chaperonines étant très limité, l'exploration de ce sujet semble primordial pour apporter une meilleure compréhension du fonctionnement des chaperonines. Notre étude a permis de montrer que la RMN du liquide s'est révélée être un outil de choix pour l'étude de cette interaction et que cette technique permet d'accéder à de nombreux paramètres difficilement accessibles par d'autres techniques de biologie structurale. Il pourrait être intéressant de tester l'effet de protéines avec des propriétés différentes sur le cycle fonctionnel de PhCpn. On pourra par exemple tester l'influence de protéines plus grosses qui ne peuvent pas ou plus difficilement rentrer dans l'anneau et par conséquent devraient permettre de modifier les équilibres du cycle fonctionnel.

(2) L'interaction entre les prefoldines et les chaperonines du groupe II n'a pas pu être abordée dans cette thèse. Malgré l'importance biologique de ces "co-chaperonines", leur rôle reste encore mal connu. Tout comme une protéine dépliée peut avoir un effet sur le cycle fonctionnel des chaperonines du groupe II, l'interaction avec ces "co-chaperonines" pourrait avoir des effets très intéressants sur le fonctionnement des chaperonines.

Finalement, comme nous l'avons indiqué dans l'introduction, l'étude du fonctionnement des chaperonnes moléculaires permet d'apporter une meilleure compréhension du phénomène de repliement des protéines dans les cellules et de mieux comprendre le rôle de ces machineries moléculaire dans ce phénomène. Notre étude permet d'ouvrir de nouvelles opportunités grâce aux développements que nous avons mis en place pour l'étude de gros assemblages par RMN qui pourraient être appliqués à d'autre chaperonnes moléculaires. Ainsi, il serait possible d'obtenir des paramètres qui sont difficilement accessibles par d'autres techniques de biologie structurale et donc d'apporter des informations complémentaires par rapport à ces techniques.

# Références bibliographiques

- [1] J. C. KENDREW, G. BODO, H. M. DINTZIS, R. G. PARRISH, H. WYCKOFF, AND D. C. PHILLIPS. **A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis.** *Nature*, **181**(4610) :662–666, March 1958. 1
- [2] L. N. JOHNSON AND D. C. PHILLIPS. **Structure of some crystalline lysozyme-inhibitor complexes determined by X-ray analysis at 6 Angstrom resolution.** *Nature*, **206**(4986) :761–763, May 1965. 1
- [3] H. W. WYCKOFF, K. D. HARDMAN, N. M. ALLEWELL, T. INAGAMI, L. N. JOHNSON, AND F. M. RICHARDS. **The structure of ribonuclease-S at 3.5 Å resolution.** *The Journal of Biological Chemistry*, **242**(17) :3984–3988, September 1967. 1
- [4] J. DRENTH, J. N. JANSONIUS, R. KOEKOEK, H. M. SWEN, AND B. G. WOLTERS. **Structure of papain.** *Nature*, **218**(5145) :929–932, June 1968. 1
- [5] INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. **Finishing the euchromatin sequence of the human genome.** *Nature*, **431**(7011) :931–945, October 2004. 1
- [6] HADAS LEONOV, JOSEPH S.B. MITCHELL, AND ISAAH T. ARKIN. **Monte Carlo estimation of the number of possible protein folds: Effects of sampling bias and folds distributions.** *Proteins : Structure, Function, and Bioinformatics*, **51**(3) :352–359, May 2003. 1
- [7] J. J. WARD, J. S. SODHI, L. J. MCGUFFIN, B. F. BUXTON, AND D. T. JONES. **Prediction and Functional Analysis of Native Disorder in Proteins from the Three Kingdoms of Life.** *Journal of Molecular Biology*, **337**(3) :635–645, March 2004. 2
- [8] FRANCIS CRICK. **Central Dogma of Molecular Biology.** *Nature*, **227**(5258) :561–563, August 1970. 2
- [9] C. B. ANFINSEN, E. HABER, M. SELA, F. H. WHITE, AND JR. **The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **47**(9) :1309, September 1961. 2, 3
- [10] EDGAR HABER AND CHRISTIAN B. ANFINSEN. **Side-chain Interactions Governing the Pairing of Half-cystine Residues in Ribonuclease.** *Journal of Biological Chemistry*, **237**(6) :1839–1844, June 1962. 3
- [11] CYRUS LEVINthal. **Are there pathways for protein folding ?** *Journal de Chimie Physique*, **65**(1) :44, 1968. 3, 4
- [12] G. N. RAMACHANDRAN AND V. SASISEKHARAN. **Conformation of Polypeptides and Proteins.** In M. L. ANSON JOHN T. EDSALL C.B. ANFINSEN AND FREDERIC M. RICHARDS, editors, *Advances in Protein Chemistry*, **23**, pages 283–437. Academic Press, 1968. 4
- [13] ALAN R FERSHT. **Nucleation mechanisms in protein folding.** *Current Opinion in Structural Biology*, **7**(1) :3–9, February 1997. 4, 7
- [14] HENRY EYRING. **The Activated Complex in Chemical Reactions.** *The Journal of Chemical Physics*, **3**(2) :107–115, February 1935. 4
- [15] ALAN R. FERSHT, ANDREAS MATOUSCHEK, AND LUIS SERRANO. **The folding of an enzyme: I. Theory of protein engineering analysis of stability and pathway of protein folding.** *Journal of Molecular Biology*, **224**(3) :771–782, April 1992. 5, 7
- [16] ANDREAS MATOUSCHEK, JAMES T. KELLIS, LUIS SERRANO, MARK BYCROFT, AND ALAN R. FERSHT. **Transient folding intermediates characterized by protein engineering.** *Nature*, **346**(6283) :440–445, August 1990. 5
- [17] PETER S. KIM AND ROBERT L. BALDWIN. **Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding.** *Annual Review of Biochemistry*, **51**(1) :459–489, 1982. 6
- [18] MARTIN KARPLUS AND DAVID L. WEAVER. **Protein-folding dynamics.** *Nature*, **260**(5550) :404–406, April 1976. 6
- [19] DONALD B. WETLAUFER. **Nucleation, Rapid Folding, and Globular Intrachain Regions in Proteins.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **70**(3) :697–701, March 1973. 6
- [20] A R FERSHT. **Optimization of rates of protein folding: the nucleation-condensation mechanism and its implications.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**(24) :10869–10873, November 1995. 6
- [21] OLEG B. PTITSYN. **Protein folding: Hypotheses and experiments.** *Journal of Protein Chemistry*, **6**(4) :273–293, August 1987. 6
- [22] D E OTZEN, L S ITZHAKI, N F ELMASRY, S E JACKSON, AND A R FERSHT. **Structure of the transition state for the folding/unfolding of the barley chymotrypsin inhibitor 2 and its implications for mechanisms of protein folding.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**(22) :10422–10425, October 1994. 7
- [23] YIYA IVARSSON, CARLO TRAVAGLINI-ALLOCATELLI, MAURIZIO BRUNORI, AND STEFANO GIANNI. **Mechanisms of protein folding.** *European Biophysics Journal*, **37**(6) :721–728, January 2008. 7
- [24] J. D. BRYNGELSON AND P. G. WOLYNES. **Spin glasses and the statistical mechanics of protein folding.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **84**(21) :7524–7528, November 1987. 8
- [25] P. G. WOLYNES, J. N. ONUCHIC, AND D. THIRUMALAI. **Navigating the folding routes.** *Science*, **267**(5204) :1619–1620, March 1995. 8
- [26] KEN A. DILL AND HUE SUN CHAN. **From Levinthal to pathways to funnels.** *Nature Structural & Molecular Biology*, **4**(1) :10–19, January 1997. 8

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [27] JOSÉ NELSON ONUCHIC, HUGH NYMEYER, ANGEL E. GARCÍA, JORGE CHAHINE, AND NICHOLAS D. SOCCI. **The energy landscape theory of protein folding: Insights into folding mechanisms and scenarios.** In C. ROBERT MATTHEWS, editor, *Advances in Protein Chemistry*, **53** of *Protein folding mechanisms*, pages 87–152. Academic Press, 2000. 8
- [28] JOSÉ NELSON ONUCHIC AND PETER G WOLYNES. **Theory of protein folding.** *Current Opinion in Structural Biology*, **14**(1) :70–75, February 2004. 9
- [29] HUGH R. B. PELHAM. **Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins.** *Cell*, **46**(7) :959–961, September 1986. 10, 12
- [30] J. ELLIS. **Proteins as molecular chaperones.** *Nature*, **328**(6129) :378–379, August 1987. 10, 12
- [31] SEAN M. HEMMINGSEN, CAROL WOOLFORD, SASKIA M. VAN DER VIES, KIT TILLY, DAVID T. DENNIS, COSTA P. GEORGIOPOULOS, ROGER W. HENDRIX, AND R. JOHN ELLIS. **Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly.** . *Published online : 26 May 1988 ; / doi :10.1038/333330a0*, **333**(6171) :330–334, May 1988. 10, 19
- [32] PIERRE GOLOUBINOFF, JOHN T. CHRISTELLER, ANTHONY A. GATENBY, AND GEORGE H. LORIMER. **Reconstitution of active dimeric ribulose biphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP.** *Nature*, **342**(6252) :884–889, December 1989. 10
- [33] R JOHN ELLIS AND F ULRICH HARTL. **Principles of protein folding in the cellular environment.** *Current Opinion in Structural Biology*, **9**(1) :102–110, February 1999. 10
- [34] KARAN S. HINGORANI AND LILA M. GIERASCH. **Comparing Protein Folding In vitro and In vivo: Foldability Meets the Fitness Challenge.** *Current opinion in structural biology*, **24** :81–90, February 2014. 10
- [35] E H MCCONKEY. **Molecular evolution, intracellular organization, and the quinary structure of proteins.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **79**(10) :3236–3240, May 1982. 11
- [36] JIAN LI, SEN ZHANG, AND CHIH-CHEN WANG. **Effects of Macromolecular Crowding on the Refolding of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase and Protein Disulfide Isomerase.** *Journal of Biological Chemistry*, **276**(37) :34396–34401, September 2001. 11
- [37] JÖRG MARTIN. **Requirement for GroEL/GroES-dependent protein folding under nonpermissive conditions of macromolecular crowding.** *Biochemistry*, **41**(15) :5050–5055, April 2002. 11
- [38] GUOPING REN, ZONG LIN, CHEN-LU TSOU, AND CHIH-CHEN WANG. **Effects of macromolecular crowding on the unfolding and the refolding of D-glyceraldehyde-3-phosphosphate dehydrogenase.** *Journal of Protein Chemistry*, **22**(5) :431–439, July 2003. 11
- [39] EUGENE I SHAKHNOVICH. **Theoretical studies of protein-folding thermodynamics and kinetics.** *Current Opinion in Structural Biology*, **7**(1) :29–40, February 1997. 11
- [40] HUE SUN CHAN AND KEN A. DILL. **Protein folding in the landscape perspective: Chevron plots and non-arrhenius kinetics.** *Proteins : Structure, Function, and Bioinformatics*, **30**(1) :2–33, 1998. 11
- [41] E. SHAKHNOVICH, V. ABKEVICH, AND O. PTITSYN. **Conserved residues and the mechanism of protein folding.** *Nature*, **379**(6560) :96–98, January 1996. 11
- [42] LEONID A. MIRNY, VICTOR I. ABKEVICH, AND EUGENE I. SHAKHNOVICH. **How evolution makes proteins fold quickly.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**(9) :4976–4981, April 1998. 11
- [43] L. D. CABRITA, S.-T. D. HSU, H. LAUNAY, C. M. DOBSON, AND J. CHRISTODOULOU. **Probing ribosome-nascent chain complexes produced in vivo by NMR spectroscopy.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**(52) :22239–22244, December 2009. 11
- [44] F. ULRICH HARTL AND MANAJIT HAYER-HARTL. **Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo.** *Nature Structural & Molecular Biology*, **16**(6) :574–581, June 2009. 12
- [45] MICHAEL E. CHEETHAM AND AVROM J. CAPLAN. **Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function.** *Cell Stress & Chaperones*, **3**(1) :28–36, March 1998. 13
- [46] X.-B. QIU, Y.-M. SHAO, S. MIAO, AND L. WANG. **The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones.** *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, **63**(22) :2560–2570, September 2006. 13
- [47] M. P. MAYER AND B. BUKAU. **Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, **62**(6) :670–684, March 2005. 13
- [48] TUOEN LIU, CHRISTOPHER K. DANIELS, AND SHOUSONG CAO. **Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential.** *Pharmacology & Therapeutics*, **136**(3) :354–374, December 2012. 13
- [49] HARM H. KAMPINGA AND ELIZABETH A. CRAIG. **The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **11**(8) :579–592, August 2010. 13
- [50] ANDREW K. SHIAU, SETH F. HARRIS, DANIEL R. SOUTHWORTH, AND DAVID A. AGARD. **Structural Analysis of E. coli hsp90 Reveals Dramatic Nucleotide-Dependent Conformational Rearrangements.** *Cell*, **127**(2) :329–340, October 2006. 13
- [51] LAURENCE H. PEARL AND CHRISOSTOMOS PRODROMOU. **Structure and Mechanism of the Hsp90 Molecular Chaperone Machinery.** *Annual Review of Biochemistry*, **75**(1) :271–294, 2006. 13
- [52] KLAUS RICHTER AND JOHANNES BUCHNER. **hsp90: Twist and Fold.** *Cell*, **127**(2) :251–253, October 2006. 13
- [53] D. ERIC DOLLINS, JOSHUA J. WARREN, ROBERT M. IMMORMINO, AND DANIEL T. GEWIRTH. **Structures of GRP94-Nucleotide Complexes Reveal Mechanistic Differences between the hsp90 Chaperones.** *Molecular Cell*, **28**(1) :41–56, October 2007. 13
- [54] JOEL R. HOSKINS, SATYENDRA K. SINGH, MICHAEL R. MAURIZI, AND SUE WICKNER. **Protein binding and unfolding by the chaperone ClpA and degradation by the protease ClpAP.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**(16) :8892–8897, August 2000. 14
- [55] SUKYEONG LEE, MATHEW E SOWA, YO-HEI WATANABE, PAUL B SIGLER, WAH CHIU, MASASUKE YOSHIDA, AND FRANCIS T. F TSAI. **The Structure of ClpB: A Molecular Chaperone that Rescues Proteins from an Aggregated State.** *Cell*, **115**(2) :229–240, October 2003. 14

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [56] TODD E. YOUNG, JUN LING, C. JANE GEISLER-LEE, ROBERT L. TANGUAY, CHRISTIAN CALDWELL, AND DANIEL R. GALLIE. **Developmental and Thermal Regulation of the Maize Heat Shock Protein, HSP101.** *Plant Physiology*, **127**(3) :777–791, November 2001. 14
- [57] BENJAMIN BOSL, VALERIE GRIMMINGER, AND STEFAN WALTER. **The molecular chaperone Hsp104-A molecular machine for protein disaggregation.** *Journal of Structural Biology*, **156**(1) :139–148, October 2006. 14
- [58] TIMM MAIER, LARS FERBITZ, ELKE DEUERLING, AND NENAD BAN. **A cradle for new proteins: trigger factor at the ribosome.** *Current Opinion in Structural Biology*, **15**(2) :204–212, April 2005. 14
- [59] ANJA HOFFMANN, BERND BUKAU, AND GÜNTER KRAMER. **Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **1803**(6) :650–661, June 2010. 14
- [60] SEBASTIAN PECHMANN, FELIX WILLMUND, AND JUDITH FRYDMAN. **The Ribosome as a Hub for Protein Quality Control.** *Molecular Cell*, **49**(3) :411–421, February 2013. 14
- [61] U. JAKOB, M. GAESTEL, K. ENGEL, AND J. BUCHNER. **Small heat shock proteins are molecular chaperones.** *Journal of Biological Chemistry*, **268**(3) :1517–1520, January 1993. 14
- [62] MARTIN HASLBECK, TITUS FRANZMANN, DANIEL WEINFURTNER, AND JOHANNES BUCHNER. **Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins.** *Nature Structural & Molecular Biology*, **12**(10) :842–846, October 2005. 14
- [63] AMBRE SALA, PATRICIA BORDES, AND PIERRE GENEVAUX. **Multitasking SecB chaperones in bacteria.** *Frontiers in Microbiology*, **5**, December 2014. 14
- [64] TROY A WALTON AND MARCELO C SOUSA. **Crystal Structure of Skp, a Prefoldin-like Chaperone that Protects Soluble and Membrane Proteins from Aggregation.** *Molecular Cell*, **15**(3) :367–374, August 2004. 14
- [65] CHAILLE T. WEBB, MICHAEL A. GORMAN, MICHAEL LAZAROU, MICHAEL T. RYAN, AND JACQUELINE M. GULBIS. **Crystal Structure of the Mitochondrial Chaperone TIM9•10 Reveals a Six-Bladed  $\alpha$ -Propeller.** *Molecular Cell*, **21**(1) :123–133, January 2006. 14
- [66] KRISTEN N. BEVERLY, MICHAEL R. SAWAYA, EINHARD SCHMID, AND CARLA M. KOEHLER. **The Tim8–Tim13 Complex Has Multiple Substrate Binding Sites and Binds Cooperatively to Tim23.** *Journal of Molecular Biology*, **382**(5) :1144–1156, October 2008. 14
- [67] ROSS E. DALBEY, PENG WANG, AND ANDREAS KUHN. **Assembly of Bacterial Inner Membrane Proteins.** *Annual Review of Biochemistry*, **80**(1) :161–187, 2011. 14
- [68] MICHAEL T RYAN, RICHARD WAGNER, AND NIKOLAUS PFANNER. **The transport machinery for the import of preproteins across the outer mitochondrial membrane.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **32**(1) :13–21, January 2000. 14
- [69] BJÖRN M. BURMANN AND SEBASTIAN HILLER. **Chaperones and chaperone–substrate complexes: Dynamic playgrounds for NMR spectroscopists.** *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy*, **86** :41–64, 2015. 15
- [70] BERND BUKAU AND ARTHUR L HORWICH. **The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines.** *Cell*, **92**(3) :351–366, February 1998. 16
- [71] F. ULRICH HARTL. **Molecular chaperones in cellular protein folding.** *Nature*, **381**(6583) :571–580, June 1996. 16
- [72] KERSTIN BRAIG. **Chaperonins.** *Current Opinion in Structural Biology*, **8**(2) :159–165, April 1998. 16
- [73] D K EGGERS, W J WELCH, AND W J HANSEN. **Complexes between nascent polypeptides and their molecular chaperones in the cytosol of mammalian cells.** *Molecular Biology of the Cell*, **8**(8) :1559–1573, August 1997. 16
- [74] S B ZIMMERMAN AND A P MINTON. **Macromolecular Crowding: Biochemical, Biophysical, and Physiological Consequences.** *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **22**(1) :27–65, 1993. 16, 21
- [75] THOMAS LANGER, CHI LU, HARRISON ECHOLS, JOHN FLANAGAN, MANAJIT K. HAYER, AND F. ULRICH HARTL. **Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding.** *Nature*, **356**(6371) :683–689, April 1992. 17
- [76] WILLIAM J. NETZER AND F. ULRICH HARTL. **Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes.** *Nature*, **388**(6640) :343–349, July 1997. 17
- [77] WILLIAM J. NETZER AND F. ULRICH HARTL. **Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms.** *Trends in Biochemical Sciences*, **23**(2) :68–73, February 1998. 17
- [78] ZHAOHUI XU AND PAUL B. SIGLER. **GroEL/GroES: Structure and Function of a Two-Stroke Folding Machine.** *Journal of Structural Biology*, **124**(2–3) :129–141, December 1998. 17
- [79] O FAYET, T ZIEGELHOFFER, AND C GEORGIOPOULOS. **The groES and groEL heat shock gene products of Escherichia coli are essential for bacterial growth at all temperatures.** *Journal of Bacteriology*, **171**(3) :1379–1385, March 1989. 19
- [80] V. STOLDT, F. RADEMACHER, V. KEHREN, J. F. ERNST, D. A. PEARCE, AND F. SHERMAN. **Review: the Cct eukaryotic chaperonin subunits of Saccharomyces cerevisiae and other yeasts.** *Yeast (Chichester, England)*, **12**(6) :523–529, May 1996. 19
- [81] GEORGIA KAPATAI, ANDREW LARGE, JUSTIN L. P. BENESCH, CAROL V. ROBINSON, JOSÉ L. CARRASCOSA, JOSÉ M. VALPUESTA, PREETHY GOWRINATHAN, AND PETER A. LUND. **All three chaperonin genes in the archaeon Haloflex volcanii are individually dispensable.** *Molecular Microbiology*, **61**(6) :1583–1597, September 2006. 19
- [82] KERSTIN BRAIG, ZBYSZEK OTWINOWSKI, RASHMI HEGDE, DAVID C. BOISVERT, ANDRZEJ JOACHIMIAK, ARTHUR L. HORWICH, AND PAUL B. SIGLER. **The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å [Aring].** , *Published online : 13 October 1994 ; | doi :10.1038/371578a0*, **371**(6498) :578–586, October 1994. 21
- [83] ZHAOHUI XU, ARTHUR L. HORWICH, AND PAUL B. SIGLER. **The crystal structure of the asymmetric GroEL–GroES–(ADP)7 chaperonin complex.** *Nature*, **388**(6644) :741–750, August 1997. 21
- [84] ANDREW KUSMIERCZYK AND JÖRG MARTIN. **Assembly of chaperonin complexes.** *Molecular Biotechnology*, **19**(2) :141–152, October 2001. 21, 29
- [85] JONATHAN S WEISSMAN, HAYS S RYE, WAYNE A FENTON, JOSEPH M BEECHEM, AND ARTHUR L HORWICH. **Characterization of the Active Intermediate of a GroEL–GroES-Mediated Protein Folding Reaction.** *Cell*, **84**(3) :481–490, February 1996. 21

