



**HAL**  
open science

# Étude structurale et fonctionnelle d'un transporteur de lipides “ une flippase ” de la levure *S. cerevisiae* : l'ATPase P4 Drs2p et sa sous unité-associée Cdc50p

Hassina Azouaoui

## ► To cite this version:

Hassina Azouaoui. Étude structurale et fonctionnelle d'un transporteur de lipides “ une flippase ” de la levure *S. cerevisiae* : l'ATPase P4 Drs2p et sa sous unité-associée Cdc50p. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS224 . tel-01649120

**HAL Id: tel-01649120**

**<https://theses.hal.science/tel-01649120>**

Submitted on 27 Nov 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.

NNT: 2016SACLS224

THÈSE DE DOCTORAT  
DE  
L'UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY

Préparée dans le  
Laboratoire des Protéines et des Systèmes Membranaires,  
I2BC et CEA Saclay

ÉCOLE DOCTORALE N° 568  
Signalisation et Réseaux Intégratifs en Biologie (Biosigne)  
Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Par

**Madame Hassina AZOUAOUI-BOUMZAR**

*Étude fonctionnelle d'un transporteur de lipides, « une flippase » de la levure  
S. cerevisiae: l'ATPase P4 Drs2p et sa sous unité-associée Cdc50p*

Thèse présentée et soutenue à l'I2BC (Campus de Gif, Bât n°21) le 28/09/2016 :

**Composition du Jury :**

Monsieur NÜSSE, Oliver	Professeur, INSERM, UP-Sud	Président
Monsieur GASNIER, Bruno	Directeur de recherche, CNRS, LN, UP-Descartes	Rapporteur
Monsieur PICARD, Martin	Chargé de recherche, CNRS, IBPC, UP-Diderot	Rapporteur
Monsieur JAULT, Jean Michel	Directeur de recherche, CNRS, IBCP, UCB-Lyon 1	Examinateur
Monsieur LENOIR, Guillaume	Maître de Conférences, UP-Sud	Directeur de thèse
Monsieur le MAIRE, Marc	Professeur émérite, UP-Sud	Co-directeur de thèse

# Remerciements

*« Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent  
du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers  
par qui nos âmes sont fleuries. »*

*Marcel Proust*

*Par ces quelques lignes, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse, en espérant n'avoir oublié personne.*

*J'exprime mes plus vifs remerciements et ma gratitude à mon directeur de thèse, Guillaume LENOIR, pour avoir cru en mes capacités, pour le temps et la patience qu'il m'a accordé tout le long de ces années. Je garderai dans ma mémoire sa patience, sa rigueur, ses précieux conseils, sa compréhension, son grand soutien et sa disponibilité malgré ses nombreuses charges. Je te remercie très sincèrement.*

*Je tiens à remercier particulièrement mon co-directeur de thèse, Marc le MAIRE, pour sa rigueur intellectuelle, pour ses précieux conseils, ses relectures, et surtout sa compréhension et son grand soutien. Merci de m'avoir permis de réaliser mon travail dans les meilleures conditions. J'en profite également pour saluer ses talents d'apiculteur.*

*Je tiens à remercier particulièrement Philippe CHAMPEIL "Djeddi", pour ses précieux conseils, sa disponibilité, son soutien et pour tout ce que j'ai pu apprendre à ses côtés. Je garde toujours beaucoup de plaisir*

à discuter avec lui et à bénéficier de sa richesse humaine et intellectuelle (merci de m'avoir fait découvrir entre-autres les contes suédois).

Je remercie spécialement Christine JAXEL pour ses précieux conseils en biologie moléculaire, sa patience, sa disponibilité, son amitié et son grand soutien.

Merci à Philippe CAMPELL et à Cédric MONTIGNY pour leur énorme contribution à la réalisation de ce travail et à leur grande disponibilité.

Merci à Aurore JACQUOT pour sa disponibilité à mes débuts, ses conseils et son aide précieuse. Aussi pour les liens amicaux qui ont pu se créer.

Mes remerciements chaleureux s'adressent aussi à Thibaud DIEUDONNÉ, José Luis VÁZQUEZ-IBAR, Manuel GARRIGOS, Veronica BESWICK, Nadège JAMIN et à Marie-Thérèse PATERNOSTRE pour leurs collaborations de près ou de loin au bon déroulement de ce travail.

J'en profite également pour remercier Josiane et Pascale pour leur grande disponibilité et leur soutien logistique.

Je remercie tous les jeunes des différents laboratoires, composante essentielle pour la bonne humeur, et en particulier Stéphanie BOSNE.

*Je tiens à remercier mon tuteur Oliver NÜSSE qui a été présent et à mon écoute.*

*J'exprime mes sincères remerciements aux rapporteurs et membres du jury Bruno GASNIER, Martin PICARD, Jean Michel JAULT et Oliver NÜSSE de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail de thèse.*

*Je tiens à remercier également Poul NISSEN, Miriam-Rose ASH, Pontus GOURDON, Christina GRONBERG, Franck FIJALOKOWSKI, , Joseph A. LYONS, Paulette DECOTTIGNIES et Pierre le MARÉCHAL pour leurs précieuses collaborations.*

*Je tiens à remercier les établissements; Université Paris-Saclay, Université Paris-Sud, l'école doctorale Biosigne (568) et le Laboratoire des Protéines et Systèmes Membranaires (I2BC, CEA) de leur soutien logistique et financier et de m'avoir permis de réaliser ce travail et d'accéder au monde de la recherche en laissant une petite trace de ce passage par la science.*

*Les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille, et en particulier à mes parents chéris, Papa, Maman, et mon cher frère Hocine qui m'ont fait comprendre que dans la vie tout est possible, il faut simplement oser. Malgré mon éloignement depuis de longues années, leur confiance, leur intelligence, leur tendresse et surtout leur amour guident chaque instant de ma vie. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. JE VOUS AIME.*

*Je remercie ma grande famille, mes grands-parents, mes tantes et oncles, en particulier OUAHBA et NAJMA, pour leur soutien et encouragement.*

*J'exprime mes chaleureux remerciements à Madame Zahia GUESSOUM, ma maman d'adoption, ma grande sœur et mon amie à qui je souhaite tant de bonheur et de succès. Ainsi qu'à son fils Anis et sa sœur Dalila.*

*Je remercie mes amis, plus particulièrement ma sœur, ma meilleure amie celle qui m'a le plus soutenue depuis notre tendre enfance, Sonia KHAR, Vivement nos retrouvailles!*

*J'adresse mes respects à mes beaux parents Papa-Youssef et Mama-Safia pour leur boneté, leur gentillesse et leurs prières. Sans oublier ma sœur Badiia, mon frère Yacine et leurs familles.*

*Le meilleur est pour la fin, je remercie le plus merveilleux des hommes, mon amour, mon ami, mon âme sœur, je cite : Monsieur Markuche Abdallah BOUMZAR, Merci d'être TOI!*

*J'ai failli oublié "mes chères levures" sans qui ce travail n'aurait pas pu être réalisé!*

*Je tourne une page et j'en ouvre une autre, vivement la suite!*

**Titre :** Étude fonctionnelle d'un transporteur de lipides, « une flippase » de la levure *S. cerevisiae*: l'ATPase P4 Drs2p et sa sous-unité-associée Cdc50p.

**Mots clés :** ATPases-P4, membranes, protéines membranaires, transporteurs de lipides, phosphorylation, régulation.

**Résumé :** Les ATPases-P4 sont des transporteurs membranaires couplant l'hydrolyse de l'ATP au transport de lipides dans les membranes cellulaires eucaryotes. Avec leurs partenaires, les protéines CDC50, les ATPases-P4 transportent les phospholipides, en particulier la phosphatidylsérine (PS) et la phosphatidyléthanolamine (PE), du feuillet exoplasmique au feuillet cytosolique des membranes, assurant ainsi le maintien de l'asymétrie membranaire.

Drs2p est l'une des cinq ATPases-P4 de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Elle est localisée dans les membranes du *trans*-Golgi (TGN), et elle a comme partenaire la protéine Cdc50p, qui est nécessaire à l'adressage correct et probablement au transport catalysé par Drs2p. Drs2p est principalement responsable du transport de la PS dans les membranes du TGN et son activité est essentielle pour le maintien de la PS dans le feuillet cytosolique de ces membranes. En raison du rôle crucial de la PS dans de nombreuses voies de signalisation, aussi bien à l'extérieur (au cours de l'apoptose par exemple) qu'à l'intérieur de la cellule (par le recrutement de protéines impliquées dans des processus cellulaires essentiels), il est important de comprendre le mécanisme par lequel l'asymétrie de la PS est établie.

Afin de progresser dans la compréhension du mécanisme moléculaire du transport de lipides, nous avons mis au point une procédure pour la *co*-expression de Drs2p et Cdc50p dans *Saccharomyces cerevisiae*. La purification de Drs2p par chromatographie d'affinité sur résine streptavidine a permis d'obtenir une fraction purifiée contenant très majoritairement Drs2p et Cdc50p (concentration finale : 1-2 mg/L de culture). Les deux protéines sont sous forme de complexe avec une stœchiométrie d'association de 1:1 (mol:mol). Le complexe purifié est actif, et présente une hydrolyse de l'ATP stimulée par son substrat, la PS. Cette stimulation n'est cependant possible qu'en présence de PI4P, un phosphoinositide impliqué dans la régulation du trafic membranaire.

A cause de leur rôle crucial dans le maintien de l'asymétrie membranaire, il est logique de penser que les ATPases-P4 doivent être régulées. Par ailleurs, de nombreuses ATPases de type P sont soumises à auto-régulation par leurs extrémités terminales. Nous avons donc examiné la possibilité d'une telle auto-régulation dans le cas des ATPases P4. Pour ce faire, une approche par protéolyse ménagée et identification des peptides par spectrométrie de masse, associée à de la mutagenèse dirigée, a été effectuée.

La protéolyse par la thrombine, en présence de PI4P, engendre une protéine Drs2p dépourvue d'une partie de son extrémité N-terminale (coupure après R104) et d'une partie de son extrémité C-terminale (coupure après R1290). Après protéolyse, le complexe purifié Drs2p/Cdc50p montre une activité ATPasique qui reste toujours stimulable par le PI4P (activité 30 à 50 fois plus importante que celle du complexe intact), et Drs2p reste toujours associée à son partenaire Cdc50p. Une coupure appropriée au niveau des extrémités terminales de Drs2p peut donc augmenter de façon significative l'activité ATPasique du complexe en présence du PI4P, ce qui établit sans ambiguïté le rôle auto-inhibiteur des extrémités N- et/ou C-terminales de Drs2p. Nos résultats suggèrent que pour que la flippase Drs2p/Cdc50p soit pleinement active, un mécanisme d'activation en deux étapes est nécessaire : une première étape consisterait à relâcher les contraintes exercées par les extrémités terminales de Drs2p sur la chaîne polypeptidique (peut-être par une interaction de Drs2p avec des protéines régulatrices, et/ou un phénomène de maturation de Drs2p effectué par une protéolyse limitée au niveau du *trans*-Golgi), pour que lors d'une deuxième étape, le PI4P puisse activer Drs2p de façon maximale.

Ce travail ouvre des pistes pour la caractérisation structurale et fonctionnelle de ce transporteur de lipides, et laisse entrevoir la possibilité d'étudier les bases moléculaires des pathologies associées aux mutations de certaines ATPases-P4 humaines.

**Title :** Functional characterization of the yeast Drs2p/Cdc50p “lipid flippase” complex.

**Keywords :** P4-ATPases, membranes, membrane proteins, lipid transporters, phosphorylation, regulation.

**Abstract :** Maintenance of phospholipid asymmetry in eukaryotic cell membranes is essential for cellular integrity and function. P4-ATPases, together with their CDC50 accessory subunits, are energy-dependent transporters that couple ATP hydrolysis to lipid transport from the exoplasmic to cytoplasmic leaflet to maintain membrane asymmetry.

Drs2p is one of these P4-ATPases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Drs2p is localised in *trans*-Golgi network (TGN) membranes, in association with its Cdc50p partner, the latter contributing to the correct addressing of Drs2p and probably also to the transport itself catalyzed by Drs2p. Drs2p mainly transports phosphatidylserine (PS) in TGN membranes. PS is important for several signalling pathways, for example for apoptosis or for the recruitment of proteins involved in various essential cellular processes. It is therefore of critical importance to understand the mechanism by which lipid asymmetry is established.

To gain insight into the molecular mechanism of lipid transport, robust protocols for expression and purification are required. In this work, we present a procedure for high-yield co-expression of Drs2p and Cdc50p. The purification of Drs2p and Cdc50p was achieved in a single step by affinity chromatography on streptavidin beads, yielding 1-2 mg purified Drs2p/Cdc50p per liter of culture. This procedure allows purification of a Drs2p/Cdc50p complex with a 1:1 (mol:mol) stoichiometry. The purified complex is functional, as testified by overall ATP hydrolysis measurements and by the fact that ATPase activity is dependent on both PS, the transported substrate of Drs2p, and the

presence of PI4P, a phosphoinositide involved in regulation of membrane trafficking.

As several other P-type ATPases are subjected to auto-regulation by their terminal extensions, we examined the possibility that P4-ATPases too are auto-regulated. To investigate this possibility, we used limited proteolysis and mass spectrometry to identify the generated peptides, as well as directed mutagenesis.

We show that limited proteolysis of a purified complex Drs2p/Cdc50p may result in up to a 30-50-fold increase of its ATPase activity, which however remains dependent on the presence of PS and PI4P. Using thrombin as the protease, Cdc50p remained intact and in complex with Drs2p, the latter being cleaved at two positions, namely after R104 and after R1290. Our results therefore reveal that trimming off appropriate regions of the terminal extensions of Drs2p can increase its ATPase activity in the presence of PI4P by an enormous factor, thereby unambiguously establishing a role of N- and/or C-terminal extensions in auto-inhibition of Drs2p.

Our results suggest that full activation of the Drs2p/Cdc50p flippase might follow a two-step mechanism, with preliminary release of a number of constraints (possibly through the binding of regulatory proteins or proteolysis in the TGN), followed by full activation by PI4P.

Our results open perspectives with regard to the structural and the functional characterization of the lipid transport mechanism by the Drs2p/Cdc50p lipid flippase complex. Furthermore, the protocols developed here open up the possibility of studying the molecular bases of the pathologies associated with mutations of human P4-ATPases.

# Abréviations

ADP : Adénosine Di-Phosphate  
ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique  
APLT : Amino-Phospholipide Translocase  
ATP : Adénosine Tri-Phosphate  
Arf : ADP-Ribosylation Factor  
ARN : Acide Ribo-Nucléique  
BAD : Biotin Acceptor Domain  
BCA : Bi-Cinchoninic Acid  
BET : Bromure d'Éthidium  
BSA : Bovine Serum Albumin  
C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> : Octaéthylène glycol monododecyl Ether  
Cer : Céramide  
Chol : Cholestérol  
CPV : Compartiment Pré-Vacuolaire  
DAG : Di-Acyl-Glycérol  
DDM : n-Dodecyl-b-D-Maltopyranoside  
DMPS : 1,2-Di-Myristoyl-*sn*-glycero-3-Phospho-L-Serine  
dNTPs : Désoxy-Nucléotides Tri-Phosphates  
DOPC : 1,2-Di-Oleoyl-*sn*-glycero-3-Phospho-Choline  
DO : Densité Optique  
DTT : Di-Thio-Thréitol  
ECL : Electro-Chemi-Luminescence  
EDTA : Acide Éthylène-Diamine Tétracétique  
EE : Early Endosomes  
FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography  
GAP : GTPase-Activating Protein  
GDP : Guanosine Di-Phosphate  
GEF : GTP Exchange Factor

GGA : Golgi-localized, Gamma Adaptin ear-containing  
GM3 : Mono-sialoganglioside simple  
GTP : Guanosine Tri-Phosphate  
HEPES : Acid N-2-hydroxy Ethyl Piperazine-N'-2-Ethanesulfonique  
HPLC : High Performance Liquid Chromatography  
HRP : Horse-Radish Peroxidase  
IMAC : Immobilized Metal Affinity Chromatography  
LPC : Lyso-Phosphatidyl-Choline  
LPE : Lyso-Phosphatidyl-Éthanolamine  
LPS : Lyso-Phosphatidyl-Sérine  
MA : Membrane Apicale  
MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight  
MBD : Metal Binding Domain  
MOPS : acid 3-[N-Morpholino]Propane-Sulfonique  
MP : Membrane Plasmique  
NBD : 7-Nitro-Benz-2-oxa-1,3-di-Azol-4-yl  
Ni<sup>2+</sup>-TED : Nickel Tris-carboxymethyl Ethylene Diamine  
PA : Acide Phosphatidique  
PBS : Phosphate Buffer Saline  
PBS-T : Phosphate Buffer Saline Tween  
PC : Phosphatidyl-Choline  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PE : Phosphatidyl-Éthanolamine  
PH : Pleckstrin Homology  
PI : Phospho-Inositol  
Pi : Phosphate inorganique  
PI4P : L-alpha-Phosphatidyl-Inositol-4-Phosphate  
PL : Phospho-Lipide  
PLN : Phospholamban  
PMSF : Phényl-Méthyl-Sulfonyl-Fluoride  
POPC : 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-glycero-3-Phospho-Choline

POPE : 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-glycero-3-Phospho-Ethanolamine  
POPS : 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-glycero-3-Phospho-L-Serine  
PS : Phosphatidyl-Sérine  
PVDF : Poly-Vinylidene-difluorure  
RE : Réticulum Endoplasmique  
SDS : Sodium Dodécyl-Sulfate  
SDS-PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis  
SERCA : Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase  
SL : Sphingo-Lipide  
SLN : Sarcolipine  
SM : Sphingo-Myéline  
SSD : Deoxyribonucleic acid Sodium salt from Salmon  
TB buffer : Trizma-Base  
TCA : Tri-Chloroacetic Acid  
TES : acide 2-[[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxyméthyl)éthyl]amino]éthanesulfonique  
TEV : Tobacco Etch Virus  
TFA : Acide Tri-Fluoroacétique  
TGN : *Trans*-Golgi Network  
UV : Ultra-Violet  
VS : Vésicules de Sécrétion post-Golgi

# Sommaire

<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>15</b>
<b>I.1. Asymétrie membranaire chez les eucaryotes .....</b>	<b>16</b>
<i>I.1.1. Asymétrie transversale et son importance .....</i>	<i>17</i>
<i>I.1.2. Création et maintien de l'asymétrie transversale .....</i>	<i>18</i>
<b>I.2. Les ATPases de type P (ATPases-P) .....</b>	<b>22</b>
<i>I.2.1. Les ATPases-P1 .....</i>	<i>25</i>
<i>I.2.2. Les ATPases-P2 .....</i>	<i>25</i>
<i>I.2.3. Les ATPases-P3 .....</i>	<i>26</i>
<i>I.2.4. Les ATPases-P4 .....</i>	<i>27</i>
<i>I.2.5. Les ATPases-P5 .....</i>	<i>27</i>
<i>I.2.6. Caractéristiques structurales des ATPases-P .....</i>	<i>28</i>
• <i>Domaine M .....</i>	<i>30</i>
• <i>Domaine P .....</i>	<i>30</i>
• <i>Domaine N .....</i>	<i>30</i>
• <i>Domaine A .....</i>	<i>31</i>
• <i>Domaine R .....</i>	<i>31</i>
• <i>Sous-unités additionnelles .....</i>	<i>31</i>
<i>I.2.7. Caractéristiques fonctionnelles des ATPases-P .....</i>	<i>32</i>
<b>I.3. Les ATPases de type P4 .....</b>	<b>35</b>
<i>I.3.1. Découverte des ATPases-P4 comme transporteurs de lipides .....</i>	<i>35</i>
<i>I.3.2. Les différentes ATPases-P4 et leurs partenaires, les protéines CDC50 .....</i>	<i>35</i>
<i>I.3.3. Structure et fonction des ATPases-P4 .....</i>	<i>38</i>
<i>I.3.4. Les ATPases-P4, transporteurs de phospholipides .....</i>	<i>42</i>
<i>I.3.5. La famille des protéines CDC50 .....</i>	<i>44</i>
<i>I.3.6. Hypothèses sur le mécanisme de transport .....</i>	<i>47</i>
<i>I.3.7. Rôle des ATPases-P4 dans le trafic membranaire .....</i>	<i>49</i>

I.3.8. Les ATPases-P4 et les pathologies .....	54
I.3.9. Régulation des ATPases-P4 .....	55
<b>I.4. Problématique et objectifs de notre travail .....</b>	<b>58</b>
<b>II. MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>61</b>
<b>II.1. Matériels .....</b>	<b>62</b>
II.1.1. Produits utilisés .....	62
II.1.2. Matériels biologiques .....	63
• Description de la souche bactérienne .....	63
• Description de la souche de levure .....	63
• Description du vecteur .....	65
<b>II.2. Stratégies de clonage .....</b>	<b>67</b>
II.2.1. Construction de vecteurs de simple expression portant différentes versions du gène <i>DRS2</i> ou du gène <i>CDC50</i> .....	67
• Construction des vecteurs portant le gène <i>DRS2</i> ( <i>DRS2</i> sauvage ou <i>DRS2</i> <sup>D560N</sup> ) avec une étiquette BAD en N-terminal de la protéine .....	67
• Obtention du gène <i>DRS2</i> <sup>E342Q</sup> .....	68
• Obtention de gènes codant des protéines <i>Drs2p</i> délétées en N- ou C-terminal .....	68
• Construction du vecteur portant le gène <i>CDC50</i> avec l'étiquette <i>HIS</i> <sub>10</sub> en N-terminal, avec ou sans site TEV entre la séquence codant <i>CDC50</i> et l'étiquette .....	73
II.2.2. Construction des vecteurs permettant la co-expression des gènes <i>DRS2</i> et <i>CDC50</i> .....	74
<b>II.3. Détails de diverses méthodes de Biologie Moléculaire .....</b>	<b>76</b>
II.3.1. PCR .....	76
II.3.2. Électrophorèse sur gel d'agarose .....	78
II.3.3. Nettoyage des produits de PCR et des produits de digestion .....	79
II.3.4. Concentration des fragments d'ADN .....	80
II.3.5. Digestion enzymatique .....	80
II.3.6. Purification d'ADN à partir du gel d'agarose .....	81

II.3.7. Déphosphorylation de l'extrémité 5' .....	81
II.3.8. Ligation .....	81
II.3.9. Préparation de bactéries compétentes.....	82
II.3.10. Transformation des bactéries compétentes par choc thermique .....	82
II.3.11. Criblage des clones .....	83
<b>II.4. Expression des protéines Drs2p et Cdc50p .....</b>	<b>84</b>
II.4.1. Transformation de la souche de levure W303.1b/GAL4 .....	84
II.4.2. Test de croissance des levures à basse température .....	85
II.4.3. Expression de Drs2p et de Cdc50p en milieu minimum .....	86
II.4.4. Expression de Drs2p et de Cdc50p en milieu riche .....	86
<b>II.5. Analyse de l'expression des protéines d'intérêt .....</b>	<b>87</b>
II.5.1. Préparation de fractions membranaires après expression en milieu minimum.....	87
II.5.2. Préparation de fractions membranaires après expression en milieu riche ...	88
II.5.3. Dosage de la concentration des protéines totales ou purifiées.....	89
II.5.4. Analyse par électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) .....	90
<b>II.6. Purification du complexe Drs2p/Cdc50p .....</b>	<b>93</b>
II.6.1. Solubilisation.....	93
II.6.2. Purification du complexe Drs2p/Cdc50p par chromatographie d'affinité sur résine Streptavidine Sepharose .....	94
II.6.3. Élimination de la TEV grâce à la résine Ni <sup>2+</sup> -TED .....	96
II.6.4. Chromatographie d'exclusion de taille (SEC) .....	96
II.6.5. Analyse du complexe Drs2p/Cdc50 purifié par spectrométrie de masse (MALDI-TOF).....	97
<b>II.7. Protéolyse ménagée.....</b>	<b>98</b>
<b>II.8. Séquençage N-terminal.....</b>	<b>99</b>
<b>II.9. Caractérisation fonctionnelle du complexe Drs2p/Cdc50p .....</b>	<b>99</b>
II.9.1. Mesure par filtration de la formation de dérivé phosphorylé .....	99

II.9.2. Mesure de dérivé phosphorylé par autoradiographie d'un gel en conditions acides (« Sarkadi »).....	100
II.9.3. Activité ATPasique.....	101
<b>II.10. Article décrivant certains de nos protocoles</b> (Article 1, publié (Azouaoui et al., 2016) : <i>Coordinated Overexpression in Yeast of a P4-ATPase and Its Associated Cdc50 Subunit: The Case of the Drs2p/ Cdc50p Lipid Flippase Complex</i> ) .....	102
<b>III. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS (résultats sous forme d'article)</b> .....	123
<b>III.1. Co-expression et purification de l'ATPase-P4 Drs2p/Cdc50p, et sa caractérisation fonctionnelle</b> (Article 2, publié (Azouaoui et al., 2014): <i>A High-Yield Co-Expression System for the Purification of an Intact Drs2p-Cdc50p Lipid Flippase Complex, Critically Dependent on and Stabilized by Phosphatidylinositol-4Phosphate</i> ) .....	124
III.1.1. Introduction de l'article 2 .....	124
III.1.2. Article 2.....	125
III.1.3. Résultats généraux et Discussion de l'article 2 .....	144
<b>III.2. Étude de la régulation de l'activité du complexe Drs2p/dc50p par ses extrémités N- et C-terminales</b> (Article 3, soumis : <i>A high and PI4P-dependent ATPase activity for the Drs2p/Cdc50p flippase after removal of its N- and C-terminal extensions</i> ).....	151
III.2.1. Introduction de l'article 3 .....	151
III.2.2. Article 3.....	153
III.2.2. Résultats généraux et Discussion de l'article 3 .....	191
<b>IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b> .....	196
<b>V. BIBLIOGRAPHIE</b> .....	203

# I. INTRODUCTION

## I.1. Asymétrie membranaire chez les eucaryotes

On a longtemps cru que la composante la plus importante de la membrane plasmique était constituée par les protéines, au vu des nombreux rôles qui leur sont attribués, et on a alors décrit la bicouche lipidique comme une mer inerte, baignant les protéines et servant principalement à isoler le milieu intracellulaire du milieu extracellulaire. Bien plus tard, on a découvert que 5 % des gènes des cellules eucaryotes étaient cependant consacrés à la synthèse des lipides, permettant ainsi de produire des milliers de lipides différents; et on a alors posé la question du pourquoi de toute cette diversité lipidique, inutile pour une seule fonction de barrière entre milieu interne et milieu externe. Il a cependant été ensuite progressivement montré que les lipides sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques nécessaires à la vie cellulaire, bien au-delà du seul maintien de l'imperméabilité des membranes cellulaires. En effet, les lipides constituent un réservoir à énergie, ils peuvent être des molécules de signalisation impliquées dans de nombreux processus de transduction du signal ([Shimizu, 2009](#) ; [Hannun & Obeid, 2008](#)), et leur caractère amphiphile donne aux membranes cellulaires la capacité de bourgeonnement, de fission et de fusion permettant ainsi la division cellulaire, mais aussi le trafic membranaire ([Van Meer, 2008](#)) entre des organelles divers. D'un organelle à un autre, la contribution des divers lipides diffère, notamment en ce qui concerne ces lipides particuliers que sont les phosphoinositides ([Odorizzi et al., 2000](#)), qui confèrent aux différents organelles une partie de leur identité ([Behnia & Munro, 2005](#)).

Les lipides représentent donc une composante essentielle des membranes cellulaires. Les lipides sont des molécules amphiphiles, ayant une partie polaire (hydrophile) et une partie apolaire (hydrophobe) qui toutes deux peuvent varier d'un lipide à un autre, et ils sont organisés sous forme d'une bicouche lipidique ([Gorter & Grendel, 1925](#)), avec les parties apolaires des lipides constituant l'intérieur de la bicouche et leurs parties polaires en contact avec le milieu aqueux présent de part et d'autre de la bicouche. Mais une telle bicouche, seule, serait imperméable à la plupart des molécules hydrosolubles, rendant ainsi quasi-impossibles les échanges de la cellule avec le milieu externe. De ce fait, une seconde composante de la

membrane plasmique est également nécessaire pour effectuer ces échanges : elle est représentée par les protéines membranaires.

Le concept de base de la bicouche lipidique a également évolué avec le modèle de la mosaïque fluide proposé par Singer et Nicolson ([Singer & Nicolson, 1972](#)). En effet, ce modèle décrit les interactions entre les protéines et les lipides comme étant dynamiques, permettant ainsi divers mouvements à ces deux constituants. Cette liberté de mouvement permet non seulement des configurations tridimensionnelles différentes pour chacun des deux constituants, mais aussi la création de "nanodomains" dédiés à une réponse cellulaire spécifique ([Lingwood & Simons, 2010](#)), des sortes de plateformes impliquées dans divers processus cellulaires (par exemple la transduction du signal). Il a été décrit que ces nanodomains étaient enrichis en cholestérol, sphingolipides (SL) et en phosphatidylcholine (PC) ([Lingwood & Simons, 2010](#)), mais la diversité de leur composition (en termes de lipides et de protéines) permet d'imaginer une adaptation à toute une diversité de réponses cellulaires spécifiques ([Sangiorgio et al., 2004](#)).

Au-delà de l'existence de ces nanodomains, il a enfin été décrit que la plupart des membranes des cellules eucaryotes présentaient une répartition asymétrique des lipides qui les composent : sur la membrane plasmique, par exemple, le feuillet cytosolique est enrichi en aminophospholipides (phosphatidyléthanolamine, PE, et phosphatidylsérine, PS), alors que le feuillet exoplasmique est enrichi en phosphatidylcholine (PC) et en sphingolipides (SL) ([Bretscher, 1972](#) ; [Verkleij et al., 1973](#) ; [Whiteley & Berg, 1974](#) ; [Op den Kamp, 1979](#)). L'existence de cette asymétrie transversale rajoute donc une autre dimension de complexité aux membranes cellulaires des eucaryotes, et pose de nouvelles questions, par exemple sur le rôle de cette asymétrie transversale et sur le mécanisme qui permet son maintien. C'est cette dernière question qui fait l'objet de la présente thèse.

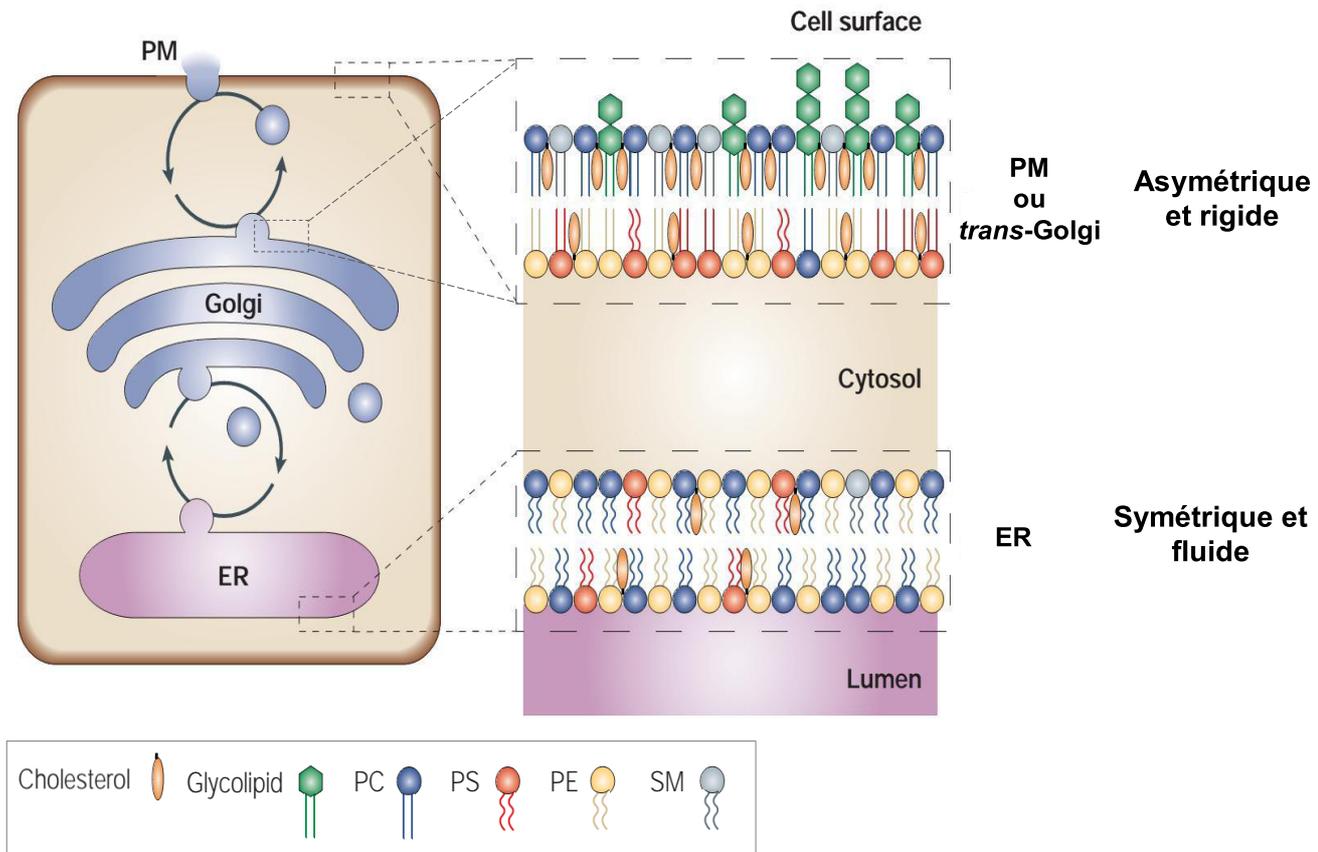
### ***1.1.1. Asymétrie transversale et son importance***

La différence de composition en lipides entre le feuillet externe et le feuillet interne de certaines membranes cellulaires des eucaryotes n'est pas sans

importance fonctionnelle. En effet, l'enrichissement en sphingolipides et en stérol du feuillet externe de la membrane plasmique lui confère une rigidité la rendant ainsi quasiment imperméable. Les chaînes d'acides gras saturés et les longues chaînes des sphingolipides favorisent une interaction forte entre ces deux types de lipides, mais aussi avec les stérols qui sont rigides et qui présentent une structure plane, ce qui rend le feuillet externe de la membrane particulièrement compact (Holthuis et al., 2001). Les aminophospholipides présents dans le feuillet cytosolique, de leur côté, sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires. En effet, la PE, de par sa petite tête polaire et donc sa structure conique d'ensemble, perturbe la bicouche lipidique et facilite les courbures de la membrane impliquées dans les phénomènes de fusion et de fission (Kinnunen & Holopainen, 2000). La PS est elle aussi impliquée dans différents processus physiologiques, car de nombreuses protéines reconnaissent la charge négative que porte sa tête, voire la structure même de sa tête : elle est par exemple la cible du domaine C2 présent dans de nombreuses protéines impliquées dans diverses fonctions cellulaires (phosphorylation, fusion membranaire...) (Bohdanowicz et al., 2013 ; Lemmon, 2008). De fait, l'exposition de la PS consécutive à la perte de l'asymétrie transversale conduit à de nombreuses réponses physiologiques, comme par exemple la reconnaissance des cellules apoptotiques par les macrophages (Fadok et al., 2000), la coagulation du sang (Rosing et al., 1980), la capacitation des spermatozoïdes (Flesch et al., 2001), ou l'entrée de virus dans les cellules hôtes (Mercer & Helenius, 2008).

### ***1.1.2. Création et maintien de l'asymétrie transversale***

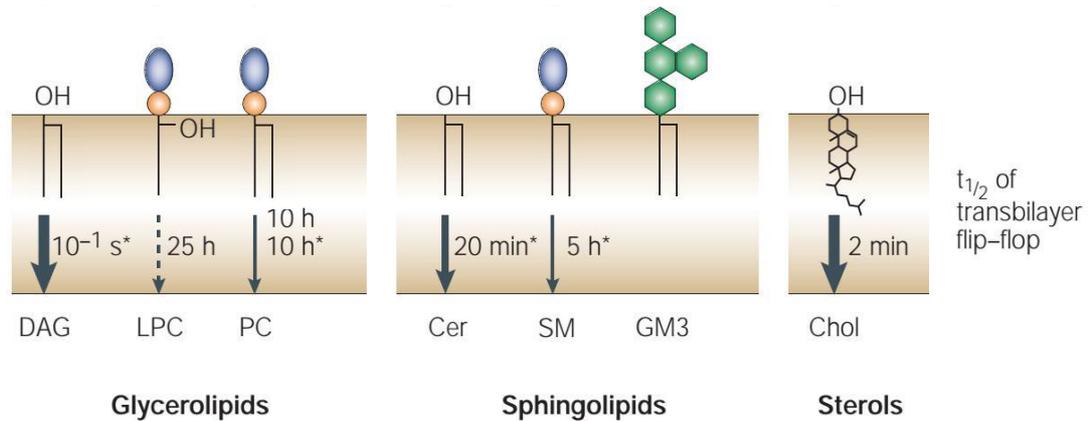
Le degré d'asymétrie transversale des membranes de cellules eucaryotes n'est pas homogène à l'intérieur d'une cellule donnée (Alder-Baerens et al., 2006 ; Holthuis & Levine, 2005). Le long de la voie sécrétoire, par exemple, les membranes des différents organelles présentent un gradient d'asymétrie : la membrane du RE est réputée symétrique (bien que quelques données contredisent cette thèse (Kay et al., 2012)) et fluide, tandis que celle du *trans*-Golgi et de la membrane plasmique est asymétrique et moins fluide (Fig. 1) (Holthuis & Levine, 2005).



**Figure 1. Distribution des lipides dans les membranes cellulaires (adapté de Holthuis & Levine, 2005).** La répartition des lipides dans les membranes cellulaires et leur asymétrie transverse varient à l'intérieur de la cellule : la membrane est symétrique au niveau du réticulum endoplasmique (ER), lieu de synthèse des lipides ; elle évolue, le long de la voie sécrétoire, vers une asymétrie au niveau du trans-Golgi et de la membrane plasmique (PM).

La synthèse des lipides se fait principalement dans le ER, au niveau du feuillet cytosolique (van Meer, 2008), et les lipides doivent après leur synthèse se répartir de façon homogène sur les deux feuillets, pour éviter de créer un déséquilibre entre les deux feuillets. Pour qu'une bicouche stable puisse se former, la vitesse de diffusion transverse des lipides d'un feuillet à l'autre doit en effet être au moins aussi rapide que la vitesse de leur synthèse du côté cytosolique. Pourtant, à cause de leur tête polaire, les phospholipides (PL) ont *a priori* une diffusion spontanée lente d'un feuillet à l'autre (le « transbilayer spontaneous flip-flop ») ; cette diffusion passive a été

effectivement trouvée fort lente (jusqu'à quelques jours) dans un certain nombre de systèmes modèles (Fig. 2).



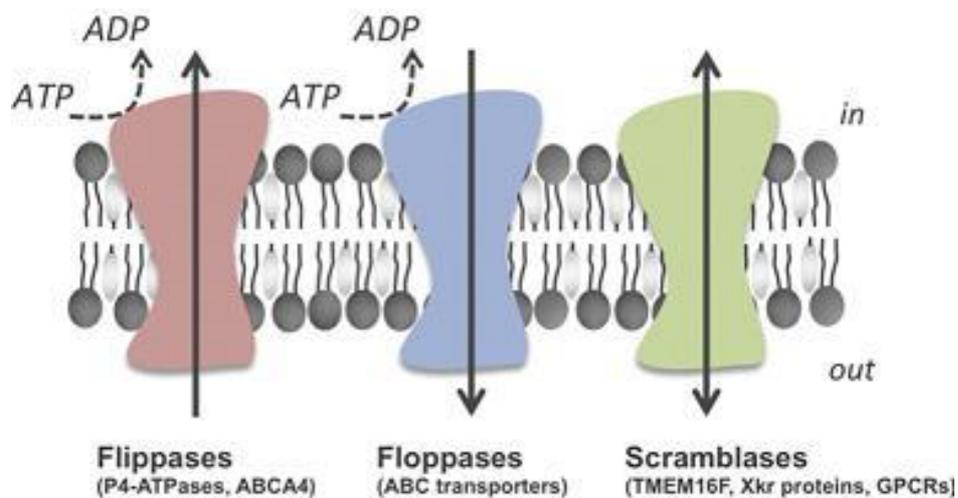
**Figure 2. La vitesse de diffusion passive de lipides (adapté de Holthuis & Levine, 2005).** La figure indique le  $t_{1/2}$  de la diffusion passive de différents lipides à travers une membrane modèle. Les flèches épaisses correspondent à un mouvement rapide des lipides, les flèches plus fines (voire en pointillé) indiquent un mouvement plus lent.

\*: ici, le  $t_{1/2}$  a été mesuré avec un analogue du lipide étudié. DAG: diacylglycérol; LPC: lysophosphatidylcholine; PC: phosphatidylcholine; Cer: céramide; SM: sphingomyéline; GM3: mono-sialoganglioside simple; Chol: cholestérol.

Cette vitesse de diffusion passive (« flip-flop ») est cependant plus rapide dans les membranes biologiques, notamment le RE, que dans les systèmes modèles. De ce fait, il a été proposé l'existence dans le RE d'une protéine responsable de cette diffusion rapide, assurant donc la redistribution passive des lipides (le flip et le flop) au fur et à mesure qu'ils sont synthétisés, de façon non sélective et indépendante de l'ATP (Bretscher et al., 1973 ; Kol et al., 2003). Cette protéine a été initialement nommée « flippase », mais actuellement, elle est souvent appelée « scramblase ». La scramblase peut aussi se trouver au niveau de la membrane plasmique, assurant la perturbation de l'asymétrie membranaire lorsque ceci est nécessaire (Fig.3). L'identité de la scramblase est à ce jour inconnue, mais

des études récentes suggèrent qu'elle fait partie dans le RE de la famille des protéines Xk ou encore de la famille des protéines TMEM16 dans la membrane plasmique (Menon et al., 2011 ; Goren et al., 2014 ; Chen et al., 2013 ; Williamson, 2016 ; Montigny et al., 2016).

À l'inverse, la création et le maintien de l'asymétrie transversale dans les membranes de la voie sécrétoire tardive requièrent la présence de protéines assurant un transport actif des lipides contre leur gradient de concentration, de façon unidirectionnelle, sélective et dépendante de l'ATP : le transport des phospholipides du feuillet exoplasmique vers le feuillet cytosolique est ainsi assuré par des flippases qui permettent leur accumulation dans le feuillet cytosolique (Fig. 3). Il existe par ailleurs aussi des protéines de la famille des transporteurs ABC, les floppases, capables de transporter certains lipides de façon active du feuillet cytosolique vers le feuillet exoplasmique (Fig. 3).



**Figure 3. Transporteurs actifs de lipides dans les membranes cellulaires des eucaryotes (Montigny et al., 2016).** Les flippases (en rose) effectuent un transport actif de lipide du feuillet exoplasmique vers le feuillet cytosolique, contrairement aux floppases (en bleu) qui effectuent elles aussi un transport actif de lipide mais plutôt du feuillet cytosolique vers le feuillet exoplasmique. Les scramblases (en vert)

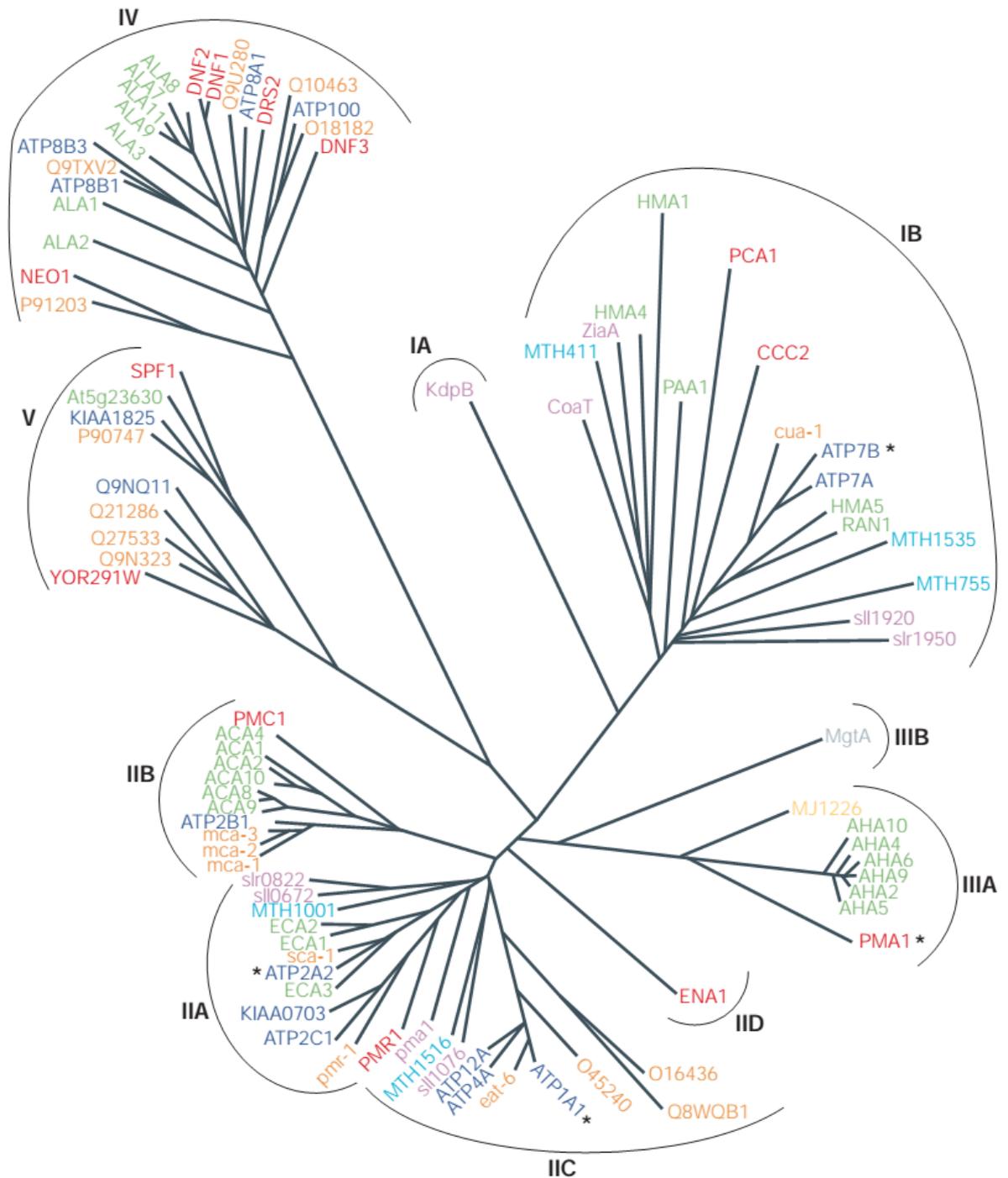
*effectuent un transport passif, bidirectionnel et non sélectif. Les flèches indiquent la direction dans laquelle le lipide est transporté.*

Les premières mesures de transport de phospholipides ont été décrites en 1984 par Seigneuret et Devaux, dans la membrane des érythrocytes, comme un transport spécifique d'aminophospholipides qui a donné aux futures flippases leur premier nom d'aminophospholipide translocases (APLT). Ces APLT avaient comme substrat le  $Mg^{2+}$ -ATP, l'ATP se fixant indépendamment du phospholipide. De plus, elles étaient inhibées par le vanadate et les composés fluorés (Seigneuret & Devaux, 1984). En 1989, une autre activité flippase a été détectée dans les granules chromaffines bovins (Zachowski, 1989). La protéine responsable de l'activité flippase dans ces granules a été par la suite identifiée et pour la première fois clonée ; on la connaît maintenant sous le nom d'ATP8A1 (Tang et al, 1996). Une protéine localisée dans le *trans*-Golgi de la levure, Drs2p, a été ensuite identifiée, après une analyse de séquence, comme étant un orthologue d'ATP8A1 (Tang et al 1996). L'analyse comparative des séquences des flippases et des ATPases-P confirme le fait que les flippases appartiennent à la famille particulière des ATPases-P. Une nouvelle sous-famille d'ATPase-P a alors été créée pour regrouper ces flippases : ce sont les ATPases de type P4 (ATPases-P4), qui seront l'objet de notre étude.

## **I.2. Les ATPases de type P (ATPases-P)**

La superfamille des ATPases de type P (ATPases-P) est une large famille de protéines membranaires intégrales dont les membres les plus étudiés sont impliqués dans le transport actif d'ions. Les ATPases-P sont nécessaires à la vie de tous les organismes vivants, elles sont impliquées dans la création de gradients électrochimiques et dans des processus de signalisation cellulaire (signalisation calcique, par exemple), dans l'initiation du bourgeonnement des membranes cellulaires des eucaryotes, etc... Elles effectuent un transport sélectif et unidirectionnel de certains éléments contre leur gradient de concentration, grâce à l'hydrolyse de l'ATP. Elles s'auto-phosphorylent de façon transitoire au cours de leur

cycle catalytique (d'où leur nom d'ATPases de type P), sur un résidu aspartate conservé chez toutes les ATPases de type P. L'autophosphorylation puis la déphosphorylation permettent aux ATPases de prendre séquentiellement différentes conformations tridimensionnelles permettant le transport. L'analyse de l'alignement de séquence et de la spécificité de transport des ATPases-P a abouti au classement de ces dernières en 5 sous-familles: les ATPases-P1, -P2 et -P3 sont des transporteurs de cations et sont présentes chez tous les organismes vivants. Les ATPases-P4 sont des transporteurs de phospholipides et ne sont présentes que chez les eucaryotes, et les ATPases-P5, qui ne sont elles aussi présentes que chez les eucaryotes, restent mystérieuses puisque l'élément qu'elles transportent probablement est toujours inconnu à ce jour (Fig. 4).