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [86] ALAN M. ROSEMAN, SHAOXIA CHEN, HELEN WHITE, KERSTIN BRAIG, AND HELEN R. SAIBIL. **The Chaperonin ATPase Cycle: Mechanism of Allosteric Switching and Movements of Substrate-Binding Domains in GroEL.** *Cell*, **87**(2) :241–251, October 1996. 23
- [87] NEIL A. RANSON, GEORGE W. FARR, ALAN M. ROSEMAN, BRENT GOWEN, WAYNE A. FENTON, ARTHUR L. HORWICH, AND HELEN R. SAIBIL. **ATP-Bound States of GroEL Captured by Cryo-Electron Microscopy.** *Cell*, **107**(7) :869–879, December 2001. 23
- [88] OFER YIFRACH AND AMNON HOROVITZ. **Nested cooperativity in the ATPase activity of the oligomeric chaperonin GroEL.** *Biochemistry*, **34**(16) :5303–5308, April 1995. 23
- [89] GEORGE LORIMER. **Protein folding Folding with a two-stroke motor.** *Nature*, **388**(6644) :720–721, August 1997. 23
- [90] M. SCHMIDT, K. RUTKAT, R. RACHEL, G. PFEIFER, R. JAE-NICKE, P. VIITANEN, G. LORIMER, AND J. BUCHNER. **Symmetric complexes of GroE chaperonins as part of the functional cycle.** *Science (New York, N.Y.)*, **265**(5172) :656–659, July 1994. 23
- [91] ARTHUR L. HORWICH, WAYNE A. FENTON, ELI CHAPMAN, AND GEORGE FARR. **Two Families of Chaperonin: Physiology and Mechanism.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **23**(1) :115–145, 2007. 23, 27
- [92] TOMONAO INOBE, KAZUNOBU TAKAHASHI, KOSUKE MAKI, SAKAWO ENOKI, KIYOTO KAMAGATA, AKIO KADOOKA, MUNEHITO ARAI, AND KUNIHIRO KUWAJIMA. **Asymmetry of the GroEL-GroES Complex under Physiological Conditions as Revealed by Small-Angle X-Ray Scattering.** *Biophysical Journal*, **94**(4) :1392–1402, February 2008. 23
- [93] ARTHUR L. HORWICH. **Protein folding in the cell: an inside story.** *Nature Medicine*, **17**(10) :1211–1216, October 2011. 23, 24
- [94] DANIEL K. CLARE, DAVEN VASISHTAN, SCOTT STAGG, JOEL QUISPE, GEORGE W. FARR, MAYA TOPF, ARTHUR L. HORWICH, AND HELEN R. SAIBIL. **ATP-Triggered Conformational Changes Delineate Substrate-Binding and -Folding Mechanics of the GroEL Chaperonin.** *Cell*, **149**(1) :113–123, March 2012. 23
- [95] LARS SKJÆ RVEN, JORGE CUELLAR, AURORA MARTINEZ, AND JOSÉ MARÍA VALPUESTA. **Dynamics, flexibility, and allostery in molecular chaperonins.** *FEBS Letters*, **589**(19) :2522–2532, 2015. 23
- [96] TOMOYA SAMESHIMA, RYO IIZUKA, TARO UENO, AND TAKASHI FUNATSU. **Denatured proteins facilitate the formation of the football shaped GroEL-(GroES)<sub>2</sub> complex.** *Biochemical Journal*, **427**(2) :247–254, April 2010. 23, 25, 26
- [97] XIANG YE AND GEORGE H. LORIMER. **Substrate protein switches GroE chaperonins from asymmetric to symmetric cycling by catalyzing nucleotide exchange.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**(46) :E4289–E4297, November 2013. 23, 25, 26
- [98] XUE FEI, XIANG YE, NICOLE A. LARONDE, AND GEORGE H. LORIMER. **Formation and structures of GroEL:GroES<sub>2</sub> chaperonin footballs, the protein-folding functional form.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**(35) :12775–12780, September 2014. 23, 26
- [99] HIDEKI TAGUCHI. **Reaction Cycle of Chaperonin GroEL via Symmetric “Football” Intermediate.** *Journal of Molecular Biology*, **427**(18) :2912–2918, 2015. 23
- [100] SHRUTI SHARMA, KAUSIK CHAKRABORTY, BARBARA K. MÜLLER, NAGORE ASTOLA, YUN-CHI TANG, DON C. LAMB, MANAJIT HAYER-HARTL, AND F. ULRICH HARTL. **Monitoring protein conformation along the pathway of chaperonin-assisted folding.** *Cell*, **133**(1) :142–153, April 2008. 23
- [101] ZONG LIN, DAMIAN MADAN, AND HAYS S RYE. **GroEL stimulates protein folding through forced unfolding.** *Nature structural & molecular biology*, **15**(3) :303–311, March 2008. 23, 26
- [102] NEIL A. RANSON, DANIEL K. CLARE, GEORGE W. FARR, DAVID HOULDERSHAW, ARTHUR L. HORWICH, AND HELEN R. SAIBIL. **Allosteric signaling of ATP hydrolysis in GroEL-GroES complexes.** *Nature Structural & Molecular Biology*, **13**(2) :147–152, February 2006. 23, 24
- [103] DONG-HUA CHEN, DAMIAN MADAN, JEREMY WEAVER, ZONG LIN, GUNNAR F. SCHRÖDER, WAH CHIU, AND HAYS S. RYE. **Visualizing GroEL/ES in the Act of Encapsulating a Folding Protein.** *Cell*, **153**(6) :1354–1365, June 2013. 23
- [104] SHAOXIA CHEN, ALAN M. ROSEMAN, ALLISON S. HUNTER, STEPHEN P. WOOD, STEVEN G. BURSTON, NEIL A. RANSON, ANTHONY R. CLARKE, AND HELEN R. SAIBIL. **Location of a folding protein and shape changes in GroELGroES complexes imaged by cryo-electron microscopy.** *Nature*, **371**(6494) :261–264, September 1994. 23
- [105] JOHN P. GRASON, JENNIFER S. GRESHAM, LUSIANA WIDJAJA, SARAH C. WEHRI, AND GEORGE H. LORIMER. **Setting the chaperonin timer: The effects of K<sup>+</sup> and substrate protein on ATP hydrolysis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**(45) :17334–17338, November 2008. 24
- [106] HAYS S. RYE, STEVEN G. BURSTON, WAYNE A. FENTON, JOSEPH M. BEECHEM, ZHAOHUI XU, PAUL B. SIGLER, AND ARTHUR L. HORWICH. **Distinct actions of cis and trans ATP within the double ring of the chaperonin GroEL.** *Nature*, **388**(6644) :792–798, August 1997. 24
- [107] HAYS S. RYE, ALAN M. ROSEMAN, SHAOXIA CHEN, KRYSZYNA FURTAK, WAYNE A. FENTON, HELEN R. SAIBIL, AND ARTHUR L. HORWICH. **GroEL-GroES Cycling : ATP and Nonnative Polypeptide Direct Alternation of Folding-Active Rings.** *Cell*, **97**(3) :325–338, April 1999. 24, 26
- [108] SHUBHASIS HALDAR, AMIT J. GUPTA, XIAO YAN, GORAN MILIČIĆ, F. ULRICH HARTL, AND MANAJIT HAYER-HARTL. **Chaperonin-Assisted Protein Folding: Relative Population of Asymmetric and Symmetric GroEL:GroES Complexes.** *Journal of Molecular Biology*, **427**(12) :2244–2255, June 2015. 25
- [109] ARTHUR L. HORWICH, ADRIAN C. APETRI, AND WAYNE A. FENTON. **The GroEL/GroES cis cavity as a passive anti-aggregation device.** *FEBS letters*, **583**(16) :2654–2662, August 2009. 26, 27
- [110] ANDREW I. JEWETT AND JOAN-EMMA SHEA. **Reconciling theories of chaperonin accelerated folding with experimental evidence.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, **67**(2) :255–276, October 2009. 26
- [111] ACHIM BRINKER, GUENTHER PFEIFER, MICHAEL J. KERNER, DEAN J. NAYLOR, F. ULRICH HARTL, AND MANAJIT HAYER-HARTL. **Dual Function of Protein Confinement in Chaperonin-Assisted Protein Folding.** *Cell*, **107**(2) :223–233, October 2001. 26
- [112] TAPAN K. CHAUDHURI, GEORGE W. FARR, WAYNE A. FENTON, SABINE ROSPERT, AND ARTHUR L. HORWICH. **GroEL/GroES-Mediated Folding of a Protein Too Large to Be Encapsulated.** *Cell*, **107**(2) :235–246, October 2001. 27

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [113] SUBHANKAR PAUL, CHANPREET SINGH, SAROJ MISHRA, AND TAPAN K. CHAUDHURI. **The 69 kDa Escherichia coli maltodextrin glucosidase does not get encapsulated underneath GroES and folds through trans mechanism during GroEL/GroES-assisted folding.** *The FASEB Journal*, **21**(11) :2874–2885, January 2007. 27
- [114] VINAY DAHIYA AND TAPAN K. CHAUDHURI. **Chaperones GroEL/GroES Accelerate the Refolding of a Multidomain Protein through Modulating On-pathway Intermediates.** *Journal of Biological Chemistry*, **289**(1) :286–298, January 2014. 27
- [115] Y. TANG, H. CHANG, ANNETTE ROEBEN, DIRK WISCHNEWSKI, NADINE WISCHNEWSKI, MICHAEL J KERNER, ULRICH F HARTL, AND MANAJIT HAYERHARTL. **Structural features of the GroEL-GroES nano-cage required for rapid folding of encapsulated protein.** *Cell*, **125**(5) :903–14, June 2006. 27, 36
- [116] Y. TANG, H. CHANG, KAUSIK CHAKRABORTY, ULRICH F. HARTL, AND MANAJIT HAYERHARTL. **Essential role of the chaperonin folding compartment in vivo.** *The EMBO journal*, **27**(10) :1458–68, May 2008. 27
- [117] MARIA GIULIA BIGOTTI AND ANTHONY R. CLARKE. **Chaperonins: The hunt for the Group II mechanism.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **474**(2) :331–339, June 2008. 29
- [118] HUGO YEBENES, PABLO MESA, INES G. MUNOZ, GUILLERMO MONTOYA, AND JOSE M. VALPUESTA. **Chaperonins: two rings for folding.** *Trends in Biochemical Sciences*, **36**(8) :424–432, August 2011. 29
- [119] JOSE M. VALPUESTA, JAIME MARTIN-BENITO, PAULINO GOMEZ-PUERTAS, JOSE L. CARRASCOSA, AND KEITH R. WILLISON. **Structure and function of a protein folding machine: the eukaryotic cytosolic chaperonin CCT.** *FEBS Letters*, **529**(1) :11–16, October 2002. 29
- [120] ALEXANDER LEITNER, LUKASZ A. JOACHIMIAK, ANDREAS BRACHER, LEONIE MÖNKEMEYER, THOMAS WALZTHOENI, BRYAN CHEN, SEBASTIAN PECHMANN, SUSAN HOLMES, YAO CONG, BOXUE MA, STEVE LUDTKE, WAH CHIU, F. ULRICH HARTL, RUEDI AEBERSOLD, AND JUDITH FRYDMAN. **The molecular architecture of the eukaryotic chaperonin TRiC/CCT.** *Structure*, **20**(5) :814–825, May 2012. 29
- [121] MARIA GIULIA BIGOTTI AND ANTHONY R. CLARKE. **Cooperativity in the Thermosome.** *Journal of Molecular Biology*, **348**(1) :13–26, April 2005. 31
- [122] ANDREW R. KUSMIERCZYK AND JÖRG MARTIN. **Nested cooperativity and salt dependence of the ATPase activity of the archaeal chaperonin Mm-cpn.** *FEBS Letters*, **547**(1–3) :201–204, July 2003. 31
- [123] HUA-YOU CHEN, ZHONG-MEI CHU, YAN-HE MA, YI ZHAN, AND SHENG-LI YAND. **Expression and characterization of the chaperonin molecular machine from the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus.** *Journal of Basic Microbiology*, **47**(2) :132–137, April 2007. 31, 160
- [124] JOSE H. PEREIRA, CORIE Y. RALSTON, NICHOLAI R. DOUGLAS, DANIEL MEYER, KELLY M. KNEE, DANIEL R. GOULET, JONATHAN A. KING, JUDITH FRYDMAN, AND PAUL D. ADAMS. **Crystal Structures of a Group II Chaperonin Reveal the Open and Closed States Associated with the Protein Folding Cycle.** *Journal of Biological Chemistry*, **285**(36) :27958–27966, September 2010. 31, 33, 36
- [125] YANWU HUO, ZHONGJUN HU, KAI ZHANG, LI WANG, YUJIA ZHAI, QIANGJUN ZHOU, GABE LANDER, JIANG ZHU, YONGZHI HE, XIAOYUN PANG, WEI XU, MARK BARTLAM, ZHIYANG DONG, AND FEI SUN. **Crystal structure of group II chaperonin in the open state.** *Structure (London, England : 1993)*, **18**(10) :1270–1279, October 2010. 31, 115
- [126] GALIT KAFRI, KEITH R. WILLISON, AND AMNON HOROVITZ. **Nested allosteric interactions in the cytoplasmic chaperonin containing TCP-1.** *Protein Science*, **10**(2) :445–449, 2001. 31, 34
- [127] GALIT KAFRI AND AMNON HOROVITZ. **Transient Kinetic Analysis of ATP-induced Allosteric Transitions in the Eukaryotic Chaperonin containing TCP-1.** *Journal of Molecular Biology*, **326**(4) :981–987, February 2003. 31, 34
- [128] STEFANIE REISSMANN, LUKASZ A. JOACHIMIAK, BRYAN CHEN, ANNE S. MEYER, ANTHONY NGUYEN, AND JUDITH FRYDMAN. **A Gradient of ATP Affinities Generates an Asymmetric Power Stroke Driving the Chaperonin TRiC/CCT Folding Cycle.** *Cell Reports*, **2**(4) :866–877, October 2012. 31
- [129] NIR KALISMAN, CHRISTOPHER M. ADAMS, AND MICHAEL LEVITT. **Subunit order of eukaryotic TRiC/CCT chaperonin by cross-linking, mass spectrometry, and combinatorial homology modeling.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**(8) :2884–2889, February 2012. 31
- [130] MÓNICA CHAGOYEN, JOSÉ L. CARRASCOSA, FLORENCIO PAZOS, AND JOSÉ M. VALPUESTA. **Molecular determinants of the ATP hydrolysis asymmetry of the CCT chaperonin complex.** *Proteins : Structure, Function, and Bioinformatics*, **82**(5) :703–707, May 2014. 31
- [131] OSCAR LLORCA, JAIME MARTIN-BENITO, JULIE GRANTHAM, MONICA RITCO-VONSOVICI, KEITH R. WILLISON, JOSE L. CARRASCOSA, AND JOSE M. VALPUESTA. **The sequential allosteric ring mechanism in the eukaryotic chaperonin-assisted folding of actin and tubulin.** *The EMBO Journal*, **20**(15) :4065–4075, August 2001. 31, 33
- [132] STEFANIE REISSMANN, CHARLES PARNOT, CHRISTOPHER R BOOTH, WAH CHIU, AND JUDITH FRYDMAN. **Essential function of the built-in lid in the allosteric regulation of eukaryotic and archaeal chaperonins.** *Nature Structural & Molecular Biology*, **14**(5) :432–440, April 2007. 31, 33, 36
- [133] TARO KANZAKI, RYO IIZUKA, KAZUNOBU TAKAHASHI, KOSUKE MAKI, RIE MASUDA, MUHAMAD SAHLAN, HUGO YÉBENES, JOSÉ M. VALPUESTA, TOSHIHIKO OKA, MASAHIRO FURUTANI, NORIYUKI ISHII, KUNIHIRO KUWAJIMA, AND MASAFUMI YOYODA. **Sequential Action of ATP-dependent Subunit Conformational Change and Interaction between Helical Protrusions in the Closure of the Built-in Lid of Group II Chaperonins.** *The Journal of Biological Chemistry*, **283**(50) :34773–34784, December 2008. 31, 33, 34
- [134] NICHOLAI R. DOUGLAS, STEFANIE REISSMANN, JUNJIE ZHANG, BO CHEN, JOANITA JAKANA, RAMYA KUMAR, WAH CHIU, AND JUDITH FRYDMAN. **Dual Action of ATP Hydrolysis Couples Lid Closure to Substrate Release into the Group II Chaperonin Chamber.** *Cell*, **144**(2) :240–252, January 2011. 31, 33, 36
- [135] RONALD MELKI, GÉRARD BATELIER, STÉPHANIE SOULIÉ, AND ROBBLEY C. WILLIAMS. **Cytoplasmic Chaperonin Containing TCP-1: Structural and Functional Characterization.** *Biochemistry*, **36**(19) :5817–5826, May 1997. 33, 121, 130, 131
- [136] OSCAR LLORCA, MARTIN G. SMYTH, SERGIO MARCO, JOSÉ L. CARRASCOSA, KEITH R. WILLISON, AND JOSÉ M. VALPUESTA. **ATP Binding Induces Large Conformational Changes**