**Figure 4. Arbre phylogénétique des ATPases de type P (Kühlbrandt, 2004).** Le nom des gènes est coloré selon l'espèce: *Arabidopsis thaliana* (en vert); *Caenorhabditis elegans* (en orange); *Escherichia coli* (en gris); *Homo sapiens* (en bleu foncé); *Methanobacterium thermoautotrophicum* (en bleu clair); *Methanococcus jannaschii* (en jaune); *Synechocystis PCC6803* (en violet); *Saccharomyces cerevisiae* (en rouge). Classification réalisée par Axelsen et Palmgren en 1998.

### ***1.2.1. Les ATPases-P1***

Les ATPases de type P1 sont principalement (mais pas seulement) des transporteurs de métaux de transition. Elles sont classées en deux sous-familles: ATPases-P1A et ATPases-P1B. Les ATPases-P1A sont présentes chez les bactéries et les archaebactéries, elles sont supposées primitives et sont constituées de plusieurs sous-unités formant le complexe qui va finalement transporter du  $K^+$  (Palmgren et Nissen, 2011). Les ATPases-P1B sont des transporteurs de métaux lourds, monovalents ( $Cu^+$ ,  $Ag^+$ ) ou divalents ( $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ). Elles ont comme particularité la présence d'un domaine de fixation aux métaux (MBD) sur l'une de leurs extrémités terminales, un domaine qui joue un rôle dans la fixation du métal mais aussi dans la régulation de son transport (Tsivkovskii et al., 2001; Mattle et al., 2013; Smith et al., 2015). La fonction des ATPases-P1B est, d'une part, d'importer les métaux nécessaires aux métalloprotéines et, d'autre part, d'exporter les métaux toxiques hors de la cellule : elles jouent ainsi un rôle central dans l'homéostasie des métaux.

### ***1.2.2. Les ATPases-P2***

Les ATPases-P2 ont été les plus étudiées des ATPases-P. Ce sont des transporteurs de cations, classés en 3 sous-familles: P2A, P2B et P2C (Palmgren & Nissen, 2011).

Les ATPases-P2A sont présentes chez les procaryotes et les eucaryotes. Elles sont représentées par les ATPases- $Ca^{2+}$  du réticulum sarco-endoplasmique (SERCA), et la première structure tridimensionnelle à haute résolution d'une ATPase de type P a été obtenue pour l'une de ces ATPases (SERCA de lapin) (Toyoshima, 2000). Grâce à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP, elles transportent vers la lumière du réticulum deux ions  $Ca^{2+}$  prélevés dans le cytosol, et les échangent contre deux à trois  $H^+$  prélevés dans la lumière. Dans le muscle, elles permettent ainsi, après un épisode de contraction, la relaxation musculaire, qui requiert une très basse concentration de  $Ca^{2+}$  dans le cytosol, tout en assurant le maintien d'une haute concentration de calcium (sub-millimolaire) dans le RE (Palmgren & Nissen, 2011).

Ces ATPases-P2A sont associées à une sous-unité, le phospholamban ou la sarcolipine (d'autres sous-unités régulatrices pourraient ne pas avoir été détectées à ce jour). Ces deux sous-unités semblent réguler l'affinité de l'ATPase pour le  $\text{Ca}^{2+}$  (Suzuki & Wang, 1986; Toyoshima et al., 2003; Asahi et al., 2003, Montigny et al., 2014).

Les ATPases-P2B transportent du  $\text{Ca}^{2+}$  comme les ATPases-P2A, mais au niveau de la plupart des membranes cellulaires, et elles n'assurent le transport que d'un seul  $\text{Ca}^{2+}$  par ATP hydrolysé. Elles présentent sur l'une de leurs extrémités terminales un domaine de fixation à la calmoduline, une protéine régulatrice de ces ATPases-P.

Parmi les ATPases P2 de la troisième sous-famille P2, les ATPases-P2C, les représentants les plus étudiés ont été la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase et la  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase. La  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, découverte en 1957 par Skou (Skou, 1957) et présente au niveau de la membrane plasmique, exporte trois  $\text{Na}^+$  (par ATP hydrolysé) contre l'import de deux  $\text{K}^+$  (Møller et al., 1996 ; Skou, 1998) : elle est à l'origine du potentiel membranaire nécessaire à la vie cellulaire. Cette ATPase est elle-même un hétéro-oligomère, elle est associée à deux sous-unités additionnelles : la sous-unité  $\beta$ , nécessaire au repliement et à l'adressage correct de l'ATPase et qui influence l'affinité de l'ATPase pour le  $\text{K}^+$  (Lutsenko & Kaplan, 1993 ; Ueno et al., 1997), et la sous-unité  $\gamma$ , qui régule l'affinité de l'ATPase pour le  $\text{Na}^+$  (Geering, 2006). La  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase, elle, est une ATPase présente notamment dans l'estomac, se redistribuant (selon l'état de la digestion) entre la membrane plasmique et des compartiments internes à la cellule gastrique. Elle exporte un  $\text{H}^+$  contre un  $\text{K}^+$ , rendant ainsi la cavité gastrique acide afin de faciliter la digestion et l'absorption des nutriments.

### **1.2.3. Les ATPases-P3**

Les ATPases-P3 sont situées au niveau de la membrane plasmique des champignons et des plantes. Elles assurent le transport de  $\text{H}^+$  du milieu intracellulaire au milieu extracellulaire, créant ainsi un gradient électrochimique à l'origine de l'assimilation des nutriments par un transport secondaire. Contrairement aux

ATPases-P2, les ATPases-P3 semblent transporter un proton sans qu'il y ait d'élément contre-transporté. Elles ont aussi la particularité de posséder des extrémités N- et C-terminales régulatrices (Palmgren & Nissen, 2011 ; Ekberg et al., 2010).

#### ***1.2.4. Les ATPases-P4***

La particularité remarquable des ATPases-P4, c'est que les molécules qu'elles transportent sont des phospholipides. Elles ne sont présentes que chez les eucaryotes (Axelsen & Palmgren, 1998). Les résidus impliqués dans la fixation du substrat sont probablement hydrophobes, contrairement au cas des ATPases de transport d'ions (Tang et al., 1996). Il est nécessaire que les ATPases-P4 interagissent avec un partenaire, de la famille des protéines CDC50, pour que le transport puisse se faire correctement (Lenoir et al., 2009 ; Coleman & Molday, 2011). Cette sous-famille sera décrite plus longuement par la suite, puisque c'est l'objet de la présente thèse.

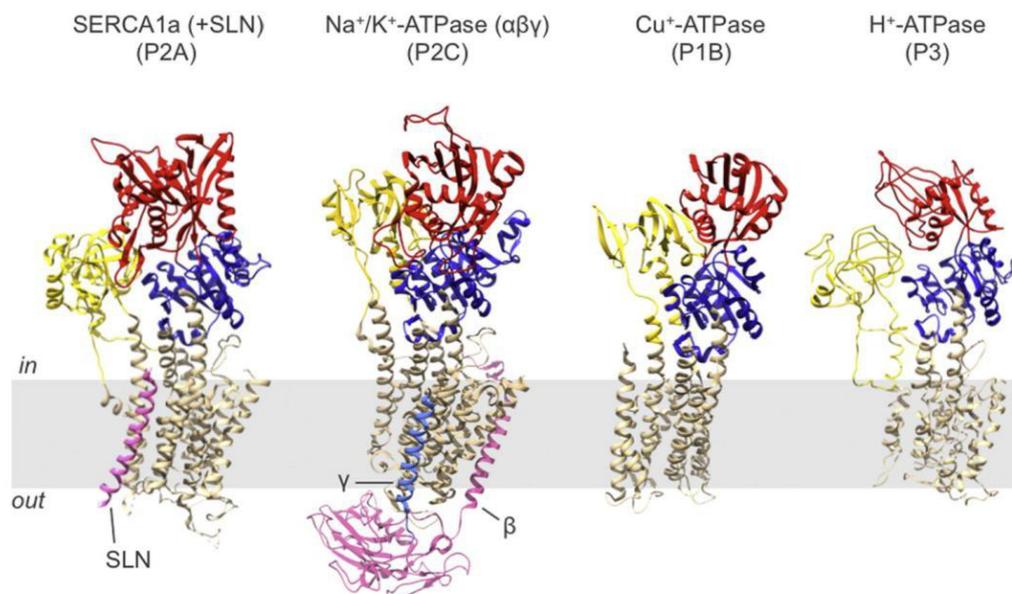
#### ***1.2.5. Les ATPases-P5***

Les ATPases-P5, exclusivement présentes chez les eucaryotes, sont encore mystérieuses du fait que l'élément transporté reste toujours inconnu à ce jour. Elles diffèrent des autres ATPases-P notamment par la présence d'un ou deux segments transmembranaires supplémentaires au niveau de leur extrémité N-terminale, d'un long domaine extra-membranaire entre les segments transmembranaires 1 et 2, et de séquences particulières qui ne sont pas détectées dans les autres groupes (Catty et al., 1997). Elles sont classées en deux sous-familles : P5A et P5B. Les ATPases-P5A sont présentes dans les membranes cellulaires de la voie sécrétoire, et le motif possiblement impliqué dans la fixation de l'élément à transporter présente deux charges négatives, suggérant peut-être un transport d'espèces positivement chargées (Sørensen, 2010). Les ATPases-P5B, elles, sont présentes au niveau de la membrane plasmique, dans les lysosomes et la vacuole, et le motif possiblement impliqué dans la fixation de l'élément à transporter présente, lui, deux résidus

hydrophobes : elles sont peut-être destinées au transport de composants organiques particuliers? (Sørensen, 2010).

### 1.2.6. Caractéristiques structurales des ATPases-P

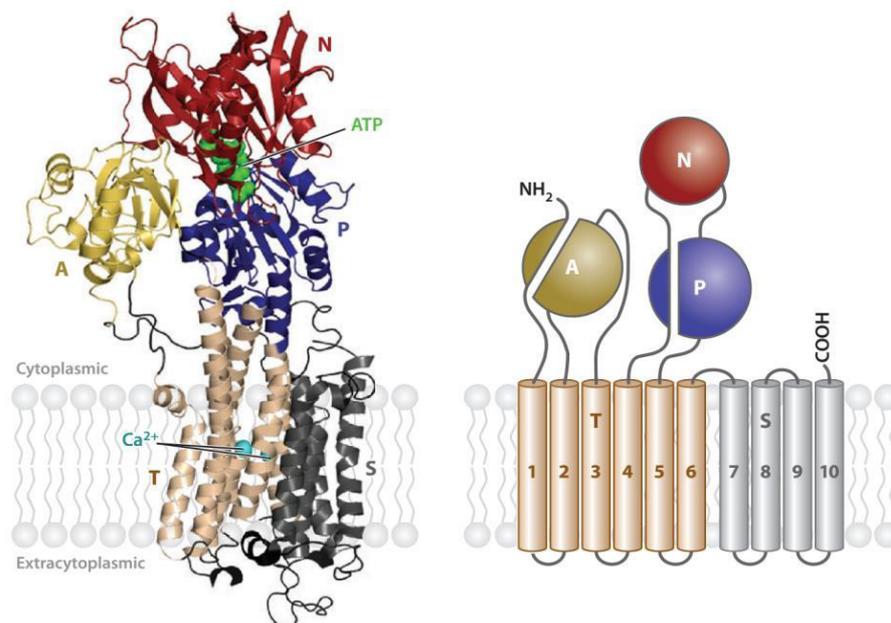
Les alignements de séquences des diverses ATPases de type P, en dehors des motifs clés impliqués dans le mécanisme catalytique, ne montrent pas un degré de conservation important. En revanche, la comparaison des structures tridimensionnelles des quelques ATPases-P de diverses sous-familles qui ont été cristallisées, l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  SERCA1a de lapin (Toyoshima et al., 2000), l'ATPase- $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de porc (Morth et al., 2007), l'ATPase- $\text{H}^+$  de plante AHA2 (Pedersen et al., 2007), et l'ATPase- $\text{Cu}^+$  de *Legionella pneumophila* CopA (Gourdon et al., 2011), montre que l'architecture tridimensionnelle de ces représentants de différentes sous-familles d'ATPases-P est similaire (Fig. 5).



**Figure 5. L'architecture tridimensionnelle de diverses ATPases-P cristallisées est similaire (Montigny et al., 2016).** De gauche à droite, la figure montre l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  SERCA du lapin (à l'état E1) associée à la sarcolipine (en rose), l'ATPase- $\text{Na}^+/\text{K}^+$  du rein de cochon (à l'état E2P) associée à ses sous-unités  $\beta$  (rose) et  $\gamma$  (en

bleu clair), l'ATPase-Cu<sup>+</sup> de *Legionella pneumophila* (à l'état E2P), et l'ATPase-H<sup>+</sup> de *Arabidopsis thaliana* (à l'état E1). Les domaines A sont en jaune, les domaines N en rouge, les domaines P en bleu foncé ; le domaine membranaire est délimité par le rectangle gris.

Ces ATPases-P sont généralement constituées de 4 domaines (Figs. 5 et 6). Un domaine membranaire (M) constitué de 6 à 12 segments transmembranaires et impliqué dans le transport de l'ion concerné, et trois domaines cytosoliques impliqués dans l'hydrolyse de l'ATP : le domaine de fixation du nucléotide (N), le domaine de phosphorylation (P), et le domaine impliqué dans la déphosphorylation de l'ATPase (A). Les extrémités N- et C-terminales, dans la très grande majorité des cas, sont du côté cytosolique. Il existe sur certaines ATPases-P un cinquième domaine qui se situe sur l'une et/ou l'autre des deux extrémités terminales, et qui joue un rôle de régulateur.



**Figure 6. Organisation structurale des ATPases-P (ici SERCA1a, une ATPase-Ca<sup>2+</sup>) (Palmgren & Nissen, 2011).** À gauche: structure de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> SERCA1a, avec son domaine membranaire (sous-divisé en deux parties, T et S) fixant les 2 molécules de Ca<sup>2+</sup>, son domaine N (en rouge) fixant l'ATP et jouant le rôle de kinase

*pour la phosphorylation du domaine P (en bleu), et son domaine A (en jaune) jouant le rôle de phosphatase pour la déphosphorylation du domaine P. À droite: représentation simplifiée de la structure de gauche, avec de nouveau un domaine constitué de 10 segments transmembranaires (dont les 6 premiers constituent le domaine T et les 4 derniers constituent le domaine S), le domaine A constitué d'une partie de l'extrémité N-terminale et de la première boucle cytoplasmique, et les domaines N et P formés à partir de la deuxième boucle cytoplasmique, avec le domaine N comme excroissance du domaine P.*

- **Domaine M**

Le domaine membranaire est constitué de deux sous-domaines: le sous-domaine T et le sous-domaine S. Le sous-domaine T (pour Transport) est impliqué dans le transport de cations. Il se présente généralement en six hélices  $\alpha$  transmembranaires très flexibles au sein desquelles se situe le site de fixation des cations transportés. Le sous-domaine S (S pour Support), selon Toyoshima et al 2002, reste quasiment inchangé dans les différents états conformationnels de l'ATPase, et sert de support structural pour le domaine T. La séquence des domaines M des différentes ATPases-P montre une faible conservation.

- **Domaine P**

Le domaine P (pour "phosphorylation") contient une séquence conservée dans toutes les ATPases-P, DKTG, où le D est l'aspartate qui est transitoirement phosphorylé au cours du cycle catalytique. Ce domaine contient deux autres séquences, TGDN et GDGXND, qui sont impliquées dans la coordination du  $Mg^{2+}$  lié à l'ATP au niveau du site de phosphorylation. Ce domaine est hautement conservé parmi les ATPases-P, il est constitué de deux parties directement reliées au domaine transmembranaire, l'une reliée à l'hélice M4 et l'autre à l'hélice M5.

- **Domaine N**

Le domaine N (pour "nucléotide") est un domaine contenant le site de fixation du  $Mg^{2+}$ -ATP ou du moins de sa partie adénosine, et laissant les phosphates

exposés afin qu'ils soient disponibles pour l'autophosphorylation de l'ATPase. Ce domaine est relié au domaine P par une simple « charnière ». Des trois domaines cytoplasmiques, c'est ce domaine N qui présente la séquence la plus variable parmi les différentes sous-familles d'ATPases-P.

- **Domaine A**

Du domaine A (pour "actuator"), on sait maintenant qu'il est la partie phosphatase de l'ATPase : il contient une séquence hautement conservée parmi les ATPases-P, TGES (ou DGET pour les ATPases P4), où le E est un glutamate qui joue un rôle critique dans la déphosphorylation de l'aspartate (du domaine P) transitoirement phosphorylé pendant le cycle catalytique. Ce domaine se présente sous une forme globulaire, il est lié aux hélices M1 et M2 par deux « linkers » longs et flexibles, ce qui lui permet d'adopter différentes positions au cours du cycle catalytique.

- **Domaine R**

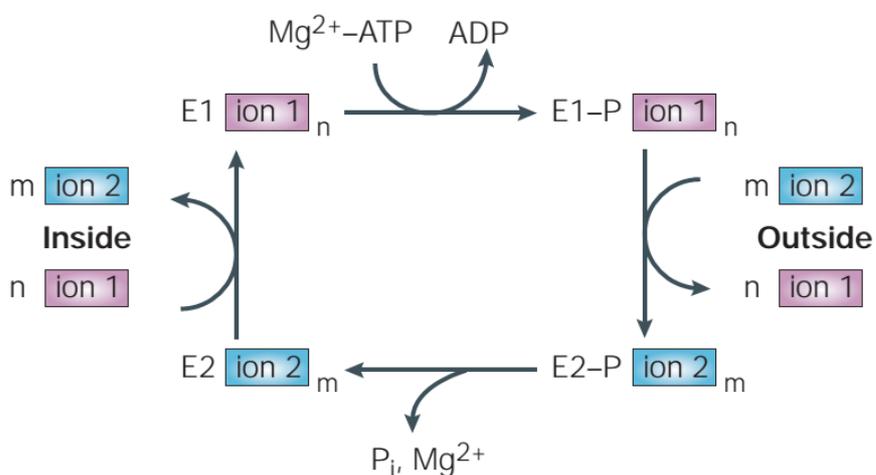
Le domaine R (pour "regulator") est présent dans certaines ATPases de type P au niveau de l'une des extrémités terminales (ou des deux). Lorsqu'il existe, il agit alors comme un auto-inhibiteur, régulant ainsi l'ATPase.

- **Sous-unités additionnelles**

Certaines ATPases-P sont accompagnées de sous-unités qui sont nécessaires à leur maturation et à leur adressage correct, voire à leur fonction. Comme précédemment mentionné, la sous-unité  $\beta$  de l'ATPase- $\text{Na}^+/\text{K}^+$  est par exemple nécessaire au bon repliement et à l'adressage correct de l'ATPase, mais elle module aussi l'affinité pour le  $\text{K}^+$  (Geering, 2001). La sarcolipine et le phospholamban semblent réguler le transport du  $\text{Ca}^{2+}$  de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  SERCA1a (Odermatt et al., 1998 ; Toyoshima et al., 2003 ; Asahi et al., 2003). Et pour l'ATPase-P4 Drs2p, son partenaire Cdc50p est nécessaire non seulement à son adressage correct mais probablement aussi à son bon fonctionnement (Saito et al., 2004; Chen et al., 2006 ; Paulusma et al., 2008 ; Poulsen et al., 2008a ; Lenoir et al., 2009 ; Coleman & Molday, 2011).

### 1.2.7. Caractéristiques fonctionnelles des ATPases-P

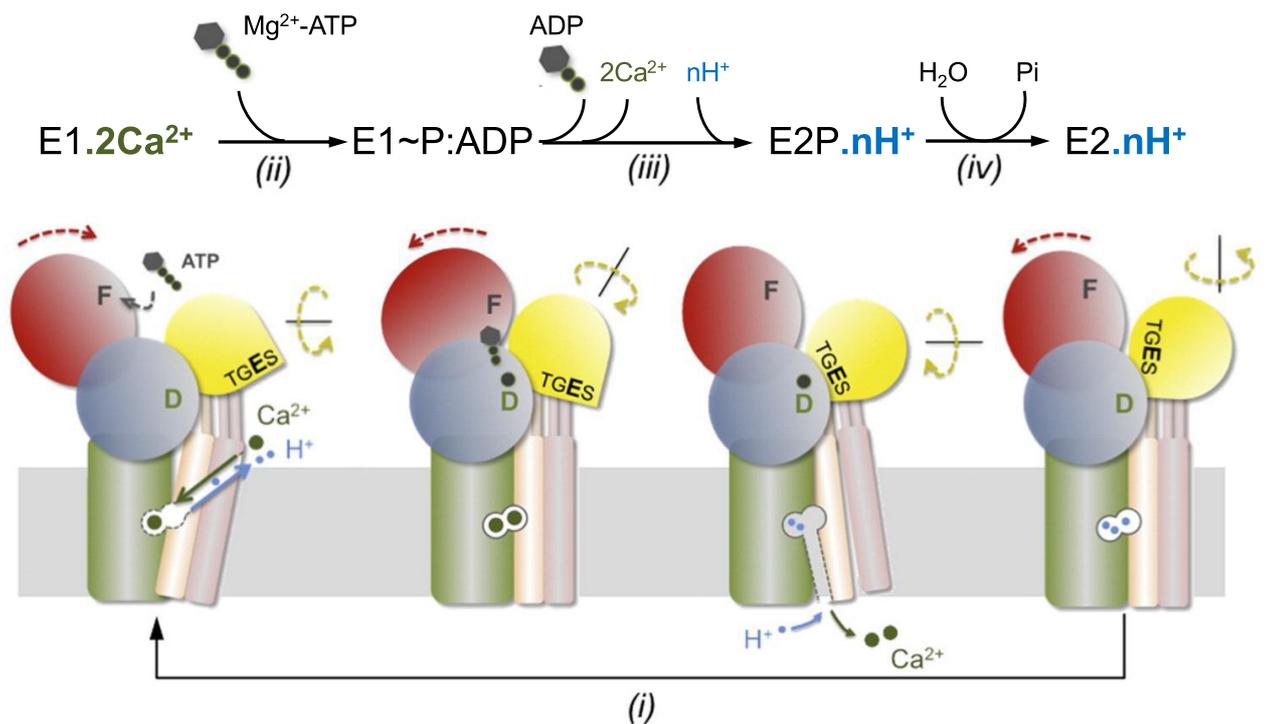
La conservation de la structure tridimensionnelle et des séquences clés impliquées dans la catalyse suggère un mécanisme catalytique commun aux ATPases de type P. Et les données structurales et fonctionnelles récoltées depuis de nombreuses années, en particulier avec l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  SERCA1a, ont permis la compréhension du mécanisme catalytique sur la base d'un schéma dit de "Post-Albers" initialement proposé pour l'ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Fig. 7) (Kühlbrandt, 2004).



**Figure 7. Schéma général du cycle catalytique des ATPases-P (Kühlbrandt, 2004).**

Ce mécanisme va ici être décrit en prenant comme exemple l'ATPase SERCA1a (Fig. 8). Les ions à transporter, c'est à dire ici deux ions  $\text{Ca}^{2+}$ , vont au début du cycle se placer sur leurs sites de fixation (à haute affinité) *via* un héli-canal ouvert vers le cytoplasme ; à ce moment-là, l'enzyme est sous une conformation dite "E1". La fixation des deux  $\text{Ca}^{2+}$  cytosoliques induit un réarrangement du domaine P, transmis *via* les mouvements des segments transmembranaires M4 et M5, à la suite duquel le  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP fixé au domaine N peut transférer son phosphate gamma à

l'aspartate conservé du domaine P (le  $Mg^{2+}$  fixé minimisant la répulsion entre les charges négatives respectives de l'aspartate et de l'ATP, Marchand et al., 2008). À ce moment-là, l'enzyme se retrouve sous une forme de phosphoenzyme dite "E1-P", ou plutôt "E1~P:ADP". L'ADP va alors se dissocier, et dans son état "E1~P" : ce phosphoenzyme est dit "à haute énergie", parce que lors d'une éventuelle refixation d'ADP l'enzyme a la capacité de catalyser l'étape inverse et donc de reformer l'ATP, ce qui en principe est énergétiquement coûteux. Quant aux deux ions  $Ca^{2+}$ , à ce stade ils se retrouvent séquestrés ou "occlus", c'est-à-dire qu'ils ne sont accessibles ni du côté cytoplasmique de la membrane ni du côté exoplasmique. L'hydrolyse de l'ATP a aussi désolidarisé le domaine N du domaine P, le domaine N peut alors s'éloigner du domaine P et laisser la place au domaine A qui, pour cela, doit effectuer une rotation proche de  $90^\circ$  ; cette nouvelle forme du phosphoenzyme est dite "E2P", et aussi dite "à basse énergie" (probablement à tort, tout comme la précédente dite à "haute énergie") puisque l'ADP ne pouvant plus se fixer en face de l'aspartate, elle ne permet plus la régénération de l'ATP. Par ailleurs la rotation du domaine A induit un changement conformationnel qui, transmis au domaine membranaire, a ouvert vers le côté luminal le site de fixation des ions  $Ca^{2+}$  (occlus dans l'état précédent), et a fait perdre à ces sites réorientés leur haute affinité pour le  $Ca^{2+}$  : leur affinité devient basse, et cette transition de E1~P à E2P (souvent la plus lente du cycle catalytique) permet le relargage des deux ions calcium dans la lumière du réticulum. Les nouveaux sites présentent par ailleurs une affinité accrue pour les  $H^+$ , et après relargage des ions  $Ca^{2+}$ , 2 à 3  $H^+$  vont venir s'y fixer. La fixation des protons induit probablement un changement conformationnel et la séquence TGES (ou DGET pour les ATPases-P4) est désormais positionnée de façon à interagir avec le magnésium fixé au site de phosphorylation : la déphosphorylation de l'aspartate peut s'effectuer après une attaque par l'eau (hydrolyse du dérivé phosphorylé). Le  $Mg^{2+}$  et le  $P_i$  sont libérés et l'enzyme se retrouve sous la forme "E2" dans laquelle les protons sont probablement toujours occlus dans le domaine membranaire (les ions  $K^+$  transportés par l'ATPase  $Na^+/K^+$  sont bel et bien occlus à l'étape correspondante). Lorsque le domaine A s'éloignera du domaine P, une nouvelle transition pourra se produire et l'enzyme pourra se retrouver dans son état initial "E1". La transition de l'état E2 à l'état E1 fait repasser les sites cationiques dans un état de forte affinité pour les  $Ca^{2+}$  mais de basse affinité pour les  $H^+$ , induisant le relargage de ces protons ainsi contre-transportés vers le cytosol (Palmgren & Nissen, 2011 ; Montigny et al., 2016).



**Figure 8. Schéma simplifié du cycle catalytique de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$**  (adapté de Montigny et al., 2016). Cycle catalytique ATPase- $\text{Ca}^{2+}$  SERCA1a. À l'étape (i), le cycle démarre avec la libération par l'ATPase de 2-3  $\text{H}^+$  en échange de la fixation de deux  $\text{Ca}^{2+}$  cytosoliques, et la formation de l'espèce  $\text{E1.2Ca}^{2+}$ . L'étape (ii) correspond à la fixation du  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP et à son hydrolyse, permettant d'abord l'autophosphorylation de l'ATPase sur l'aspartate phosphorylable d'où l'intermédiaire  $\text{E1}\sim\text{P}:\text{ADP}$ , puis, après départ de l'ADP, le basculement (c'est l'étape (iii)) vers un état  $\text{E2P}$  permettant la libération des ions  $\text{Ca}^{2+}$  vers la lumière du réticulum et la fixation de 2-3 ions  $\text{H}^+$ . À l'étape (iv), l'hydrolyse de la liaison phosphate-aspartate permet à l'ATPase de se trouver à l'état  $\text{E2}$ , avec de nouveau, au cycle suivant, relargage des protons et fixation de nouveaux ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Domaine N: en rouge. Domaine P: en bleu. Domaine A: en jaune. (F): un résidu phénylalanine essentiel pour la fixation de l'ATP. (D): aspartate phosphorylable. (TGES): motif impliqué dans la déphosphorylation de SERCA1a.

### **I.3. Les ATPases de type P4**

#### ***I.3.1. Découverte des ATPases-P4 comme transporteurs de lipides***

La première activité de flippase a été détectée en 1984 sur des érythrocytes humains, où après introduction dans des membranes d'érythrocytes, via de l'éthanol, de phospholipides non naturels (PC, PS ou PE dont la chaîne latérale est marquée au nitroxyde), un transport rapide du feuillet exoplasmique vers le feuillet cytosolique a été observé pour la PS et la PE, mais pas pour la PC. Ceci a suggéré que cette activité de flippase était spécifique pour les aminophospholipides (PS et PE) (Seigneuret & Devaux, 1984). Cette activité a été retrouvée dans de nombreux types cellulaires d'eucaryotes (Pomorski et al., 2004), et la protéine responsable de cette activité a été initialement nommée aminophospholipide translocase (APLT). Par la suite, une activité flippase similaire a été détectée dans les granules chromaffines bovins, et attribuée à une protéine initialement nommée ATPase II (Zachowski et al., 1989). Quelques années plus tard, cette APLT des granules chromaffins a été purifiée, et le gène codant cette protéine a été identifié sous le nom *ATP8A1* (Tang et al., 1996), la protéine elle-même étant désormais nommée ATP8A1. Cette protéine ATP8A1 a été reconnue très proche d'une protéine précédemment identifiée dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, Drs2p (Ripmaster et al., 1993). À cette époque-là, les ATPases-Ca<sup>2+</sup> semblaient être les orthologues de *DRS2* les plus plausibles, mais la comparaison des séquences de l'ATPase II et de Drs2p a révélé, outre une identité d'environ 50 % (Tang et al., 1996), des motifs conservés qui ont permis de les classer dans une nouvelle sous-famille des ATPases-P : la sous-famille des ATPases-P4 (Axelsen & Palmgren, 1998).

#### ***I.3.2. Les différentes ATPases-P4 et leurs partenaires, les protéines CDC50***

Les ATPases-P4 ne sont présentes que chez les eucaryotes. Le génome humain code par exemple 14 ATPases-P4, de ATP8A1 à ATP11C (selon la nomenclature unifiée utilisée pour l'ensemble des mammifères), le génome de la souris en compte 15, celui de *Caenorhabditis elegans* en compte 6, de TAT-1 à TAT-6 (pour Transbilayer Amphipath Transporter), et celui d'*Arabidopsis thaliana* en

compte 12, de ALA1 à ALA12 (pour AminophosphoLipid ATPases). Quant au génome de *Saccharomyces cerevisiae*, il en compte 5 : Drs2p (pour Defect in Ribosome Synthesis), Neo1p (pour Neomycin resistance), Dnf1p, Dnf2p et Dnf3p (pour Drs2 and Neo1 Family ATPases). Ces différentes ATPases-P4 sont réputées transporter divers phospholipides (Tableau I).

Les ATPases-P4 sont généralement accompagnées d'un partenaire non catalytique, une protéine CDC50 (pour Cell Division Cycle), l'équivalent d'une sous-unité  $\beta$  (selon la nomenclature des ATPases-P2). Il en existe 3 types chez l'Homme (CDC50A, CDC50B et CDC50C), et autant chez *Caenorhabditis elegans* (W03G11.2, R08C7.2a et F20C5.4) ou *Saccharomyces cerevisiae* (Cdc50p, Lem3p et Crf1p), contrairement à *Arabidopsis thaliana* qui en compte 5 (de ALIS1 à ALIS5). Le nombre des protéines CDC50 est dans tous les cas plus petit que celui des ATPases-P4, et différentes ATPases-P4 peuvent avoir la même sous-unité CDC50 (Tableau 1). (Sebastian et al., 2012 ; Lopez-Marqués et al., 2014a ; Lopez-Marqués et al., 2014b ; Montigny et al., 2016). Certaines ATPases-P4 semblent n'être accompagnées d'aucune protéine CDC50 (par exemple Neo1 ou ATP9B) (Takatsu et al, 2011 ; Wicky et al, 2004).

**Tableau 1: Quelques ATPases-P4 avec le substrat transporté (si connu) et leur sous-unité associée, ainsi que leur localisation.**

Organisme	ATPase-P4	Sous unité CDC50	Localisation	Substrat lipidique
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Dnf1p	Lem3p	MP	PC, PE, (PS), LPC, LPE, LPS
	Dnf2p	Lem3p	MP	PC, PE, (PS), LPC, LPE
	Dnf3p	Crf1p	TGN, VS	PC, (PE)
	Drs2p	Cdc50p	TGN, VS	PS, (PE)
	Neo1p	—	Endosomes	?
<i>Leishmania donovani</i>	LdMT	LdRos	MP	PC, PE, (PS)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	TAT-1	CHAT-1	MP	PS
	TAT-5	?	MP	PE
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ALA1	ALIS1/3/5	MP	(PS)
	ALA2	ALIS1/3/5	CPV	PS
	ALA3	ALIS1/3/5	Golgi	PS, PE, PC
<i>Homo sapiens</i>	ATP8A1	CDC50A/B	Golgi, VS	PS, (PE)
	ATP8A2	CDC50A	Golgi, disques	PS, PE
	ATP8B1	CDC50A/B	MP, MA	PC, (PS), (PE),
	ATP8B2	CDC50A/B	MP	PC
	ATP8B3	CDC50C	MP	PS
	ATP8B4	CDC50A/B	MP	?
	ATP9A	—	TGN, EE	?
	ATP9B	—	TGN	?
	ATP10A	CDC50A	MP	PC
	ATP10B	CDC50A	Vésicules	?
	ATP10D	CDC50A	MP	?
	ATP11A	CDC50A	MP, EE	PS, PE
	ATP11B	CDC50A	MP, EE	?
	ATP11C	CDC50A/B	MP	PS, PE

*MP: membrane plasmique, MA: membrane apicale, TGN: trans-Golgi, VS: vésicules de sécrétion post-Golgi, CPV: compartiment pré-vacuolaire, disques: membrane des disques photorécepteurs, EE: endosomes précoces. PC: phosphatidylcholine, PS: phosphatidylsérine, PE: phosphatidyléthanolamine, LPC: lysophosphatidylcholine, LPS: lysophosphatidylsérine, LPE: lysophosphatidyléthanolamine. —: non détecté, (?): non déterminé. Les substrats qui sont entre parenthèse sont moins efficacement transportés. (Modifié de: Lopez-Marquès et al., 2014b).*

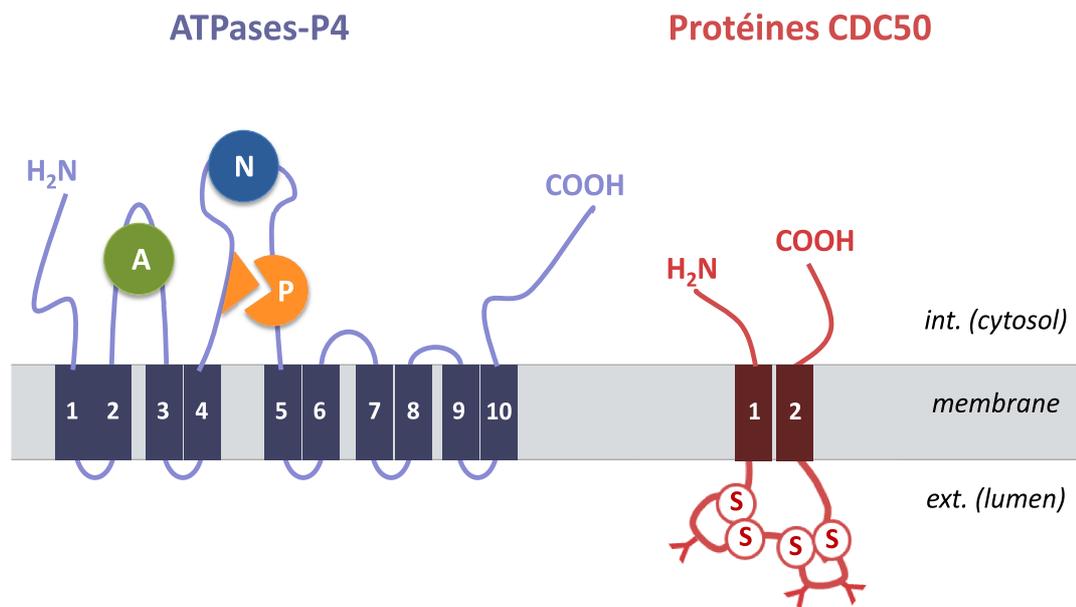
### **1.3.3. Structure et fonction des ATPases-P4**

À ce jour la structure tridimensionnelle des ATPases-P4 reste à élucider. L'existence de motifs hautement conservés parmi toutes les ATPases-P suggère cependant que les ATPases-P4 adoptent la même architecture générale que celle des ATPases-P déjà cristallisées (Figs. 5 & 6), avec un domaine membranaire prédit comme ayant 10 segments transmembranaires, des domaines N et P, un domaine A où le motif TGES de la plupart des ATPases-P est remplacé chez les ATPases-P4 par un motif DGET, et des extrémités N- et C-terminales (cytosoliques) relativement longues pour la plupart des ATPases-P4 ([Palmgren & Nissen 2011](#)) (Fig.9).

Les différentes ATPases-P dont la structure a été élucidée (et qui transportent des cations) présentent des résidus chargés dans ce qui a été identifié comme le domaine de fixation de ces cations. Une particularité des ATPases-P4 est qu'à la place de ces résidus polaires, elles présentent des résidus hydrophobes ([Tang et al., 1996](#) ; [Tanaka et al., 2011](#)), reflétant probablement une adaptation des ATPases-P4 au cours de leur évolution de transporteurs d'ions vers des transporteurs de phospholipides. Le mécanisme de transport de ces nouveaux substrats, à ce jour non encore élucidé, présente alors l'intrigue suivante: comment l'ATPase-P4 transporte-t-elle un substrat beaucoup plus volumineux qu'un ion et chimiquement plus complexe, avec à la fois une partie hydrophile et une partie hydrophobe?

Les protéines CDC50, quant à elles, ont une masse molaire comprise entre 40 et 50 kDa, elles sont prédites pour avoir deux segments transmembranaires (contrairement aux sous unités  $\beta$  des autres ATPases-P cristallisées qui présentent

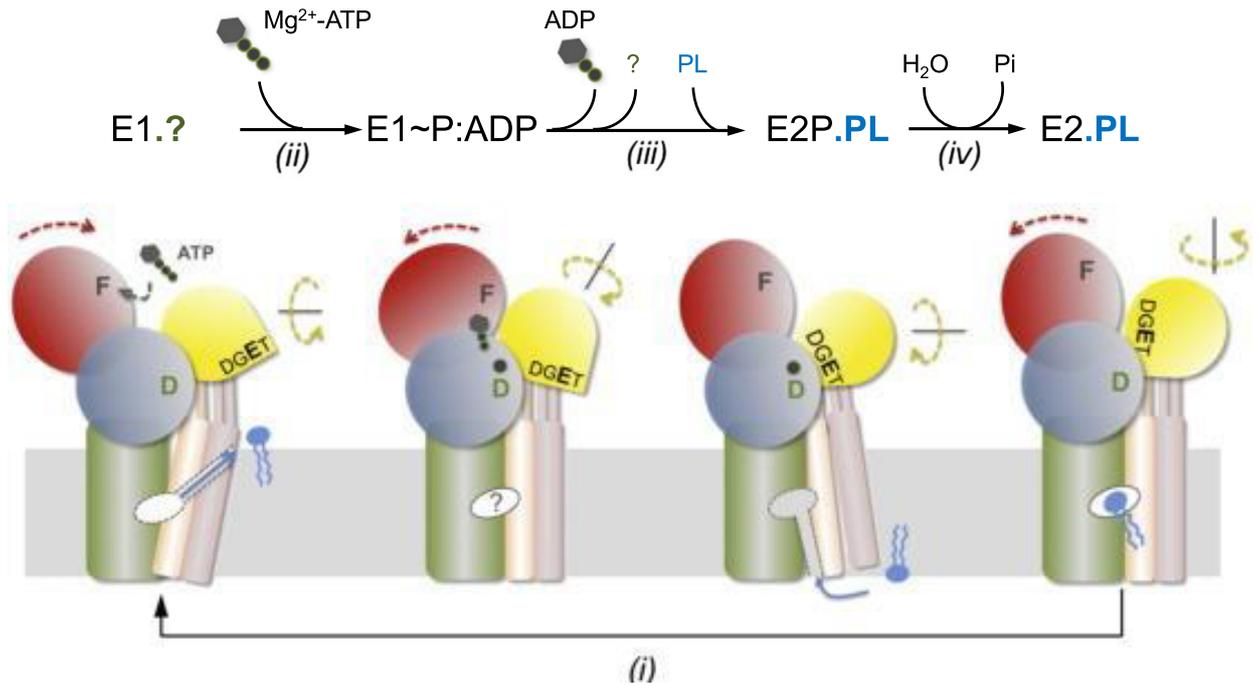
un seul segment transmembranaire), des extrémités N- et C-terminales cytosoliques, et une large boucle exoplasmique, N-glycosylée et présentant des ponts disulfures qui la stabilisent (Fig. 9) (Jacquot et al., 2012 ; van der Velden et al., 2010 ; Puts et al., 2012).



**Figure 9. Topologies prédites pour les ATPases-P4 et leurs partenaires, les protéines CDC50.** Les ATPases-P4 sont prédites pour avoir 10 segments transmembranaires (TM), avec : un domaine impliqué dans la phosphorylation (P) de l'ATPase et contenant l'aspartate phosphorylé transitoirement au cours du cycle catalytique, domaine situé entre TM4 et TM5 ; un domaine de fixation à l'ATP (N) situé lui aussi entre TM4 et TM5 ; un domaine activateur (A) impliqué dans la déphosphorylation de l'ATPase, situé entre TM2 et TM3 ; et des extrémités N- et C-terminales cytosoliques prédites pour être longues et déstructurées. La sous-unité associée CDC50 est prédite pour avoir deux segments transmembranaires avec des extrémités cytosoliques, et un grand domaine exoplasmique, N-glycosylé et contenant des ponts disulfures.

Grâce à la particularité qu'ont toutes les ATPases-P de s'autophosphoryler au cours de leur cycle catalytique, et à l'utilisation possible d'ATP radioactif pour étudier cette phosphorylation transitoire, quelques éléments ont été apportés ces dernières années pour la compréhension du cycle catalytique des ATPases-P4. Il a été montré que ATP8A2 (bovine) et Drs2p (de levure) nécessitent la présence simultanée d'ATP et de  $Mg^{2+}$  pour que ces ATPases puissent s'autophosphoryler en présence d'ATP (Coleman et al, 2012 ; Zhou & Graham, 2009 ; Jacquot et al, 2012), et que ATP8A2 présentait bien les deux formes phosphorylées classiques E1P et E2P (Coleman et al, 2012). Les ATPases-P4 sont sensibles à des inhibiteurs connus des ATPases-P, le vanadate (Coleman et al, 2012 ; Jacquot et al, 2012 ; Ding et al, 2000) et les composés fluorés (Jacquot et al, 2012). Les ATPases-P4 semblent obéir elles aussi au schéma classique dit « de Post-Albers » (Fig. 7). Comme dans le cas de l'ATPase- $Ca^{2+}$  SERCA1a et de l'ATPase- $Na^+/K^+$ , l'espèce transportée par l'ATPase-P4 vers le milieu cytosolique, c'est à dire le phospholipide, présente une forte affinité pour la forme E2P de l'enzyme (comme le  $H^+$  dans le cas de la SERCA1a ou le  $K^+$  dans le cas de l'ATPase- $Na^+/K^+$ ) et stimule la déphosphorylation de l'enzyme (Jacquot et al., 2012 ; Ding et al., 2000). L'étape de déphosphorylation induit le passage de l'enzyme vers la forme E2 d'où le phospholipide sera libéré, probablement au cours du passage de l'enzyme à la forme E1 qui, elle, présente probablement un état de basse affinité pour le PL. L'ATPase-P4 dans sa forme E1 est prête pour entamer un nouveau cycle de phosphorylation par l'ATP (Fig. 10).

Les ATPases-P, qui transportent des ions, réalisent souvent des contre-transports, avec un ion transporté vers le côté cytoplasmique et un autre vers le côté exoplasmique, ce dernier ion étant nécessaire à la phosphorylation initiale de l'enzyme par l'ATP. Cependant, pour les ATPases-P4, et notamment ATP8A2 et Drs2p, aucun élément n'a été identifié comme étant essentiel pour l'étape de phosphorylation, suggérant que l'aminophospholipide est peut-être transporté sans contrepartie (Coleman et al., 2012 ; Jacquot et al., 2012).



**Figure 10. Schéma du cycle catalytique putatif des ATPases-P4 (adapté de Montigny et al., 2016).** Le cycle catalytique putatif des ATPases-P4 est basé sur celui des ATPases-P2 (Fig 8). L'étape (i) est l'étape où le phospholipide est libéré vers le côté cytosolique de la membrane, et où l'élément contre-transporté est fixé, (s'il en existe un). L'étape (ii) illustre la fixation du Mg<sup>2+</sup>-ATP et son hydrolyse permettant l'autophosphorylation de l'ATPase sur l'aspartate phosphorylable donnant l'état intermédiaire E1~P:ADP ; ce dernier, après départ de l'ADP, bascule (c'est l'étape iii) vers un état E2P permettant la libération de l'élément contre-transporté s'il existe, et la fixation du PL. L'étape (iv) d'hydrolyse de la liaison phosphate-aspartate permet à l'ATPase de se trouver à l'état E2 permettant ainsi la libération du PL (et éventuellement la fixation de l'élément contre-transporté). Domaine N: en rouge. Domaine P: en bleu. Domaine A: en jaune. (F): un résidu essentiel dans la fixation de l'ATP. (D): aspartate phosphorylable. (DGET): motif impliqué dans la déphosphorylation de l'ATPase P4.

#### ***1.3.4. Les ATPases-P4, transporteurs de phospholipides***

Comme indiqué plus haut, la première activité de transport de phospholipide, une activité de flippase, a été détectée en 1984, induisant plus tard (Seigneuret & Devaux, 1984) la classification d'ATP8A1 et de son orthologue Drs2p comme des transporteurs éventuels de phospholipides. Plusieurs études, en particulier celles effectuées sur les ATPases-P4 de *Saccharomyces cerevisiae*, ont ensuite bien confirmé que les ATPases-P4 étaient impliquées dans le transport de phospholipides. Néanmoins, ce qui a été observé, en réalité, est un transport de lipides modifiés par un groupement fluorescent (NBD) greffé sur une des chaînes d'acide gras du lipide), et non un transport de lipide naturel, plus difficile à détecter.

Il a été ainsi montré que la délétion de Dnf1p et de Dnf2p supprimait la translocation de NBD-PS, NBD-PE et NBD-PC à travers la membrane plasmique, suggérant que Dnf1p et Dnf2p étaient requises pour le transport de ces NBD-PL (Pomorski et al., 2003). Par la suite il a cependant été montré que Dnf1p et Dnf2p n'étaient pas directement impliquées dans le transport de NBD-PS (Stevens et al., 2008). Il a aussi été décrit que Dnf1p et Dnf2p étaient impliquées dans le transport de la lyso-PC et la lyso-PE radioactive à travers la membrane plasmique (Reikhof & Voelker, 2006 ; Reikhof et al., 2007).

L'ATPase-P4 des endosomes de *Saccharomyces cerevisiae*, Neo1p, est essentielle pour la levure, et de ce fait, elle ne peut être délétée. Mais des études sur Drs2p et Dnf3p, qui, elles, peuvent être délétées sans effet létal pour la levure, et qui sont localisées au niveau du *trans*-Golgi, ont montré que leur délétion simultanée supprimait le transport de NBD-PS, NBD-PE et NBD-PC (Natarajan, 2004 ; Alder-Baerens, 2006). En effet, la purification de membranes dérivant du *trans*-Golgi et exprimant un mutant de Drs2p sensible à la température, a montré que le transport de NBD-PS et NBD-PE était inhibé après incubation de ces membranes à la température non permissive de 37°C (Natarajan, 2004). De plus, le transport de NBD-PL et l'asymétrie membranaire dans des vésicules de sécrétion issues du *trans*-Golgi sont altérés après délétion de Drs2p et de Dnf3p (Alder-Baerens, 2006).

Des études de complémentation chez des levures délétées pour leurs gènes *DRS2*, *DNF1* et *DNF2* ont montré que les ATPases-P4 d'*Arabidopsis thaliana* ALA1, ALA2 et ALA3 (ALA3 est l'orthologue de Drs2p) y restauraient une activité flippase au niveau de la membrane plasmique, en transportant NBD-PS, NBD-PE et NBD-PC (Poulsen et al., 2008a ; Lopez-Marques et al., 2010).

Des études sur TAT-1, qui est une ATPase-P4 de *Caenorhabditis elegans* et qui présente 40% d'identité avec Drs2p, ont aussi suggéré que TAT-1 était impliquée dans le maintien de l'asymétrie de la PS au niveau de la membrane plasmique. En effet, la délétion de TAT-1 permet la détection de PS (avec l'annexine V) à l'extérieur de cellules somatiques et de cellules germinales des gonades (Darland-Ranson et al., 2008).

L'ATPase-P4 de souris *Atp8a1* a été elle aussi décrite comme étant impliquée dans le transport de la PS au niveau de l'hippocampe de la souris. En effet, une souris knockout pour *Atp8a1* laisse apparaître de la PS, détectée à l'annexine V, à l'extérieur des cellules (Kelly Levano et al., 2012). Dans une autre étude réalisée avec des vésicules de sécrétion purifiées à partir de *Saccharomyces cerevisiae* exprimant *Atp8a1*, *Atp8a1* de la souris semble bien transporter la NBD-PS (Soupene et al., 2008).

Quant à ATP8B1 humain, sa sur-expression dans les cellules CHOK1 déficientes en transport de PS a été rapportée induire une restauration du transport de la NBD-PS (Paulusma et al., 2008 ; Ujhazy et al., 2001). Dans une autre étude, cependant, le knock-down de ATP8B1 ne semble pas perturber le transport de la PS (Verhulst et al., 2010), et d'ailleurs dans une récente étude, il a été montré que ATP8B1 présentait une préférence pour la PC (Takatsu et al., 2014). Ces études de transport sont évidemment difficiles à interpréter de façon non ambiguë.

Une activité flippase de transport de NBD-lipides a été également détectée au niveau de la membrane plasmique de levures délétées pour leurs gènes *DRS2*, *DNF1* et *DNF2* mais exprimant l'ATPase-P4 *Atp8b5* de la souris (Xu et al., 2009). D'autres études ont montré que l'ATPase-P4 *Atp11c* de la souris, quand elle est

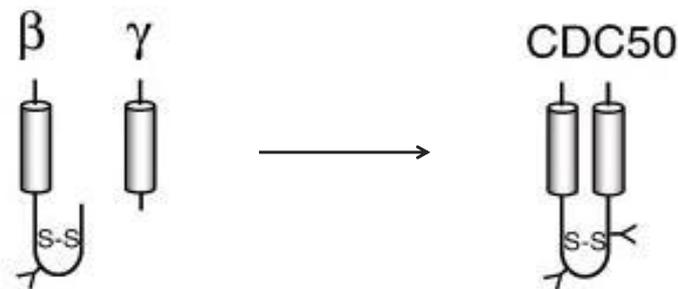
mutée, perturbait le transport de la PS au niveau des cellules Pro-B, affectant ainsi leur différenciation en lymphocytes B (Yabas et al., 2011).

Des études plus directes ont finalement montré que les ATPases-P4 transportent bien des PL. Par exemple, Atp8a2 de souris, purifiée et reconstituée dans des liposomes contenant des NBD-PL, transporte la NBD-PS (Coleman et al., 2009). Avec Drs2p, après purification et reconstitution en protéoliposomes, il a également été montré une activité flippase spécifique pour la NBD-PS (Zhou et al., 2009). Une autre étude, qui s'est appuyée sur l'étude de chimères formées à partir de Dnf1p et de Drs2p et sur l'effet de mutations ponctuelles de certains résidus, a montré que Dnf1p transportait plutôt la PC, alors que Drs2p transportait la PS (Baldrige & Graham, 2013b).

### ***1.3.5. La famille des protéines CDC50***

Dans toutes les études rapportées ci-dessus, la contribution des protéines CDC50 pour l'activité flippase des ATPases-P4 reste cependant à préciser. Les protéines CDC50 ont été décrites pour la première fois par l'équipe de Umeda (Kato et al., 2002), et elles ont été identifiées par l'équipe de Tanaka en 2004 comme étant des sous-unités importantes pour les ATPases-P4 (Saito et al., 2004). Les protéines CDC50 sont généralement assimilées aux sous-unités accessoires de l'ATPase- $\text{Na}^+/\text{K}^+$  : les sous-unité  $\beta$  sont nécessaires à la stabilisation de l'ATPase- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , à son adressage correct et à son bon fonctionnement, et modulent les propriétés intrinsèques de cette ATPase lors du transport de cations (Geering, 2001 ; Puts & Holthuis, 2009), et les sous-unités  $\gamma$  jouent aussi un rôle dans la modulation de l'ATPase- $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Geering, 2008). Les protéines CDC50 présentent une large boucle exoplasmique, N-glycosylée et ayant des ponts disulfures conservés, analogue à la longue extrémité C-terminale exoplasmique de la sous unité  $\beta$ , et sont même parfois décrites comme mimant la fusion de la sous unité  $\beta$  et la sous unité  $\gamma$  (Fig. 11) (Poulsen et al., 2008b ; Puts & Holthuis, 2009). Serait ainsi suggérée une similarité de fonction entre les protéines CDC50 et les sous unités  $\beta$  et  $\gamma$ . La glycosylation de la boucle exoplasmique, quant à elle, semble nécessaire pour la stabilité des

ATPases-P4 lors de leur expression (van der Velden et al., 2010 ; Coleman & Molday, 2011).



**Figure 11. Les protéines CDC50, une fusion des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  ? (Adapté de Puts & Holthuis, 2009).** À gauche la topologie des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ , et à droite la topologie prédite pour les protéines CDC50, qui pourraient être le résultat d'une fusion entre les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ . S-S: pont disulfure. Y: site de N-glycosylation.

Dans différents organismes, il a été attribué un rôle de chaperon aux protéines CDC50. En effet, elles sont importantes pour la sortie des ATPases-P4 du RE. De même, les ATPases-P4 sont nécessaires à la sortie des protéines CDC50 du RE (Poulsen et al., 2008a ; Saito et al., 2004 ; Paulusma et al., 2008 ; Takatsu et al., 2011 ; van der Velden et al., 2010 ; Chen et al., 2006 ; Lopez-Marqués et al., 2012). Dans la levure, les protéines CDC50 semblent jouer un rôle dans la localisation subcellulaire des ATPases-P4, mais chez les plantes, les ATPases-P4 semblent suffire à déterminer leur propre localisation subcellulaire (Lopez-Marqués et al., 2010 ; Lopez-Marqués et al., 2012). Chez les mammifères, il a été montré que pour certaines ATPases-P4, la sous-unité CDC50 est nécessaire pour la sortie du complexe du RE et sa localisation subcellulaire : par exemple, ATP8B1 exprimée seule se localise au niveau du RE, par contre lorsqu'elle est exprimée avec CDC50A et CDC50B elle se trouve localisée au niveau de la membrane plasmique (van der Velden et al., 2010 ; Bryde et al., 2010).

Les protéines CDC50 semblent le plus souvent être impliquées dans le transport des phospholipides et la modulation des ATPases-P4, mais cela ne semble pas cependant être le cas pour tous les organismes. Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana*, l'étude de transport du NBD-lipides par les ATPases-P4 ALA2 et ALA3 avec trois protéines de la famille CDC50, ALIS1, ALIS2 et ALIS5, a montré que la spécificité pour le substrat semblait être portée par l'ATPase elle-même (Lopez-Marques et al., 2010). En revanche, chez les mammifères, il a été montré que les protéines CDC50 étaient le plus souvent impliquées dans le transport des PL, voire dans la spécificité de ce transport. ATP8A2 a ainsi été décrite comme se liant préférentiellement à CDC50A : l'étude de chimères entre CDC50A et CDC50B a montré que le fait de remplacer l'extrémité N-terminale de CDC50A par celle de CDC50B altérerait largement le transport de NBD-PS, ce qui a suggéré que cette extrémité N-terminale de CDC50A était impliquée dans l'activité catalytique de l'ATPase (Coleman & Molday, 2011). Rappelons cependant, comme on l'a déjà dit, que l'ATPase-P4 de mammifère ATP9B, localisée dans le *trans*-Golgi, ne semble pas, elle, interagir avec une protéine CDC50, tout comme l'ATPase-P4 de la levure Neo1p, localisée dans les endosomes (Saito et al., 2004 ; Takatsu et al., 2011).

Dans la levure, l'étude de différents mutants de Cdc50p gardant néanmoins leur capacité à interagir physiquement avec Drs2p a permis d'observer un défaut de trafic membranaire entre les endosomes précoces et le *trans*-Golgi, ce qui a suggéré que Cdc50p jouait un rôle indirect dans l'activité flippase elle-même (Takahashi et al., 2011). Il a aussi été montré que plusieurs mutations de Lem3p, la sous-unité associée à Dnf1p et Dnf2p (des ATPases-P4 transportant les mêmes substrats), entraînaient des défauts de transport par ces ATPases de la PC et de la PE à travers la membrane plasmique (Kato et al., 2002 ; Hanson et al., 2003), et que Cdc50p, la sous-unité de Drs2p, était bien impliquée dans l'activité flippase de Drs2p, puisque la co-expression du complexe Drs2p/Lemp3 dans des levures délétées pour leur gène CDC50 ne permettait pas la phosphorylation de Drs2p (Lenoir et al., 2009), et que la sur-expression de Drs2p sans sa sous-unité Cdc50p ne permettait pas d'obtenir une phosphorylation de Drs2p à la hauteur de celle obtenue lorsque Drs2p est co-exprimée avec Cdc50p (Lenoir et al., 2009 ; Jacquot et al., 2012). Il a aussi été montré que l'interaction entre Cdc50p et Drs2p de la levure était dynamique : l'affinité de Cdc50p pour Drs2p semble fluctuer avec les différentes conformations que Drs2p

adopte au cours du cycle catalytique, avec une interaction plus forte avec la conformation E2-P de Drs2p, c'est à dire à l'étape où le PL est supposé se fixer (Lenoir et al., 2009). Ces données suggèrent fortement que les protéines CDC50, tout comme les sous-unités  $\beta$  des ATPases-P2 (Geering, 2001 ; Puts & Holthuis, 2009), n'ont pas seulement un rôle de chaperon pour les ATPases-P4 mais jouent aussi un rôle important dans le transport des phospholipides. La distinction entre ces deux rôles reste cependant à ce jour difficile à établir.

### ***1.3.6. Hypothèses sur le mécanisme de transport***

À ce jour le mécanisme de transport des phospholipides reste encore mal compris. On a longtemps pensé qu'il n'était pas évident d'imaginer, pour le transport d'un phospholipide qui est un substrat "géant", amphiphile, un mécanisme de transport similaire à celui des ATPases-P transportant des ions, ces toutes petites espèces hydrophiles, même si les résidus impliqués dans le transport des cations étaient remplacés dans le cas des ATPases-P4 par des résidus aromatiques et/ou hydrophobes. La question qui se pose est: comment le transport des phospholipides est-il effectué? Deux mécanismes de transport ont été proposés.

Le premier, proposé par Graham et son équipe est un mécanisme dit "des deux portes". Ce groupe a étudié le transport de PL par différentes chimères, obtenues en remplaçant certains segments de Dnf1p (qui transporte plus spécifiquement la PC et la PE) par les segments correspondants de Drs2p (qui transporte plus spécifiquement la PS), et l'effet de la mutation ponctuelle de certains résidus a également été étudié. Les résultats semblent indiquer que Dnf1p reconnaît la PC grâce à des séquences situées au niveau du troisième segment transmembranaire (TM3), au niveau de la boucle reliant TM1 à TM2, et au niveau de la boucle reliant TM3 à TM4. Pour Drs2p, il semble que les séquences impliquées dans le transport de la PS sont situées au niveau de TM1, TM2 et TM4. Graham et son équipe suggèrent que le flip s'effectue par un chemin situé à la périphérie de la protéine (et non pas au cœur de celle-ci), c'est à dire qu'il va se créer une interface entre la protéine et le groupement polaire du PL afin qu'il puisse être transporté du feuillet exoplasmique au feuillet cytosolique : tout d'abord, le PL serait sélectionné du

côté exoplasmique de la membrane par un ensemble de résidus formant "la porte d'entrée". Au cours du flip, une cavité hydrophile prendrait en charge la tête polaire du phospholipide. Enfin, après le passage du PL à travers la membrane, le PL serait pris en charge par un ensemble de résidus formant "la porte de sortie" permettant de libérer le PL du côté cytosolique de la membrane ([Baldrige & Graham, 2012, 2013a et 2013b](#)).

Le second mécanisme, proposé par Andersen et son équipe est un mécanisme dit "de la porte hydrophobe". A la suite de leur étude par mutagenèse dirigée, sur ATP8A2, de l'importance respective des divers acides aminés situés dans TM4, un segment important pour le transport des ions par les ATPases P2, l'un de ces acides aminés, l'isoleucine 364 (I364), semble être particulièrement important pour le transport de PL. Or, cet acide aminé correspond justement au résidu glutamate qui, dans le TM4 de l'ATPase- $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et de l'ATPase- $\text{Ca}^{2+}$ , lie les ions et contribue à leur transport. Après études plus détaillées du cycle catalytique, et aussi études de modélisation par dynamique moléculaire s'appuyant sur la structure des ATPases-P2, il semblerait que I364 joue effectivement un rôle central dans le transport de PL. De plus, TM1, TM2, TM4 et TM6 seraient impliqués eux aussi dans le transport, et un autre résidu situé au niveau du TM4 jouerait également un rôle significatif dans le transport de PL, le résidu N359. À partir de cette étude, Andersen et son équipe suggèrent que le résidu N359 va aider à la reconnaissance et à la fixation de la tête polaire du PL du côté exoplasmique de la membrane. Ensuite, au cours de la translocation du PL, ce dernier va se retrouver dans un sillon hydrophobe constitué du résidu I364 entouré par des résidus hydrophobes de TM1, TM2, TM4 et TM6 : ce sillon est qualifié de "porte hydrophobe". Grâce au mouvement de TM4 au cours du cycle catalytique, il va pousser la tête hydrophile du PL vers la porte de sortie, la chaîne hydrocarbonée du PL va suivre le mouvement, et le PL se retrouvera du côté cytosolique de la membrane ([Vestergaard et al., 2014](#)).

On peut cependant probablement imaginer un mécanisme unique avec les données récoltées dans les deux études précédemment citées. Le mécanisme dit des "deux portes" décrit l'interaction du PL avec la porte d'entrée et la porte de sortie sans décrire ce qui se passe entre ces deux étapes, alors que le mécanisme dit de "la porte hydrophobe" peut combler ce manque du mécanisme des "deux portes". On

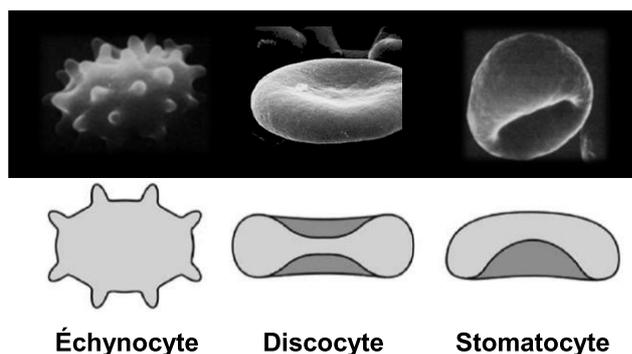
peut imaginer que le PL va être reconnu par la porte d'entrée, qu'il va être fixé pour être transporté, qu'au cours de cette translocation il va se retrouver dans le sillon de la « porte hydrophobe » (les résidus des TM1, TM2, TM4 et TM6), et qu'il va être poussé vers la porte de sortie pour se retrouver du côté cytosolique de la membrane (Montigny et al., 2016).

Comme dit précédemment, cependant, le PL est un substrat "géant", et la présence des sous-unités associées aux ATPases-P4 pourrait aider à imaginer son transport. Quel est donc le rôle de la sous unité CDC50 dans le transport des PL ? Comme mentionné précédemment, la sous-unité Cdc50p associée à Drs2p interagit fortement avec l'état E2-P de Drs2p, un état censé interagir avec le PL pour le transporter (Lenoir et al., 2009). On peut alors imaginer que Cdc50p fournisse ses deux hélices transmembranaires à Drs2p afin de créer un site de fixation pour le PL, permettant ainsi son transport, un site dont l'affinité pour le phospholipide serait modulée au cours du transport.

Entre les données récoltées et les suggestions proposées, le mécanisme de transport de PL reste encore à éclaircir, en collectant davantage d'informations sur les ATPases-P4 et leurs partenaires CDC50.

### ***1.3.7. Rôle des ATPases-P4 dans le trafic membranaire***

Lors de la découverte de la première activité flippase dans les érythrocytes par Seigneuret et Devaux, les deux auteurs ont observé que le transport des aminophospholipides (PS et PE) du feuillet exoplasmique au feuillet cytosolique induisait un changement de la forme de l'érythrocyte. L'ajout aux érythrocytes des phospholipides exogènes favorisait une forme échinocyte, et au fur et à mesure que le transport des aminophospholipides se faisait, les érythrocytes passaient graduellement d'une forme échinocyte à une forme discocyte, puis à une forme stomatocyte où les érythrocytes présentent une forte invagination de la membrane (Fig. 12), expliquée par le transport de l'excès de phospholipides exogènes ajoutés (Seigneuret & Devaux, 1984).



**Figure 12. Schéma des formes échinocyte, discocyte et stomatocyte d'érythrocyte (Adapté de Lim, Wortis et Mukhopadhyay, 2002 et de Tachev, Danov et Kralchevsky, 2004).**

Il a été observé plus tard, lors d'un ajout d'aminophospholipides exogènes à des cellules tumorales de l'érythroleucémie (leucémie aiguë myéloïde où les précurseurs des polynucléaires -un type de globules blanc- perdent leur capacité à se différencier et se développent anormalement), qu'un transport de ces lipides du feuillet externe au feuillet interne de la membrane de ces cellules stimulait une invagination de la membrane de ces cellules conduisant au phénomène d'endocytose (Farge et al., 1999 ; Rauch & Farge, 2000). Dans une autre étude, des vésicules géantes ont été formées à partir d'érythrocytes, et après ajout d'ATP, de petits bourgeons ont été observés à la surface de ces vésicules géantes, reflétant l'augmentation de la surface du feuillet externe de la membrane probablement liée au transport unidirectionnel des lipides par la flippase (seules les flippases qui exposent leur site de fixation de l'ATP vers l'extérieur sont activées par l'addition d'ATP : les flippases reconstituées avec leur site de fixation au nucléotide vers l'intérieur ne contribuent pas au transport) (Ezanno et al., 2010). L'étude de membranes modèles où il y a un transport de lipides a montré là aussi des déformations membranaires probablement liées à une augmentation de la surface d'un feuillet par rapport à l'autre (Devaux et al., 2008). Ces études suggèrent que les ATPases-P4 sont impliquées dans les phénomènes de courbure membranaire, qui interviennent notamment lors de la biogenèse de vésicules et pendant le trafic membranaire.

De fait, de nombreuses études ont associé une altération du trafic vésiculaire à l'inactivation des ATPases-P4. Ainsi, chez les mammifères, Atp8b5 de la souris semble bien être impliquée dans le trafic membranaire : l'utilisation de l'ARN interférant d'Atp8b5 dans les mastocytomes P815 de la souris provoque une forte diminution de la sécrétion des protéines dans le milieu extracellulaire et une forte perturbation à basse température de la structure de l'appareil de Golgi : une distension des citernes du Golgi, et une non-distinction entre le *cis*- et le *trans*-Golgi, avec la perte de la région médiane de l'appareil (Xu et al 2009). Chez *Caenorhabditis elegans*, TAT-1 semble être impliqué dans la formation des vésicules endo-lysosomales : la mutation de TAT-1 conduit à une accumulation anormale de structures vacuolaires larges présentant des marqueurs de l'endosome tardif et du lysosome, et à une distribution anormale des marqueurs de l'endosome précoce et tardif (Ruaud et al., 2009 ; Chen et al., 2010). Chez *Arabidopsis thaliana*, ALA3 semble être impliquée dans la formation des vésicules de sécrétion contenant les polysaccharides et les enzymes destinées à être secrétées : sa mutation altère l'exocytose de ces vésicules et leur formation (Poulsen et al., 2008a). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'étude de mutants thermosensibles de l'ATPase-P4 Neo1p (située au niveau de l'endosome et du Golgi) montre une altération du transport rétrograde entre le Golgi et le RE, ainsi qu'une altération de l'endocytose, de la biogenèse des vacuoles et du transport des protéines vacuolaires (Hua et al. 2003 ; Wicky et al 2004 ; Singer-Kruger et al., 2008). A propos des ATPases-P4 Dnf1p et Dnf2p (situées dans la membrane plasmique), il a été montré que leur délétion est accompagnée d'une altération de la formation des vésicules d'endocytose (Pomorski et al., 2003). Et quant à l'ATPase-P4 Drs2p (située dans le *trans*-Golgi), sa délétion entraîne la perturbation de la formation des vésicules à clathrine au niveau du *trans*-Golgi : les cellules de levure délétées pour leur gène *DRS2* présentent un phénotype similaire à celui des cellules déficientes en clathrine, qui correspond à une accumulation anormale de citernes de Golgi élargies avec une altération du bourgeonnement des vésicules à clathrine (Chen et al., 1999 ; Gal et al., 2002); et de fait, la première ATPase-P4 dont la fonction a été reliée aux phénomènes de trafic membranaire a été Drs2p.

Par ailleurs, une interaction génétique (c'est la capacité d'un gène à modifier l'action d'un autre gène, exemple: si le phénotype d'un mutant d'un gène A est

aggravé par une mutation sur un gène B, il y a interaction génétique entre les deux gènes) a été montrée entre Drs2p (et sa sous unité associée Cdc50p) et la petite protéine G Arf (Chen et al., 1999). Rappelons que Arf (ADP-ribosylation factor) se présente sous deux formes, une forme inactive soluble et liée au GDP et une forme active liée au GTP et associée à la membrane, et que sous sa forme active, Arf permet le recrutement de plusieurs effecteurs impliqués dans le trafic membranaire. Il a aussi été montré qu'il y avait une interaction génétique entre Drs2p et plusieurs effecteurs de Arf : par exemple, en plus de l'interaction avec Arf, Drs2p interagit avec des régulateurs de Arf comme la protéine GAP Gcs1p (activatrice de l'activité GTPase de Arf) (Sakane et al., 2006). Il a aussi été décrit une interaction génétique entre Drs2p et la clathrine, Chc1p (Chen et al., 1999) et aussi avec l'adaptateur de clathrine AP-1, qui est recruté par Arf au niveau du *trans*-Golgi et des endosomes précoces; Drs2p et Cdc50p sont d'ailleurs nécessaires au transport bidirectionnel entre ces deux organelles (Liu et al., 2008). En plus des interactions génétiques, il a été montré qu'il y avait des interactions physiques entre Drs2p et AP-1, et aussi entre Drs2p et Gea2p (un échangeur de GDP en GTP activant Arf) (Liu et al., 2008 ; Chantalat et al., 2004). Une autre interaction génétique a été rapportée entre Drs2p et les adaptateurs de clathrine Gga1 et Gga2 (nécessaires à la formation de vésicules du *trans*-Golgi vers les endosomes tardifs) (Liu et al., 2008 ; Sakane et al., 2006). D'autres interactions ont aussi été montrées : une interaction génétique de Drs2p avec Pik1p, une phosphatidylinositol-4-kinase produisant le phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) (Sciorro et al., 2005), et aussi une interaction physique avec Sac1p, une phosphatase déphosphorylant le PI4P (Puts et al., 2010). Il a été montré par la suite que l'extrémité C-terminale de Drs2p présentait un site de fixation pour le PI4P, et que le PI4P était nécessaire à l'activité de Drs2p (Natarajan et al., 2009 ; Jacquot et al., 2012). Le PI4P est un phosphoinositide qui joue un rôle critique dans le trafic membranaire en recrutant à la membrane du *trans*-Golgi les protéines du manteau de clathrine initiant la génération de vésicules (Wang et al., 2003 ; Wang et al., 2007 ; Graham & Burd, 2011 ; Santiago-Tirado & Bretscher, 2011). On verra par la suite que le PI4P tient une place importante dans ce travail de thèse.

Ces différentes interactions (et bien d'autres décrites dans la littérature) entre Drs2p et des protéines impliquées dans le trafic membranaire suggèrent une

implication forte de Drs2p dans la formation de vésicules le long des voies sécrétoires et endocytaires. Ceci pourrait conduire à penser que Drs2p constituerait une sorte de plateforme de recrutement de ces protéines ; cette hypothèse n'est cependant pas confirmée, car après délétion du gène *DRS2*, AP-1, Gea2p et la clathrine sont normalement recrutés au niveau de la membrane du *trans*-Golgi (Liu et al., 2008).

Une hypothèse alternative pourrait être que c'est plutôt la différence d'aire entre le feuillet cytosolique et le feuillet exoplasmique engendrée par l'activité de la flippase qui courberait la membrane avant invagination ou formation de vésicules. Cette seconde hypothèse est appuyée par différentes études. Par exemple, l'ajout au feuillet exoplasmique d'érythrocytes de phospholipides marqués conduit au transport de ces derniers vers le feuillet cytosolique et à la formation de vésicules d'endocytose (Müller et al., 1994). La formation de vésicules d'endocytose a été aussi observée avec les cellules K562, où PS et PE ajoutées au feuillet exoplasmique de la membrane plasmique sont rapidement internalisés (Farge et al., 1999). Dans une autre étude (déjà mentionnée), une formation de bourgeons au niveau de vésicules géantes préparées à partir d'érythrocytes a été observée après ajout d'ATP (Ezanno et al., 2010). Cependant, la formation de bourgeons liée à l'activité de transport de lipides par une flippase purifiée et reconstituée n'a jamais été observée.

Une troisième hypothèse propose que ce soit le transport lui-même de lipides particuliers d'un feuillet à l'autre qui conduirait à la formation de vésicules. Graham suggère ainsi que c'est le transport de la PS vers le feuillet cytosolique qui facilite l'invagination de la membrane, la PS avec sa charge négative permettant alors le recrutement d'effecteurs induisant la formation de vésicules (Xu et al., 2013), tandis que l'équipe de Tanaka appuie l'idée que c'est le flip lui-même (du feuillet exoplasmique vers le feuillet cytosolique), et non la simple présence finale de la PS au niveau du feuillet cytosolique, qui induit l'invagination de la membrane et donc la formation de vésicules, (Takeda et al., 2014).

Tous ces travaux amènent néanmoins à penser que l'activité flippase des ATPases-P4, autrement dit le transport du phospholipide, est bien l'élément initiateur de la biogenèse de vésicules.

### ***1.3.8. Les ATPases-P4 et les pathologies***

Le dysfonctionnement des ATPases-P4 est associé à différentes pathologies, diverses par leur nature et leur gravité, mais témoignant de l'importance des ATPases-P4 dans la vie cellulaire.

La première ATPase-P4 à avoir été décrite comme directement impliquée dans une maladie chez l'Homme a été ATP8B1. Des mutations d'ATP8B1 causent en effet deux formes de cholestase intrahépatique, l'une sévère dite cholestase intrahépatique familiale et progressive (PFIC1), qui s'aggrave progressivement pour éventuellement atteindre un stade de dysfonctionnement hépatique létal (fibrose et cirrhose), et l'autre moins sévère dite cholestase intrahépatique bénigne et récurrente (BRIC) (Bull et al., 1998). Une cholestase intrahépatique est ce qui résulte de l'arrêt ou de la diminution de l'écoulement des sels biliaires, qui, parce qu'ils solubilisent le cholestérol et les phospholipides, aident normalement à la digestion et à l'absorption des lipides au niveau de l'intestin grêle. Les sels biliaires sont sécrétés par les hépatocytes dans des canalicules biliaires. Au niveau des membranes apicales de ces hépatocytes, sont co-localisées l'ATPase-P4 ATP8B1, une ABC-floppase, ABCB4, et un transporteur de sels biliaires, ABCB11.

ATP8B1 semble être particulièrement importante pour le maintien de l'organisation des membranes apicales, pour l'expression des protéines apicales, et donc pour le maintien de l'intégrité des hépatocytes et l'export correct des sels biliaires (Eppens et al., 2001 ; Ujhazy et al., 2001 ; Paulusma et al., 2006 ; Groen et al., 2011 ; Verhulst et al., 2010). Il a ainsi été rapporté que la carence en ATP8B1 conduisait à la perte de l'asymétrie membranaire des membranes apicales hépatocytaires formant les parois des canicules biliaires (en cas de PFIC1), donc à la perte de l'organisation en microvillosités de ces membranes, et à l'enrichissement de leur surface en PS, ce qui rendrait ces membranes plus sensibles aux sels biliaires :

des composants membranaires tels que le cholestérol et la PC seraient alors plus facilement extraits de ces membranes, qui deviendraient incapables de réaliser le transport de sels biliaires qu'elles sont censées réaliser (van der Mark et al., 2013). Notons au passage qu'ATP8B1 est également localisée dans d'autres tissus, notamment au niveau de la membrane apicale des cellules du pancréas, des entérocytes et des cellules cochléaires, et sa mutation peut conduire à d'autres symptômes dits extra-hépatiques accompagnant la cholestase intrahépatique (pancréatite, diarrhée et perte de l'audition).

D'autres maladies ont été associées à l'inactivation des ATPases-P4. Par exemple, l'inactivation d'ATP8B4 (qui est localisée au niveau du cerveau) semble être impliquée dans la maladie d'Alzheimer (Li et al., 2008). Atp8b3 et Atp8b5 (localisés au niveau des testicules) semblent être impliqués dans la capacitation des spermatozoïdes (Wang et al., 2004 ; Xu et al., 2009). L'inactivation d'ATP8A2 humaine, exprimée fortement dans le cerveau, la rétine et les testicules, semble être liée à de sévères retards mentaux (Cacciagli et al., 2010). L'inactivation d'ATP10A est associée au diabète de type 2 et à l'obésité (Dhar et al., 2000 ; Dhar et al., 2006). ATP10D semble aussi être liée à des défauts du métabolisme des lipides chez l'humain et la souris (Flamant et al., 2003), avec un risque d'infarctus du myocarde (Hicks et al., 2009). Un dernier exemple est donné par ATP11C, qui semble être impliquée dans le développement des lymphocyte B et l'export correct de la bile au niveau du foie (Siggs et al., 2011a ; Yabas et al., 2011 ; Siggs et al., 2011b).

### ***1.3.9. Régulation des ATPases-P4***

De par leur rôle dans le maintien de l'asymétrie membranaire et leur implication probable dans le trafic membranaire, les ATPases-P4 doivent très certainement être régulées pour assurer le maintien de l'homéostasie cellulaire, tout en évitant l'initiation de mécanismes cellulaires non souhaités.

*Les ATPases-P4 peuvent être régulées par des lipides.*

Par exemple, dans le cas de Drs2p, un site de fixation au PI4P a été identifié au niveau de l'extrémité C-terminale de Drs2p, et il a été montré que la mutation ou la

délétion du site de fixation du PI4P conduisait à la perte de l'activité flippase de Drs2p, et que l'arrêt de la production du PI4P réduisait dramatiquement l'activité flippase de Drs2p (Natarajan et al., 2009). Dans une autre étude, l'analyse des étapes de phosphorylation et de déphosphorylation de Drs2p a montré que le PI4P stimulait Drs2p en augmentant la vitesse de son étape de déphosphorylation en présence du substrat transporté par Drs2p, la PS (Jacquot et al., 2012).

*Les ATPases-P4 peuvent être régulées par des protéines.*

Dnf1p et Dnf2p présentent un site de phosphorylation par des sérine-thréonine kinases, Fpk1 et Fpk2, et il a été montré que la délétion de ces deux protéines conduisait à la perte de l'activité flippase de Dnf1p et Dnf2p, à la perturbation de l'asymétrie membranaire, et à l'altération du trafic membranaire (Nakano et al., 2008). L'activité de Drs2p semble aussi être inhibée par l'activité de la protéine Osh4, une protéine fixant le cholestérol (Muthusamy et al., 2009) ; il a été suggéré que Osh4 enrichissait le *trans*-Golgi (et par conséquent aussi la membrane plasmique) en stérols: Osh4 prendrait en charge un stérol prélevé dans le RE et le transporterait vers le *trans*-Golgi, et en échange du stérol, Osh4 prendrait en charge un PI4P prélevé dans le *trans*-Golgi, d'où la baisse de l'activité de Drs2p (de Saint-Jean et al., 2011 ; Moser von Filseck et al., 2015). Drs2p, qui interagit génétiquement avec la kinase Pik1p, qui conduit à la production de PI4P à partir de PI, et physiquement avec la phosphatase du PI4P (Sac1p), est également régulée par ces deux protéines : Pik1p exerce une régulation positive sur l'activité flippase de Drs2p en augmentant la quantité de PI4P au niveau du *trans*-Golgi (Natarajan et al., 2009), et Sac1p exerce une régulation négative en réduisant la quantité de PI4P (Stefan et al., 2011).

Deux autres acteurs du trafic membranaire, Arl1p et Gea2p, régulent l'activité flippase de Drs2p et méritent une mention spéciale. En effet, Arl1p interagit avec Drs2p au niveau de son extrémité N-terminale, et l'interaction d'Arl1p avec Drs2p au niveau de membranes de *trans*-Golgi purifiées stimule l'activité flippase de Drs2p (Tsai et al., 2013). Par ailleurs, l'ajout du domaine Gea2p à des membranes du *trans*-Golgi isolées stimule le transport de NBD-PS (Natarajan et al., 2009). Le site de fixation de Gea2p sur Drs2p, au niveau de l'extrémité C-terminale de Drs2p, chevauche celui du PI4P, et il semble qu'il y ait synergie entre l'activation par Gea2p

et l'activation par le PI4P de Drs2p (tests réalisés au niveau de membranes du *trans*-Golgi isolées) (Natarajan et al., 2009). Par analogie avec celles des ATPases-P2 et -P3 qui présentent des extrémités terminales régulatrices, et en s'appuyant sur les données précédemment mentionnées (PI4P, Gea2p et Arl1p), les extrémités N- et C-terminales de Drs2p pourraient donc bien jouer un rôle significatif dans la régulation de Drs2p.

*Les ATPases-P4 pourraient être régulées par leurs extrémités terminales.* Dans le cas de Drs2p, son extrémité C-terminale (qui comme on l'a vu ci-dessus présente un site de fixation au PI4P et à Gea2p) pourrait contenir un domaine auto-inhibiteur, et l'équipe de Graham a mené une étude sur cette hypothèse. Dans cette étude Drs2p a été exprimée avec un site de clivage à la protéase TEV inséré juste après le 10<sup>ème</sup> segment transmembranaire prédit pour Drs2p, de telle sorte que le clivage par la TEV engendrait une version de Drs2p dans laquelle Drs2p était dépourvue de son extrémité C-terminale, et par conséquent de son site de fixation pour le PI4P. L'étude de l'activité ATPasique et du transport de NBD-PS par cette forme tronquée a montré que cette protéine Drs2p tronquée présentait d'emblée, en absence même de PI4P, une activité basale importante, alors que pour la forme entière, l'activité de Drs2p était bien dépendante du PI4P. Ces résultats ont amené les auteurs à suggérer que l'extrémité C-terminale de Drs2p contenait un domaine exerçant une auto-inhibition sur l'ATPase Drs2p, le rôle du PI4P étant de lever cette auto-inhibition (Zhou et al., 2013). Ce point sera particulièrement réexaminé dans la présente thèse.

*Les ATPases-P4 peuvent être régulées par des protéolyses.*

ATP11C (avec son partenaire CDC50A) présente, comme les autres ATPases-P4, une activité de transport de PL du feuillet exoplasmique vers le feuillet cytosolique, et il a été montré que l'inactivation de cette flippase par protéolyse est associée au phénomène d'apoptose. En effet, ATP11C présente des sites de reconnaissance par une caspase, et l'action de cette protéase, via le clivage d'ATP11C, inactive la flippase : après l'attaque protéolytique, le transport de PS vers le feuillet cytosolique de la membrane des cellules est bloqué (ou ralenti), le feuillet exoplasmique s'enrichit en PS, et la cellule entre donc dans un processus d'apoptose. L'étude d'ATP11C mutée sur ses sites de reconnaissance par cette caspase, et donc ne

pouvant pas être clivée par la caspase, exprimée dans des cellules déficientes en ATP11C, montre que son activité flippase (testée via un transport de NBD-PS) empêche ces cellules d'entrer en apoptose, contrairement aux cellules exprimant ATP11C non mutée. Ces résultats suggèrent que la protéolyse de la flippase par la caspase inactive le transport de lipide, ce qui conduit à l'exposition de la PS au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique des cellules, prélude à la phagocytose de la cellule en apoptose par les macrophages (Segawa et al., 2014).

#### **I.4. Problématique et objectifs de notre travail**

Les ATPases-P4 restent à ce jour une famille de protéines sur laquelle on se pose beaucoup de questions.

La question principale porte sur le mécanisme de transport des phospholipides. En effet, vu que cette famille fait partie de la famille des ATPases-P, qui pour la plupart transportent des ions, il est difficile d'imaginer un mécanisme de transport de phospholipides qui serait totalement similaire à celui pour le transport de cations : il y a trop de différences entre les deux types de substrats, au niveau de leurs tailles, le phospholipide ayant une taille nettement plus importante qu'un ion, mais aussi au niveau de leurs natures chimiques, le phospholipide étant une molécule amphiphile et l'ion une espèce hydrophile. Le site de transport du lipide doit néanmoins pouvoir présenter une certaine spécificité pour une tête polaire de phospholipide ou une autre, et aucune affinité pour d'autres types de lipides. Comme décrit précédemment (dans la section "*Hypothèses sur le mécanisme de transport*"), divers mécanismes de transport des phospholipides ont été proposés, mais les données restent à ce jour insuffisantes pour pouvoir confirmer l'une ou l'autre de ces propositions. D'autres investigations sont donc nécessaires afin de comprendre le mécanisme de transport de phospholipides. Et il est important aussi de pouvoir mieux caractériser ces ATPases-P4 d'un point de vue fonctionnel, mais aussi bien sûr du point de vue de leurs structures tridimensionnelles, qui apporteraient des informations précieuses pour la compréhension du transport de lipides par ces ATPases-P4.

Au vu de leur implication dans la création de l'asymétrie membranaire, dans le trafic vésiculaire, et dans bien d'autres fonctions cellulaires, une autre question se pose à propos des ATPases-P4. Puisque ces ATPases-P4 doivent être régulées afin d'assurer le maintien de l'homéostasie cellulaire, il serait très intéressant de connaître par quel mécanisme cette régulation s'effectue. Comme décrit précédemment (dans la section "*Régulation des ATPases-P4*"), les ATPases-P4 semblent pouvoir être régulées de différentes façons, notamment via un système d'auto-inhibition et de levée d'auto-inhibition. Comme les ATPases-P2 et P3, les ATPases-P4 pourraient être régulées par leurs extrémités terminales, et dans le prolongement de la suggestion de Zhou et al., des recherches spécifiques sont nécessaires afin de déterminer le rôle des extrémités terminales dans cette auto-régulation, et par quel mécanisme s'effectue cette auto-régulation.

Dans notre laboratoire, on s'est intéressé d'abord à l'ATPase-P4 Drs2p et son partenaire Cdc50p de *Saccharomyces cerevisiae*, l'une des ATPases-P4 pour lesquelles il existait le plus de données. Dans un travail précédent ([Jacquot et al., 2012](#)), notre équipe avait réussi à co-exprimer Drs2p et Cdc50p dans des membranes de levure, et à commencer grâce à cela la caractérisation fonctionnelle du cycle catalytique de l'ATPase. Dans le présent travail, notre premier objectif a été de mettre au point la purification en quantité importante du complexe formé par Drs2p et son partenaire Cdc50p, dans le but d'affiner la caractérisation fonctionnelle de son cycle catalytique, et de permettre des essais de cristallogénèse visant à élucider la structure tridimensionnelle du complexe Drs2p/Cdc50p. Ceci nous aidera à comprendre le mécanisme de transport des phospholipides par les ATPases-P4. Nous avons donc dans ce travail mis au point la purification du complexe Drs2p/Cdc50p et l'obtention en quantité importante de ce complexe isolé, pour l'étude de son cycle catalytique et en particulier l'étude de son activité ATPasique, qui est impossible à réaliser avec des membranes brutes à cause de la présence de contaminants trop actifs, et pour sa caractérisation dans des conditions diverses, notamment du point de vue de sa stabilité en présence ou en absence de ses ligands phospholipidiques. La mise au point de la purification et de la caractérisation fonctionnelle de Drs2p/Cdc50p seront des étapes indispensables pour l'étude détaillée du mécanisme par lequel fonctionne Drs2p/Cdc50p, ouvrant la voie, dans

l'avenir, à l'étude d'autres ATPases-P4, notamment celles qui sont impliquées dans des pathologies humaines.

Notre second effort a été de tenter d'étudier l'implication des extrémités N- et C-terminales dans l'auto-régulation de Drs2p, et si possible de déterminer plus précisément les parties de ces extrémités impliquées dans cette auto-régulation, voire même les acides aminés impliqués. Des résultats préliminaires dans notre laboratoire soutenaient l'hypothèse que Drs2p est bel et bien auto-inhibée au moins par son extrémité C-terminale. Au cours de ma thèse, une autre équipe a obtenu des résultats allant dans le même sens ([Zhou et al., 2013](#)). Pour cette seconde partie, nous avons surexprimé différentes versions tronquées de Drs2p afin de comprendre l'implication des extrémités terminales dans l'autorégulation, et ces études ont été complémentées par des expériences de protéolyse ménagée.

## **II. MATÉRIELS ET MÉTHODES**

## II.1. Matériels

### II.1.1. Produits utilisés

Les milieux de culture pour les bactéries et les levures proviennent de Difco (BD Bioscience). Les enzymes de restriction, la ligase et le marqueur de poids moléculaire pour ADN (1 kb DNA Ladder) proviennent de New England Biolabs. La polymérase haute fidélité (Phusion<sup>®</sup> Hgh-Fidelity DNA Polymerase) provient de Finnzymes. Les oligonucléotides sont synthétisés par Eurofins. Le kit de purification des fragments d'ADN Nucleospin Gel and PCR Clean-up et le kit de purification d'ADN plasmidique Nucleospin Plasmid QuickPure proviennent de Macherey-Nagel. Le kit de clonage Clone JET<sup>™</sup> PCR et la sonde histidine (India Hisprobe<sup>™</sup>-HRP) proviennent de Thermo Fischer Scientific. La sonde biotine (Avidin-HRP) provient de Sigma-Aldrich. L'anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la boucle cytoplasmique située entre les hélices transmembranaires 4 et 5 de Drs2p (correspondant aux domaines P et N) a été généreusement donné par le Dr T. Graham (Vanderbilt University, USA). L'anticorps secondaire de chèvre couplé à la peroxydase (Goat anti-rabbit-HRP) provient de Bio-Rad. Le DDM (n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside) provient d'Affymetrix (Anatrace product), le C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> (octaethylene glycol mono-n-dodecyl ether) de Nikkol Chemical, le Triton X-100 de Pierce, le Tween 20 de Bio-Rad. Les lipides POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), DOPC (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), POPE (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine), POPS (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine), DMPS (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine), et PI4P (L-alpha-Phosphatidylinositol-4-phosphate) proviennent d'Avanti Polar Lipids. La BSA (Albumin fraction V) provient de Roth Sochiel. Le cocktail d'inhibiteurs de protéases (sans EDTA) provient de Sigma-Aldrich. Le marqueur de poids moléculaire Precision Plus Protein Standards provient de Bio-Rad. Les produits pour le SDS-PAGE (TGX Stain-Free Precast 4-20% Gels) proviennent de Bio-Rad. Les membranes PVDF (Immobilon<sup>®</sup>-P transfer membrane 0,45  $\mu$ m) proviennent de Millipore. Les blots sont révélés par chimioluminescence avec le kit ECL de GE Healthcare. L'ATP radioactif [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP provient de PerkinElmer Life Sciences. Les filtres en fibre de verre (A/E, 1  $\mu$ m de porosité) proviennent de Pall Corporation, et les filtres de cellulose (GS, 0,22  $\mu$ m de porosité) proviennent de Millipore. La résine Streptavidine-Sépharose

(Streptavidin Sepharose High Performance) provient de GE Healthcare, la résine Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose provient de Qiagen, et la résine Ni<sup>2+</sup>-TED (Protino Ni<sup>2+</sup>-TED silica resin) provient de Macherey-Nagel. Les unités de concentration YM100 proviennent d'Amicon (Millipore). Les colonnes TSK-3000SW et Superdex 200 10/300GL, utilisées pour la chromatographie d'exclusion de taille, proviennent respectivement de Tosoh Biosciences et de GE Healthcare. La préparation des membranes de réticulum sarcoplasmique de lapin a été décrite précédemment (Picard et al., 2006). Les autres produits chimiques utilisés au cours de nos études proviennent généralement de Sigma-Aldrich.

### **II.1.2. Matériels biologiques**

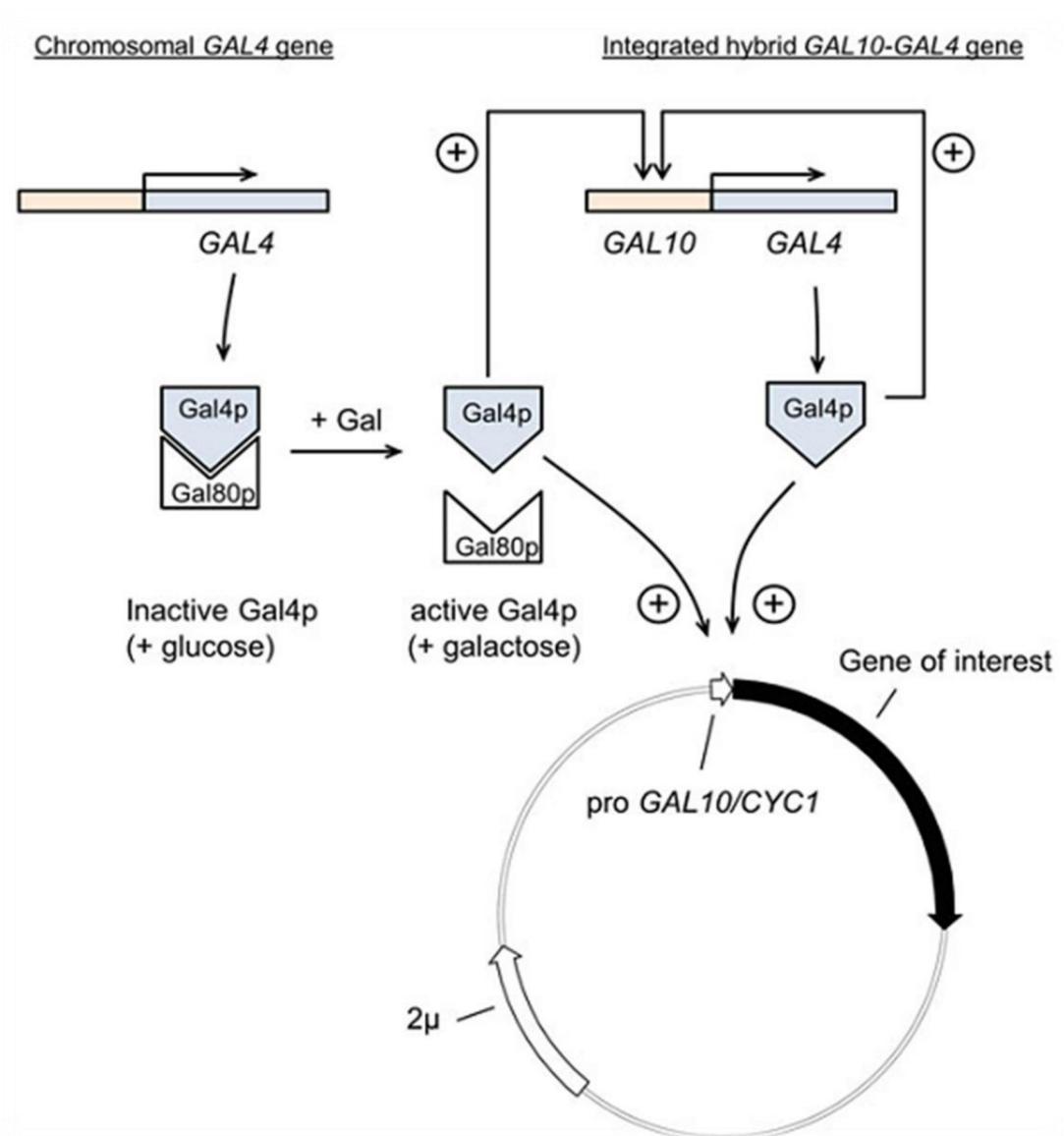
- **Description de la souche bactérienne**

La souche bactérienne JM109 d'*Escherichia coli*, sensible à l'ampicilline, a été utilisée, après l'avoir rendue compétente, pour la propagation et le maintien de plasmides portant ou bien le gène *DRS2* seul ou le gène *CDC50* seul (plasmides « de simple expression »), ou bien les gènes *DRS2* et *CDC50* (plasmides dits « de co-expression »).

- **Description de la souche de levure**

La souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* W303.1b/*GAL4* (a, *leu2-3*, *his3-11*, *trp1-1:TRP1-GAL10-GAL4*, *ura3-1*, *ade2-1*, *can<sup>r</sup>*, *cir<sup>+</sup>*) (Lenoir et al, 2002) a été utilisée dans ce travail pour l'expression de l'ATPase P4 Drs2p (sauvage et mutée) et de sa protéine partenaire Cdc50p. Cette souche se caractérise par la présence dans son chromosome d'une copie supplémentaire du gène *GAL4*, sous le contrôle du promoteur *GAL10*, inductible par le galactose. Le gène *GAL4* code la protéine Gal4p, un facteur de transcription qui active les gènes sous contrôle du promoteur *GAL10* en présence de galactose (Schultz et al, 1987). Dans la souche originelle W303.1b, le gène *GAL4* a été fusionné au promoteur *GAL10*, par recombinaison homologue. En effet, l'expression du gène *GAL4* dans la souche originelle W303.1b est très faible, ce qui limite l'expression des protéines régulées

par Gal4p. La présence de cette copie additionnelle de *GAL4* va permettre la sur-expression de la protéine Gal4p, ce qui va induire la sur-expression des protéines qui sont sous le contrôle du promoteur *GAL10* (Fig. 13), notamment nos protéines d'intérêt (voir plus loin).