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- in the Apical and Equatorial Domains of the Eukaryotic Chaperonin Containing TCP-1 Complex. *Journal of Biological Chemistry*, **273**(17) :10091–10094, April 1998. 33, 121, 130, 131
- [137] OSCAR LLORCA, MARTIN G. SMYTH, JOSE L. CARRASCOSA, KEITH R. WILLISON, MICHAEL RADERMACHER, STEFAN STEINBACHER, AND JOSE M. VALPUESTA. **3D reconstruction of the ATP-bound form of CCT reveals the asymmetric folding conformation of a type II chaperonin.** *Nature Structural & Molecular Biology*, **6**(7) :639–642, July 1999. 33, 34, 121, 130, 131
- [138] IRINA GUTSCHE, JÖRG HOLZINGER, MANFRED RÖSS LE, HERMANN HEUMANN, WOLFGANG BAUMEISTER, AND ROLAND P. MAY. **Conformational rearrangements of an archaeal chaperonin upon ATPase cycling.** *Current Biology*, **10**(7) :405–408, April 2000. 33, 121, 130, 131
- [139] IRINA GUTSCHE, JÖRG HOLZINGER, NADINE RAUH, WOLFGANG BAUMEISTER, AND ROLAND P. MAY. **ATP-Induced Structural Change of the Thermosome Is Temperature-Dependent.** *Journal of Structural Biology*, **135**(2) :139–146, August 2001. 33, 43, 121, 130, 131, 132, 138, 140
- [140] RYO IIZUKA, TAKAO YOSHIDA, YASUHIRO SHOMURA, KUNIO MIKI, TADASHI MARUYAMA, MASAFUMI ODAKA, AND MASAFUMI YOHDA. **ATP Binding Is Critical for the Conformational Change from an Open to Closed State in Archaeal Group II Chaperonin.** *Journal of Biological Chemistry*, **278**(45) :44959–44965, July 2003. 33, 115, 121, 130, 131, 198
- [141] ANNE S. MEYER, JOEL R. GILLESPIE, DIRK WALTHER, IAN S. MILLET, SEBASTIAN DONIACH, AND JUDITH FRYDMAN. **Closing the Folding Chamber of the Eukaryotic Chaperonin Requires the Transition State of ATP Hydrolysis.** *Cell*, **113**(3) :369–381, May 2003. 33, 36
- [142] RYO IIZUKA, TAKAO YOSHIDA, NORIYUKI ISHII, TAMOTSU ZAKO, KAZUNOBU TAKAHASHI, KOSUKE MAKI, TOMONAO INOBE, KUNIHIRO KUWAJIMA, AND MASAFUMI YOHDA. **Characterization of Archaeal Group II Chaperonin-ADP-Metal Fluoride Complexes implies that group II chaperonins operate as a "Two-stroke engine".** *Journal of Biological Chemistry*, **280**(48) :40375–40383, December 2005. 33, 34, 198
- [143] TAKAO YOSHIDA, RYO IIZUKA, KEISUKE ITAMI, TAKUO YASUNAGA, HARUHIKO SAKURABA, TOSHIHISA OHSHIMA, MASAFUMI YOHDA, AND TADASHI MARUYAMA. **Comparative analysis of the protein folding activities of two chaperonin subunits of Thermococcus strain KS-1: the effects of beryllium fluoride.** *Extremophiles*, **11**(2) :225–235, March 2007. 33, 198
- [144] RYO IIZUKA, TARO UENO, NOBUHIRO MORONE, AND TAKASHI FUNATSU. **Single-Molecule Fluorescence Polarization Study of Conformational Change in Archaeal Group II Chaperonin.** *PLoS ONE*, **6**(7) :e22253, July 2011. 33, 198
- [145] AYUMI NAKAGAWA, KAZUKI MORIYA, MAYUNO ARITA, YOHEI YAMAMOTO, KYOTARO KITAMURA, NAOKI ISHIGURO, TARO KANZAKI, TOSHIHIKO OKA, KOKI MAKABE, KUNIHIRO KUWAJIMA, AND MASAFUMI YOHDA. **Dissection of the ATP-Dependent Conformational Change Cycle of a Group II Chaperonin.** *Journal of Molecular Biology*, **426**(2) :447–459, January 2014. 33, 35, 198, 199
- [146] JUNJIE ZHANG, MATTHEW L. BAKER, GUNNAR F. SCHR[OUML]DER, NICHOLAI R. DOUGLAS, STEFANIE REISSMANN, JOANITA JAKANA, MATTHEW DOUGHERTY, CAROLINE J. FU, MICHAEL LEVITT, STEVEN J. LUDTKE, JUDITH FRYDMAN, AND WAH CHIU. **Mechanism of folding chamber closure in a group II chaperonin.** *Nature*, **463**(7279) :379–383, January 2010. 33, 36
- [147] JUNJIE ZHANG, BOXUE MA, FRANK DiMAIO, NICHOLAI R. DOUGLAS, LUKASZ A. JOACHIMIAK, DAVID BAKER, JUDITH FRYDMAN, MICHAEL LEVITT, AND WAH CHIU. **Cryo-EM Structure of a Group II Chaperonin in the Prehydrolysis ATP-Bound State Leading to Lid Closure.** *Structure*, **19**(5) :633–639, 2011. 33
- [148] JOSE H. PEREIRA, CORIE Y. RALSTON, NICHOLAI R. DOUGLAS, RAMYA KUMAR, TOM LOPEZ, RYAN P. McANDREW, KELLY M. KNEE, JONATHAN A. KING, JUDITH FRYDMAN, AND PAUL D. ADAMS. **Mechanism of nucleotide sensing in group II chaperonins.** *The EMBO Journal*, **31**(3) :731–740, February 2012. 33
- [149] BARBARA K. SZPIKOWSKA, MARK A. SHERMAN, MARIA T. MAS, AND KRISTINE M. SWIDEREK. **MgATP binding to the nucleotide-binding domains of the eukaryotic cytoplasmic chaperonin induces conformational changes in the putative substrate-binding domains.** *Protein Science*, **7**(7) :1524–1530, July 1998. 33
- [150] CHRISTOPHER R. BOOTH, ANNE S. MEYER, YAO CONG, MAYA TOPF, ANDREJ SALI, STEVEN J. LUDTKE, WAH CHIU, AND JUDITH FRYDMAN. **Mechanism of lid closure in the eukaryotic chaperonin TRiC/CCT.** *Nature structural & molecular biology*, **15**(7) :746–753, July 2008. 33
- [151] GUY SCHOEHN, ELSIE QUATE-RANDALL, JOSÉ L. JIMÉNEZ, ANDRZEJ JOACHIMIAK, AND HELEN R. SAIBIL. **Three conformations of an archaeal chaperonin, TF55 from Sulfolobus shibatae.** *Journal of Molecular Biology*, **296**(3) :813–819, 2000. 34, 120, 121
- [152] GUY SCHOEHN, MICHELLE HAYES, MATTHEW CLIFF, ANTHONY R. CLARKE, AND HELEN R. SAIBIL. **Domain rotations between open, closed and bullet-shaped forms of the thermosome, an archaeal chaperonin.** *Journal of Molecular Biology*, **301**(2) :323–332, August 2000. 34, 120, 121
- [153] J. FRYDMAN, E. NIMMESGERN, H. ERDJUMENT-BROMAGE, J. S. WALL, P. TEMPST, AND F. U. HARTL. **Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits.** *The EMBO Journal*, **11**(13) :4767–4778, December 1992. 34
- [154] CARIEN DEKKER, S. MARK ROE, ELIZABETH A. McCORMACK, FABIENNE BEURON, LAURENCE H. PEARL, AND KEITH R. WILLISON. **The crystal structure of yeast CCT reveals intrinsic asymmetry of eukaryotic cytosolic chaperonins.** *EMBO J*, **30**(15) :3078–3090, 2011. 36
- [155] INÉS G. MUÑOZ, HUGO YÉBENES, MIN ZHOU, PABLO MESA, MARINA SERNA, AH YOUNG PARK, ELISABETH BRAGADO-NILSSON, ANA BELOSO, GUILLERMO DE CÁRCER, MARCOS MALUMBRES, CAROL V. ROBINSON, JOSÉ M. VALPUESTA, AND GUILLERMO MONTÓYA. **Crystal structure of the open conformation of the mammalian chaperonin CCT in complex with tubulin.** *Nature Structural & Molecular Biology*, **18**(1) :14–19, 2011. 36, 182, 209, 211
- [156] LAILA VILLEBECK, SATISH BABU MOPARTHI, MIKAEL LINDGREN, PER HAMMARSTRÖM, AND BENGT-HARALD JONSSON. **Domain-Specific Chaperone-Induced Expansion Is Required for  $\beta$ -Actin Folding: A Comparison of  $\beta$ -Actin Conformations upon Interactions with GroEL and Tail-less Complex Polypeptide 1 Ring Complex (TRiC)†.** *Biochemistry*, **46**(44) :12639–12647, November 2007. 36, 182
- [157] LAILA VILLEBECK, MALIN PERSSON, SHI-LU LUAN, PER HAMMARSTRÖM, MIKAEL LINDGREN, AND BENGT-HARALD JONSSON. **Conformational Rearrangements of Tail-less Complex Polypeptide 1 (TCP-1) Ring Complex (TRiC)-Bound Actin†.** *Biochemistry*, **46**(17) :5083–5093, May 2007. 36, 182

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [158] MIHOKO SUZUKI, TARO UENO, RYO IZUKA, TAKAHIRO MIURA, TAMOTSU ZAKO, RENA AKAHORI, TAKEO MIYAKE, NAONOBU SHIMAMOTO, MUTSUOKO AOKI, TAKASHI TANII, IWAO OHDOMARI, AND TAKASHI FUNATSU. **Effect of the C-terminal Truncation on the Functional Cycle of Chaperonin GroEL.** *The Journal of Biological Chemistry*, **283**(35) :23931–23939, August 2008. 36
- [159] LISA M. BERGERON, DAVID L. SHIS, LIZABETH GOMEZ, AND DOUGLAS S. CLARK. **Small molecule inhibition of a Group II chaperonin: Pinpointing a loop region within the equatorial domain as necessary for protein refolding.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **481**(1) :45–51, January 2009. 36
- [160] NIR KALISMAN, GUNNAR F. SCHRÖDER, AND MICHAEL LEVITT. **The crystal structures of the eukaryotic chaperonin CCT reveal its functional partitioning.** *Structure (London, England : 1993)*, **21**(4) :540–549, April 2013. 37
- [161] JORGE CUÉLLAR, JAIME MARTÍN-BENITO, SJORS H. W. SCHERES, RUI SOUSA, FERNANDO MORO, EDUARDO LÓPEZ-VIÑAS, PAULINO GÓMEZ-PUERTAS, ARTURO MUGA, JOSÉ L. CARRASCOSA, AND JOSÉ M. VALPUESTA. **The structure of CCT–Hsc70NBD suggests a mechanism for Hsp70 delivery of substrates to the chaperonin.** *Nature Structural & Molecular Biology*, **15**(8) :858–864, August 2008. 39
- [162] ARTHUR L. HORWICH. **Chaperonin-mediated Protein Folding.** *Journal of Biological Chemistry*, **288**(33) :23622–23632, August 2013. 39
- [163] IRINA E VAINBERG, SALLY A LEWIS, HEIDI ROMMELAERE, CHRISTOPHE AMPE, JOEL VANDEKERCKHOVE, HANNAH L KLEIN, AND NICHOLAS J COWAN. **Prefoldin, a Chaperone that Delivers Unfolded Proteins to Cytosolic Chaperonin.** *Cell*, **93**(5) :863–873, May 1998. 39
- [164] KATJA SIEGERS, THOMAS WALDMANN, MICHEL R. LEROUX, KATRIN GREIN, ANDREJ SHEVCHENKO, ELMAR SCHIEBEL, AND F. ULRICH HARTL. **Compartmentation of protein folding in vivo: sequestration of non-native polypeptide by the chaperonin–GimC system.** *The EMBO Journal*, **18**(1) :75–84, January 1999. 39
- [165] M R LEROUX, M FÄNDRICH, D KLUNKER, K SIEGERS, A N LUPAS, J R BROWN, E SCHIEBEL, C M DOBSON, AND F U HARTL. **MtGimC, a novel archaeal chaperone related to the eukaryotic chaperonin cofactor GimC/prefoldin.** *The EMBO Journal*, **18**(23) :6730–6743, December 1999. 39
- [166] RALF SIEGERT, MICHEL R. LEROUX, CLEMENS SCHEUFLER, F. ULRICH HARTL, AND ISMAIL MOAREFI. **Structure of the Molecular Chaperone Prefoldin: Unique Interaction of Multiple Coiled Coil Tentacles with Unfolded Proteins.** *Cell*, **103**(4) :621–632, November 2000. 39
- [167] MUHAMAD SAHLAN, TAMOTSU ZAKO, PHAN THE TAI, AKASHI OHTAKI, KEIICHI NOGUCHI, MIZUO MAEDA, HIDEYUKI MIYATAKE, NAOSHI DOHMAE, AND MASAFUMI YOHDA. **Thermodynamic Characterization of the Interaction between Prefoldin and Group II Chaperonin.** *Journal of Molecular Biology*, **399**(4) :628–636, June 2010. 39
- [168] VICTOR F. LUNDIN, PETER C. STIRLING, JUAN GOMEZ-REINO, JILL C. MWENIFUMBO, JENNIFER M. OBST, JOSÉ M. VALPUESTA, AND MICHEL R. LEROUX. **Molecular clamp mechanism of substrate binding by hydrophobic coiled-coil residues of the archaeal chaperone prefoldin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(13) :4367–4372, March 2004. 40
- [169] J. MARTIN-BENITO. **Structure of eukaryotic prefoldin and of its complexes with unfolded actin and the cytosolic chaperonin CCT.** *The EMBO Journal*, **21**(23) :6377–6386, December 2002. 40
- [170] MINA OKOCHI, TOMOKO NOMURA, TAMOTSU ZAKO, TAKATOSHI ARAKAWA, RYO IZUKA, HIROSHI UEDA, TAKASHI FUNATSU, MICHEL LEROUX, AND MASAFUMI YOHDA. **Kinetics and Binding Sites for Interaction of the Prefoldin with a Group II Chaperonin contiguous non-native substrate and chaperonin binding sites in the archaeal prefoldin.** *Journal of Biological Chemistry*, **279**(30) :31788–31795, July 2004. 40
- [171] MUHAMAD SAHLAN, TARO KANZAKI, TAMOTSU ZAKO, MIZUO MAEDA, AND MASAFUMI YOHDA. **Analysis of the interaction mode between hyperthermophilic archaeal group II chaperonin and prefoldin using a platform of chaperonin oligomers of various subunit arrangements.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, **1804**(9) :1810–1816, September 2010. 40
- [172] C. R. WOESE, O. KANDLER, AND M. L. WHEELIS. **Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **87**(12) :4576–4579, June 1990. 42
- [173] BEATRICE GRABOWSKI AND ZVI KELMAN. **Autophosphorylation of Archaeal Cdc6 Homologues Is Regulated by DNA.** *Journal of Bacteriology*, **183**(18) :5459–5464, September 2001. 42
- [174] N. BAN, P. NISSEN, J. HANSEN, P. B. MOORE, AND T. A. STEITZ. **The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution.** *Science (New York, N.Y.)*, **289**(5481) :905–920, August 2000. 42
- [175] JONATHAN D. TRENT, ELMAR NIMMESGERN, JOSEPH S. WALL, F.-ULRICH HARTL, AND ARTHUR L. HORWICH. **A molecular chaperone from a thermophilic archaeobacterium is related to the eukaryotic protein t-complex polypeptide-1.** *Nature*, **354**(6353) :490–493, December 1991. 44, 122
- [176] B. M. PHIPPS, A. HOFFMANN, K. O. STETTER, AND W. BAUMEISTER. **A novel ATPase complex selectively accumulated upon heat shock is a major cellular component of thermophilic archaeobacteria.** *The EMBO Journal*, **10**(7) :1711, July 1991. 44
- [177] ANNAMARIA GUAGLIARDI, LAURA CERCHIA, SIMONETTA BARTOLUCCI, AND MOSÉ ROSSI. **The chaperonin from the archaeon Sulfolobus solfataricus promotes correct refolding and prevents thermal denaturation in vitro.** *Protein Science*, **3**(9) :1436–1443, September 1994. 44, 122, 160
- [178] TAKAO YOSHIDA, MASAFUMI YOHDA, TOSHII IIDA, TADASHI MARUYAMA, HIDEKI TAGUCHI, KAZUMORI YASAKI, MASAFUMI ODAKA, ISAO ENDO, AND YASUO KAGAWA. **Structural and functional characterization of homo-oligomeric complexes of a and b chaperonin subunits from the hyperthermophilic archaeum Thermococcus strain KS-1.** *Journal of Molecular Biology*, **273**(3) :635–645, October 1997. 44, 122, 123
- [179] THOMAS WALDMANN, MICHAEL NITSCH, MARTIN KLUMPP, AND WOLFGANG BAUMEISTER. **Expression of an archaeal chaperonin in E. coli: formation of homo- ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) and hetero-oligomeric ( $\alpha + \beta$ ) thermosome complexes.** *FEBS Letters*, **376**(1–2) :67–73, November 1995. 44, 121, 122
- [180] STEFAN ANDRA, GERHARD FREY, RAINER JAENICKE, AND KARL O. STETER. **The thermosome from Methanopyrus kandleri possesses an NH<sub>4</sub><sup>+</sup> dependent ATPase activity.** *European Journal of Biochemistry*, **255**(1) :93–99, July 1998. 44, 115, 122, 125
- [181] MINA OKOCHI, HIROKI MATSUZAKI, TOMOKO NOMURA, NORIYUKI ISHII, AND MASAFUMI YOHDA. **Molecular characterization of the group II chaperonin from the hyperthermophilic archaeum Pyrococcus horikoshii OT3.** *Extremophiles*, **9**(2) :127–134, November 2004. 44, 45, 114, 120, 122, 129, 153