**Figure 13: Modification de la souche de levure W303.1b permettant la surproduction de Gal4p, un facteur de transcription activant les gènes sous le contrôle du promoteur *GAL10* (Azouaoui et al, 2016 (Article1)). En présence de glucose, la protéine Gal80p inhibe l'action de Gal4p. Quand le glucose est**

consommé et que le galactose est ajouté au milieu de culture, l'interaction entre Gal4p et Gal80p est rompue, et Gal4p peut alors activer les promoteurs GAL. Comme le gène GAL4 de levure est très faiblement exprimé (1-3 copies par cellule), la souche W303.1b a été génétiquement modifiée en intégrant et fusionnant le gène GAL4 avec le promoteur GAL10 permettant la régulation de la surproduction de Gal4p et l'augmentation de l'expression des gènes qui sont sous le contrôle du promoteur GAL10.

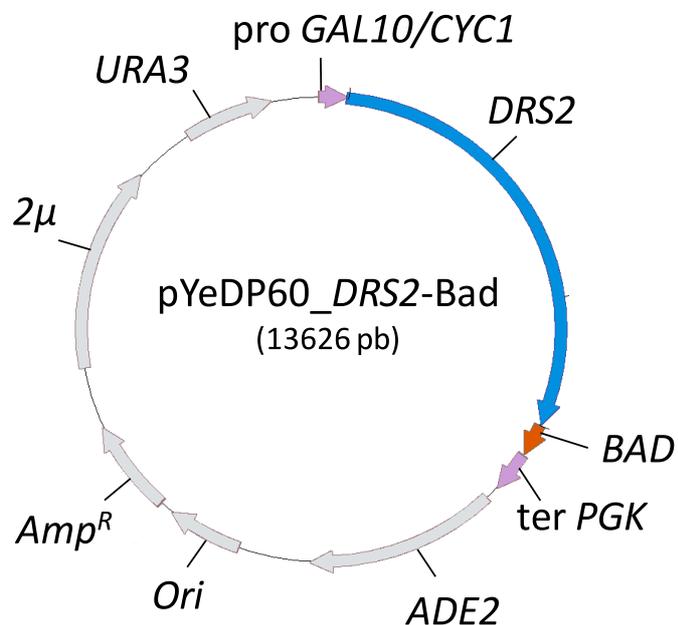
Par ailleurs, comme cette souche de levure présente des mutations dans certains des gènes responsables de la biosynthèse de l'uracile et de l'adénine, elle est auxotrophe pour l'uracile et à l'adénine : l'absence de ces éléments essentiels à la croissance des levures doit être compensée par le milieu de culture ou par complémentation. Cette propriété nous permettra de sélectionner les levures ayant intégré le vecteur (pYeDP60) utilisé.

- **Description du vecteur**

Nous utiliserons pour l'expression de nos protéines d'intérêt des vecteurs « pYeDP60\_gène(s) d'intérêt », formés à partir d'un vecteur de base connu sous le nom de pYeDP60 et des gènes codant pour *DRS2* et/ou *CDC50*. Ces gènes seront sous le contrôle du promoteur *GAL10/CYC1* qui est un promoteur hybride fort, inductible par le galactose. Cette région promotrice contient la séquence transactivatrice du promoteur *GAL10*, séquence reconnue par l'activateur de transcription Gal4p, ainsi que la séquence initiatrice de la transcription du cytochrome c1, *CYC1*. La séquence terminatrice de la transcription est celle de la phosphoglycérate kinase (*terPGK*).

Le vecteur pYeDP60 présente les caractéristiques d'un vecteur navette (Fig. 14). Grâce à la présence de deux origines de répliation, le vecteur peut se répliquer dans la bactérie (*Escherichia coli*) et dans la levure (*Saccharomyces cerevisiae*). En plus de l'origine de répliation bactérienne dite *Ori*, le vecteur contient un marqueur de sélection : le gène de résistance à l'ampicilline (*Amp<sup>R</sup>*), qui permet la sélection des bactéries transformées par ce vecteur. Pour sa répliation dans la levure, le

vecteur contient l'origine de réplication de la levure  $2\mu$ , qui assure la réplication du vecteur et le maintien du nombre de copies dans la lignée cellulaire (entre 5 et 20 copies par levure). En outre, deux marqueurs de sélection, les gènes *ADE2* et *URA3*, permettent la synthèse d'adénine et d'uracile et pallient donc l'auxotrophie de la levure W303.1b/Gal4 pour l'adénine et l'uracile, permettant ainsi la sélection des levures transformées par ce vecteur lorsqu'on les fait pousser dans des milieux sans adénine ou uracile. Lorsqu'on fait ensuite pousser dans des milieux « riches » les levures précédemment sélectionnées dans des milieux « pauvres », la présence du gène *ADE2* responsable de la biosynthèse de l'adénine, présente un autre intérêt, celui de permettre la croissance cellulaire des levures à haute densité sans perte du plasmide d'intérêt. En effet, malgré le fait que les milieux riches sont, comme leur nom le suggère, riches en éléments essentiels (et en particulier adénine et uracile), ils peuvent très vite devenir carencés en adénine si les levures y poussent très concentrées, et seules les levures transformées par le vecteur pYeDP60 peuvent donc rester viables à ces hautes concentrations.



**Figure 14: Cartographie du vecteur pYeDP60 portant un gène d'intérêt (ici *DRS2*).**

## II.2. Stratégies de clonage

### II.2.1. Construction de vecteurs de simple expression portant différentes versions du gène *DRS2* ou du gène *CDC50*

- **Construction des vecteurs portant le gène *DRS2* (*DRS2* sauvage ou *DRS2*<sup>D560N</sup>) avec une étiquette *BAD* en N-terminal de la protéine**

Dans le cadre de notre étude, une étiquette *BAD* (domaine accepteur de biotine) suivie de la séquence du site de coupure à la protéase *TEV* doit être fusionnée du côté 5' du gène *DRS2* (i.e. en N-terminal de la protéine). Dans ce but, des oligonucléotides sens et antisens ont été synthétisés pour amplifier le fragment d'intérêt (par *PCR*) à partir d'une matrice déjà disponible au laboratoire, pYeDP60\_BAD(site Thrombine)*DRS2*, cette matrice correspondant au vecteur pYeDP60 portant le gène *DRS2* et à son extrémité 5' le gène de l'étiquette *BAD*, mais portant entre ces deux gènes la séquence codant le site de coupure à une autre protéase, la thrombine.

L'amorce sens, (5'*CACAGTTTAAACGGTGGT**GAGAATCTTTATTTTCAGGGCGGTGGTGGTGGTA**TGAATGAC* 3'), porte à son extrémité 5' le site de restriction *PmeI* (souligné) suivi de nucléotides codant deux glycines (en italique), de nucléotides codant le site de coupure par la protéase *TEV* (en gras), de nucléotides codant quatre autres glycines (en italique), et enfin de nucléotides permettant, avec la séquence codant les quatre glycines précédentes, l'hybridation à l'extrémité 5' du gène *DRS2*.

L'amorce antisens, elle, (5' *CACAAGCTGCCTGTATCATACTAAC* 3'), s'hybride dans une région en aval du site de restriction unique *NheI*, entre les bases 2875 et 2895 de *DRS2*.

Le fragment amplifié par *PCR* a ensuite été introduit dans le vecteur pJET1.2/blunt en utilisant le kit de clonage CloneJET™ (et en suivant les recommandations du fournisseur). Le vecteur résultant et les vecteurs pYeDP60\_BAD(site Thrombine)*DRS2* et pYeDP60\_BAD(site Thrombine)*DRS2*<sup>D560N</sup> ont été digérés par les enzymes de restriction *PmeI* et *NheI*, et les fragments d'intérêt

ont été isolés. La séquence initialement située entre les sites de restriction *PmeI* et *NheI* dans les vecteurs pYeDP60\_BAD(site Thrombine)*DRS2* et pYeDP60\_BAD(site Thrombine)*DRS2*<sup>D560N</sup> a été remplacée par le fragment de PCR digéré, ceci après ligation. La double digestion rend les extrémités du vecteur et des fragments de PCR cohésives, permettant ainsi une insertion unidirectionnelle du fragment souhaité dans le vecteur. Les produits de ligation obtenus ont été amplifiés dans les bactéries compétentes JM109 transformées par ces derniers. Les vecteurs obtenus et vérifiés par séquençage sont les suivants: pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2* et pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2*<sup>D560N</sup>.

- **Obtention du gène *DRS2*<sup>E342Q</sup>**

L'introduction de la mutation E342Q dans le gène sauvage *DRS2* a été effectuée par mutagenèse dirigée. Les oligonucléotides sens et antisens utilisés pour l'introduction de la mutation s'apparient parfaitement à l'ADN sauvage, sauf au niveau où on souhaite introduire la mutation ponctuelle en remplaçant une base G (à la position n° 1024) du gène *DRS2* sauvage par la base C (en gras sur les oligonucléotides sens et antisens). La séquence de l'oligonucléotide sens était (5' CTGCCAACTTGGATGGTCAAACAAATTTGAAAATC 3') et celle de l'oligonucléotide antisens était (5' GATTTTCAAATTTGTTTGACCATCCAAGTTGGCAG 3'). En présence de ces oligonucléotides et du vecteur portant le gène *DRS2*, une amplification complète du vecteur (par PCR) a permis d'obtenir le vecteur ayant intégré la mutation ponctuelle souhaitée : *DRS2*<sup>E342Q</sup>.

Selon que la matrice utilisée pour la PCR de mutagenèse portait le gène *DRS2* étiqueté par BAD en 5' ou en 3', nous avons en fait généré deux constructions différentes portant le gène *DRS2* muté: pYeDP60\_*DRS2*<sup>E342Q</sup>(site TEV)BAD et pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2*<sup>E342Q</sup>.

- **Obtention de gènes codant des protéines *Drs2p* délétées en N- ou C-terminal**

Pour notre étude, nous avons aussi généré différentes versions tronquées du gène *DRS2*, avec la séquence de l'étiquette BAD du côté 5' ou du côté 3' du gène *DRS2*. Cela donne les constructions suivantes: pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2*

tronqué ou pYeDP60\_*DRS2* tronqué(site TEV)BAD. Dans ce qui suit, le gène codant pour l'une des protéines tronquées, par exemple, celle tronquée juste après l'acide aminé 1302 (Drs2p<sup>1-1302</sup>), sera noté *DRS2*<sup>1-1302</sup>. Le gène *DRS2* complet (ou sauvage), lui, code une protéine Drs2p de 1355 acides aminés.

Six versions tronquées du gène *DRS2* étiqueté en 3' par la séquence codant pour BAD (donc avec l'étiquette BAD positionnée en C-ter de la protéine) ont d'abord été réalisées.

Une de ces versions visait à obtenir une protéine dépourvue de ses acides aminés N-terminaux 1-194, donc à obtenir la protéine tronquée Drs2p<sup>195-1355</sup>. Dans ce but, des oligonucléotides sens et antisens ont été synthétisés pour amplifier par PCR, à partir de la matrice pYeDP60\_*DRS2*(site TEV)BAD, le fragment *DRS2*<sup>195-1355</sup> (exprimant la protéine Drs2p<sup>195-1355</sup>). L'amorce sens (5' CACAGAATTCGAC**ATG**TCCTTCGGTTATAGTGACAAC 3') contribuant à l'amplification du fragment tronqué en 5', porte à son extrémité 5' le site de restriction *EcoRI* (souligné), une séquence Kozak (GAC), et le codon d'initiation (en gras) ; le reste de la séquence s'hybride au gène *DRS2* à partir des bases qui codent l'acide aminé 195. L'amorce antisens (5' CACAAGCTGCCTGTATCATCATAAC 3') s'hybride dans une région en aval du site de restriction unique *NheI*, entre les bases 2874 et 2895 de *DRS2*.

Les cinq autres versions visaient à obtenir des protéines tronquées de leur côté C-terminal, les protéines Drs2p<sup>1-1226</sup>, Drs2p<sup>1-1249</sup>, Drs2p<sup>1-1274</sup>, Drs2p<sup>1-1283</sup>, et Drs2p<sup>1-1302</sup> (correspondent à des délétions du côté 3' du gène *DRS2*). En prenant comme exemple la troncature qui conduit à l'expression de la protéine Drs2p<sup>1-1226</sup>, l'amorce sens

(5' TGGCGAAGCTTTGTAAAGCG 3') s'hybride au gène *DRS2* au niveau de la séquence allant des bases 2749 à 2769, en amont du site de restriction unique *NheI*.

L'amorce antisens

(5' CACAGCGGCCGC**ACCACC**ATAGTACTTCCATAGAAAATCTC 3') comporte le site de restriction unique *NotI* (souligné) suivi de nucléotides codant pour deux glycines (en gras), et le reste de la séquence s'hybride à la région 3' du gène *DRS2* commençant l'hybridation avec les bases qui correspondent à l'acide aminé 1226.

Pour générer les autres délétions de *DRS2* (*DRS2*<sup>1-1249</sup>, *DRS2*<sup>1-1274</sup>, *DRS2*<sup>1-1283</sup>, *DRS2*<sup>1-1302</sup>) la même procédure a été suivie. L'amorce sens est la même que celle utilisée pour générer le fragment correspondant à la troncation qui conduit à l'expression de *Drs2p*<sup>1-1226</sup> et les amorces antisens, dont les séquences sont données dans le tableau 2, comportent à chaque fois le site de restriction unique *NotI* (souligné) suivi de nucléotides codant pour deux glycines (en gras), ainsi que la séquence s'hybridant à la région 3' du gène *DRS2*.

**Tableau 2: Amorces utilisées pour la génération des différentes versions tronquées du gène *DRS2* avec la séquence *BAD* du coté 3'.**

Fragment de PCR	Amorce sens (5'-->3')	Amorce antisens (5'-->3')
<i>DRS2</i> <sup>195-1355</sup> (séquence 923 à 2895 du gène <i>DRS2</i> )	CACAGAATTCGACATGTCC TTCGGTTATAGTGACAAC	CACAAGCTGCCTGTATCATACT AAC
<i>DRS2</i> <sup>1-1226</sup> (séquence 2749 à 3697 du gène <i>DRS2</i> )	TGGCGAAGCTTTGTAAAGC G	CACAG <u>CGGCCGC</u> <b>ACCACC</b> ATA GTACTTCCATAGAAAATCTC
<i>DRS2</i> <sup>1-1249</sup> (séquence 2749 à 3767 du gène <i>DRS2</i> )	TGGCGAAGCTTTGTAAAGC G	CACAG <u>CGGCCGC</u> <b>ACCACC</b> AGA GTCGCTGATATTGTATTTTC
<i>DRS2</i> <sup>1-1274</sup> (séquence 749 à 3839 du gène <i>DRS2</i> )	TGGCGAAGCTTTGTAAAGC G	CACAG <u>CGGCCGC</u> <b>ACCACC</b> TCT TTGTTTTTTCATTCTTTGCA
<i>DRS2</i> <sup>1-1283</sup> (séquence 2749 à 3868 du gène <i>DRS2</i> )	TGGCGAAGCTTTGTAAAGC G	CACAG <u>CGGCCGC</u> <b>ACCACC</b> CTC TTCAGCCTGTGAAA
<i>DRS2</i> <sup>1-1302</sup> (séquence 2749 à 3944 du gène <i>DRS2</i> )	TGGCGAAGCTTTGTAAAGC G	CACAG <u>CGGCCGC</u> <b>ACCACC</b> ACC GTACTTACCTCTCTTTTG

Après génération des fragments de PCR, ces fragments ont été introduits dans le vecteur pJET1.2/blunt. Les vecteurs résultant, tout comme le vecteur pYeDP60\_ *DRS2*(site *Tev*)BAD, ont été digérés soit par les enzymes de restriction *EcoRI* et *NheI* (cas de la délétion en 5') soit par *NheI* et *NotI* (cas des délétions en 3'), et les fragments d'intérêt ont été isolés. La séquence initialement située entre les sites de restriction *EcoRI* et *NheI* ou *NheI* et *NotI* dans le vecteur pYeDP60\_ *DRS2*(site *TEV*)BAD a été remplacée par l'un des fragments de PCR digérés, ceci après ligation. Les produits de ligation obtenus ont été amplifiés dans les bactéries compétentes JM109 transformées par ces derniers. Les vecteurs obtenus et vérifiés par séquençage sont les suivants : pYeDP60\_ *DRS2*<sup>195-1355</sup>(site *TEV*)BAD, pYeDP60\_ *DRS2*<sup>1-1226</sup>(site *TEV*)BAD, pYeDP60\_ *DRS2*<sup>1-1249</sup>(site *TEV*)BAD, pYeDP60\_ *DRS2*<sup>1-1274</sup>(site *TEV*)BAD, pYeDP60\_ *DRS2*<sup>1-1283</sup>(site *TEV*)BAD, pYeDP60\_ *DRS2*<sup>1-1302</sup>(site *TEV*)BAD.

Ensuite, pour les constructions codant des protéines tronquées portant l'étiquette BAD positionnée en N-ter de la protéine, pYeDP60\_ *BAD*(site *TEV*)*DRS2* *tronqué*, nous n'avons engendré cette fois que cinq versions tronquées du gène *DRS2*, versions pour lesquelles la délétion a été effectuée uniquement du côté 3' du gène. En prenant comme exemple la protéine tronquée *Drs2p*<sup>1-1226</sup>, l'amorce sens utilisée est la même que celle utilisée précédemment pour engendrer le gène *DRS2* délété du côté 3' et ayant l'étiquette BAD du côté 3'. L'amorce antisens (5' CACAGAGCTCATAGTACTTCCATAGAAAATCTC 3') comporte le site de restriction unique *SacI* (souligné) suivi d'une séquence s'hybridant à la région 3' du gène *DRS2*, variable selon les troncatures réalisées. Pour générer les autres délétions de gène *DRS2* (*DRS2*<sup>1-1249</sup>, *DRS2*<sup>1-1274</sup>, *DRS2*<sup>1-1283</sup>, *DRS2*<sup>1-1302</sup>) la même procédure a été suivie. L'amorce sens est la même que celle utilisée pour générer le gène exprimant la troncature *Drs2p*<sup>1-1226</sup> et les amorces antisens, regroupées dans le Tableau 3, comportent à chaque fois le site de restriction unique *SacI* (souligné) et la séquence qui s'hybride à la région 3' du gène *DRS2*.

**Tableau 3: Amorces utilisées pour la génération du gène *DRS2* délété avec la séquence *BAD* du coté 5'.**

Fragment de PCR	Amorce sens (5'-->3')	Amorce antisens (5'-->3')
<i>DRS2</i> <sup>1-1226</sup> (séquence 2749 à 3697 du gène <i>DRS2</i> )	TGGCGAAGCTTTGTAAAGC G	CACAGAGCTCATAGTACTTCCA TAGAAAATCTC
<i>DRS2</i> <sup>1-1249</sup> (séquence 2749 à 3767 du gène <i>DRS2</i> )	TGGCGAAGCTTTGTAAAGC G	CACAGAGCTCAGAGTCGCTGA TATTGTATTC
<i>DRS2</i> <sup>1-1274</sup> (séquence 749 à 3839 du gène <i>DRS2</i> )	TGGCGAAGCTTTGTAAAGC G	CACAGAGCTCTCTTTGTTTTT CATTCTTTGCA
<i>DRS2</i> <sup>1-1283</sup> (séquence 2749 à 3868 du gène <i>DRS2</i> )	TGGCGAAGCTTTGTAAAGC G	CACAGAGCTCACCTCTTCAG CCTGTGAAA
<i>DRS2</i> <sup>1-1302</sup> (séquence 2749 à 3944 du gène <i>DRS2</i> )	TGGCGAAGCTTTGTAAAGC G	CACAGAGCTCACCGTACTTAC CTCTCTTTTG

Après amplification par PCR, les fragments et la matrice pYeDP60\_BAD(TEV)*DRS2* ont été soumis à une double digestion par les enzymes de restrictions *NheI* et *SacI* et les fragments d'intérêt ont été isolés. La séquence initialement située entre les sites de restriction *NheI* et *SacI* dans le gène *DRS2* a été remplacée par l'un des fragments de PCR digérés, par ligation. Les vecteurs obtenus et vérifiés par séquençage sont les suivants: pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2*<sup>1-1226</sup>, pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2*<sup>1-1249</sup>, pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2*<sup>1-1274</sup>, pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2*<sup>1-1283</sup>, pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2*<sup>1-1302</sup>.



été remplacée par l'un des fragments de PCR digérés, après ligation. Les vecteurs obtenus et vérifiés par séquençage sont les suivants: pYeDP60\_HIS<sub>10</sub>(site TEV)CDC50 et pYeDP60\_HIS<sub>10</sub>CDC50.

### **II.2.2. Construction des vecteurs permettant la co-expression des gènes *DRS2* et *CDC50***

Dans le but de générer le vecteur de co-expression portant à la fois les gènes *DRS2* et *CDC50*, la cassette *GAL10-CDC50-PGK* a été amplifiée par PCR à partir des matrices pYeDP60\_CDC50(site TEV)HIS<sub>10</sub>, pYeDP60\_HIS<sub>10</sub>(site TEV)CDC50, ou pYeDP60\_HIS<sub>10</sub>CDC50. L'amorce sens utilisée, (5' CACACCCTGCAGGTGCATGTATACTAACTCACAA 3'), porte le site de restriction *SbfI* (souligné), et le reste de la séquence s'hybride en 5' de la séquence promotrice *GAL10*. L'amorce antisens (5' CACACCCTGCAGGAGCTATGACCATGATTACGC 3') porte le même site de restriction que l'amorce sens (*SbfI*), et le reste de la séquence s'hybride en 3' de la séquence terminatrice de la *PGK*. Après amplification des différentes cassettes, ces dernières ont été introduites dans le vecteur pJET1.2/blunt. Les vecteurs résultant ont été amplifiés dans les bactéries compétentes JM109 transformées par ces derniers. Les vecteurs obtenus et vérifiés par séquençage sont les suivants: pJET\_GAL10-CDC50(site TEV)HIS<sub>10</sub>-PGK, pJET\_GAL10- HIS<sub>10</sub>(site TEV)CDC50-PGK, et pJET\_GAL10- HIS<sub>10</sub>CDC50-PGK.

Les vecteurs de simple expression portant le gène *DRS2* (sauvage, muté, ou tronqué), et le plasmide pJET contenant l'une des configurations de la cassette *GAL10-CDC50-PGK*, ont été digérés par l'enzyme de restriction *SbfI* (ce site est unique dans les vecteurs de simple expression). Afin d'éviter une recircularisation des vecteurs sans intégration de l'une des configurations de la cassette, une étape de déphosphorylation des vecteurs a précédé l'étape de ligation. Ainsi chacune des configurations de la cassette *GAL10-CDC50-PGK* a pu être intégrée dans chacune des différentes constructions des vecteurs de simple expression, permettant d'obtenir les vecteurs de co-expression suivant:

- BAD en 3' de *DRS2* et HIS<sub>10</sub>-site TEV en 3' de *CDC50*  
 pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2*\_HIS<sub>10</sub> (site TEV)*CDC50*  
 pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2*<sup>D560N</sup>\_HIS<sub>10</sub> (site TEV)*CDC50*  
 pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2*<sup>E342Q</sup>\_HIS<sub>10</sub> (site TEV)*CDC50*  
 pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2*<sup>1-1226</sup>\_HIS<sub>10</sub> (site TEV)*CDC50*  
 pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2*<sup>1-1249</sup>\_HIS<sub>10</sub> (site TEV)*CDC50*  
 pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2*<sup>1-1274</sup>\_HIS<sub>10</sub> (site TEV)*CDC50*  
 pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2*<sup>1-1283</sup>\_HIS<sub>10</sub> (site TEV)*CDC50*  
 pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2*<sup>1-1302</sup>\_HIS<sub>10</sub> (site TEV)*CDC50*

- BAD en 5' de *DRS2* et HIS<sub>10</sub> en 5' de *CDC50*  
 pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2*\_HIS<sub>10</sub>*CDC50*  
 pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2*<sup>D560N</sup>\_HIS<sub>10</sub>*CDC50*  
 pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2*<sup>E342Q</sup>\_HIS<sub>10</sub>*CDC50*  
 pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2*<sup>1-1226</sup>\_HIS<sub>10</sub>*CDC50*  
 pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2*<sup>1-1249</sup>\_HIS<sub>10</sub>*CDC50*  
 pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2*<sup>1-1274</sup>\_HIS<sub>10</sub>*CDC50*  
 pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2*<sup>1-1283</sup>\_HIS<sub>10</sub>*CDC50*  
 pYeDP60\_BAD(site TEV)*DRS2*<sup>1-1302</sup>\_HIS<sub>10</sub>*CDC50*

- BAD en 5' de *DRS2* et HIS<sub>10</sub>-Tev en 5' de *CDC50*  
 pYeDP60\_*DRS2*(site TEV)BAD\_*CDC50*(Tev)HIS<sub>10</sub>  
 pYeDP60\_*DRS2*<sup>E342Q</sup>(site TEV)BAD\_*CDC50*(site TEV)HIS<sub>10</sub>  
 pYeDP60\_*DRS2*<sup>195-1355</sup>(site TEV)BAD\_*CDC50*(Site TEV)HIS<sub>10</sub>  
 pYeDP60\_*DRS2*<sup>1-1226</sup>(site TEV)BAD\_*CDC50*(site TEV)HIS<sub>10</sub>  
 pYeDP60\_*DRS2*<sup>1-1249</sup>(site TEV)BAD\_*CDC50*(site TEV)HIS<sub>10</sub>  
 pYeDP60\_*DRS2*<sup>1-1274</sup>(site TEV)BAD\_*CDC50*(site TEV)HIS<sub>10</sub>  
 pYeDP60\_*DRS2*<sup>1-1283</sup>(site TEV)BAD\_*CDC50*(site TEV)HIS<sub>10</sub>  
 pYeDP60\_*DRS2*<sup>1-1302</sup>(site TEV)BAD\_*CDC50*(site TEV)HIS<sub>10</sub>

## II.3. Détails de diverses méthodes de Biologie Moléculaire

### II.3.1. PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique utilisée pour l'amplification ciblée d'un fragment d'ADN, et cela grâce à l'utilisation de deux amorces nucléotidiques, l'une complémentaire de l'extrémité (5') et l'autre de l'extrémité (3') du fragment à amplifier. La PCR se fait en plusieurs cycles et chaque cycle comporte trois étapes, l'étape de dénaturation qui vise à rompre les liaisons hydrogène entre les deux brins d'ADN, l'étape d'hybridation qui vise à promouvoir l'association des amorces avec les brins d'ADN, et l'étape d'élongation qui vise à synthétiser la partie complémentaire du fragment situé entre les deux amorces.

Pour l'obtention du gène *DRS2*<sup>E342Q</sup>, l'amplification a été réalisée avec trois quantités différentes de matrice ADN (5 ng, 10 ng et 50 ng), 2,5 µM de chacune des amorces, 200 µM d'un mélange équimolaire de dNTPs, 10 µL de tampon 5X fourni avec la polymérase, et de l'eau distillée (filtrée et stérilisée) en quantité appropriée pour avoir un volume réactionnel final de 50 µL. On ajoute ensuite 1 unité de l'ADN polymérase Phusion.

Le programme de PCR qui a été utilisé est présenté dans le Tableau 4.

**Tableau 4.**

Étape	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	98 °C	1 minute	1
Dénaturation	98 °C	30 secondes	15
Hybridation	55 °C	1 minute	
Élongation	72 °C	7 minutes	
Élongation finale	72 °C	10 minutes	1

Pour l'obtention des gènes *DRS2* sauvage, *DRS2*<sup>D560N</sup> avec la séquence de l'étiquette BAD du côté 5', des différentes versions tronquées du gène *DRS2*, et des différentes configurations de la cassette *GAL10-CDC50-PGK*, l'amplification des fragments d'ADN a été réalisée avec ~0,5 ng de matrice ADN, 0,5 µM de chacune des amorces, 200 µM de mélange équimolaire de dNTPs, 10 µL de tampon 5X fourni avec la polymérase, et de l'eau distillée (filtrée et stérilisée) en quantité appropriée pour avoir un volume réactionnel final de 50 µL. On ajoute ensuite 1 unité de l'ADN polymérase Phusion.

Les programmes de PCR qui ont été utilisés pour l'amplification des différents fragments de PCR sont reportés dans les tableaux suivants:

**Tableau 5: Obtention des gènes *DRS2* sauvage et *DRS2*<sup>D560N</sup> ayant l'étiquette BAD en 5' clivable par un site TEV**

Étape	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	98 °C	1 minute	1
Dénaturation	98 °C	30 secondes	35
Hybridation	60 °C	30 secondes	
Élongation	72 °C	1 minute et 30 secondes (30 secondes/kb)	
Élongation finale	72 °C	5 minutes	1

**Tableau 6: Obtention des différentes versions tronquées du gène *DRS2*.**

Étape	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	98 °C	3 minutes	1
Dénaturation	98 °C	30 secondes	30
Hybridation	55 °C	1 minute	
Élongation	72 °C	30 secondes/kb	
Élongation finale	72 °C	5 minutes	1

**Tableau 7: Obtention du gène CDC50 ayant l'étiquette HIS<sub>10</sub> en 5', avec ou sans le site de coupure à la TEV.**

Étape	Température	Temps	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	98 °C	1 minute	1
Dénaturation	98 °C	30 secondes	35
Hybridation	60 °C	30 secondes	
Élongation	72 °C	30 secondes	
Élongation finale	72 °C	5 minutes	1

**Tableau 8: Amplification des différentes configurations de la cassette GAL10-CDC50-PGK.**

Étape	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95°C	3 minutes	1
Dénaturation	94 °C	30 secondes	35
Hybridation	55 °C	30 secondes	
Élongation	72 °C	2 minutes	
Élongation finale	72 °C	5 minutes	1

### **II.3.2. Électrophorèse sur gel d'agarose**

La visualisation des produits de PCR, des produits de digestion et des produits de ligation, ainsi que la quantification de fragments d'ADN, se fait par électrophorèse sur gel d'agarose. La concentration du gel d'agarose varie entre 0,8 % et 1 % selon la taille des fragments d'ADN à faire migrer. L'agarose est dissous dans du tampon TAE (40 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM acétate, 1 mM EDTA), et la migration des fragments d'ADN se fait dans le même tampon TAE durant environ 2 h à 60 V. L'échantillon à analyser est composé de l'ADN à analyser, de tampon de

charge 1x (0,5 % (p/v) SDS, 0,01 M EDTA, 5 % glycérol, 0,04 % (p/v) bleu de bromophénol) et d'eau filtrée.

Après la migration, le gel est incubé dans un bain de bromure d'éthidium (BET), un agent intercalant de l'ADN, à 1 µg/ml pendant 10 minutes, puis incubé dans un bain de MgSO<sub>4</sub> à 1 mM pendant 10 minutes, dans le but d'éliminer l'excès de BET. Après la coloration, le gel est soumis à un rayonnement ultraviolet qui fait apparaître le BET intercalé dans les fragments d'ADN.

La vérification de la taille des fragments d'ADN et leur quantification se fait grâce à l'utilisation d'un marqueur de poids moléculaire

### ***II.3.3. Nettoyage des produits de PCR et des produits de digestion***

Deux méthodes ont été utilisées pour le nettoyage des fragments d'ADN.

La première méthode, qui a été utilisée dans la plupart des cas, fait usage du kit 'Nucleospin Gel and PCR Clean-up' (en suivant le protocole qui lui est associé). Afin d'améliorer l'élution des fragments d'ADN, de l'eau distillée filtrée et préchauffée à 70 °C a été utilisée.

Avec la deuxième méthode, les produits de PCR et de digestion ont été nettoyés sur une résine Sephadex G100, qui permet l'élimination des molécules ayant une taille inférieure à 100 kDa (amorces et certaines protéines) et le tampon. La résine a été suspendue dans 100 mL de tampon filtré (10 mM Tris pH 8, 0,1 mM EDTA) puis autoclavée. Ensuite, 850 µL de résine ont été déposés sur la partie supérieure du tube Spin module (mp Biomedicals). Une centrifugation à 1000 g<sub>av</sub> (rotor AM19, centrifugeuse Jouan MR22) pendant 3 minutes a été effectuée afin d'éliminer le tampon. Les produits de PCR ou de digestion ont été déposés délicatement en haut de la résine, ensuite une centrifugation à 1000 g<sub>av</sub> (rotor AM19, Jouan MR22) pendant 8 minutes a été faite. Le filtrat a été conservé.

### **II.3.4. Concentration des fragments d'ADN**

Afin d'obtenir une solution concentrée des fragments d'ADN préparés, ces derniers ont été précipités à l'éthanol (en particulier pour concentrer les produits de digestion nettoyés avec la résine Sephadex G100, l'étape de nettoyage conduisant à la dilution de l'échantillon). À chaque fois le volume des produits de digestion a été ajusté à 160  $\mu\text{L}$  (avec de l'eau distillée et filtrée), et il a été ensuite ajouté 53  $\mu\text{L}$  d'acétate d'ammonium à 10 M et 426  $\mu\text{L}$  d'éthanol 100 % (cet éthanol pur est conservé à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Après avoir vortexé le mélange, celui-ci a été mis pendant 30 minutes à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , puis centrifugé à 13000 rpm (rotor 3015, Allegra centrifuge) pendant 30 minutes à  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Après l'élimination du surnageant, 1 mL d'éthanol à 70 % (conservé à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a été ajouté et le mélange a été à nouveau vortexé et centrifugé à 13000 rpm (rotor 3015, Allegra centrifuge) pendant 30 minutes à  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Le deuxième surnageant a été délicatement éliminé lui aussi. Le tube contenant le culot d'ADN a été lyophilisé pendant 30 minutes, bouchon ouvert, et le culot d'ADN a été finalement repris dans un petit volume (typiquement 10-30 $\mu\text{L}$ ) avec de l'eau distillée et filtrée.

### **II.3.5. Digestion enzymatique**

Les enzymes de restriction utilisées pour le clonage des gènes *DRS2* (sauvage ou tronqué) et *CDC50*, dans les vecteurs de simple expression ou de co-expression, sont utilisées à 10 unités/ $\mu\text{g}$  d'ADN dans un volume final de 30  $\mu\text{L}$ . La réaction de digestion se fait à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  selon les recommandations du fournisseur.

Dans le cas du gène *DRS2*<sup>E342Q</sup>, et afin d'éliminer l'ADN parental pYeDP60\_*DRS2* qui a servi de matrice pour l'amplification du vecteur pYeDP60\_*DRS2*<sup>E342Q</sup>, on a utilisé l'enzyme de restriction *DpnI*. Cette enzyme ne coupe au niveau de son site de restriction que lorsque ce dernier est méthylé, et l'intérêt de cette digestion est donc d'éliminer l'ADN parental méthylé utilisé pour la réalisation de la PCR, et de ne garder que le produit de la PCR qui nous intéresse, pYeDP60\_*DRS2*<sup>E342Q</sup>. Il a été utilisé 1  $\mu\text{L}$  de *DpnI* (20000 unités/mL) dans un volume

final de 15 à 20  $\mu\text{L}$ , la réaction de digestion se faisant à 37 °C durant 1 heure et demie.

### ***II.3.6. Purification d'ADN à partir du gel d'agarose***

Après avoir fait migrer les fragments d'ADN sur gel d'agarose et avoir coloré le gel, le gel est mis sur une table UV (à faible rayonnement pour ne pas abîmer l'ADN ; Dark Reader, Clarechemical) afin de visualiser les fragments d'intérêt. Après excision des bandes d'ADN à purifier à l'aide d'un scalpel, l'extraction des fragments d'ADN du gel a été réalisée grâce à l'utilisation du kit Nucleospin Gel and PCR Clean-up. L'ADN a été élué par de l'eau distillée (filtrée et préchauffée à 70 °C).

### ***II.3.7. Déphosphorylation de l'extrémité 5'***

Pour construire le vecteur de co-expression, la cassette *GAL10-CDC50-PGK* digérée par *SbfI* (2 sites de restriction présents sur la cassette) est insérée dans le vecteur de simple expression contenant le gène *DRS2* et lui-même digéré par *SbfI*. Ce vecteur est ensuite soumis à une déphosphorylation, dans un volume de 20- 30  $\mu\text{L}$ , en utilisant la phosphatase alcaline de l'intestin de veau à raison de 0,5 unité/ $\mu\text{g}$  d'ADN ; la réaction se fait à 37 °C durant 1 heure, typiquement dans 20-30  $\mu\text{L}$ .

### ***II.3.8. Ligation***

La ligation des extrémités compatibles entre les fragments de PCR et les plasmides a été faite grâce à l'ADN ligase du phage T4, utilisée à 400 unités/10 à 20  $\mu\text{L}$  du mélange réactionnel. À chaque fois que cela a été possible, 50-100 ng de plasmide ont été utilisés pour chaque réaction de ligation. Le ratio insert/plasmide (mol/mol) qui a été utilisé pour l'obtention des vecteurs de simple expression était de 3:1, alors que pour l'obtention des vecteurs de co-expression le ratio était de 10:1. La réaction a été effectuée à la température de 16 °C durant 4 heures.

L'insertion de la cassette *GAL10-CDC50-PGK*, quelle que soit sa configuration, dans le plasmide pJET, a été effectuée selon le protocole du kit de clonage CloneJET™.

### ***II.3.9. Préparation de bactéries compétentes***

Les bactéries JM109 d'*E. coli* sont rendues compétentes (i.e. elles acquièrent la capacité à incorporer de l'ADN) grâce à la méthode dite « du chlorure de calcium ». Des colonies de bactéries JM109 ont été inoculées dans 5 mL de milieu LB (10 g/L bacto-tryptone, 5 g/L yeast extract, 10 g/L NaCl), puis incubées à 37 °C, sous agitation de 200 rpm durant une nuit (préculture). Le matin suivant, 100 mL de milieu LB ont étéensemencés avec 1 mL de la préculture, puis incubés à 37 °C, sous agitation de 200 rpm, jusqu'à atteindre une densité optique (DO) à 600 nm de 0,3 à 0,5 sur un spectrophotomètre Novaspec II (Pharmacia Biotech). Ensuite les 100 mL de culture ont été centrifugés à 2000  $g_{av}$  (rotor SX 4400) pendant 5 minutes à 4 °C. Le culot obtenu a été resuspendu avec 50 mL d'un tampon calcium alcalin froid (50 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris pH 8), et laissé dans la glace pendant 20 minutes. Le mélange a été centrifugé de nouveau (à 2000  $g_{av}$ , rotor SX 4400, pendant 5 minutes et à 4 °C). Le nouveau culot a été resuspendu dans 1,5 mL du même tampon et laissé dans la glace durant 1 heure. Après avoir ajouté le glycérol à la concentration final de 20 % (v/v), les bactéries compétentes ont été aliquotées et conservées à -80 °C après congélation à l'azote liquide.

### ***II.3.10. Transformation des bactéries compétentes par choc thermique***

Les produits de ligation ont été mélangés à 100 µL de bactéries compétentes, puis 7,5 µL de CaCl<sub>2</sub> à 500 mM a été ajouté, ainsi que de l'eau distillée et filtrée de façon à atteindre 150 µL (à 25 mM de CaCl<sub>2</sub>). Le mélange a été refroidi dans la glace pendant 30 minutes. Ensuite, un choc thermique a été réalisé, pendant 1 minute à 42 °C. 1 mL de milieu LB a été ajouté au mélange, et les cellules ont été incubées pendant 1 heure à 37 °C, sous une agitation de 180 rpm. La culture a été alors centrifugée à 1000  $g_{av}$  (rotor 301.5, Allegra centrifuge) durant 5 minutes à température ambiante ; 1 ml du surnageant a été jeté, et le culot a été resuspendu

dans le volume restant (~150µL). La suspension a été étalée sur une boîte de sélection LB-ampicilline (0,1 mg/mL ampicilline) et a été incubée dans une étuve à 37 °C pendant toute une nuit.

### **II.3.11. Criblage des clones**

A partir des colonies bactériennes qui ont poussé sur boîte LB-ampicilline, des mini-préparations d'ADN ont été faites pour identifier les plasmides ayant intégré les fragments ADN d'intérêt. La purification de l'ADN plasmidique a été faite en suivant le protocole associé au kit Nucleospin Plasmid QuickPure Column (pour améliorer l'élution des vecteurs, qui sont de grande taille, de l'eau distillée, filtrée et préchauffée à 70 °C a été utilisée). Chaque préparation d'ADN plasmidique est soumise à une digestion enzymatique pour vérifier les tailles obtenues, avant d'être séquencée pour confirmation de sa séquence finale.

Dans certains cas, avant d'effectuer les mini-préparations d'ADN plasmidique, une étape de PCR sur colonies a été effectuée. Des colonies isolées ayant poussé sur boîte LB-ampicilline après transformation ont été prélevées à l'aide d'un cône, repiquées sur une nouvelle boîte LB-ampicilline, et incubées dans l'étuve à 37 °C. Le cône a ensuite été lavé dans 20 µL d'eau distillée et filtrée, et le mélange a été chauffé à 100 °C pour la lyse cellulaire. Une PCR (avec les amorces adéquates) a été effectuée sur le lysat cellulaire afin de vérifier la présence de l'insert.

Pour les vecteurs de co-expression, les amorces utilisées pour la vérification de l'insertion dans le bon sens de la cassette comportant le gène *CDC50* (dans le vecteur de simple expression comportant le gène *DRS2* sauvage ou muté) sont: l'amorce sens (5' GTAGCATAAATTACTATACTTCTA 3'), qui s'hybride au niveau de la séquence du promoteur *GAL10/CYC1*, et l'amorce antisens (5' GTTAAATTATAGTCTTCTGTGTC 3'), qui s'hybride au niveau du gène *CDC50*. Le programme de PCR est présenté dans le tableau 9.

**Tableau 9.**

Étape	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95°C	3 minutes	1
Dénaturation	94°C	30 secondes	35
Hybridation	55°C	30 secondes	
Élongation	72°C	1 minute/kb	

## **II.4. Expression des protéines Drs2p et Cdc50p**

### **II.4.1. Transformation de la souche de levure W303.1b/GAL4**

Dès l'obtention des vecteurs de simple expression et de co-expression (qui portent le gène *URA3*), la souche sauvage de levure W303.1b/GAL4 (qui est mutée pour ce gène) a été transformée par l'un de ces vecteurs. La transformation des levures a été réalisée grâce à l'utilisation de la méthode de l'acétate de lithium/SSD (sperme de saumon dénaturé)/PEG (Gietz et al., 1995).

À partir d'un stock glycérol contenant la souche sauvage W303.1b/GAL4, une boîte S6AU (1 g/L bactocasamino, 7 g/L yeast nitrogen base (+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 2 % glucose, 2 % agar, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  adénine, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  uracile) a étéensemencée. La boîte est incubée à 28 °C durant environ 3 jours. Quelques colonies sont inoculées dans 5 mL de milieu liquide S6AU (1 g/L bactocasamino, 7 g/L yeast nitrogen base (+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 2 % glucose, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  adénine, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  uracile), et incubées durant 24 h à 28 °C sous une agitation de 180 rpm, de façon à ce que les cellules en croissance atteignent le début de la phase stationnaire (avec une absorbance à 600 nm autour de 2). Ensuite 2 mL de culture sont centrifugés 5 minutes à 3000  $g_{av}$  (rotor 301.5, Allegra centrifuge). 50  $\mu\text{L}$  de sperme de saumon à 2 mg/mL, préalablement dénaturé 5 minutes à 100 °C et refroidi sur glace, sont ajoutés au culot cellulaire. Ensuite, 3  $\mu\text{L}$  de l'ADN plasmidique sont ajoutés. Ce mélange est repris dans 500  $\mu\text{L}$  de tampon PLATE (4 % PEG, 98 mM LiAc, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA). 20

$\mu\text{L}$  de DTT à 1 M sont ajoutés et le mélange est incubé pendant toute la nuit à la température de 20 °C. Par la suite, le mélange est centrifugé pendant 5 minutes à 1000 g. Le culot est repris dans 100  $\mu\text{L}$  du milieu sélectif S6A (1 g/L bactocasamino, 7 g/L yeast nitrogen base (+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 2 % glucose, 2 % agar, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  adénine). La suspension est étalée sur boîte de sélection S6A, et la boîte est incubée à 28 °C pendant 3 à 5 jours. Seules les cellules ayant été transformées par l'ADN plasmidique peuvent croître sur la boîte de sélection.

Les souches de levures qui ont été transformées sont : la souche sauvage W303.1b/*GAL4*,  $\Delta\text{drs2}$  et  $\Delta\text{cdc50}$ . Les souches  $\Delta\text{drs2}$  et  $\Delta\text{cdc50}$  ont été transformées par les vecteurs de simple expression en suivant la même méthode que celle utilisées pour la levure sauvage. Les souches transformées ont été stockées dans du glycérol à -80 °C après congélation rapide à l'azote liquide.

#### ***II.4.2. Test de croissance des levures à basse température***

Afin d'effectuer ce test, chacune des souches transformées par le plasmide approprié et stockées à -80 °C a été étalée sur boîte S6A, ensuite incubée à 28 °C environ 3 jours. Quelques colonies ont été inoculées dans 5 mL du milieu liquide S6A et incubées à 28 °C toute la nuit, sous une agitation de 180 rpm. Quand l'absorbance à 600 nm est autour de 2, chacune des cultures est diluée dans le milieu inductif S5AF (1 g/L bactocasamino, 7 g/L yeast nitrogen base (+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 2 % galactose, 1 % fructose, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  adénine) de façon à atteindre 0,02  $\text{DO}_{600}$ , 0,002  $\text{DO}_{600}$ , ou 0,0002  $\text{DO}_{600}$ . Ensuite 5  $\mu\text{L}$  de chaque dilution ont été mis sur boîte S5AF (1 g/L bactocasamino, 7 g/L yeast nitrogen base (+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 2 % galactose, 1 % fructose, 1,5 % agar, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  adénine). Les levures ont été incubées à la température permissive de 28 °C pendant 2 à 3 jours ou à la température répressive de 20 °C pendant 5 à 6 jours.

#### ***II.4.3. Expression de Drs2p et de Cdc50p en milieu minimum***

Après avoir obtenu les souches de levures transformées par les plasmides d'intérêt, un test d'expression en milieu minimum a été réalisé afin de discriminer rapidement les gènes qui s'expriment de ceux qui ne s'expriment pas. Les différentes souches transformées par l'un des vecteurs d'intérêt ont été étalées sur boîte S6A et incubées à 28 °C pendant environ 3 jours. Des colonies de chaque souche ont été inoculées dans 5 mL du milieu S6A liquide (pré-culture), puis incubées 24 heures à 28 °C sous une agitation de 180 rpm. Pour chacune des pré-cultures l'absorbance à 600 nm a été mesurée. Ensuite, les différentes pré-cultures ont été diluées dans du milieu S5A (1 g/L bactocasamino, 7 g/L yeast nitrogen base (+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 2 % galactose, 1,5 % agar, 20 µg/ml adénine), milieu inductif, de sorte à avoir une  $\text{DO}_{600}$  d'environ 0,2 dans un volume de 20 mL. La culture a été incubée pendant 17 heures à 28 °C sous une agitation de 180 rpm. Après 17 heures d'incubation, la  $\text{DO}_{600}$  est aux alentours de 0,5. Les cellules sont soumises à un fractionnement membranaire après ce temps d'incubation.

#### ***II.4.4. Expression de Drs2p et de Cdc50p en milieu riche***

Les différentes souches de levures transformées par les vecteurs d'intérêt ont été étalées sur boîte S6A et laissées à 28 °C pendant environ 3 jours. Quelques colonies ont étéensemencées dans 5 mL du milieu liquide S6A et incubées à 28 °C, pendant 24 heures sous une agitation de 180 rpm, de façon à atteindre une  $\text{DO}_{600} \sim 3$  (pré-culture 1, « PC1 »). Ensuite, 50 mL du milieu S6A ont été inoculés par PC1 de telle sorte à avoir une  $\text{DO}_{600}$  de 0,1 (PC2). La PC2 a été incubée pendant 24 heures à 28 °C sous une agitation de 180 rpm. Au même moment, le milieu riche YPGE2X (460 mL de milieu mais sans glucose et sans éthanol à ce stade) a été préincubé dans des Fernbachs à 28 °C, sous une agitation de 130 rpm (les Fernbachs sont « bafflés » pour permettre une meilleure oxygénation du milieu). Après 24 heures de croissance de la PC2, le milieu riche, auquel il a été ajouté 1 % de glucose et 2,7 % d'éthanol, estensemencé avec la PC2 de telle sorte à avoir une  $\text{DO}_{600}$  à 0,05, dans un volume final de 500 mL. La culture est incubée à 28 °C pendant 36 heures sous une agitation de 130 rpm. Au bout de 36 heures de croissance, le glucose,

répresseur de l'expression de nos gènes d'intérêt, est complètement consommé, et le substrat qui le remplace pour la croissance des levures est l'éthanol. La première induction de l'expression protéique est réalisée après les 36 heures de croissance (la  $DO_{600}$  est d'environ de 10), et déclenchée par l'ajout de 2 % (p/v) de galactose. Avant l'ajout du galactose, la culture a été refroidie en mettant les Fernbachs dans un bain eau/glace pendant environ 10 minutes pour que la température de la culture retombe aux alentours de 18 °C. La culture est ensuite incubée à 18 °C sous une agitation de 130 rpm. 13 heures plus tard, la deuxième induction est réalisée, toujours en ajoutant 2 % de galactose. Après 5 heures d'expression à 18 °C sous une agitation de 130 rpm, la culture est récoltée.

## **II.5. Analyse de l'expression des protéines d'intérêt**

Après expression en milieu minimum ou bien en milieu riche, les préparations de fractions membranaires sont réalisées (à 4 °C) comme suit.

### ***II.5.1. Préparation de fractions membranaires après expression en milieu minimum***

Suite aux 17 heures d'expression en milieu minimum inductif S5A, les cellules sont récoltées après une centrifugation à 1000  $g_{av}$ , à 4 °C durant 10 minutes. Ensuite les cellules sont lavées avec 1 mL de tampon TEPI froid (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 5 mM EDTA), auquel a été ajouté juste avant utilisation 1x du cocktail d'antiprotéases (Sigma) (1 comprimé SigmaFast pour 100 mL), 1 mM de PMSF et 20 mM de  $NaN_3$ . La suspension est transférée dans un tube de 1,5 mL et centrifugée à 1400  $g_{av}$ , à 4 °C durant 10 minutes. Le culot est repris dans 100  $\mu$ L de tampon TEPI froid avec le cocktail d'antiprotéases, 1 mM de PMSF et 20 mM de  $NaN_3$  fraîchement ajoutés. Des billes de verres (0,5 mm de diamètre) sont ajoutées à la suspension qui est mise par la suite sur vibrax (Fisher Scientific) à vitesse moyenne pendant 20 minutes à 4 °C, dans le but d'effectuer la lyse cellulaire. Du tampon TEPI froid (plus les inhibiteurs d'antiprotéases) est ajouté afin d'avoir un volume final de 1 mL. Le lysat cellulaire est centrifugé à 500  $g_{av}$ , à 4 °C pendant 5 minutes afin de culoter les noyaux et les

cellules non lysées. Le surnageant est centrifugé à 72000  $g_{av}$  (rotor TLA-45, centrifugeuse TL100) pendant 90 minutes à 4 °C. Le culot contenant les protéines d'intérêt est soit stocké après congélation rapide à l'azote liquide à -80 °C, soit repris tout de suite dans 200  $\mu$ L de tampon de dépôt 1x Urée/SDS (50 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 0,5 mM EDTA ; 4,5 M urée ; 2,5 % SDS ; 0,005 % bleu de bromophénol ; 5 % (v/v)  $\beta$ -mercaptoéthanol) et homogénéisé sur vibrax pendant 45 minutes à 4 °C avec une vitesse moyenne. L'analyse de l'expression peut alors être effectuée.

### ***II.5.2. Préparation de fractions membranaires après expression en milieu riche***

La procédure est ici décrite pour 1 litre de culture de levures.

Après la phase d'expression protéique en milieu riche, les cultures sont récoltées après centrifugation à 4000  $g_{av}$  (rotor JLA8.1, centrifugeuse J20XP) pendant 10 minutes à 4 °C. Les culots sont lavés avec 500 mL d'eau froide distillée, puis les surnageants sont éliminés après une centrifugation à 4000  $g_{av}$  (rotor JLA8.1, centrifugeuse J20XP) pendant 10 minutes à 4 °C. Les culots cellulaires sont pesés : la masse de ces culots ( $m_{culot}$ ) est habituellement entre 30 et 40 g par litre de culture. Ces culots cellulaires sont repris dans un volume de tampon TEKS froid (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1 M KCl, 0,6 M Sorbitol) équivalent à 2 fois le  $m_{culot}$ , puis incubés pendant 15 minutes dans le but de fragiliser les parois des levures, puis recentrifugés à 4000  $g_{av}$  (rotor JLA8.1, centrifugeuse J20XP) pendant 10 minutes à 4 °C. Les culots cellulaires sont maintenant repris dans du tampon TES froid (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,6 M Sorbitol) auquel a été fraîchement ajouté 1 mM de PMSF et 1x du cocktail d'antiprotéases (1 comprimé SigmaFast pour 100 mL, (Sigma)) (on utilise 1 mL du tampon TES pour 1 g de levures). Ces suspensions sont mises dans des pots en agate, et 1 volume de billes de verre (de 0,5 mm de diamètre) y est ajouté (1 volume de billes de verre = le volume des levures resuspendues). Le broyage des levures est alors réalisé grâce à l'utilisation d'un broyeur planétaire (Pulvérisette 6" planetary mill, Fritsch) : le pot d'agate est mis dans le broyeur, il y a une forte agitation (une « pulvérisation ») de 3 minutes à 450 rpm, suivie d'une pause de 30 secondes, puis une nouvelle agitation de 3 minutes à 450 rpm, en sens inverse. Les lysats cellulaires sont récupérés et les billes sont

rincées 3 fois avec 0,5 fois le volume équivalent au  $m_{\text{culot}}$  de tampon TES froid additionné des inhibiteurs de protéases. On obtient alors l'extrait brut (EB). Très rapidement, le pH de l'extrait brut est vérifié et ajusté si nécessaire à 7,0-7,5, en ajoutant du NaOH). Cet extrait brut est ensuite centrifugé à 1000  $g_{\text{av}}$  (JLA10.5, centrifugeuse J20XP) durant 20 minutes à 4 °C, produisant un culot (C1) contenant débris cellulaires et noyaux, et le premier surnageant (S1). Ce surnageant est centrifugé à 20000  $g_{\text{av}}$  durant 20 minutes à 4 °C, produisant un deuxième culot (C2) contenant les membranes dites "lourdes", et un deuxième surnageant (S2). Ce dernier est finalement centrifugé à 125000  $g_{\text{av}}$  (rotor Ti45, centrifugeuse L8-M) durant 60 minutes à 10 °C. Le troisième culot (C3) et le troisième surnageant sont collectés. Le culot C3, qui contient les membranes dites "légères", est resuspendu avec 0,2 fois le volume équivalent au  $m_{\text{culot}}$  du tampon HEPES-sucrose (HS) froid (20 mM HEPES-Tris pH 7,5; 0,3 M sucrose et 0,1 M Ca Cl<sub>2</sub>). Toutes les fractions sont stockées à -80 °C après avoir été congelées rapidement à l'azote liquide.

### ***II.5.3. Dosage de la concentration des protéines totales ou purifiées***

L'estimation de la concentration des protéines totales a été effectuée grâce à l'utilisation de la méthode BCA (acide bicinchoninique). Le principe de cette méthode repose sur la réduction du cuivre divalent ( $\text{Cu}^{2+}$ ) du  $\text{CuSO}_4$  en cuivre monovalent ( $\text{Cu}^+$ ) après qu'il y ait eu un contact avec les liaisons peptidiques des protéines (Smith et al., 1985), et la chélation de ces ions  $\text{Cu}^+$  par l'acide bicinchoninique produit un complexe de couleur pourpre. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration protéique, et l'absorbance est maximale à 562 nm. Le dosage protéique a été réalisé sur une plaque de 96 puits.

La préparation de l'échantillon à tester a été réalisée dans un volume de 25  $\mu\text{L}$  comme suit: 10  $\mu\text{L}$  de l'échantillon qui a (selon sa concentration) pu être préalablement dilué 10 fois dans l'eau distillée et filtrée, 10  $\mu\text{L}$  d'eau distillée et filtrée, et 5  $\mu\text{L}$  de SDS à 10 % (la concentration finale dans le mélange est de 2 %). Aux 25  $\mu\text{L}$  de protéine, on ajoute par la suite 225  $\mu\text{L}$  du réactif BCA (1 volume de  $\text{CuSO}_4$  pour 50 volumes de BCA fraîchement préparé). Le mélange réactionnel est mélangé et incubé dans un bain-marie à 37 °C pendant 30 minutes, puis 200  $\mu\text{L}$  en sont

transférés sur une plaque 96 puits. L'absorbance est mesurée à 562 nm sur un lecteur de plaque de type Epoch (BioTek).

La concentration des protéines à l'issue de la purification a été déduite de leur absorption à 280 nm. L'absorption obtenue est convertie en mg de protéine/mL en utilisant le coefficient d'extinction prédit sur la base de la séquence de Drs2p et Cdc50p, en mélange équimolaire ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)). Une autre quantification a été effectuée sur la base de comparaison de concentrations connues de l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> SERCA1a avec Drs2p et Cdc50p purifiés en utilisant l'analyse par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie.

#### ***II.5.4. Analyse par électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)***

Les échantillons à analyser sont mélangés avec le tampon de dépôt Urée/SDS (concentrations finales : 50 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 0,5 mM EDTA ; 4,5 M urée ; 2,5 % SDS ; 0,005 % bleu de bromophénol ; 5 % (v/v) β-mercaptoéthanol) de telle sorte que puisse être déposée sur le gel la quantité totale de protéines souhaitée (selon l'analyse à faire). Le mélange est incubé à 30 °C au bain-marie pendant 10 minutes avant le dépôt sur gel, et dans certains cas à 96 °C pendant 1 minute. Les échantillons à analyser sont soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide de type Laemmli (Laemmli, 1970) à 8 %, à 10 % ou à 12 % d'acrylamide. Le tampon de migration contient 25 mM Tris-HCl, 250 mM glycine et 1 % SDS, et la migration prend environ 90 minutes à 25 mA/gel et à 110 V maximum. La détection des protéines est effectuée par coloration au Bleu de Coomassie, par coloration au nitrate d'argent, ou par immuno-détection (Western-Blot).

La coloration au Bleu de Coomassie a été réalisée comme suit: après la migration des protéines sur gel en conditions dénaturantes, le gel a été incubé pendant 15 minutes sous agitation lente avec la solution de coloration (40 % (v/v) méthanol; 10 % (v/v) acide acétique; et 0,1 % (p/v) de Bleu de Coomassie R250). Après incubation, la solution colorante a été récupérée, et l'excès a été éliminé avec de l'eau distillée. Pour la décoloration, le gel a été mis dans de l'eau distillée et a été

passé au micro-onde. Au moment où les premières bulles d'ébullition apparaissent, le micro-onde a été arrêté, un papier absorbant a été mis avec le gel afin d'absorber le colorant. Le gel a été mis à décolorer pendant environ 30 minutes sous une agitation lente.

La coloration au nitrate d'argent a été réalisée comme suit : le gel a été rincé à l'eau distillée afin d'éliminer le tampon de migration, puis a été mis durant 1 heure dans un premier tampon de fixation (1) (50 % (v/v) de méthanol; 12 % (v/v) d'acide acétique; et 0,02 % (v/v) de formaldéhyde, à ajouter au dernier moment vu qu'il est instable dans l'eau). Le gel a ensuite été incubé 20 à 30 minutes dans un deuxième tampon de fixation (2) (50 % (v/v) éthanol), puis dans un troisième tampon (3) contenant 0,04 % (p/v)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , pendant exactement 1 minute, et enfin lavé 3 fois avec de l'eau distillée pendant exactement 20 secondes à chaque fois. Le gel a été finalement incubé dans le tampon de coloration (0,2 % (p/v)  $\text{AgNO}_3$ ; 0,03 % (v/v) de formaldéhyde à ajouter juste avant utilisation) pendant 45 minutes (en étant protégé par du papier aluminium à partir de cette étape-là). Après coloration, le gel a été lavé 2 fois avec de l'eau distillée pendant 30 secondes à chaque fois, puis mis dans le tampon de développement (6 % (p/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 0,0004 %  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; et 0,02 % de formaldéhyde à ajouter juste avant utilisation) jusqu'à l'apparition des bandes protéiques avec l'intensité voulue. La réaction a été stoppée avec le tampon d'arrêt (1 % (v/v) d'acide acétique) (mais la réaction ne s'arrête pas immédiatement).

Les gels colorés au Bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent ont été séchés pendant toute la nuit : les gels ont été rincés dans de l'eau distillée, puis mis entre deux feuilles de cellophane; gels et feuilles de cellophane ont été préalablement imbibés dans le tampon de séchage (10 % (v/v) éthanol; 10 % (v/v) d'acide acétique; et 5 % (v/v) de glycérol).

Le Western-Blot a été réalisé comme suit : après la migration des protéines en SDS-PAGE, les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF (Millipore) préalablement incubée pendant 1 minute dans du méthanol. Le transfert a été réalisé à froid à 350 mA et à 110 V pendant 1 heure dans le tampon de transfert froid (26 mM Tris; 0,19 M de glycine; 10 % de méthanol). Après le transfert, différents traitements ont été appliqués sur les membranes et la détection s'est effectuée en

utilisant différentes sondes. Toutes les protéines biotinyllées ont été détectées par l'avidine qui est couplée à la peroxydase. Les protéines portant un tag histidine ont été détectées grâce à l'utilisation de la sonde histidine couplée elle aussi à la peroxydase. Drs2p a été détectée grâce à l'utilisation d'un anticorps primaire polyclonal de lapin dirigé contre les domaines qui se situent entre les passages transmembranaires 4 et 5, anticorps généreusement fourni par Todd Graham. L'anticorps secondaire utilisé dans ce cas est un anticorps polyclonal de chèvre, couplé à la peroxydase, qui est dirigé contre les anticorps de lapin. Les différents traitements appliqués sont décrits dans le Tableau 10.

**Tableau 10.**

Étapes	Sonde Avidine	Sonde Histidine	Anti-Drs2p
Saturation (1 heure à température ambiante ou toute une nuit à 4 °C)	5 % de lait écrémé	2 % de BSA	5 % de lait écrémé
Lavage	3 fois 10 minutes	—	—
Incubation anticorps primaire ou sonde	1/25000, 1 heure	1/2000, 2 % BSA, 1 heure	1/5000, 5 % de lait écrémé, 1 heure
Lavage	—	—	3 fois 10 minutes
Incubation anticorps secondaire anti-lapin	—	—	1/5000, 5 % de lait écrémé, 1 heure
Lavage	3 fois 10 minutes PBS-T et 2 fois 10 minutes PBS	3 fois 10 minutes PBS-T et 2 fois 10 minutes PBS	3 fois 10 minutes PBS-T et 2 fois 10 minutes PBS

Toutes les étapes s'effectuent en présence du tampon PBS-T, contenant du PBS (2,7 mM KCl; 0,14 M NaCl; 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4) additionné de 0,2 % (v/v) de Tween 20 (excepté le dernier lavage où il n'a été utilisé que du PBS).

La révélation des protéines a été réalisée par luminescence, en utilisant le kit ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham) qui contient le substrat de la peroxydase. Les images ont été acquises par la caméra G:BOX HR16 (Syngene).

Dans certains cas, la détection des protéines purifiées a été directement visualisée sur-gel : les tryptophanes des protéines purifiées sont modifiés chimiquement par les haloalkanes en lumière blanche, ces tryptophanes modifiés fluorescent dans le spectre du visible facilitant ainsi la visualisation des protéines (Ladner et al, 2004 ; Gürtler et al., 2013).

## **II.6. Purification du complexe Drs2p/Cdc50p**

Toutes les étapes ont été effectuées à 4 °C.

### **II.6.1. Solubilisation**

La solubilisation des protéines membranaires s'effectue grâce à l'utilisation de détergents dont on espère qu'ils vont solubiliser les protéines sans altérer leur structure tridimensionnelle ni leur fonction. Dans notre étude, les membranes C3 ont été diluées à 2 mg/mL de protéines totales dans un tampon de solubilisation SSR (50 mM MOPS-Tris pH 7; 100 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub> et 20 % glycérol), supplémenté avec 1 mM de PMSF et 1X du cocktail d'inhibiteurs de protéases Sigma-Fast. Après avoir mélangé la préparation, un détergent doux, le DDM, a été ajouté. Le ratio détergent/protéines totales (p/p) qui a été choisi est de 1:1 (2 mg/mL de DDM pour 2 mg/mL de protéines totales). Dans certains cas d'autres ratios ont été testés. Le mélange a été incubé durant 15 minutes sur roue à basse vitesse pour éviter la formation de bulles. L'échantillon a été ensuite soumis à une centrifugation à 125000

g pendant 1 heure (rotor Ti 45, centrifugeuse L8-80M Beckman Coulter). Le surnageant contenant les protéines solubilisées a été récupéré.

### **II.6.2. Purification du complexe Drs2p/Cdc50p par chromatographie d'affinité sur résine Streptavidine Sepharose**

La purification du complexe Drs2p/Cdc50p résulte de la capacité de la streptavidine à lier fortement ( $K_d$  de 10-15 nM) la biotine. En effet, la protéine d'intérêt, Drs2p, a été étiquetée à son extrémité ou bien N- ou bien C-terminale, avec un domaine accepteur de biotine prêt à être biotinylé, lors de l'expression, par la biotine ligase de *Saccharomyces cerevisiae*. Drs2p ainsi biotinylée pourra interagir avec de la streptavidine couplée à des billes de Sépharose.

La biotine (vitamine H) est naturellement synthétisée par des organismes procaryotes et eucaryotes, et elle sert comme co-facteur pour certaines protéines, pour les rendre fonctionnelles. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, il existe 5 protéines pour lesquelles la biotine est un co-facteur nécessaire à la fonction de ces protéines : l'acetyl-coA carboxylase cytosolique ou mitochondriale (250 ou 242 KDa), l'urée amidolyase (202 KDa), la pyruvate carboxylase (2 isoformes à 130 KDa) et le complexe Acyl-ARN (Arc1p à 45 KDa). La biotinylation de ces protéines se fait sur un domaine accepteur de biotine (BAD) contenu dans les protéines, et ce n'est pas une simple fixation de biotine : c'est le résultat d'une réaction covalente entre la biotine et le BAD. Dans notre étude le domaine accepteur de biotine utilisé en tant qu'étiquette est celui de l'oxaloacétate décarboxylase de *Klebsiella pneumoniae* (Pouny et al., 1998).

Dans notre cas, la protéine recombinante Drs2p, avec son domaine accepteur de biotine (et pour autant que ce domaine soit correctement replié et biotinylé), va interagir avec la streptavidine, tout comme les protéines naturellement biotinylées de la levure. Comme la liaison entre la streptavidine et la biotine est forte, la récupération ultérieure de Drs2p est cependant difficile, et c'est pour cela qu'un site de clivage par la protéase TEV a été introduit entre Drs2p et l'étiquette BAD lors de la construction des plasmides. Cette stratégie permet de décrocher les protéines

d'intérêt de la résine en lui ajoutant la protéase, sans décrocher les protéines naturellement biotinyllées de la levure, qui restent fixées à la résine.

Avant de mettre en contact les protéines solubilisées avec la résine, la résine a été préalablement pré-équilibrée dans le tampon SSR supplémenté de 0,5 mg/mL de DDM. La pré-équilibration de la résine consiste à la laver 3 fois avec 3 fois son volume de tampon, la laissant à chaque fois sur la roue pendant 5 minutes avant d'effectuer une centrifugation à 500  $g_{av}$  pendant 3 minutes et d'éliminer le tampon de lavage. Le surnageant contenant les protéines solubilisées est alors mis en contact avec la résine pré-équilibrée. La fixation de Drs2p à la résine est effectuée sur la roue à basse vitesse pendant 2 heures à 4 °C. Typiquement, le ratio résine/protéines utilisé est de 1 mL de résine/4 mg de Drs2p. Après l'étape de fixation, la fraction non retenue par la résine est récupérée après une centrifugation de 5 minutes à 500  $g_{av}$  à 4 °C, et afin d'éliminer le reste du matériel non retenu, la résine est lavée, 4 fois, avec 3 fois son volume de tampon SSR supplémenté de 0,5 mg/mL de DDM et de 0,025 mg/mL de POPS en présence de 1 mM de PMSF mais en absence du cocktail anti-protéases (la résine est mise à chaque fois sur la roue pendant 5 minutes, avant d'être centrifugée à 500  $g_{av}$ ). La résine lavée est resuspendue dans un volume de tampon, et la récupération du complexe peut alors se faire après addition de la protéase TEV. Différentes concentrations de TEV et différents temps d'incubation ont été testé(e)s afin de définir la concentration minimale de TEV qui permet une coupure aussi complète que possible. Ici, la TEV a été ajoutée à la résine resuspendue pour que la coupure se fasse sur la roue à 4 °C pendant 15 à 18 heures. Notons que la coupure à la TEV permet de se débarrasser non seulement du tag BAD de Drs2p, mais aussi du tag His<sub>10</sub> de Cdc50p.

Pour l'élution après action de la protéase, 1 volume de tampon SSR supplémenté de 0,5 mg/mL de DDM, de 0,025 mg/mL de POPS, de 2 mM de PMSF et éventuellement de 2x du cocktail anti-protéases (pour inactiver la protéase TEV, voire les autres protéases si on le souhaite) est d'abord ajouté à la résine. Ensuite, la résine est mise sur la roue pendant 5 minutes puis centrifugée à 500  $g_{av}$  pendant 5 minutes, ce qui permet la récupération du complexe. Cette opération est renouvelée une seconde fois mais cette fois-ci la résine est resuspendue dans 2 volumes de tampon SSR supplémenté de 0,5 mg/mL de DDM, de 0,025 mg/mL de POPS, de 1

mM de PMSF et de 1x du cocktail anti-protéases. Finalement, la résine est resuspendue dans 1 volume de tampon SSR supplémenté de 0,5 mg/mL de DDM, de 0,025 mg/mL de POPS, de 1 mM de PMSF et de 1X du cocktail anti-protéase. Toutes les fractions, éventuellement rassemblées, sont congelées dans l'azote liquide et stockées à -80 °C.

### ***II.6.3. Élimination de la TEV grâce à la résine Ni<sup>2+</sup>-TED***

Pour débarrasser l'éluat streptavidine de la protéase TEV qu'il contient en plus du complexe Drs2p/Cdc50p, on peut exploiter le fait que la protéase TEV que nous utilisons est étiquetée avec 6 histidines (His<sub>6</sub>-TEV), et on peut donc utiliser une chromatographie d'affinité sur résine de nickel. Dans ce but, une résine de type IMAC a été utilisée, ayant comme phase stationnaire la silice avec des ions nickel (Ni<sup>2+</sup>) immobilisés via un chélateur du nickel (Ni<sup>2+</sup>-TED de Macherey-Nagel). Le ratio résine Ni<sup>2+</sup>-TED: His<sub>6</sub>-TEV utilisé a été de 500:1 (p/p). La résine a été pré-équilibrée dans le tampon SSR supplémenté de 0,5 mg/mL de DDM et de 0,025 mg/mL de POPS pendant 5 minutes sur la roue avant d'être centrifugée à 500 g<sub>av</sub> pendant 3 minutes à 4 °C. Cette opération a été répétée deux fois. Une fois que la résine a été pré-équilibrée, l'éluat streptavidine lui a été ajouté. Par la suite, la résine a été mise sur la roue afin de fixer la TEV et cela pendant 45 minutes à 4 °C. Après l'étape de fixation, une centrifugation à 500 g<sub>av</sub> pendant 5 minutes a été effectuée. Le matériel non retenu contient le complexe purifié débarrassé de la TEV. Il peut alors être congelé dans l'azote liquide et stocké à -80 °C.

### ***II.6.4. Chromatographie d'exclusion de taille (SEC)***

Après avoir éliminé la TEV via la résine Ni<sup>2+</sup>-TED, et après une centrifugation préliminaire à 120000 g (rotor TLA 100.3, centrifugeuse TL100) pendant 10 minutes à 4 °C destinée à éliminer d'éventuels gros agrégats, l'échantillon purifié peut être concentré grâce à un filtre YM100 (cutoff: 100 kDa), jusqu'à 4 mg/mL. 250-500 µL d'un tel échantillon peuvent alors être analysés par chromatographie d'exclusion de taille. La colonne utilisée pour cela a été ou bien une TSK-3000SW (avec un système

HPLC « Gold » de Beckman et un débit d'écoulement de 1 mL/minute) ou bien une Superdex 200 10/300 (avec un système FPLC, Äkta Purifier). Le tampon qui est utilisé comme phase mobile est le tampon SSR mais préparé sans glycérol, et de nouveau additionné de 0,5 mg/mL de DDM et 0,025 mg/mL de POPS pour la TSK ou le tampon à 50 mM MOPS-Tris à pH 7,0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mg/mL DDM et 0,05 mg/mL POPS pour la Superdex. La colonne est pré-équilibrée en présence de ce tampon contenant détergent et lipide afin de limiter l'adsorption non spécifique des protéines sur la phase solide. 250 µL de marqueurs protéiques divers, à 1 mg/mL, sont d'abord injectés afin de calibrer la colonne. Un marqueur supplémentaire utilisable est la SERCA1a solubilisée (pour cela, des membranes de réticulum sarcoplasmique sont diluées à 4 mg/mL en présence de 1 mM de Ca<sup>2+</sup> et solubilisées avec 40 mg/mL de DDM pendant 10 minutes à 20 °C, puis centrifugées à 120000 g (rotor TLA 100.3, centrifugeuse TL100) pendant 10 minutes, de nouveau pour les débarrasser d'éventuels gros agrégats. 250-500 µL du surnageant sont alors injectés sur la colonne.

Les fractions éluées peuvent être collectées et congelées à l'azote liquide pour conservation à -80 °C.

#### ***II.6.5. Analyse du complexe Drs2p/Cdc50 purifié par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)***

Deux types différents d'analyse de l'échantillon purifié par chromatographie d'exclusion de taille ont été effectuées (grâce à Paulette Decottignies que nous remercions ici). La première consiste à analyser directement les protéines récupérées, et la seconde consiste à soumettre auparavant l'échantillon purifié à une digestion trypsique pour vérifier si les peptides obtenus correspondent bien à Drs2p et à Cdc50p. Ces deux analyses permettent de lever toute ambiguïté sur l'identification de Drs2p et Cdc50p. Pour la première analyse, 1 µL de l'échantillon purifié a été mélangé à 3 µL d'une solution saturée d'acide sinapinique à 30 % et d'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,3 %, puis 1 µL du mélange a été soumis à l'analyse par un spectromètre MALDI-TOF (Perseptive Biosystems, Voyager DE-STR) équipé d'un laser à 337 nm. La gamme de masse moléculaire étudiée a été entre 30-200 kDa, avec une accélération initiale des molécules chargées sous 25 kV.

Les étalons utilisés pour l'analyse ont été l'aldolase (39,211 kDa) et l'albumine (66,429 kDa) (Proteomass MALDI-MS standards, Sigma). Pour la seconde analyse, l'échantillon purifié a été d'abord soumis à un SDS-PAGE (à 7 % d'acrylamide) et coloré au bleu de Coomassie pour que les bandes correspondant aux protéines d'intérêt soient récupérées. Les bandes ont été découpées à la main, puis décolorées avec une solution 50:50 d'acétonitrile: 0,1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , et par la suite les protéines d'intérêt ont été soumises à une digestion trypsique pendant une nuit à la température de 37 °C avec 50 mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Le surnageant a été éliminé et les peptides ont été extraits avec 1 % de TFA puis avec 60 % d'acétonitrile contenant 1 % de TFA. Après évaporation, les extraits peptidiques réduits à 2  $\mu\text{L}$  ont été mélangés avec un même volume d'une solution mi-saturée d'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique dans 50 % d'acétonitrile et 0,3 % de TFA, puis soumis à une analyse par spectromètre MALDI-TOF (Voyager DE-STR). Des peptides de masse moléculaire connue ont été utilisés pour l'étalonnage. Les protéines ont été identifiées à l'aide du programme de recherche Mascot Peptide Mass Fingerprint ([http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)) réduisant la recherche aux données relatives à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

## II.7. Protéolyse ménagée

La protéolyse ménagée des protéines purifiées a été effectuée avec différentes protéases: la chymotrypsine, la trypsine, la thrombine, la protéinase K et la subtilisine. La protéolyse a été effectuée pendant différents temps mais le plus souvent pendant 1 heure et à la température de 20 °C. L'arrêt de la protéolyse a été effectué grâce à l'ajout d'un petit volume de PMSF concentré (pour ne pas entraîner de dilution), à une concentration finale de 2 mM. Pour l'arrêt de la protéolyse effectuée par la trypsine, de l'inhibiteur de trypsine a été ajouté (à 2/1 p/p par rapport à la trypsine). Les échantillons protéolysés ont été utilisés ou bien directement, ou bien après avoir été congelés à l'azote liquide et conservés à -20 °C ou -80 °C. Dans certains cas, les protéases ont été directement ajoutées pendant le test d'activité ATPasique.

## **II.8. Séquençage N-terminal**

Les fragments de protéolyse ménagée ont été soumis à un séquençage N-terminal effectué par JP Andrieu à Grenoble, que nous remercions ici. Les fragments de protéolyse avaient été auparavant séparés par SDS-PAGE puis transférés sur une membrane PVDF. Après le transfert, la membrane a été rincée avec de l'eau puis avec du méthanol à 10 % pendant quelques secondes. Par la suite, la membrane a été colorée au bleu de Coomassie puis rincée avec de l'eau. Les bandes d'intérêt colorées au bleu de Coomassie ont été découpées puis séchées pour séquençage. Le séquençage N-terminal d'Edman a été effectué en utilisant le système "Applied Biosystems gas-phase sequencer model 492". Après chaque cycle de la réaction d'Edman, il a été généré un dérivé d'acide aminé sous forme de phénylthio-hidantoïne. Grâce au système "Applied Biosystems Model 140C HPLC system" et à l'aide du système d'analyse de données pour le séquençage de protéine de "Applied Biosystems (software Procise PC v2.1)", le dérivé d'acide aminé récupéré après chaque cycle de séquençage a été identifié et quantifié.

## **II.9. Caractérisation fonctionnelle du complexe Drs2p/Cdc50p**

### ***II.9.1. Mesure par filtration de la formation de dérivé phosphorylé***

Phosphorylation : Pour la mesure du dérivé phosphorylé formé pendant l'hydrolyse d'ATP par Drs2p (présent dans les membranes de levures), 40  $\mu$ L de membranes C3 à 0,5 mg/mL de protéines totales ont été préincubés dans le tampon A (100 mM KCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub> et 50 mM Mops-Tris à pH 7) durant environ 2 heures, dans la glace, et cela en présence ou en absence de 1 mM d'orthovanadate. Divers détergents et lipides exogènes ont pu être ajoutés, cela dépendant de l'expérience à réaliser. La phosphorylation a été initiée par l'ajout de 0,5  $\mu$ M d'ATP radioactif ([ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP) à 0,25-1 mCi/ $\mu$ mol. Après 25 secondes de réaction dans la glace, la phosphorylation a été arrêtée par précipitation à l'acide, avec 1 mL de TCA 500 mM additionné de 30 mM de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Les échantillons ont été incubés environ 30 minutes dans la glace pour permettre l'agrégation des protéines précipitées; cette étape est

critique en présence de détergents. Les échantillons ont été filtrés sur des filtres en fibres de verre type A/E ou des filtres en nitrocellulose de type GSWP, préalablement imbibés dans le tampon d'arrêt. Ensuite, les filtres ont été rincés avec l'acide froid dilué (50 mM TCA additionné de 3 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Les filtres ont été mis dans des fioles, où il a été ajouté par la suite 4 mL de liquide scintillant (Picofluor 30, Packard). La mesure de la radioactivité retenue sur les filtres a été effectuée grâce à un compteur à scintillation (Beckman, LS5801 ou LS6000IC).

Déphosphorylation : La cinétique de déphosphorylation a été mesurée après que la phosphorylation ait atteint son état stationnaire (conditions précédemment décrites), en transférant l'échantillon dans un tube pré-équilibré à 37 °C contenant de l'ATP non radioactif (Mg<sup>2+</sup>-ATP à une concentration finale à 1 mM), qui va chasser l'ATP radioactif. Des prélèvements sont effectués à différents temps et sont suivis d'une filtration.

Les tests de phosphorylation/déphosphorylation de l'échantillon purifié sont faits à la température de 30 °C. 40 µL de l'échantillon purifié (à 50-100 µg/mL) contenant détergent et lipides sont mélangés à de l'ATP radioactif ([γ-<sup>32</sup>P]ATP) dans la glace, puis sont transférés immédiatement dans un bain-marie à la température de 30 °C. La mesure de la déphosphorylation commence typiquement après 1 minute et demi après phosphorylation et la chasse de l'ATP radioactif se fait en ajoutant de l'ATP non radioactif (Mg<sup>2+</sup>-ATP à une concentration finale à 1 mM). Des prélèvements sont effectués à différents temps et sont suivis d'une filtration (comme précédemment décrit).

### ***II.9.2. Mesure de dérivé phosphorylé par autoradiographie d'un gel en conditions acides (« Sarkadi »)***

L'avantage d'utiliser les gels de type Sarkadi est de permettre de stabiliser la liaison acyl-phosphate de l'ATPase phosphorylée, contrairement aux gels de type Laemmli qui avec leur pH alcalin induisent l'hydrolyse de la liaison acyl-phosphate. L'utilisation de ces gels permet donc la détection de la radioactivité liée aux différents polypeptides séparés sur gel selon leur poids moléculaire. Après phosphorylation ou

déphosphorylation des échantillons, la réaction est arrêtée après ajout d'un milieu contenant de l'urée en plus du SDS (tampon de dépôt Urée/SDS pour Sarkadi) : 16  $\mu$ L d'échantillon ont été mélangés avec 16  $\mu$ L du tampon de dépôt 2 fois concentré (300 mM Tris-Cl à pH 6,8, 4 % SDS, 8 M Urée, 20 % glycérol, 20 mM EDTA and 1,4 M  $\beta$ -Mercaptoethanol). Pour chaque échantillon préparé, 20  $\mu$ L ont été déposés sur un gel à 7 % d'acrylamide. La migration a été faite dans le tampon de migration pour gel Sarkadi (170 mM Mops-Tris pH 6 et 0,1 % de SDS) pendant 3 heures à 10 mA/gel en chambre froide avec agitation pour homogénéiser la température à l'intérieur de la cuve d'électrophorèse. Par la suite, les gels ont été colorés au bleu de Coomassie puis séchés; ces derniers ont été exposés à un écran de détection (Phosphorscreen) et la détection de la radioactivité liée à chaque polypeptide a été analysée par un système Phosphorimager (Molecular Dynamics). Outre la coloration au bleu de Coomassie, les différents polypeptides ont parfois été analysés par Western-Blot.

### ***II.9.3. Activité ATPasique***

La mesure de l'activité ATPasique a été faite selon l'un ou l'autre des deux protocoles présentés ci-dessous, avec des résultats cohérents.

Le premier est basé sur un système d'enzymes couplés, où l'hydrolyse de l'ATP est suivie de façon continue par la baisse de l'absorption du NADH à 340 nm. Grâce à la présence de pyruvate kinase, de lactate déshydrogénase, de phosphoénolpyruvate et de NADH, la production d'ADP par une ATPase après hydrolyse d'ATP entraîne en effet l'oxydation du NADH en  $\text{NAD}^+$ , et donc une baisse de l'absorption à 340 nm reflétant la concentration du NADH (Møller et al., 1980). Dans ce protocole, 10-40  $\mu$ L d'échantillon purifié sont ajoutés à une cuve pré-remplie avec 2 mL du milieu réactionnel (contenant du tampon SSR, les enzymes du système couplé, et l'ATP). Le DDM, la POPS et le PI4P (ou d'autres lipides) sont ajoutés à différentes concentrations finales au début ou durant le test, en fonction de l'expérience à effectuer. Ce test a été effectué à la température de 30 °C. Pour contrôle, de l'ADP est ajouté à une concentration finale de 10  $\mu$ M dans le but de

vérifier le fonctionnement du système d'enzymes couplés. L'absorption à 340 nm a été mesurée grâce à un spectrophotomètre Hewlett Packard à barrettes de diodes.

Le deuxième protocole consiste à doser le Pi résultant de l'hydrolyse de l'ATP (du Mg-ATP, en fait) par une mesure colorimétrique (Lenoir et al., 2004). Les échantillons contenant le complexe Drs2p/Cdc50p purifié (dilué à 50 µg de Drs2p/mL) sont préparés avec par exemple, 1 mg/mL de DDM, 0,05 mg/mL POPS, et 0,025 mg/mL de PI4P. Certains échantillons sont préincubés avec du VO<sub>4</sub>, du BeF<sub>3</sub><sup>-</sup>, ou du AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>. Pour démarrer la réaction d'hydrolyse, 1 mM de Mg<sup>2+</sup>-ATP est ajouté aux échantillons (en absence ou en présence, dans certains cas, d'un système régénérateur d'ATP, 1 mM de phosphoénolpyruvate et 0,1 mg/mL de pyruvate kinase). Les échantillons sont incubés par la suite à 30 °C. La réaction est arrêtée après différents temps : pour cela 33 µL du mélange réactionnel est mélangé à 17 µL de SDS à 10 % (p/v). Le dosage du Pi dans ces 50 µL est ensuite effectué en ajoutant 200 µL d'un mélange molybdate/acide ascorbique. Ce mélange est préparé frais pour chaque mesure d'activité, de la façon suivante : i) de l'ammonium molybdate à 35 mM est ajouté à une solution aqueuse de 15 mM d'acétate de zinc. Le pH est ajusté à 5 avec de l'HCl 1N. Parallèlement, une solution à 10 % (w/v) d'ascorbate de sodium est préparée et le pH est ajusté à 5 avec de l'HCl 1N. Puis 1 volume de la solution de molybdate est mélangée à 4 volumes de la solution d'acide ascorbique. Après incubation avec le mélange molybdate/acide ascorbique à température ambiante pendant 1 à 2 heures, l'intensité de la couleur bleue est mesurée à 850 nm sur un lecteur de plaque de type Epoch (BioTek).

## **II.10. Article décrivant certains de nos protocoles** (*Article 1, publié (Azouaoui et al., 2016) : Coordinated Overexpression in Yeast of a P4-ATPase and Its Associated Cdc50 Subunit: The Case of the Drs2p/ Cdc50p Lipid Flippase Complex*)

L'article 1 traite des matériels et méthodes utilisés dans notre laboratoire (mentionnés précédemment) pour co-exprimer nos protéines d'intérêt, l'ATPase-P4 Drs2p et son partenaire Cdc50p, ainsi que quelques tests initiaux pour vérifier la fonctionnalité de nos protéines.

## Coordinated Overexpression in Yeast of a P4-ATPase and Its Associated Cdc50 Subunit: The Case of the Drs2p/Cdc50p Lipid Flippase Complex

Hassina Azouaoui, Cédric Montigny, Aurore Jacquot, Raphaëlle Barry, Philippe Champeil, and Guillaume Lenoir

### Abstract

Structural and functional characterization of integral membrane proteins requires milligram amounts of purified sample. Unless the protein you are studying is abundant in native membranes, it will be critical to overexpress the protein of interest in a homologous or heterologous way, and in sufficient quantities for further purification. The situation may become even more complicated if you chose to investigate the structure and function of a complex of two or more membrane proteins. Here, we describe the overexpression of a yeast lipid flippase complex, namely the P4-ATPase Drs2p and its associated subunit Cdc50p, in a coordinated manner. Moreover, we can take advantage of the fact that P4-ATPases, like most other P-type ATPases, form an acid-stable phosphorylated intermediate, to verify that the expressed complex is functional.

**Key words** Membrane protein, P4-ATPase, Cdc50 protein, Co-expression, Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, Lipid transport, Phosphorylation

---

### 1 Introduction

P-type ATPases from the P4 subfamily (P4-ATPases) are prime candidates for lipid transport across eukaryotic cell membranes from the late secretory pathway, thereby establishing lipid asymmetry [1]. Additional proteins called Cdc50 proteins have been found to associate with P4-ATPases, and to be essential for both correct localization and catalytic function of P4-ATPases.

As for many other membrane proteins, Drs2p and Cdc50p are scarcely expressed in yeast membranes. In this chapter, we describe an approach, based on our previous experience with expression of the rabbit SERCA1a Ca<sup>2+</sup>-ATPase in yeast [2, 3], to optimize the high-yield co-expression of Drs2p and Cdc50p in yeast membranes. To avoid imbalanced transcription which may occur when

two genes are placed on different multi-copy plasmids, the *DRS2* and *CDC50* genes were cloned into the same expression plasmid, both under the control of a strong galactose-inducible promoter. To facilitate detection of Drs2p and Cdc50p as well as for purification of the complex, a biotin acceptor domain (BAD) and a deca-histidine tag were added at the N-terminus of Drs2p and Cdc50p, respectively. After expression in rich medium, the recombinant Drs2p protein accounts for about 3 % of the total protein present in yeast “light” membranes obtained after differential centrifugation of the total cell lysate.

Expression of Drs2p and Cdc50p restores the ability of  $\Delta drs2$  and  $\Delta cdc50$  yeast cells, respectively, to grow at low temperature. A hallmark of P-type ATPases is the formation of a transient phosphorylated intermediate during their catalytic cycle. Thanks to the rather high expression level obtained for Drs2p, it is possible to detect phosphorylation of Drs2p on its catalytic aspartate residue upon incubation of the light membrane fraction with [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP. Formation of this [ $^{32}$ P]-labeled phosphoenzyme is inhibited by orthovanadate, a classical inhibitor of P-type ATPases, and co-expression of Cdc50p is essential for phosphorylation.

---

## 2 Materials

### 2.1 Yeast Culture

The *Saccharomyces cerevisiae* W303.1b/*GAL4* (*a*, *leu2-3*, *his3-11*, *trp1-1*:: *TRP1-GAL10-GAL4*, *ura3-1*, *ade2-1*, *canr*, *cir+*) yeast strain is used. The pYeDP60 plasmid was generously given by Denis Pompon (LISBP, Toulouse, France).

Ultrapure water is used, if not otherwise specified.

1. PLATE solution: 40 % PEG 4000, 100 mM Lithium-acetate, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA.
2. Denatured single-stranded carrier DNA (SSD): dissolve deoxyribonucleic acid sodium salt from salmon testis to 2 mg/mL in water and store at  $-20$  °C. Just before use, denature SSD by heating at 100 °C for 5 min and chill on ice before yeast transformation.
3. S6AU minimal medium: 0.1 % (w/v) bactocasamino acids, 0.7 % (w/v) yeast nitrogen base, 2 % (w/v) glucose, 20  $\mu$ g/mL adenine, 20  $\mu$ g/mL uracil. Prepare a 5 % over-concentrated medium containing only bactocasamino acids and yeast nitrogen base. Sterilize for 20 min at 120 °C. After cooling, add sterile glucose, adenine, and uracil from a 40 % (w/v) stock solution (for glucose), and from a 10 mg/mL stock solution for adenine and uracil (*see* below).
4. S6AU agar minimal medium: prepare the medium as described for liquid S6AU medium but with the addition of 2 % (w/v) agar.

5. S6A minimal medium: 0.1 % (w/v) bactocasamino acids, 0.7 % (w/v) yeast nitrogen base, 2 % (w/v) glucose, 20 µg/mL adenine. Prepare a 5 % over-concentrated medium containing only bactocasamino acids and yeast nitrogen base. Sterilize for 20 min at 120 °C. After cooling, add sterile glucose and adenine from, respectively, 40 % (w/v) and 10 mg/mL stock solutions (*see* below).
6. S6A agar minimal medium: prepare the medium as described for liquid S6A medium but with the addition of 2 % (w/v) agar.
7. S5A minimal medium: 0.1 % (w/v), bactocasamino acids, 0.7 % (w/v) yeast nitrogen base, 2 % (w/v) galactose, 20 µg/mL adenine. Sterilize for 20 min at 120 °C before the addition of galactose and adenine. Preparation of this medium is identical to that of S6A except that glucose is replaced by galactose. Prepare a 40 % (w/v) galactose stock solution as described below.
8. S5AF agar minimal medium: 0.1 % (w/v) bactocasamino acids, 0.7 % (w/v) yeast nitrogen base, 2 % (w/v) galactose, 1 % (w/v) fructose, 20 µg/mL adenine, 2 % (w/v) agar. Prepare this medium as described for agar S6A medium but replace glucose with both galactose and fructose. After cooling, add galactose, fructose, and adenine from a 40 % (w/v) stock solution (for galactose and fructose), and from a 10 mg/mL stock solution for adenine.
9. Sterilize a 40 % (w/v) glucose stock solution by filtration through a 0.22 µm filter and add to the various media after sterilization and cooling to 40 °C.
10. Sterilize a 40 % (w/v) galactose stock solution by filtration through a 0.22 µm filter and add to the various media after sterilization and cooling to 40 °C.
11. Sterilize a 40 % (w/v) fructose stock solution by filtration through a 0.22 µm filter and add to the various media after sterilization and cooling to 40 °C.
12. 10 mg/mL adenine solution: prepare in 0.1 N HCl and filter through a 0.22 µm filter. Add then to the various media after sterilization and cooling to 40 °C.
13. 10 mg/mL uracil solution: neutralize with NaOH and filter through a 0.22 µm filter. Add then to the various media after sterilization and cooling at 40 °C.
14. An incubator shaker system equipped with a cooling system.
15. A spectrophotometer to follow yeast growth (*see* **Note 1**). Optical densities (OD) are measured at 600 nm.
16. YPGE2X rich medium: 2 % (w/v) Bacto™ Peptone, 2 % (w/v) yeast extract, 1 % (w/v) glucose, and 2.7 % (v/v) ethanol.

Sterilize the medium (without glucose and ethanol) directly in the Fernbach-type flask. After cooling to 28 °C, add glucose and ethanol, just before inoculation with yeast cells.

17. 96 % (v/v) ethanol stock solution.

**2.2 Small-Scale  
Membrane Preparation  
for Expression  
Screens**

1. TEPI buffer: 50 mM Tris–HCl pH 6.8, 5 mM EDTA, 20 mM NaN<sub>3</sub>, 1 mM PMSF, 1× SIGMAFAST™ EDTA-free protease inhibitor cocktail (*see* below). The buffer can be prepared beforehand and stored at room temperature. Add NaN<sub>3</sub>, PMSF, and protease inhibitor cocktail just before use.
2. Glass beads (0.5 mm diameter). They are reusable after decontamination with fungicidal solution, intensive rinsing with water, and sterilization with ethanol. After washing, dry beads by incubation in a Pasteur oven before storage at 4 °C.
3. Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF): dissolve to 0.2 M in isopropanol. Prepare 10 mL beforehand that you may store at room temperature for several weeks.
4. 10 × concentrated SIGMAFAST™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) stock solution: dissolve one tablet in 10 mL of TEPI buffer, and store at –20 °C (*see Note 2*).
5. 1 M NaN<sub>3</sub> stock solution in water.
6. Two tabletop centrifuges: the first one is a high-speed centrifuge used with a swinging bucket rotor for collecting yeast cells and the second one is an ultracentrifuge, for recovering yeast total membranes.

**2.3 Large-Scale  
Membrane Preparation**

1. Polycarbonate bottles with screw cap assemblies, each one inwardly covered with a liner.
2. Ultrapure water: store 2 L at 4 °C.
3. TEKS buffer: 50 mM Tris–HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 M KCl, 0.6 M sorbitol. Sterilize with a 0.22 µm filter and store at 4 °C.
4. TES buffer: 50 mM Tris–HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.6 M sorbitol. Sterilize with a 0.22 µm filter and store at 4 °C.
5. HEPES-sucrose buffer: 20 mM HEPES-Tris pH 7.4, 0.3 M sucrose, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>. You may prepare this buffer beforehand provided it is stored at –20 °C.
6. Reagents for protein assay: bicinchoninic acid (BCA), 4 % CuSO<sub>4</sub>, and bovine serum albumin (BSA) at 10 mg/mL in water.
7. 0.5 mm diameter glass beads and PMSF are as described in Subheading 2.2.
8. A Dounce homogenizer.

9. A “Pulverisette 6” planetary mill (Fritsch) for breaking yeast cells with glass beads.
10. 10 × concentrated SIGMAFAST™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail stock solution: prepare freshly by dissolving one tablet in 10 mL TES buffer. For long-term storage, this solution may be frozen and kept at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for months.

#### **2.4 SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)**

1. Separating gel solution: 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 8 % acrylamide (w/v), 0.1 % SDS (w/v), 0.1 % ammonium persulfate (w/v), 0.06 % TEMED (v/v). Add ammonium persulfate and TEMED last, just before pouring.
2. Stacking gel solution: 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 5 % acrylamide (w/v), 0.1 % SDS (w/v), 0.1 % ammonium persulfate (w/v), 0.1 % TEMED (v/v). Add ammonium persulfate and TEMED last, just before pouring.
3. 2 × concentrated SDS/urea sample buffer: 100 mM Tris-HCl pH 6.8, 1.4 M  $\beta$ -mercaptoethanol, 5 % SDS (w/v), 1 mM EDTA, 9 M urea, 0.01 % bromophenol blue (w/v).
4. Running buffer: 25 mM Tris, 250 mM glycine, 0.1 % SDS (w/v).
5. Coomassie blue staining solution: 0.05 % Coomassie blue R-250, 40 % (v/v) methanol, 10 % (v/v) acetic acid.

#### **2.5 Western Blotting**

1. TB buffer: 26 mM Trizma-base, 190 mM glycine, 10 % (v/v) methanol. Prepare 1 L per electrophoresis tank (for one or two blots). Stir for 2–3 h at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  in water/ice bath for cooling, and store at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (*see Note 3*).
2. Polyvinylidene-difluoride (PVDF) membranes and chromatography paper.
3. Prestained molecular weight markers.
4. 10× concentrated PBS buffer: 27 mM KCl, 1.4 M NaCl, 0.13 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , and 18 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Dissolve first in 800 mL water, adjust to pH 7.4 with NaOH, make up to 1 L with water, and filter-sterilize. Dilute tenfold before use.
5. PBS-T buffer: PBS buffer supplemented with 0.2 % Tween 20.
6. Avidin peroxidase conjugate, commercial solution for single use. Store 2  $\mu\text{L}$ -aliquots at  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . It will be referred to as biotin probe in the following protocol.
7. His-Probe-HRP peroxidase conjugate, commercial powder: reconstitute with 0.4 mL of water to a final concentration of 5 mg/mL. Store aliquots at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
8. Enhanced chemiluminescent (ECL) reagents.
9. ECL detection system.
10. CCD-cooled camera.