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [182] HAE-JIN SON, EUN-JUNG SHIN, SOO-WAN NAM, DONG-EUN KIM, AND SUNG-JONG JEON. **Properties of the  $\alpha$  subunit of a Chaperonin from the hyperthermophilic Crenarchaeon *Aeropyrum pernix* K1.** *FEMS Microbiology Letters*, **266**(1) :103–109, 2007. 44, 115, 122, 125
- [183] HAIBIN LUO, PONGPAN LAKSANALAMAI, AND FRANK T. ROBB. **An exceptionally stable Group II chaperonin from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **486**(1) :12–18, June 2009. 44, 122, 123, 124, 125, 160
- [184] JEONG-HWAN KIM, EUN-JUNG SHIN, SUNG-JONG JEON, YEON-HEE KIM, PIL KIM, CHUNG-HWAN LEE, AND SOO-WAN NAM. **Overexpression, purification, and functional characterization of the group II chaperonin from the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus horikoshii* OT3.** *Biotechnology and Bioengineering*, **14**(5) :551–558, October 2009. 44, 45, 122, 129
- [185] KUNIHIRO HONGO, HIDENORI HIRAI, CHISATO UEMURA, SHUJIRO ONO, JUNJIRO TSUNEMI, TAKASHI HIGURASHI, TOMOHIRO MIZOBATA, AND YASUSHI KAWATA. **A novel ATP/ADP hydrolysis activity of hyperthermostable group II chaperonin in the presence of cobalt or manganese ion.** *FEBS Letters*, **580**(1) :34–40, January 2006. 45, 124
- [186] MARCO BIASINI, STEFAN BIENERT, ANDREW WATERHOUSE, KONSTANTIN ARNOLD, GABRIEL STUDER, TOBIAS SCHMIDT, FLORIAN KIEFER, TIZIANO GALLO CASSARINO, MARTINO BERTONI, LORENZA BORDOLI, AND TORSTEN SCHWEDE. **SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information.** *Nucleic Acids Research*, **42**(W1) :W252–W258, July 2014. 45
- [187] MICHAEL J. PLEVIN AND JÉRÔME BOISBOUVIER. **Chapter 1 Isotope-Labeling of Methyl Groups for NMR Studies of Large Proteins.** In ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, editor, *Recent Developments in Biomolecular NMR*. August 2012. 47, 52
- [188] RIME KERFAH, MICHAEL J PLEVIN, REMY SOUNIER, PIERRE GANS, AND JEROME BOISBOUVIER. **Methyl-specific isotopic labeling: a molecular tool box for solution NMR studies of large proteins.** *Current Opinion in Structural Biology*, **32** :113–122, 2015. 47, 50, 51, 52, 97, 166
- [189] KEVIN H. GARDNER, MICHAEL K. ROSEN, AND LEWIS E. KAY. **Global Folds of Highly Deuterated, Methyl-Protonated Proteins by Multidimensional NMR†.** *Biochemistry*, **36**(6) :1389–1401, 1997. 48, 51
- [190] VITALI TUGARINOV AND LEWIS E. KAY. **An Isotope Labeling Strategy for Methyl TROSY Spectroscopy.** *Journal of Biomolecular NMR*, **28**(2) :165–172, February 2004. 49, 51, 55
- [191] SUSAN MILLER, JOËL JANIN, ARTHUR M. LESK, AND CYRUS CHOTHIA. **Interior and surface of monomeric proteins.** *Journal of Molecular Biology*, **196**(3) :641–656, August 1987. 49
- [192] JOËL JANIN, SUSAN MILLER, AND CYRUS CHOTHIA. **Surface, subunit interfaces and interior of oligomeric proteins.** *Journal of Molecular Biology*, **204**(1) :155–164, November 1988. 49
- [193] REMCO SPRANGERS, ANNA GRIBUN, PETER M. HWANG, WALID A. HOURY, AND LEWIS E. KAY. **Quantitative NMR spectroscopy of supramolecular complexes: Dynamic side pores in ClpP are important for product release.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**(46) :16678–16683, November 2005. 49, 83
- [194] REMCO SPRANGERS, ALGIRDAS VELYVIS, AND LEWIS E. KAY. **Solution NMR of supramolecular complexes: providing new insights into function.** *Nature Methods*, **4**(9) :697–703, September 2007. 49, 80, 83
- [195] IOANNIS GELIS, ALEXANDRE M.J.J. BONVIN, DIMITRA KERAMISANO, MARINA KOUKAKI, GIORGOS GOURIDIS, SPYRIDOULA KARAMANOU, ANASTASSIOS ECONOMOU, AND CHARALAMPOS G. KALODIMOS. **Structural Basis for Signal-Sequence Recognition by the Translocase Motor SecA as Determined by NMR.** *Cell*, **131**(4) :756–769, November 2007. 49, 51, 80, 83
- [196] CARLOS AMERO, M. ASUNCIÓN DURÁ, MARJOLAINE NOIRCLERC-SAVOYE, ARNAUD PEROLLIER, BENOIT GALLET, MICHAEL J. PLEVIN, THIERRY VERNET, BRUNO FRANZETTI, AND JÉRÔME BOISBOUVIER. **A systematic mutagenesis-driven strategy for site-resolved NMR studies of supramolecular assemblies.** *Journal of Biomolecular NMR*, **50**(3) :229–236, July 2011. 49, 81, 83, 85
- [197] RIVKA L. ISAACSON, PETER J. SIMPSON, MINHAO LIU, ERNESTO COTA, XIAODONG ZHANG, PAUL FREEMONT, AND STEPHEN MATTHEWS. **A New Labeling Method for Methyl Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy NMR Spectra of Alanine Residues.** *Journal of the American Chemical Society*, **129**(50) :15428–15429, December 2007. 51
- [198] ISABEL AYALA, REMY SOUNIER, NATHALIE USÉ, PIERRE GANS, AND JÉRÔME BOISBOUVIER. **An efficient protocol for the complete incorporation of methyl-protonated alanine in perdeuterated protein.** *Journal of Biomolecular NMR*, **43**(2) :111–119, 2009. 51
- [199] RAQUEL GODOY-RUIZ, CHENYUN GUO, AND VITALI TUGARINOV. **Alanine Methyl Groups as NMR Probes of Molecular Structure and Dynamics in High-Molecular-Weight Proteins.** *Journal of the American Chemical Society*, **132**(51) :18340–18350, December 2010. 51
- [200] AMY RUSCHAK AND LEWIS KAY. **Methyl groups as probes of supra-molecular structure, dynamics and function.** *Journal of Biomolecular NMR*, **46**(1) :75–87, 2010. 51
- [201] ISABEL AYALA, OLIVIER HAMELIN, CARLOS AMERO, OMBELINE PESSEY, MICHAEL J. PLEVIN, PIERRE GANS, AND JÉRÔME BOISBOUVIER. **An optimized isotopic labelling strategy of isoleucine- $\gamma$ 2 methyl groups for solution NMR studies of high molecular weight proteins.** *Chemical Communications*, **48**(10) :1434–1436, January 2012. 51
- [202] MICHAEL FISCHER, KARIN KLOIBER, JOHANNES HÄUSLER, KARIN LEDOLTER, ROBERT KONRAT, AND WALTHER SCHMID. **Synthesis of a  $^{13}\text{C}$ MethylGroupLabeled Methionine Precursor as a Useful Tool for Simplifying Protein Structural Analysis by NMR Spectroscopy.** *ChemBioChem*, **8**(6) :610–612, February 2007. 51
- [203] ALGIRDAS VELYVIS, AMY M. RUSCHAK, AND LEWIS E. KAY. **An Economical Method for Production of  $2\text{H}_1,^{13}\text{C}_3$ -Threonine for Solution NMR Studies of Large Protein Complexes: Application to the 670 kDa Proteasome.** *PLoS ONE*, **7**(9) :e43725, September 2012. 51
- [204] ROMAN LICHTENECKER, MARTIN L. LUDWICZEK, WALTHER SCHMID, AND ROBERT KONRAT. **Simplification of Protein NOESY Spectra Using Bioorganic Precursor Synthesis and NMR Spectral Editing.** *J. Am. Chem. Soc.*, **126**(17) :5348–5349, 2004. 51
- [205] PIERRE GANS, OLIVIER HAMELIN, REMY SOUNIER, ISABEL AYALA, M. ASUNCIÓN DURÁ, CARLOS AMERO, MARJOLAINE NOIRCLERC-SAVOYE, BRUNO FRANZETTI, MICHAEL J PLEVIN, AND JÉRÔME BOISBOUVIER. **Stereospecific Isotopic Labeling of Methyl Groups for NMR Spectroscopic Studies of HighMolecularWeight Proteins.** *Angewandte Chemie International Edition*, **49**(11) :1958–1962, March 2010. 51, 52, 55

- [206] ROMAN J. LICHTENECKER, NICOLAS COUDEVILLE, ROBERT KONRAT, AND WALTHER SCHMID. **Selective Isotope Labeling of Leucine Residues by Using  $\alpha$ -Ketoacid Precursor Compounds.** *ChemBioChem*, **14**(6) :818–821, 2013. 51, 57
- [207] YOHEI MIYANOIRI, MITSUHIRO TAKEDA, KOSUKE OKUMA, AKIRA M. ONO, TSUTOMU TERAUCHI, AND MASATSUNE KAINOSHO. **Differential isotope-labeling for Leu and Val residues in a protein by *E. coli* cellular expression using stereo-specifically methyl labeled amino acids.** *Journal of Biomolecular NMR*, **57**(3) :237–249, September 2013. 51, 57
- [208] GUILLAUME MAS, ELODIE CRUBLET, OLIVIER HAMELIN, PIERRE GANS, AND JÉRÔME BOISBOUVIER. **Specific labeling and assignment strategies of valine methyl groups for NMR studies of high molecular weight proteins.** *Journal of Biomolecular NMR*, **57**(3) :251–262, 2013. 51, 52, 57
- [209] NATALIE GOTO, KEVIN GARDNER, GEOFFREY MUELLER, RANDALL WILLIS, AND LEWIS KAY. **A robust and cost-effective method for the production of Val, Leu, Ile ( $\delta$ 1) methyl-protonated  $^{15}\text{N}$ -,  $^{13}\text{C}$ -,  $^2\text{H}$ -labeled proteins.** *Journal of Biomolecular NMR*, **13**(4) :369–374, 1999. 55
- [210] VITALI TUGARINOV AND LEWIS E. KAY. **Ile, Leu, and Val Methyl Assignments of the 723-Residue Malate Synthase G Using a New Labeling Strategy and Novel NMR Methods.** *J. Am. Chem. Soc.*, **125**(45) :13868–13878, 2003. 79
- [211] M A JAREMA, P LU, AND J H MILLER. **Genetic assignment of resonances in the NMR spectrum of a protein: lac repressor.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **78**(5) :2707–2711, May 1981. 83
- [212] ANGELA M. GRONENBORN, G. MARIUS CLORE, URSULA SCHMEISSNER, AND PAUL WINGFIELD. **A  $^1\text{H}$ -NMR study of human interleukin- $1\beta$ .** *European Journal of Biochemistry*, **161**(1) :37–43, November 1986. 83
- [213] KIRSI SHIVARI, MINGJIE ZHANG, ARTHUR G. PALMER III, AND HANS J. VOGEL. **NMR studies of the methionine methyl groups in calmodulin.** *FEBS Letters*, **366**(2–3) :104–108, June 1995. 83
- [214] ALGIRDAS VELYSVIS, HOWARD K. SCHACHMAN, AND LEWIS E. KAY. **Assignment of Ile, Leu, and Val Methyl Correlations in Supra-Molecular Systems: An Application to Aspartate Transcarbamoylase.** *Journal of the American Chemical Society*, **131**(45) :16534–16543, November 2009. 83
- [215] ELODIE CRUBLET, RIME KERFAH, GUILLAUME MAS, MARJOLAINE NOIRCLERC-SAVOYE, VIOLAINE LANTEZ, THIERRY VERNET, AND JEROME BOISBOUVIER. **A Cost-Effective Protocol for the Parallel Production of Libraries of  $^{13}\text{CH}_3$ -Specifically Labeled Mutants for NMR Studies of High Molecular Weight Proteins.** In YU WAI CHEN, editor, *Methods in Molecular Biology*, Methods in Molecular Biology, pages 229–244. Humana Press, January 2014. 86, 87
- [216] JOHN M. ARCHIBALD, JOHN M. LOGSDON JR, AND W. FORD DOOLITTLE. **Recurrent paralogy in the evolution of archaeal chaperonins.** *Current Biology*, **9**(18) :1053–S6, September 1999. 113
- [217] STEFAN ANDRA, GERHARD FREY, MICHAEL NITSCH, WOLFGANG BAUMEISTER, AND KARL O. STETTER. **Purification and structural characterization of the thermosome from the hyperthermophilic archaeum *Methanopyrus kandleri*.** *FEBS Letters*, **379**(2) :127–131, January 1996. 115
- [218] D RUGGERO, A CIAMMARUCONI, AND P LONDEI. **The chaperonin of the archaeon *Sulfolobus solfataricus* is an RNA-binding protein that participates in ribosomal RNA processing.** *The EMBO Journal*, **17**(12) :3471–3477, June 1998. 116
- [219] MICHIZUMI, SHINSUKE FUJIWARA, MASAHIRO TAKAGI, SHIGENORI KANAYA, AND TADAYUKI IMANAKA. **Isolation and Characterization of a Second Subunit of Molecular Chaperonin from *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1: Analysis of an ATPase-Deficient Mutant Enzyme.** *Applied and Environmental Microbiology*, **65**(4) :1801–1805, April 1999. 122
- [220] P. A. LANZETTA, L. J. ALVAREZ, P. S. REINACH, AND O. A. CANDIA. **An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate.** *Analytical Biochemistry*, **100**(1) :95–97, November 1979. 123
- [221] J. WANG AND D. C. BOISVERT. **Structural Basis for GroEL-assisted Protein Folding from the Crystal Structure of (GroEL-KMgATP) $_{14}$  at 2.0Å Resolution.** *Journal of Molecular Biology*, **327**(4) :843–855, April 2003. 123, 124
- [222] J M CGONZÁLEZ, Y MASUCHI, F T ROBB, J W AMMERMAN, D L MAEDER, M YANAGIBAYASHI, J TAMAOKA, AND C KATO. ***Pyrococcus horikoshii* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a hydrothermal vent at the Okinawa Trough.** *Extremophiles : Life Under Extreme Conditions*, **2**(2) :123–130, May 1998. 126
- [223] HUIMIN ZHAO AND WILFRED A VAN DER DONK. **Regeneration of cofactors for use in biocatalysis.** *Current Opinion in Biotechnology*, **14**(6) :583–589, December 2003. 148
- [224] JENNIFER N. ANDEXER AND MICHAEL RICHTER. **Emerging Enzymes for ATP Regeneration in Biocatalytic Processes.** *ChemBioChem*, **16**(3) :380–386, February 2015. 148
- [225] HIROSHI SAKAI, KOICHI SUZUKI, AND KAZUTOMO IMAHORI. **Purification and Properties of Pyruvate Kinase from *Bacillus stearothermophilus*.** *Journal of Biochemistry*, **99**(4) :1157–1167, April 1986. 148
- [226] MITSUHIRO TAKEDA, KLAAS HALLENGA, MASAHIRO SHIGEZANE, MARKUS WAELCHLI, FRANK LÖHR, JOHN L. MARKLEY, AND MASATSUNE KAINOSHO. **Construction and performance of an NMR tube with a sample cavity formed within magnetic susceptibility-matched glass.** *Journal of Magnetic Resonance*, **209**(2) :167–173, April 2011. 149, 150
- [227] ANNAMARIA GUAGLIARDI, LAURA CERCHIA, AND MOSÈ ROSSI. **Prevention of in Vitro Protein Thermal Aggregation by the *Sulfolobus solfataricus* Chaperonin evidence for nonequivalent binding surfaces on the chaperonin molecule.** *Journal of Biological Chemistry*, **270**(47) :28126–28132, November 1995. 160
- [228] FILIP MEERSMAN, CANAN ATILGAN, ANDREW J. MILES, RETO BADER, WEIFENG SHANG, ANDRÉ MATAGNE, B.A. WALLACE, AND MICHEL H.J. KOCH. **Consistent Picture of the Reversible Thermal Unfolding of Hen Egg-White Lysozyme from Experiment and Molecular Dynamics.** *Biophysical Journal*, **99**(7) :2255–2263, October 2010. 160
- [229] CHRISTIAN SCHLÖRB, KATRIN ACKERMANN, CHRISTIAN RICHTER, JULIA WIRMER, AND HARALD SCHWALBE. **Heterologous Expression of Hen Egg White Lysozyme and Resonance Assignment of Tryptophan Side Chains in its Non-native States.** *Journal of Biomolecular NMR*, **33**(2) :95–104, October 2005. 162
- [230] ZHENYU GU, ZHIGUO SU, AND JAN-CHRISTER JANSON. **Urea gradient size-exclusion chromatography enhanced the yield of lysozyme refolding.** *Journal of Chromatography A*, **918**(2) :311–318, May 2001. 163