## 2.6 Phosphorylation from [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP of Drs2p Embedded in Light P3 Membranes

1. Radiolabeled [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (250  $\mu$ Ci, 3000 Ci/mmol): prepare a 10  $\mu$ M stock solution by mixing [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP with non-radioactive ATP, to reach a specific radioactivity of about 0.25–1 mCi/ $\mu$ mol.
2. Trichloroacetic acid (TCA) and phosphoric acid ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ): prepare a stock solution of 1 M TCA and 60 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$  in water and store at 4  $^\circ\text{C}$ , protected from light.
3. A/E glass fiber filters (1  $\mu$ m porosity), and cellulose GSWP filters (0.22  $\mu$ m porosity).
4. Sodium orthovanadate ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) stock solution: 100 mM in water.
5. Buffer A: 100 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM Mops-Tris pH 7.
6. FILTER-COUNT liquid scintillation counting.
7. A scintillation counter.

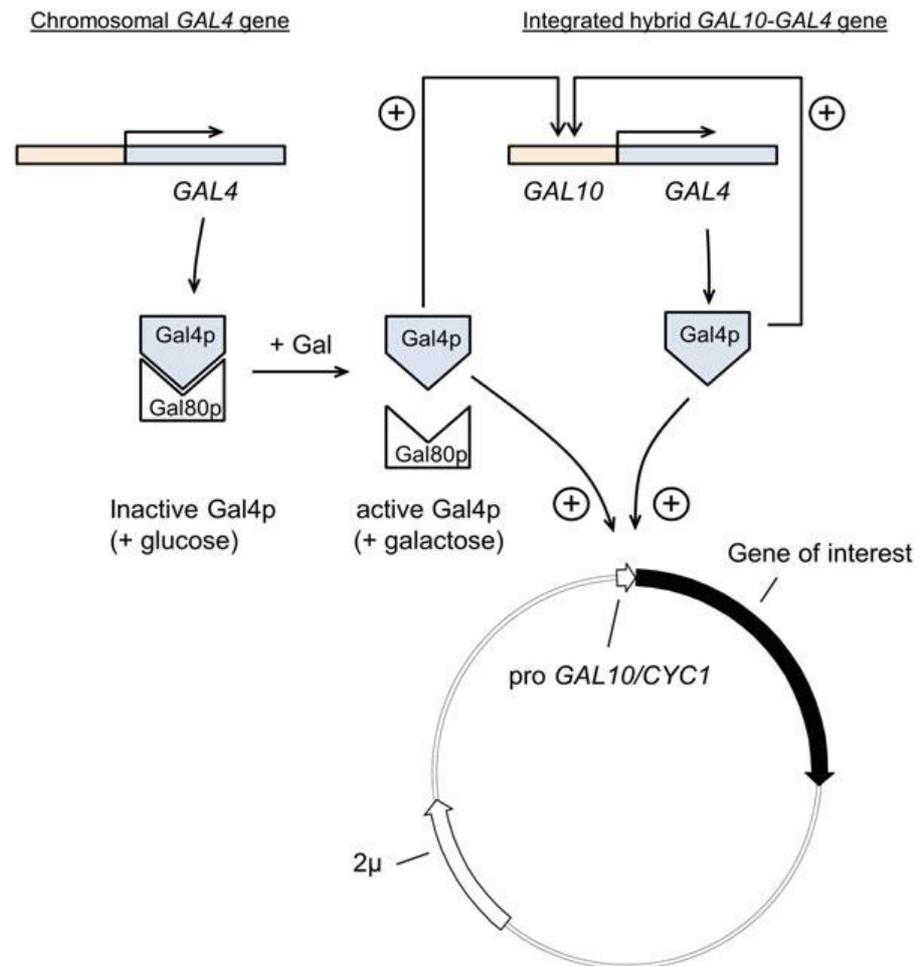
---

## 3 Methods

We previously developed methods for expression of integral membrane proteins, especially for expression of the wild-type and mutated rabbit  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA1a [2–6]. For this purpose, we use the pYeDP60 plasmid, generously given by Dr. Denis Pompon [7]. The pYeDP60 plasmid contains a strong and inducible *GAL10-CYCI* hybrid promoter which is fully repressed by glucose and activated by galactose. In addition to the classical *URA3* selection marker, this plasmid contains an *ADE2* selection marker. This marker is of special interest since even rich culture media become rapidly limiting for adenine upon yeast growth. Thus, yeast cells auxotrophic for adenine and transformed with pYeDP60 can grow in rich medium with minimal plasmid loss.

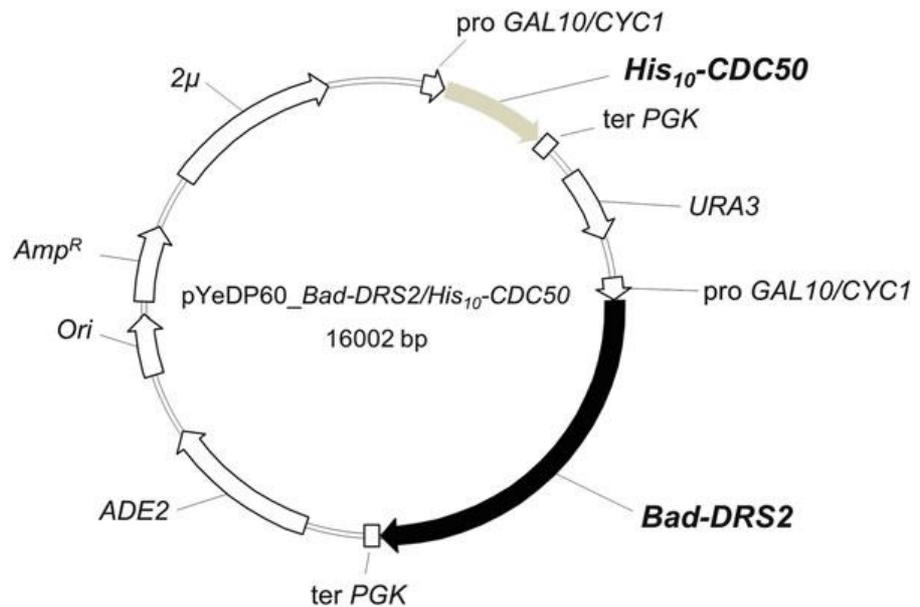
A common limitation to the use of recombinant *GAL* promoters for overexpression of foreign proteins is the low abundance of the Gal4p protein, which triggers transcription of genes that are controlled by *GAL* promoters. To overcome this limitation, we integrated a hybrid gene in the yeast chromosome consisting of the *GAL10* promoter fused to the *GAL4* gene [2, 8, 9] (Fig. 1). Following the addition of galactose to the culture medium, the integrant strain synthesizes substantially more Gal4p protein as well as more of the target protein.

In the particular case of the flippase complex broached here, the challenge is to achieve the functional and coordinated overexpression of the two membrane-embedded partners, i.e., the P-type ATPase Drs2p and its associated subunit Cdc50p. Toward this goal, we constructed a plasmid which contained *DRS2* and *CDC50* open-reading frames, both under the control of the *GAL10-CYCI*



**Fig. 1** Modification of the W303.1b yeast strain allowing regulated overproduction of the *GAL4* gene product. Gal4p is a positive regulatory factor required for the activation of transcription of genes under the control of *GAL* promoters. In the presence of glucose, the Gal80p protein antagonizes the action of the Gal4p protein. When glucose is entirely consumed and galactose is added to the medium, the interaction between Gal4p and Gal80p is disrupted and Gal4p may now activate *GAL* promoters. Chromosomal *GAL4* gene is constitutively expressed at very low levels in yeast cells (1–3 copies per cell). The W303.1b yeast strain has been genetically modified to integrate an additional copy of the *GAL4* gene fused to a *GAL10* promoter, allowing regulated overproduction of the *GAL4* gene product and an increased expression of foreign genes placed under the control of galactose-inducible promoters

inducible promoter [10, 11] (Fig. 2). The rationale for constructing this co-expression plasmid, rather than expressing the two proteins from different plasmids, was to avoid imbalanced transcription of *DRS2* and *CDC50* genes due to an unequal number of plasmids in each cell, a frequent behavior of 2  $\mu$ -based plasmids. To facilitate detection (and purification) of Drs2p and Cdc50p, a biotin acceptor domain (Bad), which is biotinylated *in vivo* in yeast, and a deca-histidine tag were added at the N-terminus of Drs2p and Cdc50p, respectively.



**Fig. 2** Map of the plasmid used for co-expression of Bad-Drs2p and His<sub>10</sub>-Cdc50p. The co-expression plasmid contains sequences encoding *CDC50* fused to an N-terminal decahistidine tag (*grey arrow*) and *DRS2* fused to an N-terminal Bad tag (*black arrow*), both under the control of a galactose-inducible *GAL10/CYC1* hybrid promoter. A short sequence encoding a tobacco etch virus (TEV) protease cleavage site was inserted between *DRS2* and *CDC50* open reading frames and their respective tags. Adapted from [10]. *ADE2* auxotrophy selection marker for adenine, *URA3* auxotrophy selection marker for uracil, *Ori* bacterial replication origin, *Amp<sup>R</sup>* gene conferring resistance to ampicilline, *2μ* yeast origin of replication, *ter PGK* phosphoglycerate kinase terminator sequence

Protein expression may be followed during the membrane preparation process, by Western blotting, using either a biotin probe coupled to horseradish peroxidase (HRP) (which binds to the biotinylated domain fused to Drs2p), or a histidine probe coupled to HRP (which binds to the Cdc50p decahistidine tag). The activity of the recombinant proteins may be followed by taking advantage of the fact that P-type ATPases undergo transient phosphorylation from ATP during their catalytic cycle.

### 3.1 Yeast Culture

#### 3.1.1 Yeast Transformation

W303.1b/*GAL4* cells are transformed with the desired pYeDP60 plasmids using the lithium-acetate/single-stranded DNA/PEG method [12].

1. Grow a 24-h culture at 28 °C and 180 rpm in S6AU medium.
2. Pellet 2 mL of cells for 5 min and 3000×g, at room temperature. Carefully discard the supernatant.
3. Add 50 μL of 2 mg/mL denatured SSD and about 1 μg plasmid DNA to the pellet. Mix up by vortexing.
4. Add 500 μL PLATE solution as well as 20 μL sterile 1 M dithiothreitol. Mix the pellet up by vortexing.

5. Incubate overnight at 20 °C.
6. Centrifuge yeast cells at 450 × *g* and resuspend the pellet in 100 μL selective S6A medium.

Then, spread the whole volume onto a S6A plate and incubate for 3–5 days at 28 °C. As *S. cerevisiae* W303.1b/*GAL4* is auxotrophic for uracil, only those yeast cells transformed with pYeDP60 plasmids will have the ability to grow on this minimal medium.

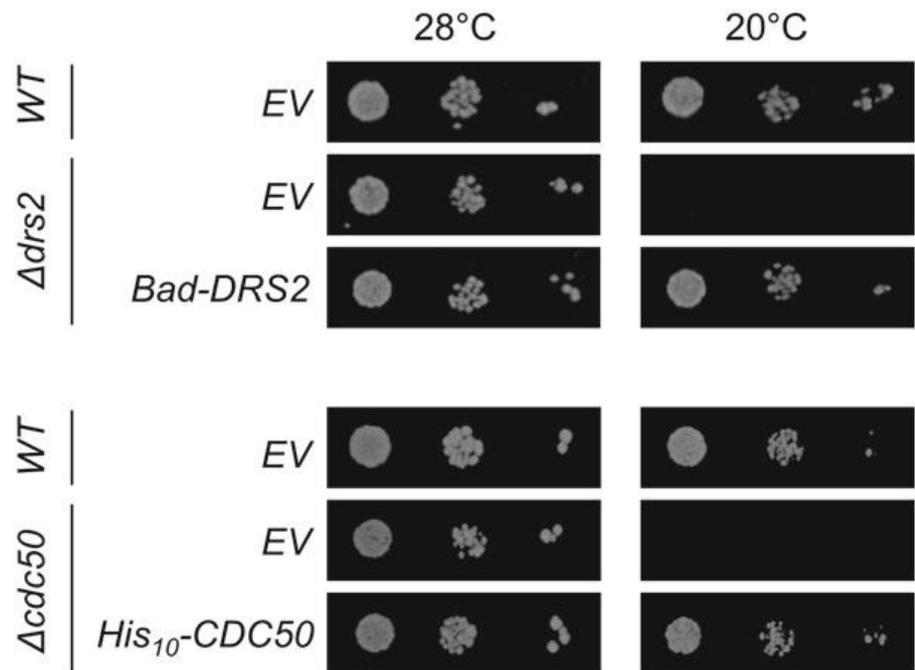
### 3.1.2 Functional Complementation of $\Delta drs2$ and $\Delta cdc50$ Cold-Sensitivity

A convenient way to check the functionality of the various constructs is to take advantage of the fact that  $\Delta drs2$  and  $\Delta cdc50$  cells exhibit a cold-sensitive growth phenotype [13].

1. Spread yeast cells (transformed with the desired expression plasmid and stored at –80 °C as a glycerol stock) onto S6A plates and incubate at 28 °C for about 72 h.
2. Inoculate a few colonies into 5 mL S6A liquid medium and grow at 28 °C and 180 rpm to mid-exponential phase for 24 h in a shaking incubator.
3. Dilute cultures serially (to 0.02, 0.001, and 0.0002 OD<sub>600</sub>) with a galactose- and fructose-containing S5AF medium (*see Note 4*). Spot 5 μL drops onto S5AF plates.
4. Incubate plates for 2–3 days at 28 °C or for 5–6 days at 20 °C. At the restrictive temperature of 20 °C,  $\Delta drs2$  and  $\Delta cdc50$  cells grow very slowly (Fig. 3).

### 3.1.3 Small-Scale Expression of Drs2p and Cdc50p in Minimal Medium

1. Spread yeast cells (transformed with the desired expression plasmid and stored at –80 °C as a glycerol stock) onto S6A plates and incubate at 28 °C for about 72 h.
2. Inoculate a few colonies into 5 mL S6A liquid medium and grow at 28 °C and 180 rpm to mid-exponential phase for 24 h in a shaking incubator.
3. Dilute cells grown in S6A into 20 mL S5A (containing 2 % galactose) to a final OD<sub>600</sub> of 0.2, to induce protein expression. Grow cells for 17 h at 28 °C, 180 rpm. After 17 h growth, the OD<sub>600</sub> should reach about 0.5.
4. Collect yeast cells (20 mL) by centrifugation at 1000 × *g* for 10 min at 4 °C in 50-mL tubes (*see Note 5*). Wash pellets once with ice-cold TEPI buffer (containing fresh protease inhibitors, 1 mM PMSF and 20 mM NaN<sub>3</sub>), and transfer to 1.5 mL tubes. Centrifuge the resuspended cells at 1400 × *g* for 10 min at 4 °C.
5. Resuspend cell pellets in 100 μL ice-cold TEPI buffer and add glass beads so that they reach the meniscus. Break cells by vortexing vigorously for 20 min at 4 °C.



**Fig. 3** Functional complementation of the temperature-sensitive phenotype of  $\Delta drs2$  and  $\Delta cdc50$  yeast cells. Yeast cells, either wild-type,  $\Delta drs2$ , or  $\Delta cdc50$  mutants, were transformed with plasmids bearing either *DRS2* tagged with a sequence coding for Bad, or *CDC50* tagged with ten histidines. Cells transformed with an empty vector (EV) were used as negative control. Serial dilutions of yeast cells were spotted on plates and incubated at 28 °C or at the restrictive temperature of 20 °C

6. Adjust volume to 1 mL with ice-cold TEPI buffer and spin down the lysate at  $500 \times g$  for 5 min at 4 °C to remove nuclei and unbroken cells.
7. Transfer supernatants to 1.5 mL ultracentrifuge tubes and spin down at  $72,000 \times g$  for 90 min at 4 °C (*see* **Notes 6** and **7**).
8. Remove the supernatant and add 200  $\mu$ L 1 $\times$  SDS/urea sample buffer to the pellet. Resuspend membrane pellets by vortexing for about 45 min at 4 °C. Incubate membrane samples for 10 min at 30 °C and analyze protein expression by Western blotting (*see* **Note 8**).

### 3.1.4 Large-Scale Expression of *Drs2p* and *Cdc50p* in Rich Medium

The procedure is described here for 4 L of yeast culture in glass Fernbach-type flasks, each flask containing 500 mL rich medium, but this protocol may be easily scaled up to 12 L.

1. Spread yeast cells (transformed with the desired expression plasmid and stored at  $-80$  °C as a glycerol stock) onto S6A plates and incubate at 28 °C for about 72 h.
2. Inoculate a few colonies into 5 mL of S6A medium and grow at 28 °C for 24 h and 180 rpm, in a shaking incubator (the cell density reaches saturation, i.e.,  $OD_{600} \sim 3$ , corresponding to  $9\text{--}15 \times 10^7$  cells per mL).

3. Inoculate this pre-culture into 50 mL of S6A medium in order to reach a final OD<sub>600</sub> of 0.1 and grow cells at 28 °C for 24 h and 180 rpm, in a shaking incubator (*see Note 9*). In the meantime, bring 4 L YPGE2X medium (without glucose and without ethanol) to 28 °C. That is, pour eight times 460 mL of sterile medium (which already contains the necessary amount of yeast extract and peptone for a final volume of 500 mL) in Fernbach flasks.
4. Prior to inoculation, add glucose and ethanol to the rich medium at a final concentration of 1 % (v/v) and 2.7 % (v/v), respectively. Add about 10 mL of the second pre-culture (at an OD<sub>600</sub> of about 2–3) to each flask containing 460 mL YPGE2X, to reach an OD<sub>600</sub> of about 0.05 (corresponding to 2–3 × 10<sup>6</sup> cells per mL). Grow cells at 28 °C and 130 rpm.
5. After 36 h growth, transfer the cultures into a water/ice bath for several minutes to allow cooling from 28 to 18 °C (*see Note 10*), and measure the OD<sub>600</sub> (~10). When a temperature of 18 °C has been reached, add 2 % galactose powder (10 g/flask) to induce expression of the recombinant proteins. Transfer cultures back to the incubator at 18 °C and shake at 130 rpm.
6. 13 h after the first induction, start the second induction by adding 2 % galactose and grow the culture for a further 5 h at 18 °C and 130 rpm.
7. Harvest cells immediately after the second induction (*see Note 11*).

### **3.2 Membrane Preparation after Yeast Growth in Rich Medium**

The procedure is described for 4 L of yeast culture (about 120–160 g yeast cells).

1. At the end of the culture, recover yeast cells in 4 centrifugation bottles (1 L each, *see Note 12*). Spin down for 10 min, at 4 °C and 4000 × *g*. Discard supernatants.  
*All subsequent steps are performed at 4 °C in a cold room.*
2. Wash yeast pellets with cooled water (with a volume equivalent to about 15 times the mass of yeast). Centrifuge resuspended cells for 10 min, at 4 °C and 4000 × *g*. After removing the supernatants, weigh the pellets. Usually, about 30–40 g of yeast are obtained for 1 L of culture.
3. Resuspend pellets in ice-cold TEKS buffer (2 mL TEKS per gram of yeast). Incubate the suspension for 15 min at 4 °C. At this stage, the cells may be transferred to a liner for easier resuspension. Centrifuge resuspended cells for 10 min, at 4 °C and 4000 × *g*.
4. Resuspend pellets with a small volume of TES buffer, equivalent to 1 mL per gram of yeast, so that the suspension eventually contains 1 mM PMSF and a 1× concentrated protease inhibitor cocktail. Using the liners, this step is easily carried out

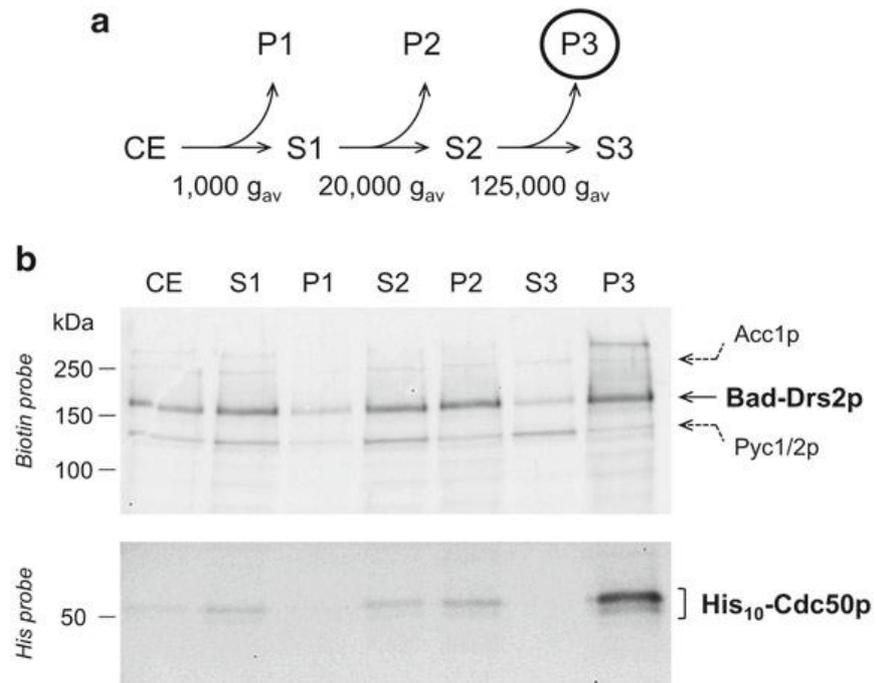
by hand kneading. Pour the resulting suspension into agate pots (80–225 mL may be handled in 500 mL pots), and add 0.5 mm diameter glass beads (a volume equal to the total volume of the suspension). Break yeast cells with a planetary mill, by shaking for 3 min at 450 rpm first, followed by a 30 s pause, and an additional shaking for 3 min at 450 rpm in the opposite direction (*see Note 13*).

5. For recovery of the crude extract from the agate pots, connect a vacuum pump to a filtering flask (3 L Erlenmeyer, as a trap), that is itself connected to a 50 mL pipette. This allows efficient sucking of the crude extract from the beads into the trap.
6. Wash the glass beads in three successive steps with a total washing volume of 180–240 mL TES buffer supplemented with 1 mM PMSF and the 1× protease inhibitor cocktail (1.5 mL buffer per g of yeast). Control the pH of the total crude extract (the first extract plus the washes will result in a total volume of about 0.4 L): it must be around 7.0–7.5. If not, adjust the pH by adding NaOH (*see Note 14*).
7. Spin down the total crude extract in 500 mL bottles at  $1000 \times g$  for 20 min, at 4 °C. Discard the pellet (P1), containing cell debris and nuclei (Fig. 4).
8. Centrifuge the corresponding supernatant (S1) in 500 mL bottles at  $20,000 \times g$  for 20 min, at 4 °C. Remove the supernatant (S2) with great care as part of the pellet is not firmly attached to the bottom of the bottle. Resuspend the pellet (P2), corresponding to “heavy” membranes, with the rest of S2 supernatant, and save for further analyses (Fig. 4).
9. Centrifuge the S2 supernatant in 70 mL polycarbonate bottles at  $125,000 \times g$  for 1 h, at 10 °C. Discard the supernatant (S3) (Fig. 4).
10. Resuspend the pellet (P3), corresponding to “light” membranes, at about 30–40 mg/mL of total protein in about 24–32 mL HEPES-sucrose buffer (0.2 mL per gram of yeast).
11. Homogenize P3 membranes with a Dounce homogenizer and store at –70 °C after snap freezing in liquid nitrogen (*see Fig. 4*: Western blot of the different fractions obtained in the course of the membrane preparation, using a biotin probe and a histidine probe).

### **3.3 Estimation of the Total Protein Concentration**

Estimation of the total protein concentration is performed in 96-well plates, using the bicinchoninic acid (BCA) assay [14].

1. The total volume of the assay mixture is 25  $\mu$ L, as follows: 10  $\mu$ L of the sample to be quantified (diluted at least ten times in water, in triplicates), 10  $\mu$ L of water, and 5  $\mu$ L of 10 % SDS (w/v) so that final concentration is 2 %.



**Fig. 4** Co-expression of Bad-Drs2p and His<sub>10</sub>-Cdc50p in yeast membranes. **(a)** Diagram of the membrane fractionation procedure. CE: crude extract; S1 and P1: supernatant and pellet recovered after low-speed centrifugation; S2 and P2: supernatant and pellet recovered after medium-speed centrifugation; S3 and P3: supernatant and pellet recovered after high-speed centrifugation. **(b)** Western blot analysis of Drs2p and Cdc50p expression in various samples collected throughout membrane fractionation. After SDS-PAGE, proteins were electrotransferred to PVDF membranes and immunostained with either a biotin probe (*top gel*) or a histidine probe (*bottom gel*). In both cases, 1.5  $\mu$ g total protein was loaded on gel. The biotin probe also weakly detects yeast proteins known to be biotinylated, Acc1p and Pyc1/2p (*dashed arrows*). Cdc50p appears as multiple bands corresponding to different glycosylation levels

2. For the standard curve, BSA is used. For reliability of the standard curve, the assay mixture must also contain 2 % SDS and the 10  $\mu$ L of water are replaced with 10  $\mu$ L of tenfold diluted TES or HEPES-sucrose buffer, depending on the sample tested. Establish the standard curve with BSA amounts comprised between 0 and 80  $\mu$ g (10  $\mu$ L of 0–8 mg/mL stock solution).
3. When SDS, the sample to be quantified, and water (or buffer) have been mixed together in a 1.5 mL tube for both the membrane samples and for the standard curve, add 225  $\mu$ L of a 50/1 BCA/CuSO<sub>4</sub> mixture. After 30 min incubation at 37 °C (*see Note 15*), transfer 200  $\mu$ L of each sample to 96-well plates. Prepare the BCA/CuSO<sub>4</sub> reagent just before use, to avoid premature oxidation.
4. Read the absorbance at 562 nm. The total protein concentration of the light membrane fraction (P3) is generally around

30–40 mg/mL and comparison, by Western blotting, of known amounts of the Bad-tagged SERCA1a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase with membrane fractions containing Bad-Drs2p allows us to estimate that Drs2p contributes to about 3 % of the total membrane protein content in P3 membranes [11].

### **3.4 SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)**

Gels are prepared according to the Laemmli procedure [15], using glass plates with 0.75 mm-thick spacers.

1. Separating gel: prepare 8 % acrylamide gels by mixing 1 mL of 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 with 1.07 mL of 30 % acrylamide/bis solution (29/1), 1.85 mL of water, 40  $\mu\text{L}$  of 10 % SDS, 40  $\mu\text{L}$  of 10 % ammonium persulfate and 2.4  $\mu\text{L}$  of TEMED (add ammonium persulfate and TEMED last, just before pouring), for a total of 4 mL (one gel). Pour the gel (3.2 mL), leaving space for a stacking gel, and overlay with water (*see Note 16*). The gel polymerizes within about 30 min at 20 °C.
2. Prepare the stacking gel by mixing 250  $\mu\text{L}$  of 1 M Tris-HCl pH 6.8 with 330  $\mu\text{L}$  of 30 % acrylamide/bis solution, 1.38 mL of water, 20  $\mu\text{L}$  of 10 % SDS, 20  $\mu\text{L}$  of 10 % ammonium persulfate and 2  $\mu\text{L}$  of TEMED (add ammonium persulfate and TEMED just before pouring), for a total of 2 mL (one gel). Remove the water on top of the separating gel, and pour an amount of stacking gel at least 1 cm-thick. Insert the comb immediately. The gel polymerizes within about 30 min at 20 °C.
3. Add the running buffer to the anode and cathode chambers of the gel unit.
4. Before running, mix samples with an equal volume of 2 $\times$  concentrated SDS/urea sample buffer and heat at 30 °C for 10 min. Load the samples onto the gels and run for 90 min, at 110 V and 25 mA/gel.

### **3.5 Western blotting for Drs2p and Cdc50p Immunodetection**

Samples that have been separated by SDS-PAGE may be transferred onto a PVDF membrane.

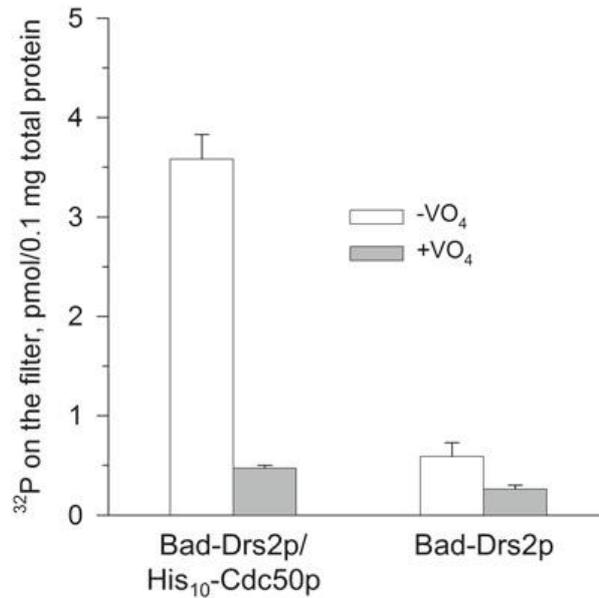
1. Soak the PVDF membrane briefly into pure methanol for maximum transfer efficiency.
2. Use prestained standards to check transfer efficiency.
3. Use TB buffer for transfer. In those conditions, the vast majority of the proteins ( $M_r$  ranging from about 20 to 200 kDa) are transferred from an 8 % Laemmli-type gel, in less than 1 h at 110 V. During transfer, set intensity to a maximum of 350 mA to prevent heating of the system. Along the same lines, place an ice cooling unit in the tank.
4. Following transfer, block unspecific binding sites on the PVDF membranes with PBS-T supplemented with 5 % dry milk, for 1 h at room temperature.

5. For detection of biotinylated proteins by the biotin probe, wash first membranes three times (10 min each) with PBS-T in order to remove any traces of milk (*see Note 17*). Add the probe (coupled to HRP) at a 1/25,000 dilution in PBS-T and incubate for 1 h at 20 °C.
6. For detection of histidine-tagged proteins, block the unspecific binding sites on PVDF membranes with PBS-T supplemented with 2 % BSA, for 1 h at room temperature. Add the histidine probe (coupled to HRP) at a 1/2000 dilution in PBS-T and incubate for 1 h at 20 °C.
7. In all cases, wash membranes three times with PBS-T buffer (10 min each), and two times with PBS (10 min each). The bound probes are revealed using ECL reagents and emitted light is detected using a CCD cooled camera (Fig. 4).

### **3.6 Phosphorylation from $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ of Drs2p Embedded in Light P3 Membranes**

Drs2p belongs to the P-type ATPase family. Those ATPases are able to form a stable phosphorylated intermediate during their catalytic cycle. Formation of this intermediate may be measured after incubation with  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  followed by acid quenching, using a filtration protocol [16] (*see Fig. 5*: phosphorylation from  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  of Bad-Drs2p in yeast membranes, in the absence or presence of its associated subunit Cdc50p).

1. Pre-incubate 40  $\mu\text{L}$  aliquots of P3 membranes, at 0.5 mg/mL total protein, on ice in buffer A, in the presence or absence of 1 mM orthovanadate.
2. Start phosphorylation by adding  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (at 0.25–1 mCi/ $\mu\text{mol}$ ) at a final concentration of 0.5  $\mu\text{M}$  (add 2  $\mu\text{L}$  of a 10  $\mu\text{M}$  stock solution).
3. Stop the phosphorylation reaction after 30 s phosphorylation (once steady-state is reached) by adding 1 mL of 500 mM TCA + 30 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Leave the samples on ice for at least 30 min after quenching, to allow aggregation of the precipitated proteins (*see Note 18*).
4. Filter the precipitated samples on either A/E glass fiber filters or GSWP nitrocellulose filters (pre-soaked with the quenching medium). Carefully rinse the filters with 50 mM TCA + 3 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .
5. Radioactivity is measured by scintillation counting. Place filters in a scintillation vial, add 4 mL FILTER-COUNT and shake until the filter is dissolved.
6. For the conversion of counts per minutes (cpm) to moles of phosphoenzyme formed, measure the radioactivity of various dilutions of the 10  $\mu\text{M}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  stock solution.



**Fig. 5** Co-expression of Cdc50p is required for phosphorylation from [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP of Bad-Drs2p expressed in P3 membranes. P3 membranes containing either Drs2p co-expressed with Cdc50p or Drs2p expressed alone were used. Samples were incubated on ice in buffer A, in the absence or presence of 1 mM orthovanadate. After 30 s phosphorylation on ice with 0.5  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, samples were quenched and filtrated. Phosphorylation of Drs2p in P3 membranes is three- to fourfold higher than that in P2 membranes (for the same amount of Drs2p and Cdc50p), suggesting that the P3 fraction contains a higher proportion of active Drs2p

## 4 Notes

1. In most cases, true optical densities do not depend on the particular equipment used; they only depend on the optical cell path length. However, to monitor the growth of an organism, what is generally significant is the turbidity of the sample, which depends on its light scattering properties. Be aware that when measuring with an ordinary spectrophotometer, the loss of transmitted light will depend on the geometry of the equipment. For our yeast cells at a given stage, the measured OD could vary by a factor 2 depending on the spectrophotometer used. The optical density values reported throughout this manuscript are measured with a Novaspec II (Pharmacia Biotech).
2. Previously, we used the Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail from Roche Diagnostics. However, in the case of Drs2p/Cdc50p expression, SIGMAFAST protease inhibitor cocktail proved more efficient at inhibiting unwanted protease activities. Another advantage of the SIGMAFAST protease inhibitor cocktail is that its composition is provided by the supplier.

3. If possible, prepare TB buffer the day before transferring, for efficient cooling. TB buffer is reusable 2–3 times and may be stored at 4 °C for about 1–2 weeks.
4. Fructose is added to the galactose-containing S5A medium to allow yeast growth at a fair rate, since galactose as the sole carbon source results in very poor yeast growth.
5. Using the swinging-bucket rotor is preferable in this case as it will allow yeast sedimentation to the bottom of the tube, and therefore limit loss of material when removing the medium after centrifugation.
6. We centrifuge at  $72,000 \times g$  in a TLA-45 rotor because this is the maximum speed allowed for such a rotor. If available, you may alternatively use a TLA-55 rotor and in this case, you may centrifuge for 1 h at  $100,000 \times g$ .
7. The procedure for small-scale membrane preparation may be stopped after ultracentrifugation and removal of the supernatant. Membrane pellets may be stored at  $-80$  °C after snap freezing in liquid nitrogen.
8. Drs2p is prone to aggregation when heated at temperatures that ensure denaturation (e.g., 2 min at 96 °C) before loading onto SDS-PAGE. This is the case even in the presence of urea, which has previously been shown to reduce significantly denaturation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA1a when incubated at high temperatures. Therefore, we incubate samples at 30 °C for 10 min prior loading onto SDS-PAGE.
9. Both pre-cultures are carried out in Erlenmeyer-type flasks, with a volume of culture which is at most one-tenth of the volume of the flask. This ensures optimal ventilation of the yeast culture.
10. Lowering the temperature of the medium to 18 °C significantly increases the amount of properly folded and active protein. It is likely that at this temperature, the yeast metabolism is slowed down, thereby facilitating integration of newly synthesized protein in the ER membrane. It might be especially relevant in the case of overexpressed proteins.
11. If necessary, yeast cells can be frozen after removal of the culture medium and stored at  $-80$  °C until their handling for membrane preparation.
12. Pay attention to the fact that depending on the geometry of your centrifugation tube (whether a sample has to migrate a few centimeters (as in preparative rotors) or a few millimeters (as, for example, in small tubes appropriate for TLA rotors) to reach the bottom of the tube), a given speed for a given period of time may lead to different results. That is why the volumes of centrifugation bottles are indicated.

13. Yeast breaking with the Pulverisette does occur at room temperature. Consequently, the culture will warm up. However, in our hands, thermal inertia of agate pots (the pots, the cells, and the beads are cold before starting shaking) allows the temperature to remain sufficiently low for preventing protein degradation.
14. Monitoring the pH is a critical step in the course of membrane preparation. Indeed, yeast breaking may result in the release of the vacuolar content and may contribute to acidifying the pH and therefore to increase the activity of vacuolar proteases.
15. To achieve good reliability for the protein assay, the period of time for color development should be long enough, so that highly diluted samples reach an  $OD_{562}$  significantly above background. Note that sorbitol contained in TES inhibits color development; thus, depending on the buffer used for membrane resuspension, you may need to adjust the time period for color development.
16. Alternatively, you may use isopropanol or ethanol for this purpose.
17. After blocking, traces of milk need to be carefully removed because of the presence of biotinylated proteins in milk. Hence, before incubation with the biotin probe, the PVDF membrane is washed three times with PBS-T. In addition, the biotin probe itself is diluted into PBS-T in the absence of milk.
18. We would like to mention here that for those phosphorylation measurements that are performed in the presence of detergent, the question arises as to whether the acid-denatured but previously detergent-solubilized Drs2p would be retained efficiently by the filters with relatively large pores (1  $\mu\text{m}$ ). In many cases, the answer is yes, provided that the acid-denatured proteins are kept on ice during a period of time sufficient for aggregation and therefore retention by the first filter. However, for a number of detergents, using two filters on top of each other for filtration revealed that the bottom filter contained 10–20 % of the radioactivity found on the first filter, suggesting that in those cases part of the radioactivity-carrying acid-quenched material had not been fully retained by the first filter.

---

## Acknowledgments

We are grateful to Dr. Miriam-Rose Ash for critical reading of the manuscript and for insightful discussions. We also thank Dr. Marc le Maire and Dr. Christine Jaxel for discussions. This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR

Blanc program, MIT-2M), the Ile de France region (Domaine d'Intérêt Majeur Maladies Infectieuses, DIM Malinf), and the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI, ANR-10-INSB-05-01).

## References

1. Lopez-Marques RL, Theorin L, Palmgren MG et al (2013) P4-ATPases: lipid flippases in cell membranes. *Pflügers Arch* 466:1227–1240
2. Lenoir G, Menguy T, Corre F et al (2002) Overproduction in yeast and rapid and efficient purification of the rabbit SERCA1a Ca(2+)-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1560:67–83
3. Cardi D, Montigny C, Arnou B et al (2010) Heterologous expression and affinity purification of eukaryotic membrane proteins in view of functional and structural studies: the example of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. *Methods Mol Biol* 601:247–267
4. Jidenko M, Lenoir G, Fuentes JM et al (2006) Expression in yeast and purification of a membrane protein, SERCA1a, using a biotinylated acceptor domain. *Protein Expr Purif* 48:32–42
5. Marchand A, Winther AM, Holm PJ et al (2008) Crystal structure of D351A and P312A mutant forms of the mammalian sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase reveals key events in phosphorylation and Ca(2+) release. *J Biol Chem* 283:14867–14882
6. Clausen JD, Bublitz M, Arnou B et al (2013) SERCA mutant E309Q binds two Ca(2+) ions but adopts a catalytically incompetent conformation. *EMBO J* 32:3231–3243
7. Pompon D, Louerat B, Bronine A et al (1996) Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods Enzymol* 272:51–64
8. Schultz LD, Hofmann KJ, Mylin LM et al (1987) Regulated overproduction of the GAL4 gene product greatly increases expression from galactose-inducible promoters on multi-copy expression vectors in yeast. *Gene* 61:123–133
9. Pedersen PA, Rasmussen JH, Jorgensen PL (1996) Expression in high yield of pig alpha 1 beta 1 Na, K-ATPase and inactive mutants D369N and D807N in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271:2514–2522
10. Jacquot A, Montigny C, Hennrich H et al (2012) Stimulation by phosphatidylserine of Drs2p/Cdc50p lipid translocase dephosphorylation is controlled by phosphatidylinositol-4-phosphate. *J Biol Chem* 287:13249–13261
11. Montigny C, Azouaoui H, Jacquot A et al (2014) Overexpression of membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae* for structural and functional studies: a focus on the rabbit Ca<sup>2+</sup>-ATPase Serca1a and on the yeast lipid “flipase” complex Drs2p/Cdc50p. Springer, New York, NY
12. Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR et al (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11:355–360
13. Chen CY, Ingram MF, Rosal PH et al (1999) Role for Drs2p, a P-type ATPase and potential aminophospholipid translocase, in yeast late Golgi function. *J Cell Biol* 147:1223–1236
14. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT et al (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76–85
15. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
16. Hatori Y, Hirata A, Toyoshima C et al (2008) Intermediate phosphorylation reactions in the mechanism of ATP utilization by the copper ATPase (CopA) of *Thermotoga maritima*. *J Biol Chem* 283:22541–22549

# **III. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS**

**(résultats sous forme d'articles)**

### **III.1. Co-expression et purification de l'ATPase-P4 Drs2p/Cdc50p, et sa caractérisation fonctionnelle (Article 2, publié (Azouaoui et al., 2014): A High-Yield Co-Expression System for the Purification of an Intact Drs2p-Cdc50p Lipid Flippase Complex, Critically Dependent on and Stabilized by Phosphatidylinositol-4Phosphate)**

#### **III.1.1. Introduction de l'article 2**

L'objectif à long terme du travail réalisé pendant cette thèse est la compréhension du mécanisme de transport des lipides par les ATPases-P4. Pour cela, il sera impératif d'avoir des informations sur les caractéristiques fonctionnelles des ATPases-P4, et aussi des informations structurales sur ces flippases. Une étape obligée est donc l'obtention de quantités significatives de ces flippases purifiées.

Notre équipe s'est intéressée à l'étude de l'ATPase-P4 de *Saccharomyces cerevisiae* Drs2p et de sa sous-unité associée Cdc50p. Pour obtenir des quantités importantes de protéines purifiées, des constructions de *DRS2* et *CDC50* ont été générées avec des étiquettes mises soit du côté 5' soit du côté 3' du gène, afin d'examiner l'effet de l'emplacement d'étiquettes sur l'expression et la fonction de nos protéines, et donc pouvoir par la suite choisir la construction la meilleure pour notre étude.

Dans un premier temps, nous avons effectué un test de criblage relativement grossier pour voir si nos constructions étaient fonctionnelles : un test de restauration du phénotype sauvage pour la croissance à basse température. En effet, la croissance de levures délétées pour leur gène *DRS2* ou *CDC50* est inhibée à basse température. Cette particularité n'est cependant pas complètement spécifique, puisque la délétion d'autres gènes entraîne également le même phénotype (Abe, 2007).

Dans un deuxième temps, nous avons construit (pour les constructions avec étiquettes mises du côté 5' ou 3' du gène) un vecteur de co-expression, portant à la fois le gène *DRS2* et le gène *CDC50*, tous deux sous le contrôle d'un même promoteur (Jacquot et al., 2012). L'avantage de cette stratégie est de contrôler le

nombre de copies de ces deux gènes dans la levure et d'avoir un nombre de copies équivalent pour les deux. Rappelons que Drs2p et Cdc50p sont censés fonctionner en complexe.

Dans un troisième temps, l'expression des deux types de constructions a été analysée et comparée, après leur surexpression dans les levures (protocole tiré de Jacquot et al., 2012), et les membranes contenant les protéines d'intérêt ont été préparées dans le but d'effectuer les premiers tests fonctionnels : puisque, comme toutes les ATPases de type P, les ATPases-P4 s'autophosphorylent au cours de leur cycle catalytique, ce sont des tests de phosphorylation et de déphosphorylation qui ont été effectués.

Après avoir choisi le meilleur type de construction, un protocole de purification de Drs2p et Cdc50p a été mis au point, dans le but de purifier ces protéines en quantités significatives. L'obtention de protéines purifiées a permis d'étudier non seulement si Drs2p et Cdc50p formaient effectivement un complexe, mais aussi la stœchiométrie du complexe.

L'obtention de protéines pures s'est révélée fort précieuse pour l'étude fonctionnelle de notre complexe Drs2p/Cdc50p, puisqu'elle a permis d'étudier non seulement les étapes de phosphorylation et déphosphorylation du cycle catalytique de notre enzyme, mais aussi l'activité ATPasique globale du complexe, et cela dans différentes conditions afin de mieux caractériser ce complexe. Par ailleurs, cette purification est évidemment le point de départ pour tout essai de cristallogénèse, et donc toute tentative d'obtention d'une structure cristallographique.

Les résultats détaillés de notre étude sont présentés dans l'article 2 Azouaoui et al., 2014, où notre travail est présenté étape par étape.

### ***III.1.2. Article 2***



# A High-Yield Co-Expression System for the Purification of an Intact Drs2p-Cdc50p Lipid Flippase Complex, Critically Dependent on and Stabilized by Phosphatidylinositol-4-Phosphate

Hassina Azouaoui<sup>1,2,3</sup>, Cédric Montigny<sup>1,2,3</sup>, Miriam-Rose Ash<sup>4,5</sup>, Frank Fijalkowski<sup>4,5</sup>,  
Aurore Jacquot<sup>1,2,3</sup>, Christina Grønberg<sup>4,5</sup>, Rosa L. López-Marqués<sup>4,6</sup>, Michael G. Palmgren<sup>4,6</sup>,  
Manuel Garrigos<sup>1,2,3</sup>, Marc le Maire<sup>1,2,3</sup>, Paulette Decottignies<sup>7,8</sup>, Pontus Gourdon<sup>4,5</sup>, Poul Nissen<sup>4,5</sup>,  
Philippe Champeil<sup>1,2,3</sup>, Guillaume Lenoir<sup>1,2,3\*</sup>

**1** Univ Paris-Sud, UMR 8221, Orsay, France, **2** CEA, iBiTec-S (Institut de Biologie et de Technologies de Saclay), SB<sup>2</sup>SM (Service de Bioénergétique, Biologie Structurale et Mécanismes), Laboratoire des Protéines Membranaires, Gif-sur-Yvette, France, **3** CNRS, UMR 8221, Gif-sur-Yvette, France, **4** Centre for Membrane Pumps in Cells and Disease – PUMPKIN, Danish National Research Foundation, Aarhus, Denmark, **5** Department of Molecular Biology and Genetics, Aarhus University, Aarhus, Denmark, **6** Department of Plant and Environmental Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark, **7** CNRS, Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire, UMR 8619, Orsay, France, **8** Univ Paris-Sud, Orsay, France

## Abstract

P-type ATPases from the P4 subfamily (P4-ATPases) are energy-dependent transporters, which are thought to establish lipid asymmetry in eukaryotic cell membranes. Together with their Cdc50 accessory subunits, P4-ATPases couple ATP hydrolysis to lipid transport from the exoplasmic to the cytoplasmic leaflet of plasma membranes, late Golgi membranes, and endosomes. To gain insights into the structure and function of these important membrane pumps, robust protocols for expression and purification are required. In this report, we present a procedure for high-yield co-expression of a yeast flippase, the Drs2p-Cdc50p complex. After recovery of yeast membranes expressing both proteins, efficient purification was achieved in a single step by affinity chromatography on streptavidin beads, yielding ~1–2 mg purified Drs2p-Cdc50p complex per liter of culture. Importantly, the procedure enabled us to recover a fraction that mainly contained a 1:1 complex, which was assessed by size-exclusion chromatography and mass spectrometry. The functional properties of the purified complex were examined, including the dependence of its catalytic cycle on specific lipids. The dephosphorylation rate was stimulated in the simultaneous presence of the transported substrate, phosphatidylserine (PS), and the regulatory lipid phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P), a phosphoinositide that plays critical roles in membrane trafficking events from the *trans*-Golgi network (TGN). Likewise, overall ATP hydrolysis by the complex was critically dependent on the simultaneous presence of PI4P and PS. We also identified a prominent role for PI4P in stabilization of the Drs2p-Cdc50p complex towards temperature- or C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>-induced irreversible inactivation. These results indicate that the Drs2p-Cdc50p complex remains functional after affinity purification and that PI4P as a cofactor tightly controls its stability and catalytic activity. This work offers appealing perspectives for detailed structural and functional characterization of the Drs2p-Cdc50p lipid transport mechanism.

**Citation:** Azouaoui H, Montigny C, Ash M-R, Fijalkowski F, Jacquot A, et al. (2014) A High-Yield Co-Expression System for the Purification of an Intact Drs2p-Cdc50p Lipid Flippase Complex, Critically Dependent on and Stabilized by Phosphatidylinositol-4-Phosphate. PLoS ONE 9(11): e112176. doi:10.1371/journal.pone.0112176

**Editor:** Robert J. Deschenes, College of Medicine, University of South Florida, United States of America

**Received:** August 1, 2014; **Accepted:** October 13, 2014; **Published:** November 13, 2014

**Copyright:** © 2014 Azouaoui et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability:** The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its supporting information files.

**Funding:** This work was supported by a grant from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR Blanc program MIT-2M to MIM and CM) and by the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI, ANR-10-INSB-05-01). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* Email: guillaume.lenoir@cea.fr

## Introduction

An essential feature of every eukaryotic cell is the asymmetric distribution of phospholipids between the two leaflets of membranes from the late secretory pathway. For instance phosphatidylserine (PS) is highly restricted to the inner leaflet of the plasma membrane [1]. Inside the cell, this specific distribution is

important, because the negatively charged headgroup of PS is for instance the target of C2 domain-containing proteins involved in key cellular processes like protein phosphorylation or membrane fusion [2,3], and more generally recruits various soluble proteins to the membrane via their polybasic motifs [4,5,6]. PS also affects the function of a number of transmembrane proteins

[7]. Conversely, appearance of PS outside the cell is an early indicator of apoptosis [8] and a signal to initiate blood clotting [9].