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [231] YUNJUN WANG, TRENT C. BJORNDAHL, AND DAVID S. WISHART. **Letter to the Editor: Complete  $^1\text{H}$  and non-carbonylic  $^{13}\text{C}$  assignments of native hen egg-white lysozyme.** *Journal of Biomolecular NMR*, **17**(1) :83–84, May 2000. 166
- [232] REMY SOUNIER, LAURENCE BLANCHARD, ZHENGRONG WU, AND JÉRÔME BOISBOUVIER. **High-Accuracy Distance Measurement between Remote Methyls in Specifically Protonated Proteins.** *Journal of the American Chemical Society*, **129**(3) :472–473, January 2007. 166
- [233] ALICE BLUMLEIN AND JENNIFER J. McMANUS. **Reversible and non-reversible thermal denaturation of lysozyme with varying pH at low ionic strength.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, **1834**(10) :2064–2070, October 2013. 168
- [234] N. A. FARROW, O. ZHANG, J. D. FORMAN-KAY, AND L. E. KAY. **A heteronuclear correlation experiment for simultaneous determination of  $^{15}\text{N}$  longitudinal decay and chemical exchange rates of systems in slow equilibrium.** *Journal of biomolecular NMR*, **4**(5) :727–734, September 1994. 169, 170
- [235] RALPH ZAHN, SARAH PERRETT, AND ALAN R. FERSHT. **Conformational States Bound by the Molecular Chaperones GroEL and SecB: A Hidden Unfolding (Annealing) Activity.** *Journal of Molecular Biology*, **261**(1) :43–61, August 1996. 175
- [236] NEIL A RANSON, STEVEN G BURSTON, AND ANTHONY R CLARKE. **Binding, encapsulation and ejection: substrate dynamics during a chaperonin-assisted folding reaction.** *Journal of Molecular Biology*, **266**(4) :656–664, March 1997. 175
- [237] DAVID S. LIBICH, VITALI TUGARINOV, AND G. MARIUS CLORE. **Intrinsic unfoldase/foldase activity of the chaperonin GroEL directly demonstrated using multinuclear relaxation-based NMR.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**(29) :8817–8823, July 2015. 175
- [238] ALAN FERSHT. *Structure and mechanism in protein science, a guide to enzyme catalysis and protein folding.*, **13409**. 1999. 177
- [239] J GARCIA DE LA TORRE, M. L HUERTAS, AND B CARRASCO. **HYDRONMR: Prediction of NMR Relaxation of Globular Proteins from Atomic-Level Structures and Hydrodynamic Calculations.** *Journal of Magnetic Resonance*, **147**(1) :138–146, November 2000. 179
- [240] TATIANA DIDENKO, ROLF BOELEN, AND STEFAN G. D. RÜDIGER. **3D DOSY-TROSY to determine the translational diffusion coefficient of large protein complexes.** *Protein Engineering Design and Selection*, **24**(1-2) :99–103, January 2011. 179
- [241] MAXIMILIAN J. HARTL, BJÖRN M. BURMANN, STEFAN J. PRASCH, CLEMENS SCHWARZINGER, KRISTIAN SCHWEIMER, BIRGITTA M. WÖHRL, PAUL RÖSCH, AND STEPHAN SCHWARZINGER. **Fast Mapping of Biomolecular Interfaces by Random Spin Labeling (RSL).** *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, **29**(4) :793–798, 2012. 184
- [242] F DELAGLIO, S GRZESIEK, G W VUISTER, G ZHU, J PFEIFER, AND A BAX. **NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes.** *Journal of Biomolecular NMR*, **6**(3) :277–293, November 1995. 192
- [243] CARLOS AMERO, PAUL SCHANDA, M. ASUNCIÓN DURÁ, ISABEL AYALA, DOMINIQUE MARION, BRUNO FRANZETTI, BERNHARD BRUTSCHER, AND JÉRÔME BOISBOUVIER. **Fast Two-Dimensional NMR Spectroscopy of High Molecular Weight Protein Assemblies.** *Journal of the American Chemical Society*, **131**(10) :3448–3449, March 2009. 196
- [244] LARS DITZEL, JAN LÖWE, DANIELA STOCK, KARL-OTTO STETTER, HARALD HUBER, ROBERT HUBER, AND STEFAN STEINBACHER. **Crystal Structure of the Thermosome, the Archaeal Chaperonin and Homolog of CCT.** *Cell*, **93**(1) :125–138, April 1998. 208

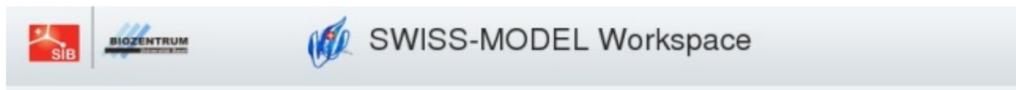
# Chapitre 6

## Annexes

## 6. ANNEXES

### 6.1 Annexe 1 : Modélisation par homologie

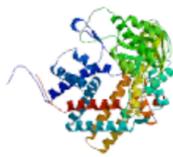
Statistiques de la modélisation par homologie de la conformation ouverte.



Workunit: P000028 Title: PhCpn conformation ouverte



#### Model Summary:



**Model information:**  
Modelled residue range: 11 to 524  
Based on template: 3izhA (11.00 A)  
**Remark:** No search for template was performed. Only user specified template was used for modelling.

**Quaternary structure information:**  
Template (3izhA): Unknown  
Model: SINGLE CHAIN

**Ligand information:**  
Ligands in the template: none.  
Ligands in the model: none.

Sequence Identity [%]: 66.796  
Evalue: 2.25676e-165

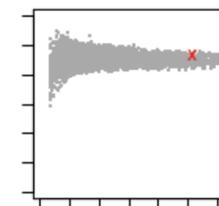
**Quality information:**  
QMEAN Z-Score: 1.71

#### Global Model Quality Estimation:

##### QMEAN4 global scores:

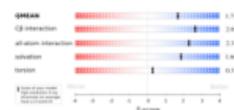
QMEANscore4: Estimated absolute model quality:

0.855



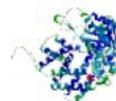
Z-Score: 1.71

##### Score components:



##### Local scores:

Coloring by residue error:



Residue error plot:

##### QMEAN4 global scores:

The QMEAN4 score is a composite score consisting of a linear combination of 4 statistical potential terms (estimated model reliability between 0-1). The pseudo-energies of the contributing terms are given below together with their Z-scores with respect to scores obtained for high-resolution experimental structures of similar size solved by X-ray crystallography:

Scoring function term	Raw score	Z-score
C_beta interaction energy	-303.45	2.66
All-atom pairwise energy	-16404.50	2.33
Solvation energy	-74.18	1.88
Torsion angle energy	-150.48	0.31
QMEAN4 score	0.855	1.71

If you publish results from QMEAN, please cite the following paper:

Benkert P, Biasini M, Schwede T. (2011). "Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models." *Bioinformatics*, 27(3):343-50.

## Statistiques de la modélisation par homologie de la conformation fermée .



Workunit: P000027 Title: PhCpn conformation fermée



### Model Summary:

#### Model information:

Modelled residue range: 9 to 524

Based on template: 1q3rA (2.90 Å)

**Remark:** No search for template was performed.

#### Quaternary structure information:

Template (1q3r): 16-mer  
Only user specified Model: 16-mer template was used for modelling.

Sequence Identity [%]: 82.171

Evalue: 0

#### Ligand information:

Ligands in the template: SO4: 16.

Ligands in the model: none.

#### Quality information:

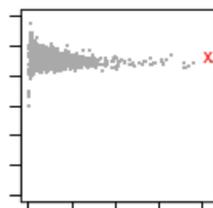
QMEAN Z-Score: 1.621

### Global Model Quality Estimation:

#### QMEAN4 global scores:

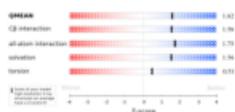
QMEANscore4: Estimated absolute model quality:

0.821



Z-Score: 1.621

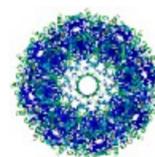
Score components:



#### Local scores:

Coloring by residue error:

Residue error plot:



#### QMEAN4 global scores:

The QMEAN4 score is a composite score consisting of a linear combination of 4 statistical potential terms (estimated model reliability between 0-1). The pseudo-energies of the contributing terms are given below together with their Z-scores with respect to scores obtained for high-resolution experimental structures of similar size solved by X-ray crystallography:

Scoring function term	Raw score	Z-score
C $\beta$ interaction energy	-4299.30	1.58
All-atom pairwise energy	-304395.82	1.75
Solvation energy	-1069.01	1.56
Torsion angle energy	-2458.32	0.51
QMEAN4 score	0.821	1.62

If you publish results from QMEAN, please cite the following paper:

Benkert P, Biasini M, Schwede T. (2011). "Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models." *Bioinformatics*, 27(3):343-50.

## 6.2 Annexe 2 : Article n°2

**A Cost-Effective Protocol for the Parallel Production of Libraries of  $^{13}\text{CH}_3$  -Specifically Labeled Mutants for NMR Studies of High Molecular Weight Proteins.**

# Chapter 17

## A Cost-Effective Protocol for the Parallel Production of Libraries of $^{13}\text{CH}_3$ -Specifically Labeled Mutants for NMR Studies of High Molecular Weight Proteins

Elodie Crublet, Rime Kerfah, Guillaume Mas,  
Marjolaine Noirclerc-Savoie, Violaine Lantez,  
Thierry Vernet, and Jerome Boisbouvier

### Abstract

There is increasing interest in applying NMR spectroscopy to the study of large protein assemblies. Development of methyl-specific labeling protocols combined with improved NMR spectroscopy enable nowadays studies of proteins complexes up to 1 MDa. For such large complexes, the major interest lies in obtaining structural, dynamic and interaction information in solution, which requires sequence-specific resonance assignment of NMR signals. While such analysis is quite standard for small proteins, it remains one of the major bottlenecks when the size of the protein increases.

Here, we describe implementation and latest improvements of SeSAM, a fast and user-friendly approach for assignment of methyl resonances in large proteins using mutagenesis. We have improved culture medium to boost the production of methyl-specifically labeled proteins, allowing us to perform small-scale parallel production and purification of a library of  $^{13}\text{CH}_3$ -specifically labeled mutants. This optimized protocol is illustrated by assignment of Alanine, Isoleucine, and Valine methyl groups of the homododecameric aminopeptidase PhTET2. We estimated that this improved method allows assignment of ca. 100 methyl cross-peaks in 2 weeks, including 4 days of NMR time and less than 2 k€ of isotopic materials.

**Key words** Methyl group, Isotopic labeling, High molecular weight proteins, NMR spectroscopy, SeSAM, Assignment, Site-directed mutagenesis

---

### 1 Introduction

Supramolecular systems are involved in many of the key processes that occur in cells. Therefore, understanding their local structure and dynamics is critical. For such investigations, NMR spectroscopy is a technique of choice and now allows studies of assemblies up to 1 MDa [1]. This was made possible by the development of protocols for the selective protonation of methyl groups in perdeuterated proteins [2–6]. This strategy is based on some very favorable relaxation properties of methyl groups in proteins that show

increased sensitivity compared to backbone amide proton. Moreover, methyl group containing residues are usually common and well dispersed within the polypeptide sequences, covering homogeneously the protein space. Thus, methyl groups are excellent probes of protein structure, dynamics, and interactions, particularly for very large proteins. In addition to studying naturally occurring methyl groups, methyl-containing amino acids can also be used to replace solvent-exposed residues as NMR reporters of protein interaction in order to, for instance, validate an expected binding site [7, 8].

In all cases, analysis of structural and dynamic information yielded by methyl groups requires sequence-specific assignment of methyl resonances. Conventional through bonds assignment approaches [9] to assign backbone and side chain methyl groups resonances work efficiently for small proteins but cease to be applicable to proteins over 100 kDa. In this case, alternative approaches are required. Several examples of different methyl group assignment procedures that have been successfully applied to large proteins are provided below. To date, many of the supramolecular systems studied by NMR spectroscopy are multimeric; an option to assign such assemblies is thus to try to split the quaternary complex into smaller fragments. This “divide-and-conquer” technique [1, 10] relies on disassembling the oligomeric system and transferring the resonances assignment to the full-size complex. This method however requires considerable optimization to find conditions that destabilize oligomeric interfaces without significantly disrupting the structure of the monomer or domain. Another alternative to overcome size limitation is solid-state NMR spectroscopy [11], in which the linewidth is independent of the molecular weight [12]. Yet, this approach requires crystal preparation giving high-quality spectra similar to solution state NMR, and time-consuming analysis of complex  $^{13}\text{C}$ – $^{13}\text{C}$  correlation spectra acquired using solid-state NMR. Methyl-methyl Nuclear Overhauser Enhancement (NOE) experiments can also be used in combination with chemical shift prediction programs to assign methyl groups in proteins [13]. This method is so far limited to small systems due to the complexity of detecting long range NOE at more than 7 Å in very large protein assemblies. Another approach to assign large proteins is to analyze paramagnetic relaxation enhancements (PRE) induced by nitroxide spin-labels in combination with an available 3D structure [14].

Alternatively, several groups have reported a mutagenesis-based approach for assignment of some methyl resonances in large proteins. Using Leu or Val mutations along with stereospecific  $^{13}\text{CH}_3$  labeling of Leu/Val residues, A. Seven and J. Rizo [15] were able to assign methyl resonances to a 73 kDa protein domain. Similarly, 15 of 17 methyl resonance frequencies of methionine methyl groups of an RNA polymerase were assigned by site-by-site

mutation strategy [16]. A similar approach was used to obtain some Ile, Leu, or Val methyl group assignments in the protease ClpB [17]. In parallel, the assignment-by-mutagenesis strategy has also been applied to a 468 kDa supramolecular protein oligomer, for the first time in a highly systematic way [18]. The method called SeSAM (Sequence-Specific Assignment of methyl groups by Mutagenesis) is based on automated molecular biology techniques, small-scale parallel preparation of residue-specific isotope-labeled samples, and sensitivity-optimized NMR experiments. Each mutant construct is expressed on a small-scale using fully perdeuterated expression media supplemented with isotope-labeled metabolic precursors designed for the specific protonation of a single class of methyl group [2–5, 10, 19–21]. A conservative mutation of one methyl-containing residue to another nonlabeled one causes the disappearance of its NMR correlation from NMR spectrum of a specifically methyl-labeled sample. This systematic strategy led to complete resonance assignment of the 34 isoleucine- $\delta$ 1 and 30 alanine- $\beta$  methyl groups in less than 2 months.

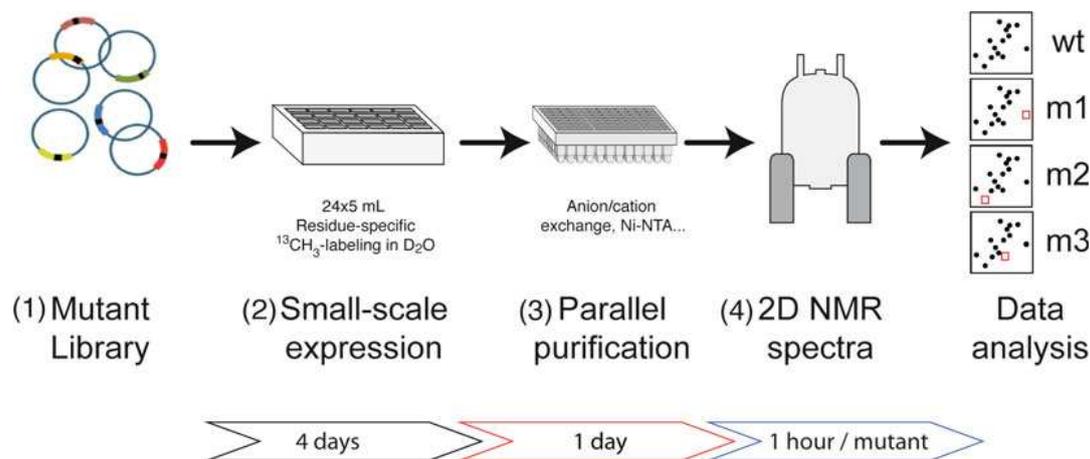
Although very effective, this method remains difficult to implement. The production step is achieved from 50 mL culture medium per mutant, i.e., one culture flask for each mutant. It therefore requires a lot of manipulation from the user and may be the source of handling mistakes. Moreover, the purification step is time consuming because each mutant is purified sequentially. Therefore, we attempted to optimize and simplify this strategy (Fig. 1). First we improved the culture medium to enhance cell density, allowing us to decrease the culture volume and perform all the cultures in parallel, in 24 deep-well plates. Then, all the mutants were purified in parallel, on a 96-well plate format, therefore enabling purification of the samples in a few hours instead of weeks. Using this improved approach, we were able to reduce experiment time by a factor of 4 and isotope cost by a factor of 2 compared to previously published implementation [18].

---

## 2 Materials

### 2.1 Expression of Methyl-Specifically Labeled Proteins

1. Freshly transformed *E. coli* cells (BL21(DE3), BL21(DE3) RIL... etc) to overexpress protein of interest.
2. LB broth.
3. 2 $\times$  M9 medium prepared in H<sub>2</sub>O (for 1 L: 20 g of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O; 6 g of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 g of NaCl; 2 g of NH<sub>4</sub>Cl). Autoclave to sterilize.
4. M9 prepared in D<sub>2</sub>O (for 1 L: 5.3 g of anhydrous Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3 g of anhydrous KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.5 g of NaCl; 1 g of NH<sub>4</sub>Cl). Use sterile D<sub>2</sub>O.
5. Oligo-elements (for 1 L of M9 medium: 1 mL of 1 M MgSO<sub>4</sub>, 1 mL of 0.1 M CaCl<sub>2</sub>, 1 mL of 0.1 M MnCl<sub>2</sub>, 1 mL of 50 mM



**Fig. 1** The Principle of improved SeSAM. Schematic illustration of the parallel mutation-based NMR assignment strategy. (1) Each methyl-containing residue in the target sequence is mutated, on a site-by-site basis, to another similar methyl containing amino acid (e.g., Val-to-Ala) (*see Table 1*). (2) Mutant constructs are expressed on a small-scale in 24 deep-well plates, using M9 medium prepared in  $\text{D}_2\text{O}$  and supplemented with 2 g/L  $^2\text{H}$ -cell extract. One hour before induction, fully perdeuterated expression medium is complemented with isotope-labeled metabolic precursors designed for the specific incorporation of  $^{13}\text{CH}_3$  isotopes of a single class of methyl groups. The volume of culture is adjusted to ensure a minimal yield of 0.3–0.5 mg of purified protein. (3) Cell pellets are then lysed in parallel using chemical lysis buffer and proteins are purified in 96-well plates filled with anion exchange (or any other suitable) resin. Each mutant sample is dialyzed against  $\text{H}_2\text{O}$ , lyophilized, and dissolved in NMR suitable buffer. (4) NMR spectra can be acquired using the SOFAST-methyl TROSY pulse sequence and an NMR spectrometer operating at high magnetic field. Sequence-specific assignment of each NMR signal is inferred by comparing the 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation spectrum of each member of the mutant library with a spectrum of the native protein. A conservative mutation of one methyl-containing residue to another nonlabeled one causes the disappearance of the methyl group signal from NMR spectra recorded for a specifically methyl-labeled sample

$\text{ZnSO}_4$ , 0.5 mL of 100 mM  $\text{FeCl}_3$ ). Sterilize on 0.22  $\mu\text{m}$  filter. Stocks solutions should be prepared in  $\text{H}_2\text{O}$  when used in M9 100 %  $\text{H}_2\text{O}$  or 50 %  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (for the precultures) and in  $\text{D}_2\text{O}$  when used in M9 100 %  $\text{D}_2\text{O}$ . In this case, all powders should be dissolved and lyophilized twice in  $\text{D}_2\text{O}$  to remove residual water before preparing stock solutions.

6. Vitamin cocktail (for 50 mL: 25 mg of pyridoxine, 25 mg of biotin, 25 mg of panthothenate hemi-calcium, 25 mg of folic acid, 25 mg of choline chloride, 25 mg of niacineamide, 2.5 mg of riboflavin, 125 mg of thiamine). Solubilize by adjusting the pH around 7, sterilize on 0.22  $\mu\text{m}$  filter and decrease the pH around 5 for long-term storage. Use 2 mL for 1 L of M9 medium. Vitamins should be prepared in  $\text{H}_2\text{O}$  for precultures and in  $\text{D}_2\text{O}$  when used in M9 100 %  $\text{D}_2\text{O}$  (*see above*).
7. Isotopes:  $\text{D}_2\text{O}$  ( $^2\text{H} \geq 99.8$  %),  $\text{D}$ -( $^2\text{H}$ ,  $^{12}\text{C}$ )-glucose ( $^2\text{H} \geq 98$  %), deuterated rich cell extract. Several sources of cell extract are commercially available (Spectra 9 (CIL), Celtone<sup>®</sup> Complete Medium (CIL), BioExpress<sup>®</sup> 1000 (CIL), Silantes<sup>®</sup>

E.Coli-OD2 (Silantes), Isogro® (Isotec), etc.) In this study, we chose Isogro® (noted as  $^2\text{H}$ -cell extract in the following text), but other cell extracts are likely to give the same results.

8. IPTG (1 M in  $\text{D}_2\text{O}$ ).
9.  $^{13}\text{CH}_3$ -methyl-specifically labeled precursors were purchased on a deuterated form ready for direct introduction into the culture medium (NMR-Bio):  $^2\text{H}$ - $^{13}\text{CH}_3$ -Alanine ( $^{13}\text{C} \geq 99\%$ ;  $^2\text{H} \geq 98\%$ ),  $^2\text{H}$ - $^{13}\text{CH}_3$ -2-ketobutyric acid ( $^{13}\text{C} \geq 99\%$ ;  $^2\text{H} \geq 98\%$ ),  $^2\text{H}$ - $^{13}\text{CH}_3$ -2-hydroxy-2-methyl-3-oxo-4-butanoic acid ( $^{13}\text{C} \geq 99\%$ ;  $^2\text{H} \geq 95\%$ ),  $^2\text{H}$ -L-Isoleucine ( $^2\text{H} \geq 98\%$ ),  $^2\text{H}$ -L-Leucine ( $^2\text{H} \geq 98\%$ ),  $^2\text{H}$ - $\alpha$ -ketoisovalerate ( $^2\text{H} \geq 98\%$ ).
10. 10 mL- 24 deep-well plates.
11. Gas permeable adhesive seals.

## 2.2 Purification

1. 10× BugBuster® buffer (Merck-Millipore).
2. DNase, RNase, lysozyme (Euromedex).
3. 96-well filter plates (Macherey-Nagel).
4. 2,2 mL-96 deep-well plates.
5. Aluminum seals.
6. QIAvac 96 Vacuum manifold (Qiagen) or any vacuum manifold for processing 96-well plates.
7. Appropriate resin (for nontagged proteins: any ion exchange resin (Q sepharose, SP sepharose, etc.) or affinity resin (Protein A, Protein G, Heparin sepharose, etc.); for tagged proteins: Ni-NTA, Talon resin, Strep-tactin sepharose. etc.). In this study, we used Q sepharose resin (GE Healthcare Life Sciences).
8. Anion exchange chromatography equilibration/washing buffer: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 160 mM NaCl.
9. Anion exchange chromatography elution buffer: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 350 mM NaCl.
10. Dialysis membrane (Gebaflex, Dialysis system for small-volume samples).

## 2.3 NMR Spectroscopy

NMR spectra were recorded on a Agilent Direct Drive spectrometer operating at a proton frequency of 800 MHz equipped with a 5 mm cryogenically cooled triple resonance pulsed field gradient probe head. Samples were loaded in a 2.5 mm shigemi tube inserted coaxially into a 5 mm tube.

## 3 Methods

The goal of the approach is both to improve yields and simplify the procedure previously published [18]. For that purpose, all the small-scale parallel production, lysis, and purification steps should first be setup on uniformly deuterated native protein before applying the

**Table 1**  
Suggested substitutions for methyl containing residues

Mutated CH <sub>3</sub> -containing residue	Suggested substitution	Acceptable substitution
Ala	Ser	Val [18], Gly, Cys, Thr
Ile	Val [30, 32]	Leu [17, 18, 32], Met
Leu	Ile [17], Met	Val, Phe
Val	Ile [17]	Met, Leu, Ala [25], Thr
Thr	Ser	Ala, Asn, Val
Met	Leu	Ile, Val

Adapted from BLOSUM 62 substitution matrix [29]

The BLOSUM (BLOcks SUBstitution Matrix) matrix is a substitution matrix used for sequence alignment of proteins [29]. BLOSUM matrices are used to score alignments between evolutionarily divergent protein sequences. They are based on local alignments. In this table, suggested/acceptable substitutions for each of the 6 methyl-containing amino acids, for the purpose of assignment using SeSAM strategy [18], are listed along with an application reference when it exists

protocol to the whole isotopically labeled library of mutants. The hypothesis is made that all mutants behave identically to the native protein and that methyl labeling does not change the purification profile (same expression level, same purification conditions, etc.).

### 3.1 Generation of Mutant Plasmids Libraries

Constructs carrying single point mutations can be purchased commercially or prepared using an automated molecular biology platform. Here, they were generated by in-house automated molecular biology Platform (RoBioMol—Institut de Biologie Structurale, Jean-Pierre Ebel) using an automated PCR-based protocol adapted from the QuikChange site-directed mutagenesis method. PCR amplification was performed with Phusion Hot Start enzyme (Finnzymes) using the expression plasmid pET41c-PhTET2 as template and the specific mutagenic primers. Products were purified and digested by DpnI. Final mutations were selected by transformation and verified by sequencing. Valine residues were mutated into Alanine residues, Alanine into Valine, Isoleucine into Leucine. Amino acids must be substituted by an isosteric one to avoid considerable changes in the structure and minimize secondary shift effects (*see* Note 1 and Table 1).

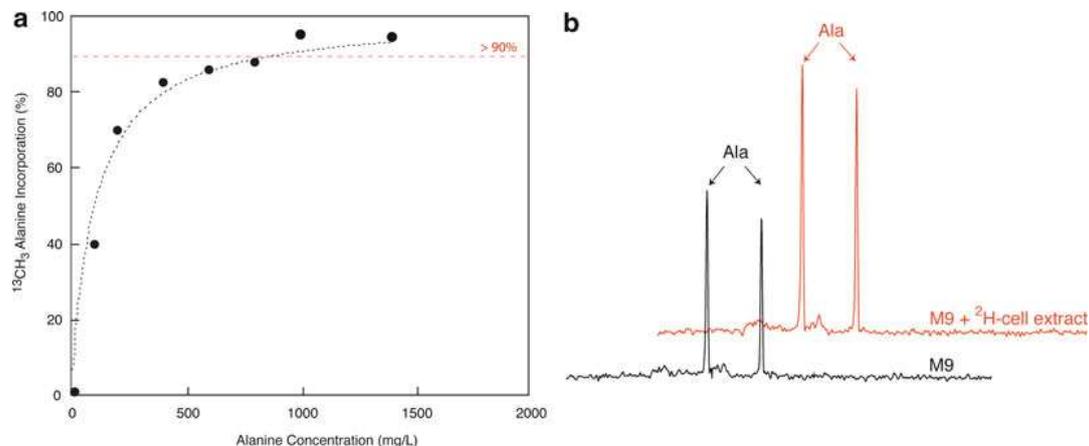
### 3.2 Protein Labeling for Methyl Detection

Selective methyl protonation provides excellent probes for monitoring interactions and dynamics, and high-quality spectra can be recorded in very large systems. For assignment, a prerequisite is to restrict labeling to only one type of methyl-containing residue at once, in order to minimize secondary chemical shift perturbations

due to the mutation. Currently, methods are available to label Isoleucine ( $\delta 1$  [2] or  $\gamma 2$  [22]), Alanine [3, 23], Threonine [24], or Methionine [10, 20] methyl groups efficiently. For Leucine and Valine, however, the labeling scheme is more difficult because these amino acids share the same biogenesis pathway and each residue has two prochiral methyl groups. Consequently, compared to other residues, for a similar spectral window, the number of methyl group resonances is four times higher, potentially resulting in peak overlap and loss of resolution. Thus, until recently, the assignment-by-mutagenesis strategy was not attractive for Valine residues. Since then, a stereospecific isotopic labeling method was developed for Leucine/Valine labeling [21]. More recently, our group has also developed the stereoselective labeling of Valine without Leucine using coinorporation of pro-*S* Acetolactate and  $^2\text{H}$ -Leucine [25]. This new isotopic labeling strategy increased the resolution and reduced overlaps and potential secondary chemical shifts by a factor of 4 on average. Thus, it enabled easy assignment-by-mutagenesis of Valine residues in large protein assemblies, compared to standard labeling using 2 keto-acids [26].

In this section we describe the protocol to specifically label large proteins for methyl detection and produced them on a small-scale using enriched cell extract.

1. Bacteria must first be trained to adapt progressively in 100 %  $^2\text{H}$  medium. All these adaptation steps will be performed in 24-well plates covered with gas permeable adhesive seal. Pick a fresh colony of transformed cells from each mutant of an LB plate (*see Note 2*) and start a 2-mL bacterial culture of LB medium prepared in  $\text{H}_2\text{O}$ . Once  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  reaches 3–4 (6–8 h) at 37 °C, transfer 50  $\mu\text{L}$  of the cell culture into 2 mL of M9 medium prepared in  $\text{H}_2\text{O}$ . The starting  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  of this new culture should be about 0.1. Incubate the culture in a shaking incubator (220–250 rpm) at 37 °C overnight (the  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  should be around 2–2.5) and transfer 100–200  $\mu\text{L}$  of the cell culture into 2 mL of M9 medium prepared in 50 %  $\text{D}_2\text{O}$  (*see Note 3*) (starting  $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.2$ ). Let the culture grow at 37 °C until the  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  reaches 2–2.5 and transfer 300  $\mu\text{L}$  of the cell culture into 3 mL of M9 medium in 100 %  $\text{D}_2\text{O}$  (starting  $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.25$ ). Incubate the culture at 37 °C overnight until  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  is 1.5–2 and use this cell culture as your starting culture.
2. Prepare the volume of M9 needed for the whole culture ( $2 \times 5$  mL for each mutant) in a sterile flask (M9 in  $\text{D}_2\text{O}$  + oligo-elements in  $\text{D}_2\text{O}$  + vitamins in  $\text{D}_2\text{O}$  + 2 g/L of  $^{12}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$  glucose + antibiotics). Add 2 g/L of  $^2\text{H}$ -cell extract (*see Notes 4–6*).
3. Fill a 24 deep-well block (*see Note 7*) with 3.5 mL of this medium. Inoculate each well with the overnight culture at a



**Fig. 2** Level of incorporation of  $^{13}\text{CH}_3$ -alanine in proteins expressed in M9 medium supplemented with  $^2\text{H}$ -cell extract. Level of incorporation of  $^{13}\text{C}$  at the  $\text{C}\beta$ -alanine position in overexpressed ubiquitin as a function of the amount of the exogenous alanine added in culture medium 1 h prior to induction. Ubiquitin was expressed in *E. coli* in M9/ $\text{D}_2\text{O}$  culture medium supplemented with 2 g/L  $^2\text{H}$ ,  $^{12}\text{C}$  glucose, and 2 g/L  $^2\text{H}$ ,  $^{12}\text{C}$  Isogro<sup>®</sup>. Different amounts of  $^{13}\text{CH}_3$  L-alanine (0–1.4 g/L) were added 1 h before induction.  $^2\text{H}$ -Isovalerate (400 mg/L) and  $^2\text{H}$ -Isoleucine (120 mg/L) were added to prevent scrambling from alanine. Fixed amount of  $^{13}\text{CH}_3$  L-methionine (0.5 g/L) was used as an internal reference. The level of incorporation was determined by analyzing the intensities of one alanine methyl resonance with respect to signal of methyl group of one methionine residue. A level of incorporation in Alanine side chains  $\geq 90\%$  is obtained by adding 1 g of alanine per liter of culture medium. **(b)** Comparison of 1D  $^{13}\text{C}$ -filtered NMR spectra of U- $^{12}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ], Ala- $^{13}\text{CH}_3$ ]  $\beta$  ubiquitin expressed in equal volume of M9 medium (M9) or M9 medium supplemented with  $^2\text{H}$ -cell extract (M9+ $^2\text{H}$ -cell extract). Data were recorded at 37 °C using a 2.5 mm Shigemi tube, on an 800 MHz NMR spectrometer equipped with a cryogenic probe head. Comparison of 1D spectra shows an increase of the signal-to-noise ratio by a factor of 1.65. These results are in agreement with an increase of both the cell density ( $\text{OD}_{600\text{nm}} \times 1.7$  with  $^2\text{H}$ -cell extract) and the culture yields (yields  $\times 1.75$  with  $^2\text{H}$ -cell extract), indicating that  $^{13}\text{C}$ -Alanine is fully incorporated in these conditions

starting  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  of 0.3. Cover with gas permeable adhesive seal and grow at 37 °C until  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  reaches 1.5.

4. Add the precursors (*see Note 8*) diluted in 1.5 mL of M9/ $\text{D}_2\text{O}$ , 1 h prior to IPTG induction. The amount of  $^{13}\text{CH}_3$ -precursors to add was optimized to ensure complete labeling of proteins overexpressed in rich medium (Fig. 2a). The yield of the protein was improved by a factor of 1.7 when  $^2\text{H}$ -cell extract was added to the culture medium, while the frequency of labeling was still almost 100 %, proving there is no isotopic dilution by  $^2\text{H}$ -cell extract (Fig. 2b).
5. Let the culture grow for 1 h. The  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  should reach a value of 1.5.
6. Add IPTG (in  $\text{D}_2\text{O}$ ) to 0.5 mM to induce protein expression. Continue incubation at 37 °C for 4 h (depending on your protein).

7. Centrifuge the entire plate in a swing-out rotor for 20 min at  $3,250 \times g$ . Discard the supernatant and store the pellet at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  or process directly.

### 3.3 Lysis

Protein purification and lysis strategy may vary according to the protein of interest (presence and type of fusion tag). Here we described the lysis strategy optimized for PhTET2 expressed in BL21(DE3)RIL.

1. Lyse the cells (*see Note 9*). Add 250  $\mu\text{L}$  of lysis buffer into each well in the 24-well culture plate (1 $\times$  BugBuster<sup>®</sup>, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl (*see Note 10*), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DNase, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RNase, 0.3 mg/mL Lysozyme) and resuspend the cells by pipetting up and down. Pool the 2 pellets of the same mutant (*see Note 7*) and incubate 40 min at room temperature with (occasional) shaking.
2. Heat the crude extract at  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  (*see Note 11*) for 15 min by making the plate directly float in a water bath.
3. Centrifuge the plate at  $3,250 \times g$  for 20 min. Both soluble- and whole-cell pellets should be analyzed (*see Subheading 3.4 step 6*).

### 3.4 Small-Scale Parallel Purification

In this section, we describe a typical protein purification procedure using an anion exchange resin, but alternative resins can be used (*see Note 12*).

1. Prepare the purification 96-well filter plate. Resuspend the Q sepharose resin thoroughly. Pipet 800  $\mu\text{L}$  of resin suspension (bed volume of 400  $\mu\text{L}$ ) into each well of the plate. Wash each well twice with 1 mL of water and 3 times with 1 mL of equilibration buffer using a vacuum manifold (or alternatively a centrifuge with a swing-out rotor).
2. Transfer the clear supernatants (Subheading 3.3 step 3) into the 96-well filter plate containing the resin. Seal the block with aluminum seal and caps to avoid leaks and place at room temperature for 1 h with gentle shaking.
3. Place the 96-well filter plate over a 96 deep-well plate in the vacuum manifold. Remove the aluminum seal and caps (only over the used wells) and let the samples flow through the resin first by gravity, then by applying vacuum until the samples have been completely drawn through the plate.
4. Place a drain deep-well plate and wash the resin by adding 400  $\mu\text{L}$  of washing buffer to each well and then apply vacuum as above. Repeat the wash 4 times.
5. Place the filter plate on top of a new deep-well plate and add 400  $\mu\text{L}$  of elution buffer in each well. Incubate 2 min and proceed as above. Repeat the elution 4 times and store the eluate.