PS distribution is therefore regulated tightly and energy-dependent transporters, the so-called flippases, have been postulated to transfer PS (as well as other phospholipid species) from the exoplasmic to the cytosolic leaflet of cell membranes. Recent data have revealed that flippases are members of the P4 subfamily of P-type ATPases (P4-ATPases) (*e.g.* [10] for review), a large family of ATP-driven membrane transporters (divided in 5 subfamilies, P1 to P5) that pump various substrates across cell membranes. All P-type ATPases share a common feature, namely the ability to form an acid-stable phosphorylated intermediate during their transport cycle. Although most P-type ATPases characterized to date have been shown to transport cations across membranes, P4-ATPases likely transport phospholipids, thereby maintaining phospholipid asymmetry in cell membranes. Studies in yeast revealed a critical role for P4-ATPases in various vesicular transport pathways [11]. For example, the yeast P4-ATPase Drs2p is required for budding of clathrin-coated vesicles at the TGN [12] and for bi-directional transport between early endosomes and the TGN [12,13,14]. To explain the membrane trafficking defects that occur after inactivation of P4-ATPases in yeast, several hypotheses have been raised: P4-ATPases might serve as a platform for the recruitment of proteins more directly involved in vesicular transport (*e.g.* Gea2p [15,16]), or the P4-ATPase-catalyzed enrichment of specific lipids (such as PS) in the cytosolic leaflet might control the recruitment of proteins involved in vesicle formation, or the mere imbalance in phospholipid number caused by P4-ATPase-catalyzed lipid translocation would be directly involved in triggering initial membrane bending and subsequent vesicle formation – an early hypothesis supported by recent results from the Tanaka group [17,18].

High-resolution crystal structures from most P-type ATPase subfamilies (*i.e.* P1, P2, and P3) have already been obtained (*e.g.* [19,20,21,22]) and they indicate a common overall domain organization, with three cytoplasmic domains called the N-domain (nucleotide binding), the P-domain (phosphorylation), and the A-domain (actuator), as well as six to twelve  $\alpha$ -helices comprising the membrane-embedded part of the enzyme [23]. Based on sequence alignments, the overall structure and the catalytic mechanism of P4-ATPases are expected to resemble those of P2-ATPases [24], and like some other P-type ATPases, P4-ATPases form heteromeric complexes with an additional protein subunit, in this case of the Cdc50 family. However, despite these similar features, the likely transport substrates of P4-ATPases (phospholipids) are very different from those of the classical cation-translocating ATPases, and the position of a phospholipid binding site as well as the nature of the transport pathway remain open questions [25,26,27,28]. Hence, detailed structural and functional information is required to decipher the transport mechanism of P4-ATPases.

Quantitative purification in an active form is a prerequisite for detailed studies of any enzyme. For this purpose, the yeast Drs2p-Cdc50p lipid flippase complex has been overexpressed in yeast. Although previous studies described partial functional characterization of this purified flippase, only small amounts of Cdc50p were found to be attached to Drs2p [29,30]. There has also been some ambiguity about whether for purification in an active form, the Drs2p protein should preferably be tagged at its N-terminus or at its C-terminus [30,31], and in many instances, N-terminal and/or C-terminal extensions of P-type ATPases have indeed been suspected or found to have auto-inhibitory or regulatory roles [21,32,33]. Here, we shortly reexamine the effects of tagging the proteins at their N-terminal or C-terminal ends, and then describe

an efficient single-step procedure for purifying a stoichiometric Drs2p-Cdc50p complex in significant amounts. Such purification enabled us to characterize some of the functional properties of the purified complex, namely the dependence on specific lipids of its phosphorylation and dephosphorylation properties, its overall ATP hydrolysis rate, and its stability.

## Materials and Methods

### Materials

Products for yeast and bacteria cultures were from Difco (BD Biosciences). The Biotin probe (Avidin coupled to HRP) was from Sigma-Aldrich, the Histidine probe (India Hisprobe-HRP) was from Thermo Fischer Scientific, and the rabbit polyclonal antibody directed against the large cytoplasmic insertion located between transmembrane helices 4 and 5 of Drs2p (corresponding to P- and N-domains) was kindly provided by Dr T. Graham [34]. Goat anti-rabbit secondary antibody coupled to HRP was from Bio-Rad. DDM (n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside) was from Affymetrix (Anatrace detergents and lipids, United Kingdom), and octaethylene glycol mono-n-dodecyl ether (C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>) was from Nikkol Chemical (Tokyo, Japan). POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), DOPC (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), POPE (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine), POPS (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine), DMPS (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine), and PI4P were from Avanti Polar Lipids (COGER, France). Streptavidin-Sepharose resin was from GE Healthcare. Protino Ni<sup>2+</sup>-TED silica resin was from Macherey-Nagel (France). YM100 ultrafiltration units were from Amicon systems (Millipore). TSK-3000SW silica gel column was purchased from Tosoh Biosciences (Tessenderlo, Belgium). Products for SDS-PAGE, haloalkanes-containing gels (TGX Stain-Free Precast 4-20% Gels), and gel filtration standards were from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France). BSA (albumin fraction V) was from Roth Sochiel (France). [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP was from PerkinElmer Life Sciences (catalog number BLU002A). Glass fiber A/E filters (1  $\mu$ m porosity) were from Pall Corporation, and cellulose GS filters (0.22  $\mu$ m porosity) were from Millipore. The EDTA-free SIGMAFAST protease inhibitors tablets were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Most of the other chemical products were purchased from Sigma-Aldrich. Rabbit sarcoplasmic reticulum (SR) membranes were prepared as described previously [35].

### Yeast strains and plasmids

The *Saccharomyces cerevisiae* W303.1b/*GAL4 (a, leu2-3, his3-11, trp1-1::TRP1-GAL10-GAL4, ura3-1, ade2-1, can<sup>r</sup>, cin<sup>+</sup>)* yeast strain was the same as previously described [36]. The *Adrs2* and *Acde50* deletion mutants were created in W303.1b/*GAL4* background using a *loxP-HIS3-loxP* cassette, as described [37]. Plasmid pYcDP60 was generously given by Denis Pompon (LISBP, Toulouse, France). Plasmids allowing the expression of either Bad-tagged Drs2p or His<sub>10</sub>-tagged Cdc50p alone, as well as co-expression plasmids allowing coordinated overexpression of Bad-tagged Drs2p and His<sub>10</sub>-tagged Cdc50p, with the tags at either the N-terminus or the C-terminus (with a Tobacco Etch Virus (TEV) cleavage site between Drs2p and its tag, and with or without a TEV cleavage site between Cdc50p and its tag), were prepared as described previously [36,38]. When present, the cleavage site was flanked by 2 glycines toward the tag and 4 glycines toward *DRS2* or *CDC50*. Site-directed mutagenesis was performed using the mega-primer method for D560N [39], or the QuickChange site-directed mutagenesis system for E342Q.

### Functional complementation of $\Delta$ drs2 and $\Delta$ cdc50 growth defect

W303.1b/*GAL4* cells were transformed with the desired plasmid according to the lithium-acetate/single-stranded carrier DNA/PEG method [40]. Transformants were grown in a liquid glucose-containing medium, S6A (0.1% (w/v) bacto casamino acids, 0.7% (w/v) yeast nitrogen base, 2% (w/v) glucose, 20  $\mu$ g/mL adenine), for 24 hours at 28°C, and then serially diluted (to 0.02, 0.001, or 0.0002 OD<sub>600</sub>) with a galactose-containing medium, S5A (0.1% (w/v) bacto casamino acids, 0.7% (w/v) yeast nitrogen base, 2% (w/v) galactose, 20  $\mu$ g/mL adenine), supplemented with 1% (w/v) fructose to enable yeast growth at a fair rate. 5- $\mu$ l drops were spotted onto S5A plates (S5A medium + 2% (w/v) agar) supplemented with 1% (w/v) fructose, and incubated at 20°C for 5–6 days or at 28°C for 2–3 days.

### Expression of Drs2p-Bad and Cdc50p-His<sub>10</sub> in Fernbach flasks and yeast membrane preparation

Yeasts were transformed using the lithium-acetate/single-stranded carrier DNA/PEG method [40]. Yeast cultures, clone selection, recombinant protein expression and membrane preparation were performed as described previously [36,38]. Briefly, yeast growth took place in a glucose-containing rich growth medium at 28°C for 36 h, whereas expression of the proteins of interest took place during an additional 18 h in the presence of galactose at 18°C. Yeast cells were harvested by centrifugation, washed with the appropriate buffer, and subsequently broken with glass beads using a “Pulverisette 6” planetary mill (Fritsch). The crude extract was then spun down at 1,000 g for 20 min at 4°C, to remove cell debris and nuclei. The resulting supernatant was centrifuged at 20,000 g for 20 min at 4°C, yielding S2 supernatant and P2 pellet. The S2 supernatant was further centrifuged at 125,000 g for 1 h at 4°C. The resulting P3 pellet was finally resuspended at about 30 mg/mL of total protein in HEPES-sucrose buffer (20 mM HEPES-Tris pH 7.4, 0.3 M sucrose, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>). We estimated, by western-blotting, that the proteins in the P3 fraction comprise about 3% of Drs2p [38].

### Protein estimation and detection

In the membrane fractions, protein concentrations were measured with the bicinchoninic acid procedure [41] in the presence of 2% (w/v) SDS, using bovine serum albumin as a standard. For the purified sample, its UV absorption was measured at 280 nm, and converted into mg protein/mL on the basis of the optical extinction coefficient predicted from the sequences (www.expasy.org) for an equimolar mixture of Drs2p and Cdc50p. According to this prediction, 1 mg/mL complex should result in an OD of about 1.3 at 280 nm (for a 1-cm optical path). Alternatively, purified Drs2p was compared with known concentrations of Ca<sup>2+</sup>-ATPase from sarcoplasmic reticulum membranes (SERCA1a) using Coomassie Blue stained gels. Protein concentrations estimated by the two methods were similar.

For electrophoretic separation and identification, proteins were loaded onto SDS-PAGE [42]. Proteins on the gels were then either stained with Coomassie Blue (or silver nitrate), or transferred to PVDF membranes. Detection of the biotinylated Drs2p-Bad was performed using a Biotin probe (at a 1/25,000 dilution), detection of total Drs2p was performed using an  $\alpha$ -Drs2p antibody (at a 1/5,000 dilution), and detection of Cdc50p-His<sub>10</sub> was performed using a Histidine probe (at a 1/2,000 dilution).

In a few cases, before their staining with Coomassie Blue, proteins were visualized in-gel by light-induced specific chemical modification of their Trp residues by a haloalkane, which makes

these modified Trp residues fluoresce at a convenient visible wavelength [43,44].

Streptavidin resin samples were heated up to 90°C before loading onto SDS-PAGE (this was not the case for other samples) in order to allow dissociation of the strong SDS-resistant interaction of avidin with the biotin bound to the Bad-tagged Drs2p. This heating step is responsible for excessive formation of Drs2p aggregates in the corresponding samples (data not shown).

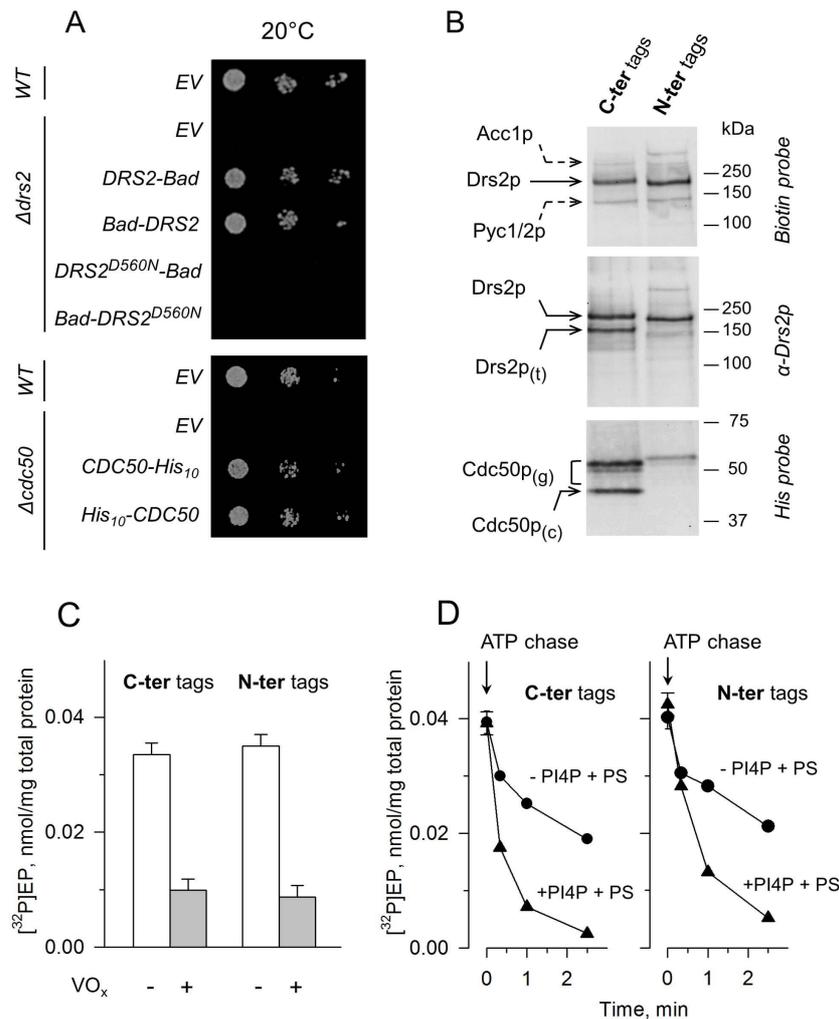
### Solubilization of P3 membranes and purification of the Drs2p-Cdc50p complex

P3 membranes obtained after co-expression of Drs2p and Cdc50p were diluted to 2 mg of total protein/mL (typically 120 mL) in ice-cold SSR buffer (Streptavidin Sepharose Resin buffer, containing 50 mM Mops-Tris at pH 7, 100 mM KCl, 20% (w/v) glycerol and 5 mM MgCl<sub>2</sub>), supplemented with 1 mM PMSF and an EDTA-free protease inhibitor mixture. DDM was added at a final concentration of 2 mg/mL (*i.e.* at a DDM: protein ratio of 1:1, w:w) and the suspension was stirred gently on a wheel for 15 minutes at 4°C. Insoluble material was pelleted by centrifugation at 100,000 g for 1 h at 4°C. The supernatant, containing solubilized proteins, was applied onto a streptavidin-Sepharose resin (typically 2.4 mL of previously washed resin per 120 mL of solubilized material) and incubated for 2 hours at 4°C to allow binding of the Bad-tagged Drs2p to the resin. To eliminate unbound material, the resin was washed four times with three resin volumes of SSR buffer supplemented with 0.5 mg/mL DDM and 0.025 mg/mL phosphatidylserine (POPS), in the presence of 1 mM PMSF but in the absence of the SIGMA-FAST protease inhibitor cocktail. Subsequent cleavage by TEV (at 0.03 mg/mL of total volume, resin + buffer) of the cleavage site inserted between Drs2p and its Bad moiety allowed release of Drs2p from the resin and simultaneous removal of the deca-histidine tag on Cdc50p, by overnight incubation at 6°C.

For removal of the His<sub>6</sub>-tagged TEV protease, the streptavidin-purified fraction was mixed with dry Ni<sup>2+</sup>-TED resin in a 500:1 Ni<sup>2+</sup>-TED:TEV ratio (w:w), and incubated for 45 minutes at 4°C with gentle mixing on a wheel. A TEV-free fraction was recovered by centrifugation at 500 g for 5 minutes.

For Size-Exclusion Chromatography (SEC)-HPLC, the streptavidin-purified sample was first incubated with Ni<sup>2+</sup>-TED, to remove the TEV protease, and then concentrated on YM100 ultrafiltration units (100 kDa cutoff). The YM100-concentrated fraction (about 4 mg/mL) was briefly centrifuged (120,000 g for 10 minutes in a Beckman Coulter TLA 100.3 rotor) to get rid of large aggregates. Aliquots (300  $\mu$ L each) of this concentrated supernatant were applied onto a TSK-3000SW column. Chromatography was performed at a flow rate of 1 mL/min, with the SEC-HPLC mobile phase buffer corresponding to SSR buffer without glycerol, supplemented with 0.5 mg/mL DDM and 0.025 mg/mL POPS. In order to limit unspecific adsorption of the proteins, filters and columns had been rinsed with the detergent- and lipid- containing buffer. The SEC purified fractions were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Standard soluble proteins (250  $\mu$ L at 1 mg/mL) were used to calibrate the column, and DDM-solubilized SERCA1a was used as a control. For the latter purpose, SR membranes were diluted to 4 mg/mL in the mobile phase buffer supplemented with 1 mM Ca<sup>2+</sup> and 40 mg/mL DDM. After 10 minutes incubation at 20°C, 550  $\mu$ L of this suspension was centrifuged at 120,000 g for 10 minutes in a TLA 100.3 rotor, and 500  $\mu$ L of the supernatant (solubilized material) was injected on the column.



**Figure 1. Co-expression in yeast and functional properties of C- or N-terminally tagged Drs2p and Cdc50p.** (A) Functional complementation of the temperature-sensitive phenotype of *Δdrs2* and *Δcdc50* yeast cells. Yeast cells, either wild-type, *Δdrs2*, or *Δcdc50* mutants, were transformed with plasmids bearing either *DRS2* (WT or D560N) tagged with a sequence coding for Bad, or *CDC50* tagged with ten histidines (His<sub>10</sub>). Tags were inserted at the proteins C- or N-termini. Cells transformed with an empty vector (EV) were used as negative control. Serial dilutions of yeast cells were spotted on plates and incubated at the restrictive temperature of 20°C. (B) Co-expression of C-terminally or N-terminally tagged Drs2p and Cdc50p in P3 membranes, as analyzed by western-blotting. For detection using a Biotin or a Histidine probe (top and bottom gels, respectively), 1.5 μg of total protein was loaded per lane and 1 μg total protein was used for detection with an α-Drs2p antibody (intermediate gel). The biotin probe also weakly detected endogenous yeast proteins known to be biotinylated, Acc1p and Pyc1/2p (dashed arrows). Drs2p<sub>(t)</sub>, truncated form of Drs2p; Cdc50p<sub>(g)</sub>, glycosylated forms of Cdc50p [36]; Cdc50p<sub>(c)</sub>, core (unglycosylated) Cdc50p. (C) Phosphorylation from [<sup>32</sup>P]ATP of P3 membrane fractions co-expressing the tagged Drs2p and Cdc50p proteins. Formation of the phosphoenzyme intermediate was measured in the absence or presence of 1 mM vanadate (open bars and grey bars, respectively). (D) Turnover-dependent dephosphorylation in the presence of DDM and POPS and in the presence (triangles) or absence (circles) of PI4P (see "Materials and Methods"). doi:10.1371/journal.pone.0112176.g001

### Analysis by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry of the purified Drs2p-Cdc50p complex

Mass spectrometry analysis was first performed using a procedure previously developed for detergent-solubilized and SEC-purified intact membrane proteins [45,46]. One microliter of the SEC purified sample was mixed with 3 μL of a saturated solution of sinapinic acid in 30% acetonitrile and 0.3% trifluoroacetic acid. One microliter of the mixture was loaded into a MALDI-TOF spectrometer (Perseptive Biosystems, Voyager DE-STR) equipped with a 337-nm nitrogen laser. Spectra were obtained in linear mode using delayed extraction. Mass range was

from 30,000–200,000 Da (accelerating voltage of 25 kV). The external standards used for calibration were: aldolase (39,211 Da) and albumin (66,429 Da) (Proteomass MALDI-MS standards, Sigma). Mass spectrometry was also used for unambiguous identification of Drs2p and Cdc50p in the final purified sample, as follows. SEC-purified samples were first loaded onto a 7% SDS-PAGE, and the gel was stained with Coomassie Blue. Bands of interest were excised manually and destained with a 50:50 mixture of acetonitrile:0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, and then submitted to tryptic digestion overnight at 37°C in 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. The supernatants were removed and peptides were extracted with 1% trifluoroacetic acid (TFA) then with 60% acetonitrile containing 1% (v/v) TFA. The combined extracts were evaporated to 2 μL,

mixed with the same volume of half-saturated solution of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile, 0.3% TFA, and submitted to MALDI-TOF mass spectrometry (Voyager DE-STR). Spectra were acquired in positive-ion reflector mode with delayed extraction, using six peptides of known masses as close external calibration standards. Proteins were identified using the Peptide Mass Fingerprint search program Mascot ([http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)) reducing the NCBIInr (release 20131113, 24201960 entries) to the *Saccharomyces cerevisiae* species. Two missed cleavage sites and possible oxidation of methionines were considered in searches.

### Phosphorylation from [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP and turnover-dependent dephosphorylation

Transient formation of the phosphoenzyme intermediate in the Drs2p catalytic cycle was measured after incubation with [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP followed by acid quenching, using a filtration protocol (see *e.g.* [47]).

For experiments with P3 membranes (Figure 1C and 1D), 40- $\mu$ L samples at 0.5 mg/mL of total protein were pre-incubated on ice in buffer A (100 mM KCl, 5 mM Mg $^{2+}$  and 50 mM Mops-Tris at pH 7), supplemented with 5 mg/mL DDM in the presence or absence of 0.25 mg/mL POPS or 0.25 mg/mL PI4P. In some cases, 1 mM orthovanadate was added. Phosphorylation was triggered by addition of 0.5  $\mu$ M [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (at 0.25–1 mCi/ $\mu$ mol) on ice (to avoid excessive ATP hydrolysis by Drs2p-unrelated proteins in crude membranes), followed after 25 seconds by acid quenching (typically 1 mL of 500 mM trichloroacetic acid (TCA) + 30 mM H $_3$ PO $_4$ ). Samples were left on ice for more than half an hour after quenching, a period sufficient for aggregation of the precipitated protein and therefore its retention by the filter (this aggregation period was critical in the presence of detergent). This was followed by filtration on either a glass fiber A/E filter or a nitrocellulose GSWP filter, and careful rinsing with dilute acid (50 mM TCA + 3 mM H $_3$ PO $_4$ ). The kinetics of turnover-dependent dephosphorylation were measured by first phosphorylating the sample for 25 seconds on ice under the above conditions and then chasing  $^{32}$ P from the phosphoenzyme by transferring it into a tube pre-equilibrated at 37°C and containing concentrated non-radioactive Mg-ATP (so that its final concentration was 1 mM) for dephosphorylation during the desired time period.

As purification of the Drs2p-Cdc50p complex allowed us to get rid of most of the other ATP-hydrolyzing proteins present in crude membranes, in this case, we could improve our phosphorylation protocol compared with phosphorylation of Drs2p in membranes: instead of allowing phosphorylation to proceed on ice and only then transferring the sample at 37°C for dephosphorylation, we could perform both phosphorylation and dephosphorylation at the same temperature (30°C). The purified sample (typically 40  $\mu$ L at 50–100  $\mu$ g protein/mL), on ice, generally in SSR buffer in the presence of detergent and exogenous lipids, was supplemented with [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP and immediately transferred to 30°C for phosphorylation, before classical acid quenching. Turnover-dependent dephosphorylation was measured by first phosphorylating the sample up to steady-state under the above conditions (typically 1 minute and a half) and then chasing  $^{32}$ P from the phosphoenzyme by simply adding concentrated non-radioactive Mg-ATP (so that its final concentration was 1 mM) for dephosphorylation during the desired time period at the same temperature (30°C). In some cases, phosphorylation and dephosphorylation were measured in a KNG buffer (SSR buffer containing 66 mM NaCl and 33 mM KCl instead of 100 mM KCl), with no obvious difference.

### ATPase activity of purified samples

P $_i$  released from ATP as a result of Mg-ATP hydrolysis was deduced from colorimetric measurements, as described in [48]. In some cases, the purified Drs2p-Cdc50p complex was first pre-incubated with VO $_x$ , BeF $_3^-$ , or AlF $_4^-$ . Typically, the enzyme (at about 50  $\mu$ g Drs2p/mL) was supplemented with Mg-ATP (generally 1 mM) and incubated at 30°C for various periods. At the desired time point, 33  $\mu$ L aliquots were withdrawn and quenched with 17  $\mu$ L of 10% SDS (plus antifoam). P $_i$  in these samples was subsequently revealed by adding ammonium-molybdate and zinc acetate at pH 5.0 [49], loading 96-well plates with these samples and measuring the resulting blue color at 850 nm, after 1–2 hours at room temperature. In some cases, ATPase activity was measured at lower concentrations of ATP, with 0.1 mg/mL pyruvate kinase and 1 mM phosphoenolpyruvate as a regenerating system. ATPase activities were measured in KNG buffer or in SSR buffer, with no difference.

Throughout this paper, the average of two to three independent data points ( $\pm$  SD) is displayed.

## Results

### Co-expression in yeast and functional properties of C- or N-terminally tagged Drs2p-Cdc50p complexes

In our previous work, we had chosen to introduce a Bad (Biotin Acceptor Domain) tag and a His $_{10}$  tag at the C-termini of Drs2p and Cdc50p, respectively, for their overexpression in yeast [36]. However, the position of affinity tags on Drs2p has been suggested to affect the activity of the resulting purified sample [30,31]. In the present work, we therefore investigated in more detail the result of an N-terminal location for these tags. We first looked at the ability of the two types of constructs to restore normal growth phenotypes in yeast strains deficient in one or the other of these proteins. When *Adc50* cold-sensitive yeast strains were transformed with an expression plasmid bearing the sole *CDC50* gene tagged at either its 5' or 3' end, growth at 20°C was restored in both cases (Figure 1A, bottom). When *Adrs2* cold-sensitive yeast strains were transformed with a plasmid bearing the sole *DRS2* gene, tagged at either its 5' or 3' end, growth at 20°C was also restored in both cases (Figure 1A, top), in agreement with a previous report in which a different set of tags was used [30]. However, expression of an inactive variant, bearing a mutation at the catalytic aspartate (D560N), did not restore growth at 20°C. Thus, at this step, the location of the tag did not appear to be critical, and we attempted to overexpress both types of constructs using a co-expression strategy where Drs2p and Cdc50p are both coded on the same plasmid and where protein expression may be achieved at high yeast cell densities [36].

After growth and expression, membranes were separated by differential centrifugation, and fractions recovered after high-speed centrifugation (P3) were submitted to SDS-PAGE. Use of a Biotin probe revealed similar expression levels for the Bad-tagged Drs2p, irrespective of the tag location. Endogenous proteins, *e.g.* Acc1p and Pyc1/2p, known to be biotinylated in yeast, were also detected (Figure 1B, top). For the construct with C-terminal tags, use of an antibody directed against Drs2p (kindly provided by Dr Graham) revealed two bands for Drs2p (Figure 1B, middle). This indicated the presence of a truncated form of Drs2p (Drs2p $_{(t)}$ ), lacking its C-terminally tagged end (since this degraded form was not detected by the Biotin probe). For this construct, use of a His probe also indicated that a significant fraction of C-terminally tagged Cdc50p was not glycosylated (Figure 1B, bottom). In contrast, for the construct with N-terminal tags, truncation of Drs2p was significantly less prominent and the relative contribution of the non-

glycosylated Cdc50p was also reduced (Figure 1B, middle and bottom). The fact that the truncated form of Drs2p was not revealed by the Biotin probe using either N- or C-terminally tagged constructs suggests that it results from degradation at both its N- and C-termini.

Incidentally, note that having the Bad tag at the C-terminus of Drs2p makes migration of the full-length Drs2p slightly slower than when this tag is attached at the N-terminus (Figure 1B, top and middle). Since subsequent Bad tag removal by TEV protease results in virtually identical mobilities (data not shown), this implies that the mere location of the tag affects the residual partial folding of Drs2p in SDS. The fact that SDS only partially unfolds proteins has already been documented for many other proteins [50]. The same fact is observed for Cdc50p tagged with His<sub>10</sub>, although in the opposite direction (Figure 1B, bottom). As subsequent tag removal again results in identical electrophoretic mobilities for both constructs (data not shown), this cannot be explained by different glycosylation levels.

We then compared the functional properties of C- or N-terminally tagged proteins. Two of these properties can be tested with crude P3 membranes, namely the ability of Drs2p to become phosphorylated and the rate of its dephosphorylation. In spite of their different susceptibility to proteolysis, C-terminally and N-terminally tagged Drs2p had a similar vanadate-sensitive phosphoenzyme level at steady-state (on a nmol <sup>32</sup>P per mg total protein basis) (Figure 1C). Moreover, the ability of phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P, a phosphoinositide previously shown to be closely associated with the flippase activity of Drs2p [16,31,36]) to stimulate dephosphorylation of Drs2p in the presence of phosphatidylserine was also observed in both cases (Figure 1D).

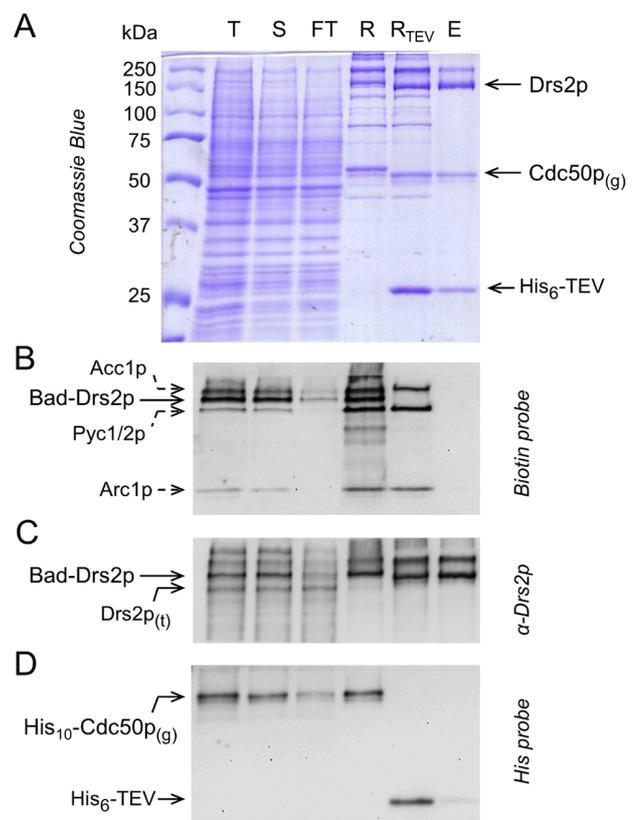
In the rest of this study, we focused on Drs2p-Cdc50p proteins overexpressed using the N-terminally tagged constructs, because of the lower extent of undesired proteolysis and of the more complete glycosylation in this case.

### Streptavidin-based single-step purification of Drs2p-Cdc50p complex

In previous experiments performed with solubilized crude membranes, we found that for protection of Drs2p from detergent-induced irreversible inactivation, DDM at a moderate concentration was one of the less deleterious detergents. DDM, for instance, was superior to C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> or Triton X-100 [36], and our purification procedure was therefore developed in the presence of DDM. Purification of the Drs2p-Cdc50p complex was achieved thanks to the strong interaction between the biotinylated Bad tag of Drs2p and an avidin-based resin. Figure 2 shows typical data obtained from N-terminally tagged constructs.

Solubilization of the Bad-tagged Drs2p and the His<sub>10</sub>-tagged Cdc50p was almost complete (compare T and S lanes in Figure 2B–2D). Most of the solubilized full-length Bad-Drs2p bound to the streptavidin resin (compare S and FT lanes in Figure 2B and 2C). In contrast, most of the solubilized truncated Drs2p (Drs2p<sub>(t)</sub>, Figure 2C) remained in the streptavidin flow-through, in agreement with the above suggestion that the truncated form of Drs2p has lost some of both its N- and C-termini.

The resin only retained a limited number of proteins (R lane in Figure 2A), primarily the full-length Bad-tagged Drs2p as well as endogenous, biotinylated yeast proteins (R lane in Figure 2B and 2C). Remarkably, the resin also retained most of His<sub>10</sub>-tagged Cdc50p (S, FT, and R lanes in Figure 2D), demonstrating that thanks to our co-expression strategy the N-terminally tagged Cdc50p is not produced in large excess compared with Drs2p, and



**Figure 2. Streptavidin-based purification of Drs2p and Cdc50p.** N-terminally Bad-tagged Drs2p and His<sub>10</sub>-tagged Cdc50p were purified onto a streptavidin column, and eluted by TEV cleavage. **(A)** Coomassie Blue stained 10% SDS-PAGE. **(B, C, D)** Immunodetection using a Biotin probe, a  $\alpha$ -Drs2p antibody and a Histidine probe, as indicated. T, total membranes before solubilization; S, DDM-solubilized fraction; FT, flow-through; R, Streptavidin Sepharose resin before addition of TEV; R<sub>TEV</sub>, Streptavidin Sepharose resin after incubation with TEV for 16 h at 6°C; E, fraction eluted from the resin after incubation with TEV. Drs2p<sub>(t)</sub>, truncated form of Drs2p; Cdc50p<sub>(g)</sub>, glycosylated form of Cdc50p; His<sub>6</sub>-TEV, N-terminally hexahistidine-tagged TEV. doi:10.1371/journal.pone.0112176.g002

strongly suggesting, in addition, that the majority of the expressed Cdc50p still interacts with Drs2p in the solubilized membranes.

Incubation of the resin with TEV protease (targeting a TEV protease cleavage site inserted between Drs2p and its Bad tag) made it possible to release Drs2p from the streptavidin beads. Cleavage was essentially complete for Bad-tagged Drs2p (Figure 2B). This was accompanied by a slight increase in the electrophoretic mobility of Drs2p (Figure 2A and 2C), while the addition of TEV did not affect the endogenous yeast proteins also retained by the resin. Cleavage was also complete for Cdc50p (Figure 2D), again with a distinct change in its migration rate (Figure 2A).

According to SDS-PAGE, the fraction eluted from the streptavidin beads contained highly pure and tag-free Drs2p and Cdc50p proteins, as well as some TEV protease (E lane in Figure 2). Note that TEV remained bound to the streptavidin resin to a significant extent (compare lanes R<sub>TEV</sub> and E in Figure 2A and 2D), presumably due to binding of the protease, after its proteolytic action, to the six residues that follow the resin-bound N-terminal Bad tag (consistent with this, the amount of TEV found in the eluate was larger when C-terminal constructs

were used, data not shown). In the final purified sample, the concentration of Drs2p was about 0.2–0.3 mg/mL, yielding a total of 1–2 mg purified Drs2p-Cdc50p for a 1-L yeast culture.

Final removal of the His<sub>6</sub>-tagged TEV protease was easily done by incubating the streptavidin-purified eluate (E<sub>s</sub>) with a nickel affinity resin, with only little non-specific loss of Drs2p and Cdc50p (Figure 3A).

The fact that some Cdc50p is found in the fraction eluted from streptavidin beads does not necessarily imply that all Drs2p molecules are in complex with Cdc50p (see for instance [29] where after a related purification attempt only 10% of purified Drs2p was found to interact with Cdc50p). To determine how much of the purified Drs2p is bound to its partner subunit, we co-expressed, together with Drs2p, a version of Cdc50p lacking the TEV-cleavage site between the His<sub>10</sub> tag and Cdc50p. In that case, purification on the streptavidin resin followed by TEV protease action results in a Drs2p-His<sub>10</sub>Cdc50p sample (D-His<sub>10</sub>C), instead of the previous tag-free Drs2p-Cdc50p sample (D-C). Subjecting this D-His<sub>10</sub>C sample to the Ni<sup>2+</sup>-TED step should allow the Ni<sup>2+</sup>-TED resin to capture Drs2p molecules that are in complex with His<sub>10</sub>-Cdc50p, while leaving Cdc50p-unbound Drs2p molecules in the flow-through, and therefore should make it possible to quantify the fraction of Drs2p molecules that are not associated with Cdc50p.

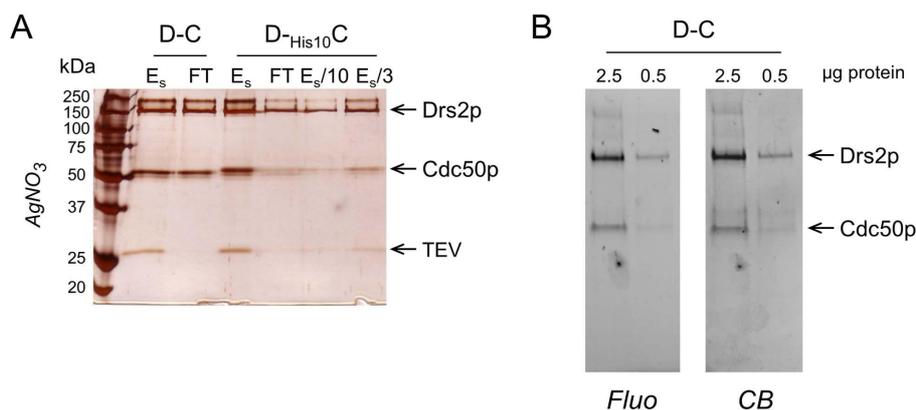
In such an experiment, only a small proportion of the His<sub>10</sub>-tagged Cdc50p eluted from the streptavidin resin was recovered in the Ni<sup>2+</sup>-TED flow-through (Figure 3A). Simultaneously, only a small proportion of Drs2p was present in this flow-through, indicating that the vast majority of Drs2p molecules are in tight complex with Cdc50p. Estimation of the proportions of His<sub>10</sub>-Cdc50p and Drs2p remaining in the Ni<sup>2+</sup>-TED flow-through was performed by comparison with various dilutions of the initial streptavidin eluate E<sub>s</sub> (Figure 3A, lanes E<sub>s</sub>/10 and E<sub>s</sub>/3), thus avoiding possible errors due to non-linearity of the silver staining procedure. It appears that the amount of Drs2p and Cdc50p in the flow-through corresponds for both proteins to about 20% of the initial total amount. This estimation was supported by western-blot analysis of the same samples (Figure S1). Therefore, at least

80% of Drs2p is bound to Cdc50p in the “E<sub>s</sub>” purified fraction. Note that in this experiment, the streptavidin eluate had been diluted five-fold before interaction with Ni<sup>2+</sup>-TED. It is therefore expected that the fraction of Cdc50p-bound Drs2p will be even greater than 80% in the original purified fraction, as dilution might lead to dissociation of the Drs2p-Cdc50p heterodimer.

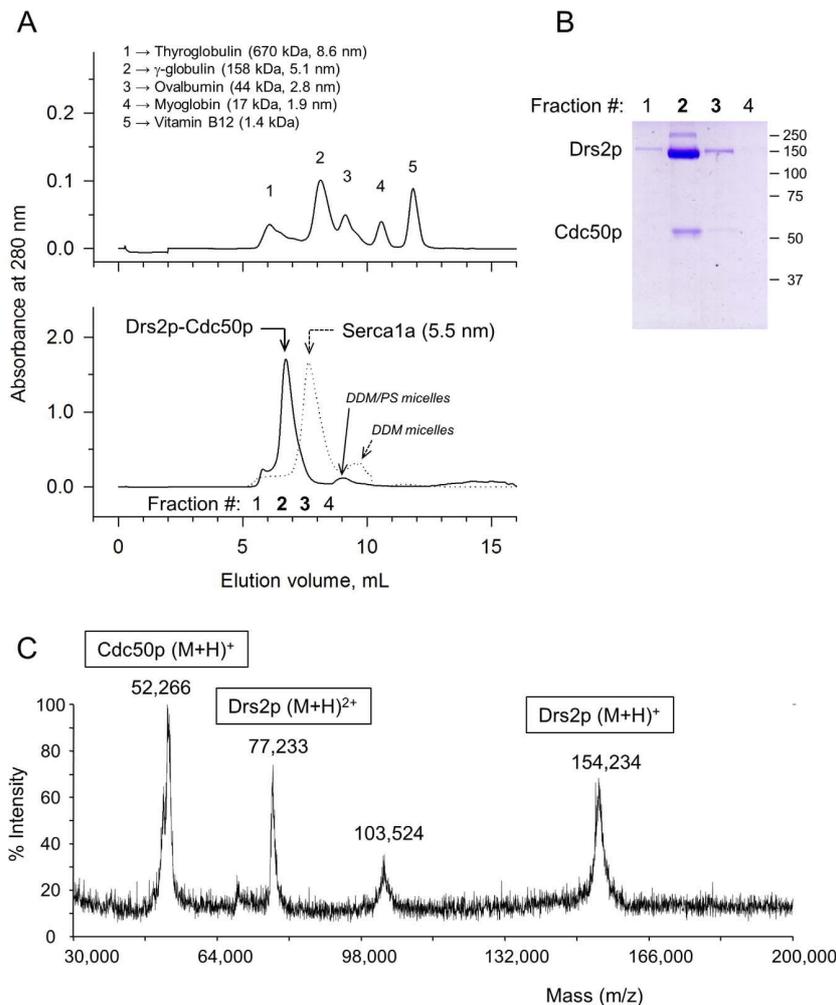
In our purified material, there is therefore neither excess Cdc50p (because of the Bad-dependent purification procedure), nor excess Cdc50p-unbound Drs2p (Figure 3). The stoichiometry of the complex itself was estimated using in-gel fluorescence after modification of the protein Trp residues by a haloalkane [43,44]. Indeed, assuming that all protein Trp residues behave similarly in the denaturing SDS-PAGE environment, the fluorescence intensities associated with Drs2p and Cdc50p bands should reflect their abundance. In-gel fluorescence quantification (Figure 3B, left) indicated a 3-fold higher fluorescence intensity for Drs2p than for Cdc50p, as expected for a 1:1 complex (mol:mol) on the basis of the molecular weights and respective Trp contents of Drs2p (154 kDa and 18 Trp) and Cdc50p (45 kDa for the non-glycosylated protein and 6 Trp). Note that estimating this stoichiometry on the basis of quantification of the Coomassie Blue stained corresponding bands (Figure 3B, right) leads to a similar 1:1 Drs2p:Cdc50p stoichiometry (mol:mol) in the streptavidin eluate.

#### Further analysis by size-exclusion chromatography (SEC) and mass spectrometry

After concentration on a 100 kDa centrifugal filter device, the purified Drs2p-Cdc50p sample was analyzed by SEC on a TSK-3000SW silica gel column, in the presence of DDM. Judging from the elution positions of soluble standards (Figure 4A, top) or of DDM-solubilized SERCA1a (110 kDa, 5.5 nm Stokes radius, Figure 4A, bottom), the main elution peak (Figure 4A, bottom) was found in the expected region. Its fairly symmetrical shape indicated a good homogeneity and the initial sample apparently contained only a very limited amount of aggregated material eluting in the column void volume. Cdc50p eluted together with



**Figure 3. The vast majority of Drs2p is in complex with Cdc50p, in a 1/1 stoichiometry.** (A) Yeasts were transformed either with a regular Bad-Drs2p/His<sub>10</sub>-Cdc50p construct (with N-terminal tags) or with a related construct in which the TEV cleavage site between the His<sub>10</sub> tag and Cdc50p had been omitted. This resulted, after streptavidin-based purification, in either the classical sample (D-C) or in a sample where Cdc50p remains tagged with His<sub>10</sub> (D-His<sub>10</sub>C). For both samples, the streptavidin-eluted fractions were diluted 5-fold (to about 70 µg/mL) in KNG buffer supplemented with 1 mg/mL DDM, 0.025 mg/mL PS and 0.025 mg/mL PI4P, and 300 µL of each diluted sample was mixed with 5 mg of dry Ni<sup>2+</sup>-TED resin (previously washed with the dilution buffer) and incubated on a wheel for 45 minutes in the cold room. Initial diluted samples (E<sub>s</sub>), and unbound material (FT), were loaded onto a 10% SDS-PAGE and stained with silver nitrate. For D-His<sub>10</sub>C, the E<sub>s</sub> sample was further diluted 3-fold and 10-fold and aliquots (E<sub>s</sub>/10 and E<sub>s</sub>/3) were loaded for comparison with the FT sample. (B) 2.5 µg and 0.5 µg of streptavidin-purified Drs2p-Cdc50p complex were loaded onto a haloalkane-containing 4–20% gradient gel for both in-gel fluorescence analysis (left, Fluo) and subsequent Coomassie Blue staining of the same gel (right, CB). doi:10.1371/journal.pone.0112176.g003



**Figure 4. Size-exclusion chromatography and mass spectrometry analysis of the purified Drs2p-Cdc50p complex.** (A) Top: calibration of the TSK-3000SW silica gel column with gel filtration standards. The elution volume of Thyroglobulin corresponds to the dead volume ( $V_0$ ), while Vitamin B12 is eluted at a volume close to the total volume ( $V_t$ ). Bottom: size-exclusion chromatography profile of the streptavidin-purified Drs2p-Cdc50p complex (continuous line). The streptavidin-purified and  $\text{Ni}^{2+}$ -TED-treated fraction was first concentrated on YM100 filters and 300  $\mu\text{L}$  was then injected on the column. Fractions 1–4 were collected. The dotted line shows the behavior of a control DDM-solubilized SR SERCA1a sample (500  $\mu\text{L}$  at 4 mg/mL was injected). (B) Analysis of the collected fractions on an 8% Coomassie Blue stained SDS-PAGE. (C) An aliquot of the SEC-eluted sample was submitted to mass spectrometry analysis. Spectra were acquired on a range of m/z values from 30,000 to 200,000. doi:10.1371/journal.pone.0112176.g004

Drs2p, as judged from SDS-PAGE analysis of eluted fractions, confirming the tight association of the two protein subunits (Figure 4B).

We also submitted the SEC-purified sample to complementary analysis by MALDI-TOF mass spectrometry, without any preliminary trypsinolysis. As displayed in Figure 4C, only a few peaks showed up, and they were in the expected range of molecular masses. One, presumably corresponding to the singly charged form of Drs2p, had an m/z at 154,324 Da, and another one, presumably corresponding to the same peptide with two positive charges, had an m/z at 77,233 ( $77,233 \times 2 = 154,466$ ). 154,324 and 154,466 are close to the theoretical mass expected for recombinant Drs2p, namely 154,050 Da (including what is left from the N-terminally located TEV cleavage site (one glycine), plus four glycines used as a linker between the TEV cleavage site and the N-terminus of Drs2p). A major peak also showed up with an m/z at 52,266, presumably corresponding to the monoionized

form of glycosylated Cdc50p (since the molecular mass of recombinant non-glycosylated Cdc50p is only 45,136, again including the linker glycines). The species detected at m/z of  $\sim 103,524$  presumably corresponds to dimers ( $52,266 \times 2 = 104,532$ ) of this glycosylated Cdc50p. The SEC-purified sample was also treated with trypsin, which allowed identification of several peptides corresponding to Drs2p and Cdc50p (data not shown).

The purification procedure described here allows us to recover a sample which contains Drs2p and Cdc50p in complex, most likely in a 1:1 stoichiometry. Starting from 240 mL of yeast P3 membranes at 2 mg protein/mL (prepared from 2.4 L of yeast culture), we recovered 4 mL of a SEC-purified fraction containing about  $0.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  of protein (as estimated from its absorbance at 280 nm), i.e. about 2.4 mg of purified Drs2p-Cdc50p (out of which  $\sim 1.8 \text{ mg}$  is Drs2p). We could therefore recover about 1 mg of SEC-purified complex per liter of yeast culture, with an

estimated purification yield of 13% assuming 3% Bad-Drs2p enrichment in the initial P3 fraction (see [36]).

### The purified Drs2p-Cdc50p complex retains a sub-micromolar apparent affinity for phosphorylation from ATP, as well as PI4P-stimulated dephosphorylation

At this step, we turned to functional characterization, and first asked whether the purified Drs2p-Cdc50p complex has retained the phosphorylation and dephosphorylation properties previously documented in crude membranes (Figure 1D and [36]). These analyses were generally performed with the streptavidin-purified Drs2p-Cdc50p complex (without SEC-HPLC), but we verified that this additional step left these properties essentially unchanged (data not shown).

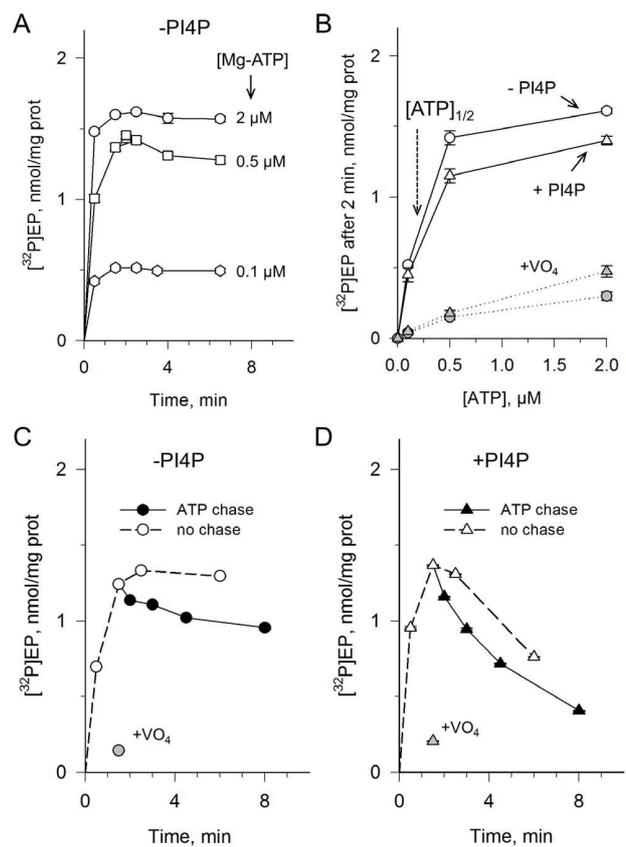
Firstly, the purified Drs2p-Cdc50p complex is efficiently phosphorylated from  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , up to a forty-fold higher level than solubilized crude membranes (about 1.6 nmol/mg in Figure 5A, compared with 0.04 nmol/mg in Figure 1D). We also found that the observed phosphorylation level was already nearly saturated at a Mg-ATP concentration of 0.5  $\mu\text{M}$  (Figure 5A). This sub-micromolar apparent affinity for Mg-ATP showed up both in the absence and presence of PI4P, whereas in the presence of vanadate the apparent affinity for ATP was much lower (Figure 5B).