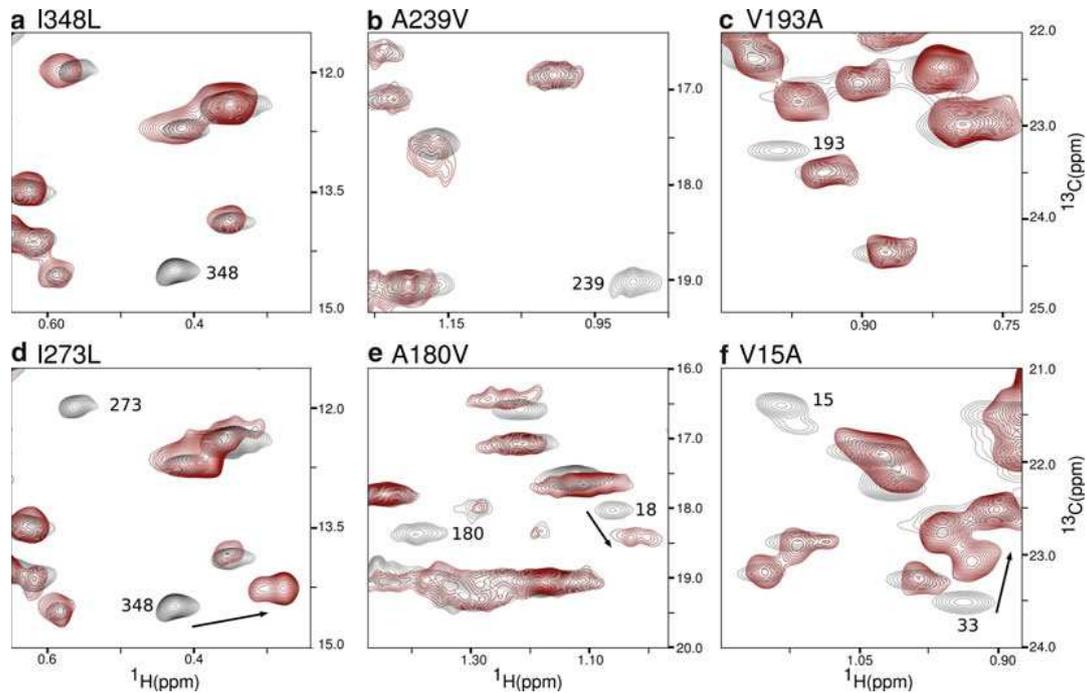
6. Analyze by SDS-PAGE the total, soluble and eluted fractions for some of the mutants, according to standard procedures.

### 3.5 NMR Spectroscopy

To assign a large protein such as PhTET2 (468 kDa, 353 residues per subunit), the SeSAM strategy [18] is followed.

The type of probe and the tube configuration can affect the required amount of material. For small sample amounts, users should always choose the most sensitive probe available (best signal-to-noise per mg of protein). Using a standard 5-mm cryogenically cooled probe, the protein should be concentrated to optimize the amount of spins present in the most sensitive area of the active volume (i.e., near the axial symmetry axis). This can be achieved simply by placing the sample in a small diameter tube (1 to 3 mm) centered inside a standard 5-mm tube. As a result, compared to a 5-mm NMR tube, the sensitivity gain is ca. a factor of 2 per mg of protein. Alternatively, using cryoprobes optimized for small volumes (3 mm coldprobe (Agilent); 1.7 mm microcryoprobe (Bruker)) can further increase sensitivity twofold allowing a reduction of the culture volume (one 5-mL well for each mutant) or a division of the acquisition time by a factor of 4. In this study, the samples were loaded in a 2.5 mm shigemi tube placed coaxially to a regular 5-mm NMR tube as a sample holder and NMR spectra were recorded on a spectrometer equipped with a 5-mm cryoprobe.

1. Prepare methyl-labeled mutants as described above. Transfer the protein in an NMR suitable buffer. In our case, the protein was extensively dialyzed in H<sub>2</sub>O, lyophilized and resuspended in 60  $\mu$ L ( $\pm$  0.15 mM) of 20 mM Tris-DCI, 20 mM NaCl pH 7.4 in 100 % D<sub>2</sub>O. Alternatively (if the protein is not stable in pure H<sub>2</sub>O), buffer can be exchanged by a series of dilution/concentration steps in D<sub>2</sub>O buffer using a concentration unit with an appropriate cut-off.
2. Record <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C SOFAST-methyl-TROSY spectra (more sensitive experiment by unit of time [27]) for each mutant sample and native protein. Here, taking advantage of the thermostability of PhTET2, NMR data are recorded at 50 °C. The angle of proton excitation pulse is set to 30° and the recycling delay is optimized to 0.4 s. The length of each NMR experiment is adjusted depending on the concentration of the sample (typically 1 h for 9 nmol of sample).
3. All data are processed and analyzed with NMRPipe [28]. Sequence-specific assignments of each NMR signal are inferred by comparing the 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C correlation spectrum recorded for each member of the mutant library with a spectrum recorded for the wild-type protein (Fig. 3). Conceptually, assignment-by-mutagenesis is straightforward. In practice, however, the overlap of resonances and the occurrence of secondary chemical



**Fig. 3** Examples of spectra of mutants with specific Ile- $\delta$ 1, Ala- $\beta$ , or Val pro-*S*-labeled methyl probes. Spectra of mutants displaying modest secondary chemical shift perturbations (**a–c**) were initially chosen for analysis and, when possible, sequence-specific assignment of methyl groups were made. This initial set of unambiguous assignments assisted the analysis of spectra displaying larger chemical shift perturbations (**d–f**). Spectra of this figure are extracted from the work of Amero et al. [18] and Mas et al. [25]. SOFAST Methyl-TROSY spectra were recorded at 50 °C, on an 800 MHz NMR spectrometer equipped with a cryogenic probe head, using samples of U- $^{12}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ , Ile- $^{13}\text{CH}_3\delta^1$  (**a** and **d**) [18], U- $^{12}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ , Ala- $^{13}\text{CH}_3\beta$  (**b** and **e**) [18], or U- $^{12}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ , Val- $^{13}\text{CH}_3^{\text{pro-}S}$  (**c** and **f**) [25] labeled mutant PhTET2 protein (*red*). Each spectrum was overlaid with the reference spectrum of the native particle (*black*). Experimental acquisition times were adjusted to the sample protein concentration (from 0.26 to 0.42 mg/sample, i.e., 7–11 nmol of PhTET2 monomer) with a maximum experimental time set to 1 h. The assignment inferred for the missing resonance in the mutant spectrum is indicated and secondary chemical shift perturbations are annotated with *arrows*

shifts changes can confuse the analysis. Perturbations are likely to occur but can be minimized (using conservative mutations). In the first round, all spectra with only one missing peak are considered for a straightforward assignment of a first set of resonances. Then, more complex spectra are studied with consideration of structure, first set of unambiguous assignment and the whole set of spectra taken into account, in order to analyze secondary chemical shift perturbations. That is why considering the full library of single-site mutations greatly simplifies the process of resonance assignment by cross-validating the results several times (*see Note 13*).

---

## 4 Conclusion

Thanks to the development of protocols and molecules that allow residue-specific protonation of methyl groups in highly perdeuterated proteins, it is now feasible to apply solution NMR techniques to protein systems as large as 1 MDa. Structural and dynamic information yielded by methyl groups is most useful when a sequence-specific assignment for the probe is known. Easily obtaining these assignments remains the major hurdle in many studies of large proteins. Here we describe a fast, efficient, and user-friendly protocol for resonance assignment that has allowed us to assign up to 100 methyl cross-peaks in about 2 weeks with 4 days of NMR time and a isotopic cost of less than 2 k€. We demonstrated the feasibility of this protocol on samples labeled on Alanine, Isoleucine, or Valine. This method can also be extended to Methionine- or Threonine-labeled proteins. As for Valine labeling, the methyl-specific labeling of Leucine residues will require the development of a stereoselectively labeled amino acid (or precursor) to label Leucine residues independently from Valines.

---

## 5 Notes

1. Amino acids should typically be substituted by an isosteric amino acid to prevent significant changes in the local environment and protein packing, which could introduce significant chemical shift perturbations. We chose to exchange Valine to Alanine according to Amero et al. [18], who mutated Alanine into Valine. However, according to BLOSUM matrices for amino acid substitutions [29], the Valine to Isoleucine mutations (score 3) would have been wiser and most likely to have minimal effect on the structure and NMR spectra. Indeed, Valine differs from Isoleucine by the loss of only one CH<sub>2</sub> group, whereas it differs from Alanine by the loss of CH-CH<sub>3</sub>. According to these matrices, Chan et al. [30] generated a set of mutants in which each Isoleucine was substituted by a Valine (score 3). The resulting chemical shift perturbations were smaller than those from the corresponding Ile to mutations Ala (score -1) facilitating the assignment (Table 1).
2. Antibiotics are not specified. Put appropriate antibiotics considering the plasmid and the cells used. However, ampicillin is not suitable because it can be inactivated by the  $\beta$ -lactamases produced by the cell, resulting in plasmid loss and drop of protein expression. This effect seems to be worse in D<sub>2</sub>O medium because of the successive adaptation steps that promote loss of selective pressure. Here, we routinely used the pET-41 plasmid, which contains the kanamycin resistance gene.

3. M9 50 % D<sub>2</sub>O is prepared with 2× M9 H<sub>2</sub>O and same volume of D<sub>2</sub>O. The oligo-elements, vitamins, antibiotics, and glucose used at this step are still prepared in water.
4. To increase cell density, we supplemented M9 medium with <sup>2</sup>H-cell extract. We optimized the protocol with Isogro® but many similar rich bacterial cell growth media are commercially available (Spectra 9, Celtone® Complete Medium, BioExpress® 1000, Silantes® E.Coli-OD2, etc.). We did not test them but they can most likely be used to replace Isogro®, after suitable optimization.
5. Rich medium can be the source of isotopic dilution as it contains <sup>12</sup>C<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-labeled amino acids. To minimize this, we tested different concentrations of <sup>2</sup>H-cell extract (2, 3, or 10 g/L). Growth is significantly increased from 0 to 2 g/L; however higher concentrations of <sup>2</sup>H-cell extract did not show further significant improvement. Moreover, <sup>2</sup>H-cell extract is added at the start of the culture, whereas methyl specifically labeled precursors are added 1 h before induction. This early addition reduces isotopic dilution because most of deuterated amino acids are consumed for the cell growth, while <sup>13</sup>CH<sub>3</sub>-precursors are incorporated for the production of the labeled protein. Optimization was done using Isogro®, but similar results are expected for other types of commercial <sup>2</sup>H-cell extracts.
6. For ubiquitin, yields with 2 g/L of <sup>2</sup>H-cell extract were increased by a factor of 1.7 (Fig. 2b).
7. Considering both yields, parallelization of the method and simplification of the purification steps, we were able to reduce the volume of production to 10 mL for each mutant. One 24 deep-well plate is thus suitable for 12 mutants (2 wells of 5 mL for each mutant). The final concentration in a 2.5 mm Shigemi tube is around 0.15 mM (9 nmol or 0.35 mg of PhTET2 monomer) in 60 µL.
8. Incorporation level of <sup>13</sup>CH<sub>3</sub>-alanine was determined using 2 g/L of <sup>12</sup>C, <sup>2</sup>H-glucose, and 2 g/L of <sup>2</sup>H-cell extract in culture medium. Using higher concentrations of glucose may cause isotopic dilution of the <sup>13</sup>CH<sub>3</sub>-precursor [31] and the incorporation curves must then be modified accordingly.
9. One crucial step to optimize in the protein production process is the bacterial cell lysis. Different lysis methods should be tested. However, when tens or hundreds of mutants are produced, only a few lysis methods can be reasonably used in parallel. Sonication proved problematic unless using High Throughput sonicators (which are expensive) or ultrasonic bath (but the ultrasonic energy is not always equally distributed throughout the plate and the results may not be reproducible from well to well). For these reasons, we chose to

optimize lysis conditions using chemical treatment (all the preliminary tests were performed on the native protein). This allowed us to achieve lysis directly on the culture plates, in parallel. We tested different lysis buffers and selected the BugBuster<sup>®</sup>, as it showed the best solubility yields for our protein of interest.

10. The NaCl concentration of the lysis buffer has to be settled according to the protein of interest. Decrease it if the protein does not bind to the ion exchange resin.
11. The protein studied is an aminopeptidase from a thermophilic organism, adapted to high temperatures. The protein is thus stable at 85 °C for 15 min, whereas most of other *E. coli* proteins will precipitate. Bacterial contaminants are then removed by centrifugation.
12. Fill your filter plate with any suitable resin (anion or cation exchange resin, Ni-NTA, StrepTactin, etc.). Adapt bead volume to the capacity of the resin. Typically, we prepare wells containing 400 µL of anion exchange resin for a 10-mL cell culture. This can be scaled up or down to suit your needs based on the expected protein yield.
13. In almost 50 % of cases (using conservative mutations (*see Note 1*)), the only difference between mutant and reference spectra is a single missing cross-peak in the spectrum of the mutant (Fig. 3a-c). In such instances, the missing peak can be unambiguously assigned to the methyl group of the mutated residue. In the remaining spectra, the disappearance of the signal is accompanied by small changes in the chemical shift of a few additional correlations (Fig. 3d-f). This effect is expected and has previously been observed [18, 32]. Peak movements that do not directly concern the mutated resonance can complicate the process of obtaining a sequence-specific assignment from a single experiment, especially in an overcrowded region of the spectrum. Conservative mutations enable minimization of secondary chemical shift perturbations. In the same way, stereospecific labeling of a single methyl group (Valine pro-*S*) versus labeling of 4 methyl groups (Val/Leu) using  $\alpha$ -ketoisovalerate [26] reduces peak overlapping as well as secondary chemical shift up to a factor of 4.

Nonetheless, secondary chemical shift perturbations reflect modifications in the local electronic environment and can therefore provide complementary information that can be used to confirm the proposed assignment. The key point is that the information provided by secondary chemical shift changes only becomes interpretable when data from a full library of methyl group mutants is considered [18]. Any ambiguous assignment can therefore be readily cross-validated

using structurally close, straightforward-assigned resonances. Using an incomplete library of mutants would not permit the same level of confidence in the final assignments.

## Acknowledgments

We would like to thank Dr P. Macek, M. Plevin, O. Hamelin, P. Gans, I. Ayala, C. Amero, and A. Favier for stimulating discussions and assistance in sample preparation or analysis. This work used the RobioMol, High-Field NMR, Isotopic Labeling, and Seq3A platforms of the Grenoble Instruct centre (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02), and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). The research leading to these results has received funding from the European Research Council under the European Community's Seventh Framework Programme FP7/2007-2013 Grant Agreement no. 260887.

## References

1. Sprangers R, Kay LE (2007) Quantitative dynamics and binding studies of the 20S proteasome by NMR. *Nature* 445:618–622
2. Gardner K, Kay LE (1997) Production and incorporation of  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$  ( $^1\text{H}$ - $\delta$ 1 methyl) isoleucine into proteins for multidimensional NMR studies. *J Am Chem Soc* 119:7599–7600
3. Ayala I, Sounier R, Use N et al (2009) An efficient protocol for the complete incorporation of methyl-protonated alanine in perdeuterated protein. *J Biomol NMR* 43:111–119
4. Tugarinov V, Kanelis V, Kay LE (2006) Isotope labeling strategies for the study of high-molecular-weight proteins by solution NMR spectroscopy. *Nat Protoc* 1:749–754
5. Ruschak AM, Kay LE (2010) Methyl groups as probes of supra-molecular structure, dynamics and function. *J Biomol NMR* 46:75–87
6. Plevin MJ, Boisbouvier J (2012) Isotope-labelling of methyl groups for NMR studies of large proteins. In: *Recent developments in biomolecular NMR*. Royal Society of Chemistry. doi:10.1039/9781849735391
7. Stoffregen MC, Schwer MM, Renschler FA et al (2012) Methionine scanning as an NMR tool for detecting and analyzing biomolecular interaction surfaces. *Structure* 20:573–581
8. Religa TL, Ruschak AM, Rosenzweig R et al (2011) Site-directed methyl group labeling as an NMR probe of structure and dynamics in supramolecular protein systems: applications to the proteasome and to the ClpP protease. *J Am Chem Soc* 133:9063–9068
9. Bax A (2011) Triple resonance three-dimensional protein NMR: before it became a black box. *J Magn Reson* 213:442–445
10. Gelis I, Bonvin AM, Keramisanou D et al (2007) Structural basis for signal-sequence recognition by the translocase motor SecA as determined by NMR. *Cell* 131:756–769
11. Turano P, Lalli D, Felli IC et al (2010) NMR reveals pathway for ferric mineral precursors to the central cavity of ferritin. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:545–550
12. Marassi FM, Ramamoorthy A, Opella SJ (1997) Complete resolution of the solid-state NMR spectrum of a uniformly  $^{15}\text{N}$ -labeled membrane protein in phospholipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8551–8556
13. Xu Y, Liu M, Simpson PJ et al (2009) Automated assignment in selectively methyl-labelled proteins. *J Am Chem Soc* 131:9480–9481
14. Venditti V, Fawzi NL, Clore GM (2011) Automated sequence- and stereo-specific assignment of methyl-labeled proteins by para-

- magnetic relaxation and methyl-methyl nuclear overhauser enhancement spectroscopy. *J Biomol NMR* 51:319–328
15. Seven A, Rizo J (2012) Assigning the methyl resonances of the 73 kDa Munc13-1 MUN domain by mutagenesis. 25<sup>th</sup> ICMRBS-poster n° P302 TU, Lyon
  16. Yang X, Welch JL, Arnold JJ et al (2010) Long-range interaction networks in the function and fidelity of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase studied by nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 49:9361–9371
  17. Rosenzweig R, Moradi S, Zarrine-Afsar A et al (2013) Unraveling the mechanism of protein disaggregation through a ClpB-DnaK interaction. *Science* 339:1080–1083
  18. Amero C, Asuncion Dura M, Noirclerc-Savoie M et al (2011) A systematic mutagenesis-driven strategy for site-resolved NMR studies of supramolecular assemblies. *J Biomol NMR* 50:229–236
  19. Goto NK, Gardner KH, Mueller GA et al (1999) A robust and cost-effective method for the production of Val, Leu, Ile ( $\delta$ 1) methyl-protonated  $^{15}\text{N}$ -,  $^{13}\text{C}$ -,  $^2\text{H}$ -labeled proteins. *J Biomol NMR* 13:369–374
  20. Fischer M, Kloiber K, Hausler J et al (2007) Synthesis of a  $^{13}\text{C}$ -methyl-group-labeled methionine precursor as a useful tool for simplifying protein structural analysis by NMR spectroscopy. *Chembiochem* 8:610–612
  21. Gans P, Hamelin O, Sounier R et al (2010) Stereospecific isotopic labeling of methyl groups for NMR spectroscopic studies of high-molecular-weight proteins. *Angew Chem Int Ed Engl* 49:1958–1962
  22. Ayala I, Hamelin O, Amero C et al (2012) An optimized isotopic labelling strategy of isoleucine- $\gamma$ 2 methyl groups for solution NMR studies of high molecular weight proteins. *Chem Commun (Camb)* 48:1434–1436
  23. Isaacson RL, Simpson PJ, Liu M et al (2007) A new labeling method for methyl transverse relaxation-optimized spectroscopy NMR spectra of alanine residues. *J Am Chem Soc* 129:15428–15429
  24. Sinha K, Jen-Jacobson L, Rule GS (2011) Specific labeling of threonine methyl groups for NMR studies of protein-nucleic acid complexes. *Biochemistry* 50:10189–10191
  25. Mas G, Crublet E, Hamelin O et al (2013) Specific labeling and assignment Strategies of valine methyl groups for the NMR Studies of high molecular weight proteins (submitted)
  26. Tugarinov V, Kay LE (2003) Ile, Leu, and Val methyl assignments of the 723-residue malate synthase G using a new labeling strategy and novel NMR methods. *J Am Chem Soc* 125:13868–13878
  27. Amero C, Schanda P, Dura MA et al (2009) Fast two-dimensional NMR spectroscopy of high molecular weight protein assemblies. *J Am Chem Soc* 131:3448–3449
  28. Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW et al (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 6:277–293
  29. Henikoff S, Henikoff JG (1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10915–10919
  30. Chan PH, Weissbach S, Okon M et al (2012) Nuclear magnetic resonance spectral assignments of  $\alpha$ -1,4-galactosyltransferase LgtC from *Neisseria meningitidis*: substrate binding and multiple conformational states. *Biochemistry* 51:8278–8292
  31. Plevin MJ, Hamelin O, Boisbouvier J et al (2011) A simple biosynthetic method for stereospecific resonance assignment of prochiral methyl groups in proteins. *J Biomol NMR* 49:61–67
  32. Sprangers R, Gribun A, Hwang PM et al (2005) Quantitative NMR spectroscopy of supramolecular complexes: dynamic side pores in ClpP are important for product release. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16678–16683

## 6.3 Annexe 3 : Production et purification de PhCpn

### Production de PhCpn :

#### Production en milieu M9 minimum $^1\text{H}_2\text{O}$ :

Les bactéries sont adaptées en trois étapes au milieu M9 minimum  $^2\text{H}_2\text{O}$  composé de 1 g/L de  $^{15}\text{N}^2\text{H}_4\text{Cl}$  et 2 g/L de D-glucose- $\text{d}_7$  (Sigma-Aldrich). Pour la culture finale les bactéries sont cultivé à  $37^\circ\text{C}$  en milieu M9 minimum préparé avec du  $^2\text{H}_2\text{O}$  99.85% (Eurisotop). Quand la DO à 600 nm atteint 0.6-0.7 l'expression de PhCpn est induite avec de l'IPTG à une concentration finale de 0.5 mM. 4 heures après l'induction les cellules sont récoltés et les culots conservés à  $-20^\circ\text{C}$  avant l'étape de purification.

#### Production de PhCpn avec un marquage de groupement méthyle milieu M9 minimum $^2\text{H}_2\text{O}$ :

Les bactéries sont adaptées en trois étapes au milieu M9 minimum  $^2\text{H}_2\text{O}$  composé de 1 g/L de  $^{15}\text{N}^2\text{H}_4\text{Cl}$  et 2 g/L de D-glucose- $\text{d}_7$  (Sigma-Aldrich). Pour la culture finale les bactéries sont cultivé à  $37^\circ\text{C}$  en milieu M9 minimum préparé avec du  $^2\text{H}_2\text{O}$  99.85% (Eurisotop). Quand la DO à 600 nm atteint 0.7-0.8 une solution contenant les précurseurs est ajouté au milieu de culture. La solution de précurseurs est adaptée en fonction de chaque marquage avec les compositions suivantes par litre de culture :

- 100 mg de L-Methionine-3,3,4,4-d4- $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\epsilon$  pour la production des échantillons U- $^{15}\text{N}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ],  $^{13}\text{CH}_3$ ]Met- $\epsilon$ .
- 300 mg de 2-hydroxy-2- $^{13}\text{C}$ ]methyl-3-oxo-4,4,4-tri- $^2\text{H}$ ]butanoate (acetolactate pro-S- $^{13}\text{C}$ ) et 40 mg de L-leucine-d 10 (Sigma-Aldrich) pour la production des échantillons U- $^{15}\text{N}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ],  $^{13}\text{CH}_3$ ]Val-proS.
- 300 mg de 2-hydroxy-2- $^{13}\text{C}$ ]methyl-3-oxo-4,4,4-tri- $^2\text{H}$ ]butanoate (acetolactate pro-S- $^{13}\text{C}$ ), 40 mg de L-leucine-d 10 (Sigma-Aldrich) et 100 mg de L-Methionine-3,3,4,4-d4- $^{13}\text{CH}_3$ ]- $\epsilon$  pour la production des échantillons U- $^{15}\text{N}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ],  $^{13}\text{CH}_3$ ]Val-proS, Met- $\epsilon$ .

Une heure après l'addition des précurseurs. L'expression de PhCpn est induite avec de l'IPTG à une concentration finale de 0.5 mM. 4 heures après l'induction les cellules sont récoltés et les culots conservés à  $-20^\circ\text{C}$  avant l'étape de purification.

### Purification de PhCpn :

Les étapes 1 à 3 sont réalisées en tampon  $^1\text{H}_2\text{O}$  et l'étape 4 en tampon  $^2\text{H}_2\text{O}$ .

- **Étape 0** : Sonication (05/05 ; 40% ; 10 minutes (2\*5'))

Tampon de lyse : TRIS 20 mM (pH 7.5), NaCl 20 mM et  $\text{MgCl}_2$  5 mM. (50 mL de tampon de lyse par litre de culture).

1 tablette d'anti-protéase (/50mL) ; Dnase 0.05 mg/mL ; Rnase 0.02 mg/mL

- **Étape 1** : Choc thermique de 30 min à 80°C

⇒ Centrifugation (12000rpm, 60', 4°C) pour séparer PhCpn des protéines de E. coli. ⇒ Filtrer le surnageant avant injection sur CeA.

- **Étape 2** : Ressource Q (CeA : Colonne Échangeuse d'anion)

⇒ Injection de 50 mL de surnageant sur la colonne de CeA

⇒ Gradient du tampon A vers 100% du tampon B en dix volume de colonne

⇒ Concentrer les fractions de 1.8 à 21.6 mL avec un centricon (« cutoff » 30 kDa ou 50 kDa) jusqu'à un volume de 3 à 5 mL

Tampon A : 20 mM TRIS (pH 7.5), 100mM NaCl, 5mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,5

Tampon B : 20 mM TRIS (pH 7.5), 1M NaCl, 5mM  $\text{MgCl}_2$  , pH 7,5

- **Étape 3** : Chromatographie d'exclusion de taille (Superdex 200 16/60 and Sephacryl 500 HiPrep 16/60)

⇒ Injection de 3 à 5 mL sur les colonnes de CE

Tampon : 25 mM MES (pH 6.5), 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM NaCl, 100 mM KCl.

- **Étape 4** : Échange du tampon  $^1\text{H}_2\text{O}$  par le tampon  $^2\text{H}_2\text{O}$ .

Pour les échantillons avec un marquage de groupement méthyle, le tampon  $^1\text{H}_2\text{O}$  doit être échangé avec un tampon  $^2\text{H}_2\text{O}$ . En fonction des échantillons du MES deutéré ou du MES protoné a été utilisé.

⇒ L'échange du tampon est réalisé par cinq cycles de dilution/concentration de l'échantillon avec un centricon (cut-off 50 kDa ou 100 kDa).

- **Étape 5** : Contrôle de la qualité de l'échantillon

Après purification de l'échantillon plusieurs tests permettent de déterminer la qualité de PhCpn.

- (1) Contrôle de la pureté et de l'oligomérisation avec une colonne de CE analytique
- (2) Test de l'activité ATPase avec le test "malachite green"
- (3) Contrôle de la particule par microscopie électronique
- (4) Échantillon avec un marquage de groupement méthyle : enregistrement d'un spectre RMN et test de l'interaction avec un analogue de l'ATP

### 6.4 Annexe 4 : Production et purification du lysozyme

#### Production du lysozyme :

##### Production avec un marquage de groupement méthyle en milieu M9 minimum $^2\text{H}_2\text{O}$ :

Les bactéries sont adaptées en trois étapes au milieu M9 minimum  $^2\text{H}_2\text{O}$  composé de 1 g/L de  $^{15}\text{N}_2\text{H}_4\text{Cl}$  et 2 g/L de D-glucose- $\text{d}_7$  (Sigma-Aldrich). Pour la culture finale les bactéries sont cultivé à  $37^\circ\text{C}$  en milieu M9 minimum préparé avec du  $^2\text{H}_2\text{O}$  99.85% (Eurisotop). Quand la DO à 600 nm atteint 0.7-0.8 une solution contenant les précurseurs est ajouté au milieu de culture. La solution de précurseurs est adaptée en fonction de chaque marquage avec les compositions suivantes par litre de culture :

- 300 mg de 2-hydroxy-2- $^{13}\text{C}$  methyl-3-oxo-4,4,4-tri- $^2\text{H}$ butanoate (acetolactate pro-S- $^{13}\text{C}$ ) et 40 mg de L-leucine- $\text{d}_{10}$  (Sigma-Aldrich) suivi par l'addition de 60 mg of 2-oxo-3-[ $^2\text{H}_2$ ]-4-[ $^{13}\text{C}$ ]-butanoate ( $\alpha$ -céto-butyrate) pour la production de l'échantillon U- $^{15}\text{N}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ],  $^{13}\text{CH}_3$ Val-proS, Leu-proS, Ile- $\delta_1$  .

Une heure après l'addition des précurseurs. L'expression du lysozyme est induite avec de l'IPTG à une concentration finale de 2 mM. 3 heures après l'induction les cellules sont récoltés et les culots conservés à  $-20^\circ\text{C}$  avant l'étape de purification.

#### Purification du lysozyme :

##### - Étape 1 : Purification des corps d'inclusions

⇒ Sonication (05/05 ; 40% ; 10 minutes (2\*5'))

Tampon de lyse : TRIS 50 mM (pH 7.5), EDTA 1 mM et 25% sucrose

⇒ Centrifugation (12000 rpm, 60',  $4^\circ\text{C}$ )

⇒ Lavage des culots dans le tampon de lyse

⇒ Centrifugation (12000 rpm, 60',  $4^\circ\text{C}$ )

⇒ Lavage des culots dans le tampon 2

Tampon 2 : TRIS 20 mM (pH 7.5), EDTA 1 mM et Triton 1%.

⇒ Centrifugation (12000 rpm, 60',  $4^\circ\text{C}$ )

⇒ Lavage des culots dans le tampon 3

Tampon 3 : TRIS 20 mM (pH 7.5) et EDTA 1 mM.

⇒ Centrifugation (12000 rpm, 60',  $4^\circ\text{C}$ )

Les corps d'inclusions peuvent être stockés plusieurs semaines à  $-20^\circ\text{C}$ .

## 6.4 Annexe 4 : Production et purification du lysozyme

---

### - **Étape 2** : Extraction du lysozyme des corps d'inclusions

⇒ Solubilisation des corps d'inclusions dans le tampon 4

Tampon 4 : TRIS 20 mM (pH 7.5), NaCl 20 mM, EDTA 1 mM, DTT 100 mM et Urée 8 M

⇒ Chauffer à 50°C et agiter à 250 rpm pendant 1 heure

⇒ Sonication (05/05 ; 40 ⇒ Chauffer à 50°C et agiter à 250 rpm pendant 1 heure

⇒ Centrifugation (12000 rpm, 30', 4°C) pour séparer le surnageant des débris cellulaires.

⇒ Filtrer le surnageant avec un filtre 0.45  $\mu$ m avant injection sur la CeC

### - **Étape 3** : Purification du lysozyme (SPFF (CeC : Colonne échangeuse de cation))

⇒ Injection de 50 mL de surnageant sur la colonne de CeC

⇒ Gradient du tampon A vers 100% du tampon B en dix volume de colonne

⇒ Concentrer les fractions contenant le lysozyme avec un centricon (« cutoff » 3 kDa) jusqu'à une concentration de +/- 2mg/mL.

Tampon A : 20mM TRIS (pH 7.5), 20mM NaCl, 5 mM  $\beta$ -mercapto-éthanol, Urée 4 M.

Tampon B : 20mM TRIS (pH 7.5), 1 M NaCl, 5 mM  $\beta$ -mercapto-éthanol, Urée 4 M.

### - **Étape 4** : Repliement sur colonne de chromatographie d'exclusion de taille. ⇒ Dépliage du lysozyme dans le tampon de dépliage pendant 1 heure à 50°C avec une agitation à 250 rpm.

Tampon de dépliage : 100 mM TRIS (pH 8.7), 20mM NaCl, 100 mM DTT, Urée 8 M.

⇒ Injection de 3 à 5 mL sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille (Colonne Superdex 200 16/60 (0.25 mL/min maximum))

Tampon de repliage : 100 mM TRIS (pH 8.7), 150 mM NaCl, 3mM GSH, 0.3mM GSSG, 1mM EDTA, 2 M Urée.

### - **Étape 5** : Échange du tampon avec le tampon d'activité de PhCpn

⇒ Concentrer les fractions contenant le lysozyme avec un centricon (« cutoff » 3 kDa) jusqu'à une concentration de +/- 5 mg/mL.

⇒ Injection de 3 à 5 mL sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille (Colonne Superdex 200 16/60 (0.25 mL/min maximum))

Tampon : 25 mM MES (pH 6.5), 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 100 mM KCl.

### - **Étape 6** : Échange du tampon <sup>1</sup>H<sub>2</sub>O par le tampon <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O.

Pour les échantillons avec un marquage de groupement méthyle, le tampon <sup>1</sup>H<sub>2</sub>O doit être

## 6. ANNEXES

---

échangé avec un tampon  $^2\text{H}_2\text{O}$ . En fonction des échantillons du MES deutéré ou du MES protoné a été utilisé.

## **RÉSUMÉ :**

Les chaperonines sont des chaperonnes moléculaires indispensables pour le repliement de certaines protéines dans les cellules. La taille et la complexité de ces machineries biologiques rendent complexes l'étude de leurs propriétés structurales et fonctionnelles. La spectroscopie RMN permet de suivre des changements structuraux et dynamiques en temps réel avec une résolution atomique. Cependant, l'étude par RMN de protéines ou de complexes de haut poids moléculaires a été un challenge pendant de nombreuses années. Dans la première partie de cette thèse, il a été montré que la combinaison de marquage spécifique des groupements méthyles, d'expériences RMN optimisées et de microscopie électronique peut être utilisée pour suivre différents états du cycle fonctionnel d'une chaperonine de 1 MDa. Pour étudier ce mécanisme, la chaperonine native a été reconstituée avec un marquage des groupements méthyles des méthionines et valines. Les résidus méthionines ont pu être utilisés comme des sondes pour identifier les spectres RMN correspondant aux états intermédiaires et aux espèces actives du cycle fonctionnel. Grâce à ces sondes il a été possible de suivre en temps réel les réarrangements structuraux correspondant aux différentes conformations de la chaperonine durant son cycle fonctionnel. La seconde partie traite de la caractérisation de l'interaction de la chaperonine avec une protéine cliente dépliée. L'observation de la stabilisation de l'état déplié de la protéine par la chaperonine a permis de mettre en évidence une activité de "holdase" de la chaperonine. En utilisant une combinaison astucieuse de différents marquages de groupements méthyles et d'expériences RMN optimisées pour des assemblages de haut poids moléculaire, il a été possible d'observer le repliement de cette protéine par la chaperonine et les effets de la présence d'une protéine dépliée sur le cycle fonctionnel de la chaperonine en action.

Mots clés : RMN, marquage spécifique, chaperonines, assemblage de haut poids moléculaire, ATPase, repliement.

## **ABSTRACT :**

Chaperonins are essential molecular chaperons for the refolding of proteins in the cells. Size and complexity of these biological machineries make complex the study of their structural and functional properties. NMR spectroscopy offers an unique ability to monitor structural and dynamic changes in real-time and at atomic resolution. However, the NMR studies of large proteins and complexes has been a real challenge for a long time. In the first part of this thesis, it has been shown that the combination of methyl specific labeling, optimized NMR spectroscopy for large assemblies and electron microscopy can be used to monitor the different states of the functional cycle of a 1 MDa chaperonin. To study this mechanism, the native chaperonin was reconstituted with a labeling of the methionines and valines methyl groups. Methionines residues have been used as probes to identify the NMR spectra corresponding to intermediates states and active species of the functional cycle. Thanks to these probes, it has been possible to follow in real time the structural rearrangements corresponding to the different conformations of the chaperonin during its functional cycle. The second part deals with the characterization of the interaction between the chaperonin and an unfolded protein. Observation of the stabilization of the unfolded protein by the chaperonin allowed to identify the holdase activity of the chaperonin. Using a clever combination of a differential methyl labeling and optimized NMR spectroscopy for large assemblies, it has been possible to follow the refolding of the unfolded protein by the chaperonin and the effects of the unfolded protein on the functional cycle of the chaperonin in action.

Key words : NMR, specific labeling, chaperonins, large assemblies, ATPase, refolding.