Secondly, we found that after a chase with non-radioactive Mg-ATP in the presence of DDM and PS only, slow dephosphorylation of the purified Drs2p took place (Figure 5C). Similar to the situation for Drs2p in crude membranes, this dephosphorylation was accelerated by the additional presence of PI4P, with an estimated decay half-time of about 3–4 minutes (Figure 5D). The purified Drs2p-Cdc50p complex has therefore retained the phosphorylation and dephosphorylation properties previously demonstrated in native or solubilized crude membranes. It is of note that in the presence of PI4P, maximal phosphorylation was soon followed by a decline in the phosphoenzyme level even in the absence of any ATP chase (Figure 5D): the more transient phosphorylation level observed in the presence of PI4P, compared to that in its absence (Figure 5C), is qualitatively consistent with the idea that a faster rate of dephosphorylation in the presence of PI4P results in a faster exhaustion of  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (here used at a total concentration of only 0.5  $\mu\text{M}$ ).

### The WT Drs2p-Cdc50p complex exhibits a PI4P-dependent ATPase activity, while for inactive constructs, only PI4P-independent activity is observed

As most of the ATP hydrolyzing contaminants in yeast membranes have presumably been removed during purification, the ATPase activity of the Drs2p-Cdc50p complex could be examined. At 30°C, we were indeed able to detect ATPase activity, and also to reveal, for the WT enzyme, its strong dependence on PI4P (Figure 6B).

We then purified inactive variants, to verify that this PI4P-stimulated ATPase activity was indeed related to Drs2p-Cdc50p. We first generated a Drs2p version mutated on the catalytic aspartate (D560N variant) and co-expressed it together with Cdc50p (D<sup>D560N</sup>-C). We could not detect any PI4P-dependent ATPase activity for the D<sup>D560N</sup>-C complex (Figure 6C), but in this case, Drs2p<sup>D560N</sup> and Cdc50p had both been expressed and therefore purified at very low levels (ATPase activities were measured at relative protein concentrations identical to those illustrated on the gels in Figure 6A). However, the PI4P-independent ATPase activity observed for the D560N variant was fairly similar to that of the WT, despite the very large

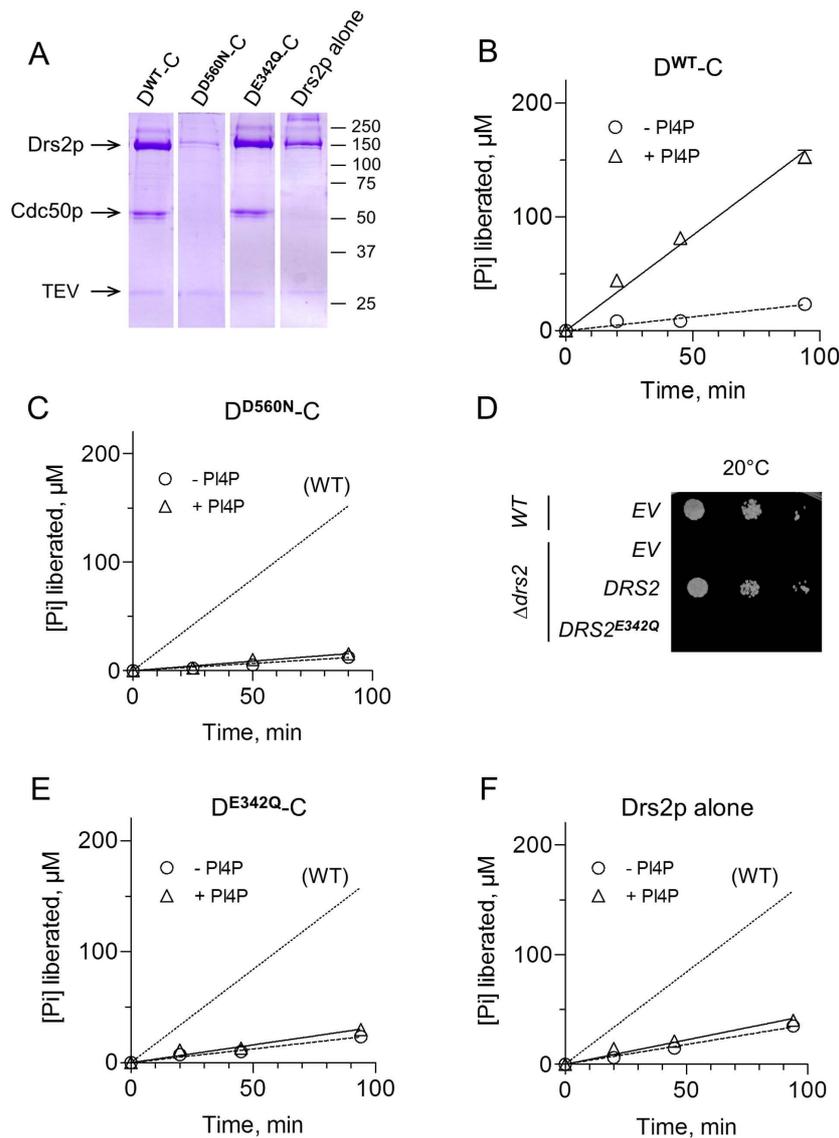


**Figure 5. Phosphorylation and dephosphorylation properties of the purified Drs2p-Cdc50p complex.** (A) Time course of ATP-dependent phosphorylation of the purified Drs2p-Cdc50p complex at various concentrations of  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . The streptavidin-purified and  $\text{Ni}^{2+}$ -TED-treated sample, diluted to about 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in SSR on ice in the presence of 1 mg/mL DDM and 0.05 mg/mL POPS, was supplemented with  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (typically 4  $\mu\text{L}$  of concentrated ATP was added to 40  $\mu\text{L}$  enzyme) and brought to 30°C for various periods before acid quenching and filtration. (B) ATP-dependence of the maximal phosphorylation level, in the absence (open circles) or presence (open triangles) of PI4P at 0.025 mg/mL. In some cases, the purified sample had been first pre-incubated with 1 mM vanadate (grey symbols). (C and D) The streptavidin-purified sample (here before  $\text{Ni}^{2+}$ -TED treatment, and diluted to about 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was supplemented with 0.5  $\mu\text{M}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  in the absence (C) or presence (D) of PI4P, and phosphorylation at 30°C was measured (white symbols). Grey symbols refer to experiments performed in the presence of vanadate. To trigger ATP-induced chase of the radioactively-labelled phosphoenzyme, 1 mM non-radioactive Mg-ATP was added after 1.5 minute (black symbols, in the absence of vanadate).

doi:10.1371/journal.pone.0112176.g005

difference in Drs2p concentrations. This suggests that most of this PI4P-independent ATPase activity is not related to the Drs2p-Cdc50p complex.

To rule out the possibility that the PI4P-dependent activity could be mediated by a minor but very active co-purified contaminant, rather than by Drs2p itself, we looked for another mutation that would make Drs2p inactive, without compromising its interaction with Cdc50p. Along those lines, it has been reported that the E342Q mutation of the DGET motif (corresponding to TGES in P2-ATPases), which is known to be critical for dephosphorylation in P-type ATPases (including P4-ATPases, see [25]), preserves the Drs2p-Cdc50p interaction [29]. Upon



**Figure 6. ATPase activities of various streptavidin-purified samples.** (A) Coomassie Blue staining after SDS-PAGE of purified wild-type complex ( $D^{WT-C}$ ), D560N variant ( $D^{D560N-C}$ ), E342Q variant ( $D^{E342Q-C}$ ), and wild-type Drs2p expressed alone. (B–C and E–F) The ATPase activity of the same samples (after 5-fold dilution resulting in about 60  $\mu\text{g/mL}$  Drs2p in the case of the WT enzyme) was measured at 30°C in a KNG medium supplemented with 1 mg/mL DDM, 0.025 mg/mL PS and 1 mM Mg-ATP, in the absence (circles and dashed lines) or presence (triangles and continuous lines) of 0.025 mg/mL PI4P. The dotted line in panels C–F is given for easier comparison with results for WT. (D) Functional complementation of the temperature-sensitive phenotype of  $\Delta\text{drs2}$  yeast cells. Yeast cells, either wild-type or  $\Delta\text{drs2}$ , were transformed with plasmids bearing *DRS2* tagged at its 5' end, either WT or E342Q. Cells transformed with an empty vector (EV) were used as negative control. Serial dilutions of yeast cells were spotted on plates and incubated at the restrictive temperature of 20°C. doi:10.1371/journal.pone.0112176.g006

expression in yeast membranes, the Drs2p<sup>E342Q</sup> variant could not restore growth of  $\Delta\text{drs2}$  cells at low temperatures (Figure 6D), suggesting that the mutation indeed makes Drs2p inactive. After co-expression of such a Drs2p<sup>E342Q</sup> variant with Cdc50p, the Drs2p<sup>E342Q</sup>-Cdc50p complex could be purified at wild-type levels (Figure 6A). Although its activity in the absence of PI4P was of the same order of magnitude as those observed for the other complexes, no PI4P-dependent activity could be detected for this inactive complex (Figure 6E).

To further strengthen our conclusions, we also purified wild-type Drs2p after its expression in the absence of Cdc50p (Figure 6A). We knew that in the absence of Cdc50p, Drs2p was

not able to undergo phosphorylation from  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  [29,36]. Consistent with expectation, purified Drs2p did not exhibit any detectable PI4P-dependent ATPase activity (Figure 6F), while the ATPase activity measured in the absence of PI4P was similar to that found for WT ATPase. As an additional control, we also purified Cdc50p alone, using a Bad-tagged version of Cdc50p. Again, that purified sample displayed a background PI4P-independent ATPase activity but no detectable PI4P-dependent ATPase activity (data not shown).

From these results we conclude that the PI4P-independent ATPase activity in the purified samples is most probably due to a contaminant with a substantial specific activity, given that no

contaminating band could be visualized on SDS-PAGE (Figure 6A). In contrast, the PI4P-dependent ATPase activity can be unambiguously attributed to the wild-type Drs2p-Cdc50p complex. Consistent with this, it is worth mentioning that after SEC-HPLC, the PI4P-independent activity was reduced compared to the PI4P-dependent activity, consistent with reduction of contaminants during SEC-HPLC (data not shown).

Note that in the experiments displayed in Figure 6B, about 180  $\mu\text{M}$   $\text{P}_i$  was produced in 100 min for a Drs2p concentration estimated to be 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , implying a specific activity of about 0.03  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  (at 0.025  $\text{mg}/\text{mL}$  PS and 0.025  $\text{mg}/\text{mL}$  PI4P). This activity varied somewhat from batch-to-batch, up to 2-fold.

### Characterization of the PI4P-dependent ATPase activity of the purified Drs2p-Cdc50p complex

Now focusing in more detail on the PI4P-dependent ATPase activity of WT Drs2p-Cdc50p complex, this activity appeared to have a number of very attractive features. In the presence of 1  $\text{mg}/\text{mL}$  DDM and 0.05  $\text{mg}/\text{mL}$  POPS, it was stimulated by PI4P to a high degree and the apparent  $[\text{PI4P}]_{1/2}$  was of the order of a few  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (or a few  $\mu\text{M}$ ) only (Figure 7A) (since PI4P does not distribute equally in the total volume but is mainly found in mixed micelles together with DDM, here used at 1  $\text{mg}/\text{mL}$ , this apparent affinity is more significantly expressed in terms of PI4P/DDM ratio:  $[\text{PI4P}]_{1/2}$  was of the order of a few  $\mu\text{g}$  of PI4P per  $\text{mg}$  of DDM). Compared with this high affinity, the apparent affinity for PS (Figure 7A), in the presence of a nearly saturating concentration of PI4P (0.025  $\text{mg}/\text{mL}$ ), was poorer:  $[\text{PS}]_{1/2}$  was certainly higher than 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Note that since purification was performed in the presence of PS, the assay medium contained in all cases  $\sim 80$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  of residual PS derived from the purification procedure, hence the uncertainty about the activity in the total absence of PS.

For testing the individual effect of each lipid, we therefore omitted PS during the final steps of the purification procedure (*i.e.* the washing steps which precede TEV addition, as well as the subsequent elution), to better control the amount of PS in the final purified sample. Under the conditions of the present relatively rapid purification protocol, the absence of PS was not deleterious and the enzyme could be purified in a very similar manner (inset to Figure 7B). In the absence of PI4P (Figure 7B), the ATPase activity was independent of the addition of POPC or POPS. In the presence of PI4P (Figure 7B), POPC only had a slightly stimulating effect, POPE had a larger one, and PS had the largest stimulating effect, irrespective of its fatty acyl chain (POPS or DMPS). Addition of PI4P alone to the purified sample had a small effect per se, possibly due to residual PS strongly bound to the purified complex.

Using the enzyme purified in the presence of PS throughout, the apparent affinity for Mg-ATP was about 10  $\mu\text{M}$  in the presence of PI4P (Figure 7C and 7D). This apparent affinity, deduced from overall ATPase measurements, is poorer than the sub-micromolar apparent affinity deduced from steady-state phosphorylation measurements (Figure 4), but for P-type ATPases this is a quite common observation, because of the modulatory effect of ATP on other steps of the functional cycle besides the phosphorylation step itself [51,52]. Note that an apparent affinity of 10  $\mu\text{M}$  for Mg-ATP for the present purified sample is far stronger than the one previously reported for Drs2p (1.5  $\text{mM}$  in [30]).

We also tested the sensitivity to orthovanadate and metallofluorides of the PI4P-dependent activity of our purified Drs2p-Cdc50p sample. These classical inhibitors of P-type ATPases did affect the ATPase activity of Drs2p-Cdc50p, but vanadate had a

rather poor  $K_I$ , in the millimolar range (Figure 7E). In contrast,  $\text{BeF}_3^-$  and  $\text{AlF}_4^-$ , which are known to be reactive with E2-like states of other P-type ATPases (*e.g.* [35]), significantly inhibited the ATPase activity of Drs2p-Cdc50p for concentrations as low as 150  $\mu\text{M}$  (Figure 7F).

### PI4P protects the purified Drs2p-Cdc50p complex from irreversible denaturation under various conditions

We previously found that during overnight incubation at 4°C of P3 membranes solubilized at a high DDM to protein ratio (10:1, w:w), a ratio likely to result in delipidation of the solubilized proteins, Drs2p slowly lost its ability to get phosphorylated [36]. We now examined the stability of the streptavidin-purified complex to identify optimal conditions for future studies (*e.g.* for crystallization).

When incubation in the presence of DDM took place at 30°C, the Drs2p-Cdc50p complex lost its phosphorylation ability very rapidly (over minutes) in the absence of PS (open circles in Figure 8A). The presence of PS exerted significant, but only partial, protection (Figure 8A). DOPC was even less effective than POPS (data not shown). In contrast, we found that the presence of PI4P afforded complete protection at 30°C, and this was in fact true both in the presence and the absence of POPS (Figure 8A).

At 20°C, PS alone was sufficient to make the Drs2p-Cdc50p complex fairly stable over 3 hours in the presence of DDM (Figure 8B), and additional PI4P was therefore not needed. This was however no longer the case in the presence of the more deleterious  $\text{C}_{12}\text{E}_8$ , and in this case the additional presence of PI4P afforded significant stabilization (Figure 8C). Note that in this experiment a significant amount of residual DDM was left together with  $\text{C}_{12}\text{E}_8$ , resulting in a  $\text{C}_{12}\text{E}_8/\text{DDM}$  ratio of about 1/1 (w/w).

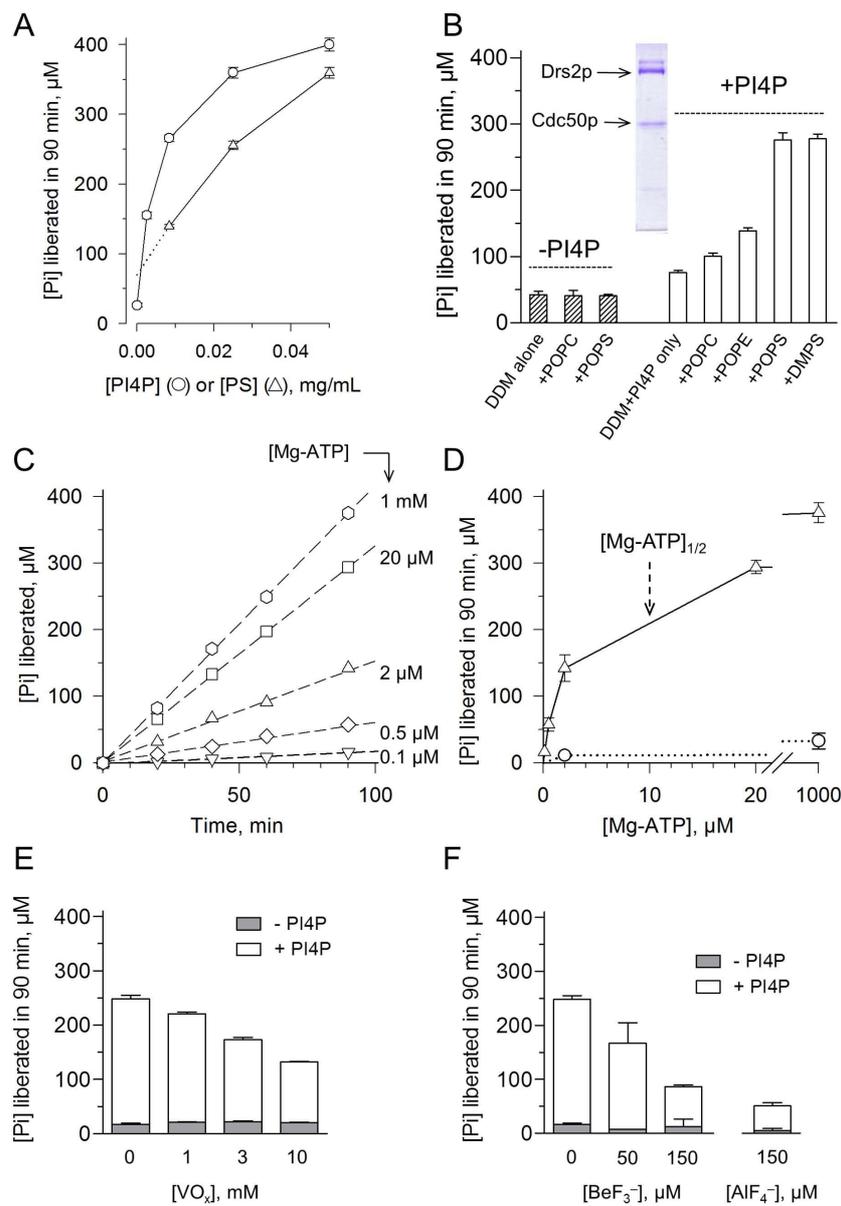
At 4°C, PI4P allowed Drs2p to remain perfectly stable in the same  $\text{C}_{12}\text{E}_8/\text{DDM}/\text{PS}$  environment (Figure 8D), just as stable as in the presence of PS alone in DDM (Figure 8D).

Protection of the Drs2p-Cdc50p complex by PI4P, either in the presence of  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  or in DDM at a temperature higher than 4°C, was also checked by measuring the residual ability of the complex to hydrolyze ATP in the presence of PI4P (not only to get phosphorylated from it). The residual ATPase activities were consistent with the residual phosphorylation levels with respect to the ability of PI4P, in addition to POPS, to protect the protein from DDM- or  $\text{C}_{12}\text{E}_8$ -induced damage. In fact, the ATPase activity was even slightly more resistant to inactivation than phosphoenzyme formation (Figure S2). This strong stabilizing effect of PI4P, here demonstrated for both aspects of Drs2p-Cdc50p function, should be of major help for future crystallization of the complex.

## Discussion

In this study, we devised a robust procedure for the purification in high-yield of a yeast lipid flippase, the Drs2p-Cdc50p complex. Because Cdc50 proteins appear to be closely associated with P4-ATPase maturation and function [14,29,53,54,55,56,57,58], we previously chose to clone *DRS2* and *CDC50* genes into the same expression plasmid. The purification procedure described here represents an additional major step forward for obtaining enough purified material for future structural and functional characterization of the Drs2p-Cdc50p complex.

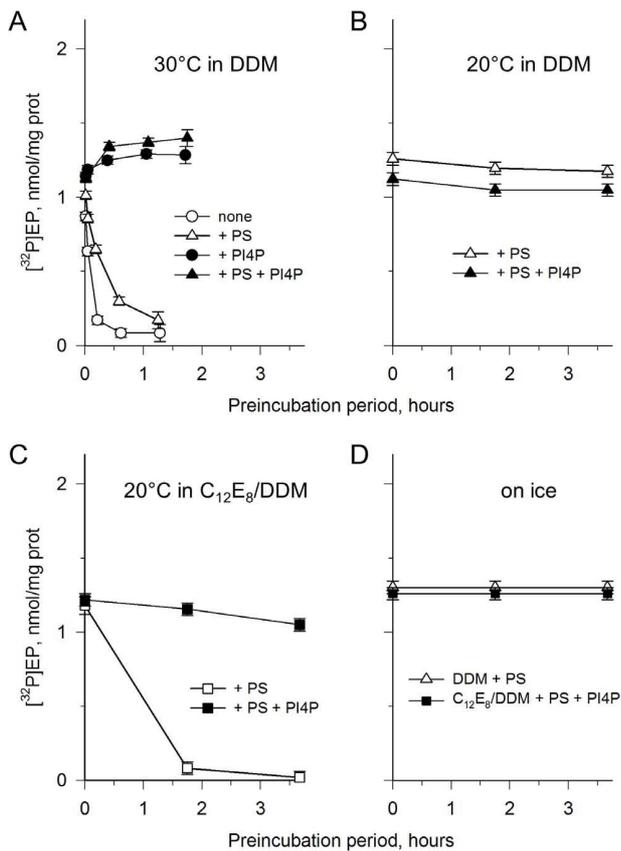
This procedure is relatively simple and efficient, as most other yeast proteins are eliminated by a single step affinity chromatography (Figure 2), and, most importantly, as it keeps associated (Figure 3) the two co-expressed partners of the complex in what



**Figure 7. Lipid-dependence and Mg-ATP-dependence of the ATPase activity of the purified sample. (A)** The ATPase activity of the streptavidin-purified and Ni<sup>2+</sup>-TED-treated sample, diluted to about 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , was measured at 30°C in SSR buffer supplemented with 1 mM Mg-ATP and 1 mg/mL DDM, as well as with PI4P at various concentrations in the additional presence of 0.05 mg/mL POPS (circles), or with POPS at various concentrations in the additional presence of 0.025 mg/mL PI4P (triangles). **(B)** The ATPase activity of a sample purified in the absence of PS (and diluted to about 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was measured at 30°C in KNG buffer supplemented with 1 mg/mL DDM, 1 mM Mg-ATP, and various lipids (all at 0.05 mg/mL), in the absence (hatched bars) or presence (open bars) of 0.025 mg/mL PI4P. Inset: Coomassie Blue staining of this purified sample after SDS-PAGE. **(C)** The same purified sample as the one for Panel A was used, but in this case the activity was measured at various concentrations of Mg-ATP, in the additional presence of an ATP-regenerating system (and in the presence of 1 mg/mL DDM, 0.05 mg/mL POPS and 0.025 mg/mL PI4P). **(D)** Plot of the results of the experiment displayed in **(C)** for determination of the apparent affinity for ATP, in the presence (open triangles) or absence (open circles) of PI4P.  $[\text{Mg-ATP}]_{1/2}$  is the concentration of ATP necessary to reach half of the maximal velocity. **(E and F)** After a 1-hour pre-incubation period on ice either with various  $\text{VO}_x$  concentrations **(E)** or with various  $\text{BeF}_3^-$  or  $\text{AlF}_4^-$  concentrations **(F)**, the ATPase activity of Drs2p-Cdc50p was measured at 30°C in SSR buffer supplemented with 1 mg/mL DDM, 0.05 mg/mL POPS, and 1 mM ATP, in the absence (grey bars) or presence (open bars), of 0.025 mg/mL PI4P.  
doi:10.1371/journal.pone.0112176.g007

appears to be a 1:1 ratio (previous reports on the purification of Drs2p or other P4-ATPases have not all been optimal in this regard [29,30,57,59]). The reason why the present protocol yields a purified fraction that mostly contains Drs2p and Cdc50p in complex might be related to the fact that unlike previous attempts,

we here chose to clone *DRS2* and *CDC50* genes on a single co-expression plasmid, rather than on two different plasmids, with both genes under the control of the same galactose-inducible promoter. By circumventing a frequent behavior of 2  $\mu$ -based plasmids, namely an unequal number of plasmids in each cell, our



**Figure 8. Protection of the purified Drs2p-Cdc50p complex from irreversible denaturation.** (A) The streptavidin-purified sample (before treatment with Ni<sup>2+</sup>-TED) was diluted to 17.5 μg/mL into KNG buffer at 30°C, supplemented with 1 mg/mL DDM, in the absence (circles) or presence (triangles) of 0.025 mg/mL POPS, and in the absence (open symbols) or presence (closed symbols) of 0.025 mg/mL PI4P. After various periods of incubation, residual phosphorylation was measured 1 min after addition of [γ-<sup>32</sup>P]ATP. (B–D) The streptavidin-purified sample (here after treatment with Ni<sup>2+</sup>-TED), was pre-incubated for various periods at about 150 μg/mL in SSR buffer supplemented with various detergents and lipids at different temperatures, before dilution with two volumes of DDM- and lipid-containing SSR buffer, such that in all cases final conditions included 1 mg/mL DDM, 0.05 mg/mL POPS, and 0.025 mg/mL PI4P. 0.5 μM [γ-<sup>32</sup>P]ATP was added and the residual ability of the sample to get phosphorylated was measured (after 1.5–2 min at 30°C). Pre-incubation conditions: (B) 20°C, 0.75 mg/mL DDM + 0.025 mg/mL POPS, in the absence (open triangles) or presence (closed triangles) of 0.025 mg/mL PI4P. (C) 20°C, 0.75 mg/mL DDM + 0.75 mg/mL C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> + 0.025 mg/mL POPS, in the absence (open squares) or presence (closed squares) of 0.025 mg/mL PI4P. (D) On ice, 0.75 mg/mL DDM + 0.75 mg/mL C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> + 0.025 mg/mL POPS in the presence of 0.025 mg/mL PI4P (closed squares), or 0.5 mg/mL DDM + 0.025 mg/mL POPS alone (open triangles). doi:10.1371/journal.pone.0112176.g008

co-expression system has probably favored a balanced expression of Drs2p and Cdc50p in yeast cells. Our choice of DDM may also have helped keeping the complex intact during the purification procedure.

The purified proteins have the expected sizes, and the very marginal fraction of aggregated protein can be successfully removed by size-exclusion chromatography (Figure 4). The purified complex retains the functional phosphorylation and dephosphorylation properties that can be measured in crude

membranes before their solubilization (Figure 5 *vs* Figure 1). Importantly, the ATPase activity of the purified sample is greatly stimulated by the simultaneous presence of PS and the phosphoinositide lipid PI4P (Figure 7), as previously reported [31]. In fact, only the PI4P-dependent ATPase activity can be specifically attributed to active Drs2p-Cdc50p complex, as mutations of either the D560 catalytic aspartate in the phosphorylation motif, or the E342 residue in the DGET motif – whose homologous mutation results in an inactive ATPase in other P-type ATPases [25,60] – abrogated the PI4P-stimulated activity but left a significant PI4P-independent activity (Figure 6). On the basis of a recent study by Graham's laboratory suggesting that PI4P relieves at least part of the auto-inhibition of Drs2p by its C-terminus, whereas it has a more limited impact on C-terminally truncated forms [31], this would be consistent with our purified fraction mainly containing full-length Drs2p together with Cdc50p. The fraction eluted after affinity chromatography also contains a few contaminant proteins (*e.g.* those contributing to PI4P-independent activity), but they are present in very small quantities (Figure 3A and Figure 6A). These contaminants can be further reduced by SEC-HPLC, with a concomitant reduction of the ratio of PI4P-independent to PI4P-dependent ATPase activities.

The purified Drs2p-Cdc50p complex has a high affinity for its regulator, PI4P (Figure 7). It also retains a high affinity for Mg-ATP, with sub-micromolar apparent affinity with respect to phosphoenzyme formation and micromolar apparent affinity with respect to overall ATPase activity (Figure 5 and Figure 7). These high apparent affinities for PI4P and Mg-ATP speak in favor of the structural integrity of the Drs2p-Cdc50p complex. The poorer apparent affinity for ATP previously described for purified Drs2p (about 1.5 mM, see [30]) might be related to the use in that case of C<sub>12</sub>E<sub>9</sub> for solubilization, as in our hands the related C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> detergent proved rather inactivating (Figure S2 and [36]). Alternatively, the discrepancy might be due to the presence of some Cdc50p-unbound Drs2p in that study [30]. The poor apparent potency of vanadate which we measured for inhibition of the PI4P-dependent ATPase activity (Figure 7E) could at first seem puzzling, but it might simply be taken as an indication that during turnover in the presence of a large ATP concentration (1 mM for ATPase activity measurements), most of the Drs2p-Cdc50p complex resides in a state which is not much sensitive to vanadate. A similar situation has been described for well-known P-type ATPases (*e.g.* SERCA1a), because vanadate is thought to recognize efficiently only certain conformations of the pump during its turnover [45,61,62]. Furthermore, our purified sample displayed an apparent affinity for vanadate in the micromolar range with respect to phosphoenzyme formation (data not shown), which is a value similar to that previously described for Drs2p embedded in yeast membranes [36].

At this point, it is useful to discuss another remarkable result of our experiments, namely the fact that the ATPase activity we measured for purified Drs2p-Cdc50p was rather slow, typically around 30–60 nmol.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> at 30°C in the presence of 1 mM Mg-ATP, 1 mg/mL DDM, 0.025 mg/mL POPS and 0.025 mg/mL PI4P, and in fact slower than previously reported [30,31]. This slow rate goes along with the previously noted very slow Drs2p dephosphorylation measured after an ATP chase, including in crude membranes ([36] and this study). Compared with ATP hydrolysis and transport rates measured for well-known P2-type transport ATPases, *e.g.* the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase or SERCA1a under similar conditions, these are very slow rates. For example, under similar conditions (except for the absence of PI4P), we measured an activity for SERCA1a at least ten-fold higher than that of Drs2p-Cdc50p (data not shown). Another P4-type ATPase,

the bovine ATP8A2, was recently described to hydrolyze ATP at rates close to  $150 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  at  $37^\circ\text{C}$  and  $7.5 \text{ mM Mg-ATP}$  [26].

This raises a number of issues. If the true activity of our purified Drs2p-Cdc50p complex is slow, could it be that it lacks a critical P4-ATPase co-factor? For instance, whether Gea2p, which has been shown to associate with Drs2p [15] and to play a role in the Drs2p flippase machinery [16] co-purifies with the Drs2p-Cdc50p complex may be worth investigating, although we do not expect this to be a critical component as no significant stimulation of the Drs2p activity by the Gea2p Sec7 domain was observed [31]. We think that it is reasonable to anticipate that the Drs2p-Cdc50p complex indeed has a fairly slow turnover rate (as suggested by its rates of dephosphorylation and ATP hydrolysis measured here), because in yeast *trans*-Golgi or secretory vesicle membranes, PS seems to be transported quite slowly, over hours [63,64], *i.e.* at a rate probably consistent with a slow rate of ATP hydrolysis, at least assuming a coupling ratio of  $\sim 1$  between ATP hydrolysis and lipid transport. A slow transport with a fast ATPase activity would in fact imply poor coupling.

Conversely, the reason why other P4-type flippases, like bovine ATP8A2 found for example in membranes of retinal photoreceptors, hydrolyze ATP and get dephosphorylated during turnover extremely rapidly (the reported hydrolysis rate of  $150 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  [25,26] implies a turnover number around  $350 \text{ s}^{-1}$ , *i.e.* that lipid transport occurs within milliseconds) is unclear. It was previously suggested [36,65] that perhaps rapid active transport of lipid was needed in specific types of membranes (like the one from which ATP8A2 originates) to efficiently counterbalance rapid dissipation of lipid asymmetry by ATP-independent flippases located in those membranes (*e.g.* opsin in retinal photoreceptors [65]). However, flipping of lipids by opsin is thought to occur at a rate faster than 10,000 per second [65,66], making it rather unlikely that ATP8A2 can efficiently counteract randomization of lipids by opsin. Therefore, the question remains open.

From a mechanistic or molecular point of view, it might be speculated that the slow activity of Drs2p could be due to auto-inhibition by its C-terminal and/or N-terminal extensions (as often observed in other P-type ATPases). The existence of such auto-inhibition of Drs2p by its C-terminal end has been suggested recently [31]. Auto-inhibition by C- or N-terminal extensions might even be a conceivable explanation for the fact that our purified Drs2p enzyme is significantly slower than Drs2p purified in other labs. Both in our hands (Figure 1A) and in the Graham lab, for instance, various types of truncations of the overexpressed Drs2p have been detected. Assuming that some very limited (and thus undetectable) truncation occurs, to a variable extent, and that this truncation partly relieves the auto-inhibition of Drs2p, this might significantly influence the overall ATPase activity of the purified Drs2p-Cdc50p complexes, both in our lab (where we found up to 2-fold variability in ATP hydrolysis rates) and in other labs. Future studies aiming at deciphering the Drs2p-Cdc50p transport mechanism should help to resolve this apparent discrepancy.

## References

- Leventis PA, Grinstein S (2010) The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu Rev Biophys* 39: 407–427.
- Bohdanowicz M, Grinstein S (2013) Role of phospholipids in endocytosis, phagocytosis, and macropinocytosis. *Physiol Rev* 93: 69–106.
- Lemmon MA (2008) Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 99–111.
- Hancock JF, Paterson H, Marshall CJ (1990) A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* 63: 133–139.
- Zhang B, Gao Y, Moon SY, Zhang Y, Zheng Y (2001) Oligomerization of Rac1 gtpase mediated by the carboxyl-terminal polybasic domain. *J Biol Chem* 276: 8958–8967.
- Yeung T, Heit B, Dubuisson JF, Fairn GD, Chiu B, et al. (2009) Contribution of phosphatidylserine to membrane surface charge and protein targeting during phagosome maturation. *J Cell Biol* 185: 917–928.
- Alexander RT, Jaumouille V, Yeung T, Furuya W, Peltekova I, et al. (2011) Membrane surface charge dictates the structure and function of the epithelial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Embo J* 30: 679–691.

Finally, this work also presents a finding which might be of major significance. A critical parameter for successful crystallogensis of a membrane protein is the choice of the detergent to be used, because among other effects it influences the stability of the protein [67] and for several P-type ATPases, C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> has proven superior to other detergents in terms of crystal growth [20,21,22]. Therefore, our finding that phosphoenzyme formation from ATP and the overall ATPase activity of Drs2p-Cdc50p are strongly stabilized by PI4P in the presence of both DDM or C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> (Figure 8) is an important step towards obtaining well-diffracting, functionally-relevant crystals of a particular and presumably important conformation of the Drs2p-Cdc50p complex.

## Supporting Information

**Figure S1 The vast majority of Drs2p is in complex with Cdc50p, as analyzed by western-blotting.** The same samples as those in Figure 3 were loaded onto a 10% SDS-PAGE and the gel was probed with a  $\alpha$ -Drs2p antibody or a Histidine probe. For D-His<sub>10</sub>C, the E<sub>s</sub> sample was further diluted 3-fold and 10-fold (E<sub>s</sub>/10 and E<sub>s</sub>/3) and aliquots were loaded for comparison with the FT sample. (TIF)

**Figure S2 Protection by PI4P of the ATP hydrolysis ability of the purified Drs2p-Cdc50p complex.** The streptavidin-purified sample (after treatment with Ni<sup>2+</sup>-TED), was pre-incubated for various periods at  $\sim 150 \mu\text{g}/\text{mL}$  in SSR buffer supplemented with various detergents and lipids and at different temperatures. These samples were then diluted with two volumes of DDM- and lipid-containing SSR buffer, such that in all cases final conditions included  $1 \text{ mg}/\text{mL}$  DDM,  $0.05 \text{ mg}/\text{mL}$  POPS, and  $0.025 \text{ mg}/\text{mL}$  PI4P. The ATPase activity was then measured at  $30^\circ\text{C}$ , in the presence of  $1 \text{ mM Mg-ATP}$ . Pre-incubation conditions:  $20^\circ\text{C}$ ,  $0.75 \text{ mg}/\text{mL}$  DDM +  $0.025 \text{ mg}/\text{mL}$  POPS, in the absence (open triangles) or presence (closed triangles) of  $0.025 \text{ mg}/\text{mL}$  PI4P;  $20^\circ\text{C}$ ,  $0.75 \text{ mg}/\text{mL}$  DDM +  $0.75 \text{ mg}/\text{mL}$  C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> +  $0.025 \text{ mg}/\text{mL}$  POPS, in the absence (open squares) or presence (closed squares) of  $0.025 \text{ mg}/\text{mL}$  PI4P. (TIF)

## Acknowledgments

We are grateful to Todd Graham for generously providing the  $\alpha$ -Drs2p antibody, to Thomas Sørensen for the TEV construct, and to Pierre Le Maréchal for his help with mass spectrometry experiments. We also want to thank Anant Menon for stimulating discussions.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HA CM MRA PD PG PN PC GL. Performed the experiments: HA CM MRA FF AJ CG PD PC GL. Analyzed the data: HA CM MRA AJ CG RLLM MGP MG MIM PD PG PN PC GL. Wrote the paper: HA CM MRA RLLM MGP PD PG PN PC GL.

8. Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM (1998) The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 5: 551–562.
9. Rosing J, Tans G, Govers-Riemsag JW, Zwaal RF, Hemker HC (1980) The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *J Biol Chem* 255: 274–283.
10. Lopez-Marques RL, Theorin L, Palmgren MG, Pomorski TG (2013) P4-ATPases: lipid flippases in cell membranes. *Pflügers Arch* 466: 1227–1240.
11. Sebastian TT, Baldrige RD, Xu P, Graham TR (2012) Phospholipid flippases: Building asymmetric membranes and transport vesicles. *Biochim Biophys Acta*.
12. Liu K, Surendhran K, Nothwehr SF, Graham TR (2008) P4-ATPase requirement for AP-1/clathrin function in protein transport from the trans-Golgi network and early endosomes. *Mol Biol Cell* 19: 3526–3535.
13. Hua Z, Fatheddin P, Graham TR (2002) An essential subfamily of Drs2p-related P-type ATPases is required for protein trafficking between Golgi complex and endosomal/vacuolar system. *Mol Biol Cell* 13: 3162–3177.
14. Furuta N, Fujimura-Kamada K, Saito K, Yamamoto T, Tanaka K (2007) Endocytic recycling in yeast is regulated by putative phospholipid translocases and the Ypt31p/32p-Rcy1p pathway. *Mol Biol Cell* 18: 295–312.
15. Chantalat S, Park SK, Hua Z, Liu K, Gobin R, et al. (2004) The Arf activator Gea2p and the P-type ATPase Drs2p interact at the Golgi in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 117: 711–722.
16. Natarajan P, Liu K, Patil DV, Sciorra VA, Jackson CL, et al. (2009) Regulation of a Golgi flippase by phosphoinositides and an ArfGEF. *Nat Cell Biol* 11: 1421–1426.
17. Devaux PF (1991) Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* 30: 1163–1173.
18. Takeda M, Yamagami K, Tanaka K (2014) Role of phosphatidylserine in phospholipid flippase-mediated vesicle transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 13: 363–375.
19. Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, Ogawa H (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405: 647–655.
20. Gourdon P, Liu XY, Skjorringe T, Morth JP, Møller LB, et al. (2011) Crystal structure of a copper-transporting PIB-type ATPase. *Nature* 475: 59–64.
21. Morth JP, Pedersen BP, Toustrup-Jensen MS, Sørensen TL, Petersen J, et al. (2007) Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* 450: 1043–1049.
22. Pedersen BP, Buch-Pedersen MJ, Morth JP, Palmgren MG, Nissen P (2007) Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature* 450: 1111–1114.
23. Palmgren MG, Nissen P (2011) P-type ATPases. *Annu Rev Biophys* 40: 243–266.
24. Lenoir G, Williamson P, Holthuis JC (2007) On the origin of lipid asymmetry: the flip side of ion transport. *Curr Opin Chem Biol* 11: 654–661.
25. Coleman JA, Vestergaard AL, Molday RS, Vilsen B, Peter Andersen J (2012) Critical role of a transmembrane lysine in aminophospholipid transport by mammalian photoreceptor P4-ATPase ATP8A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 1449–1454.
26. Vestergaard AL, Coleman JA, Lemmin T, Mikkelsen SA, Molday LL, et al. (2014) Critical roles of isoleucine-364 and adjacent residues in a hydrophobic gate control of phospholipid transport by the mammalian P4-ATPase ATP8A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E1334–1343.
27. Baldrige RD, Graham TR (2012) Identification of residues defining phospholipid flippase substrate specificity of type IV P-type ATPases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E290–298.
28. Baldrige RD, Graham TR (2013) Two-gate mechanism for phospholipid selection and transport by type IV P-type ATPases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E358–367.
29. Lenoir G, Williamson P, Puts CF, Holthuis JC (2009) Cdc50p plays a vital role in the ATPase reaction cycle of the putative aminophospholipid transporter Drs2p. *J Biol Chem* 284: 17956–17967.
30. Zhou X, Graham TR (2009) Reconstitution of phospholipid translocase activity with purified Drs2p, a type-IV P-type ATPase from budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 16586–16591.
31. Zhou X, Sebastian TT, Graham TR (2013) Auto-inhibition of Drs2p, a yeast phospholipid flippase, by its carboxyl-terminal tail. *J Biol Chem* 288: 31807–31815.
32. Bækgaard L, Fuglsang AT, Palmgren MG (2005) Regulation of plant plasma membrane H<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-ATPases by terminal domains. *J Bioenerg Biomembr* 37: 369–374.
33. Ekberg K, Palmgren MG, Veierskov B, Buch-Pedersen MJ (2010) A novel mechanism of P-type ATPase autoinhibition involving both termini of the protein. *J Biol Chem* 285: 7344–7350.
34. Chen CY, Ingram MF, Rosal PH, Graham TR (1999) Role for Drs2p, a P-type ATPase and potential aminophospholipid translocase, in yeast late Golgi function. *J Cell Biol* 147: 1223–1236.
35. Picard M, Toyoshima C, Champeil P (2006) Effects of inhibitors on luminal opening of Ca<sup>2+</sup> binding sites in an E2P-like complex of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase with Be<sup>2+</sup>/fluoride. *J Biol Chem* 281: 3360–3369.
36. Jacquot A, Montigny C, Hennrich H, Barry R, le Maire M, et al. (2012) Stimulation by phosphatidylserine of Drs2p/Cdc50p lipid translocase dephosphorylation is controlled by phosphatidylinositol-4-phosphate. *J Biol Chem* 287: 13249–13261.
37. Pomorski T, Lombardi R, Riezman H, Devaux PF, van Meer G, et al. (2003) Drs2p-related P-type ATPases Dnf1p and Dnf2p are required for phospholipid translocation across the yeast plasma membrane and serve a role in endocytosis. *Mol Biol Cell* 14: 1240–1254.
38. Montigny C, Azouaoui H, Jacquot A, le Maire M, Jaxel C, et al. (2014) Overexpression of Membrane Proteins in *Saccharomyces cerevisiae* for structural and functional studies: a focus on the rabbit Ca<sup>2+</sup>-ATPase Serca1a and on the yeast lipid "flippase" complex Drs2p/Cdc50p; Mus-veteau I, editor. New York: Springer Science + Business Media. 39 p.
39. Angelaccio S, Bonaccorsi di Patti MC (2002) Site-directed mutagenesis by the megaprimer PCR method: variations on a theme for simultaneous introduction of multiple mutations. *Anal Biochem* 306: 346–349.
40. Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11: 355–360.
41. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76–85.
42. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
43. Ladner CL, Yang J, Turner RJ, Edwards RA (2004) Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Anal Biochem* 326: 13–20.
44. Gurtler A, Kunz N, Gomolka M, Hornhardt S, Friedl AA, et al. (2013) Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Anal Biochem* 433: 105–111.
45. Lenoir G, Picard M, Gauron C, Montigny C, Le Marechal P, et al. (2004) Functional properties of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase after proteolytic cleavage at Leu119-Lys120, close to the A-domain. *J Biol Chem* 279: 9156–9166.
46. Cardi D, Pozza A, Arnou B, Marchal E, Clausen JD, et al. (2010) Purified E255L mutant SERCA1a and purified PfATP6 are sensitive to SERCA-type inhibitors but insensitive to artemisinins. *J Biol Chem* 285: 26406–26416.
47. Hatori Y, Hirata A, Toyoshima C, Lewis D, Pilankatta R, et al. (2008) Intermediate phosphorylation reactions in the mechanism of ATP utilization by the copper ATPase (CopA) of *Thermotoga maritima*. *J Biol Chem* 283: 22541–22549.
48. Lenoir G, Picard M, Møller JV, le Maire M, Champeil P, et al. (2004) Involvement of the L6-7 loop in SERCA1a Ca<sup>2+</sup>-ATPase activation by Ca<sup>2+</sup> (or Sr<sup>2+</sup>) and ATP. *J Biol Chem* 279: 32125–32133.
49. Drueckes P, Schinzel R, Palm D (1995) Photometric microtiter assay of inorganic phosphate in the presence of acid-labile organic phosphates. *Anal Biochem* 230: 173–177.
50. Garrigos M, Deschamps S, Viel A, Lund S, Champeil P, et al. (1991) Detection of Ca(2+)-binding proteins by electrophoretic migration in the presence of Ca<sup>2+</sup> combined with <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> overlay of protein blots. *Anal Biochem* 194: 82–88.
51. Champeil P, Riollot S, Orłowski S, Guillain F, Seebregts CJ, et al. (1988) ATP regulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. Metal-free ATP and 8-bromo-ATP bind with high affinity to the catalytic site of phosphorylated ATPase and accelerate dephosphorylation. *J Biol Chem* 263: 12288–12294.
52. Lund S, Møller JV (1988) Biphasic kinetics of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and the detergent-solubilized monomer. *J Biol Chem* 263: 1654–1664.
53. Paulusma CC, Folmer DE, Ho-Mok KS, de Waart DR, Hilarius PM, et al. (2008) ATP8B1 requires an accessory protein for endoplasmic reticulum exit and plasma membrane lipid flippase activity. *Hepatology* 47: 268–278.
54. Chen S, Wang J, Muthusamy BP, Liu K, Zare S, et al. (2006) Roles for the Drs2p-Cdc50p complex in protein transport and phosphatidylserine asymmetry of the yeast plasma membrane. *Traffic* 7: 1503–1517.
55. Saito K, Fujimura-Kamada K, Furuta N, Kato U, Umeda M, et al. (2004) Cdc50p, a protein required for polarized growth, associates with the Drs2p P-type ATPase implicated in phospholipid translocation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 15: 3418–3432.
56. van der Velden LM, Wichers CG, van Breevoort AE, Coleman JA, Molday RS, et al. (2010) Heteromeric interactions required for abundance and subcellular localization of human CDC50 proteins and class 1 P4-ATPases. *J Biol Chem* 285: 40088–40096.
57. Coleman JA, Molday RS (2011) Critical role of the beta-subunit CDC50A in the stable expression, assembly, subcellular localization, and lipid transport activity of the P4-ATPase ATP8A2. *J Biol Chem* 286: 17205–17216.
58. Poulsen LR, Lopez-Marques RL, McDowell SC, Okkeri J, Licht D, et al. (2008) The Arabidopsis P4-ATPase ALA3 localizes to the golgi and requires a beta-subunit to function in lipid translocation and secretory vesicle formation. *Plant Cell* 20: 658–676.
59. Bryde S, Hennrich H, Verhulst PM, Devaux PF, Lenoir G, et al. (2010) CDC50 proteins are critical components of the human class-1 P4-ATPase transport machinery. *J Biol Chem* 285: 40562–40572.
60. Clausen JD, Vilsen B, McIntosh DB, Einholm AP, Andersen JP (2004) Glutamate-183 in the conserved TGES motif of domain A of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase assists in catalysis of E2/E2P partial reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2776–2781.
61. O'Neal SG, Rhoads DB, Racker E (1979) Vanadate inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and other ATPases. *Biochem Biophys Res Commun* 89: 845–850.
62. Pick U (1982) The interaction of vanadate ions with the Ca-ATPase from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 257: 6111–6119.

63. Natarajan P, Wang J, Hua Z, Graham TR (2004) Drs2p-coupled aminophospholipid translocase activity in yeast Golgi membranes and relationship to in vivo function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10614–10619.
64. Alder-Baerens N, Lisman Q, Luong L, Pomorski T, Holthuis JC (2006) Loss of P4 ATPases Drs2p and Dnf3p disrupts aminophospholipid transport and asymmetry in yeast post-Golgi secretory vesicles. *Mol Biol Cell* 17: 1632–1642.
65. Menon I, Huber T, Sanyal S, Banerjee S, Barre P, et al. (2011) Opsin is a phospholipid flippase. *Curr Biol* 21: 149–153.
66. Goren MA, Morizumi T, Menon I, Joseph JS, Dittman JS, et al. (2014) Constitutive phospholipid scramblase activity of a G protein-coupled receptor. *Nat Commun* 5: 5115–5124.
67. Sorensen TL, Olesen C, Jensen AM, Moller JV, Nissen P (2006) Crystals of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. *J Biotechnol* 124: 704–716.

Figure S1. The vast majority of Drs2p is in complex with Cdc50p, as analyzed by western-blotting

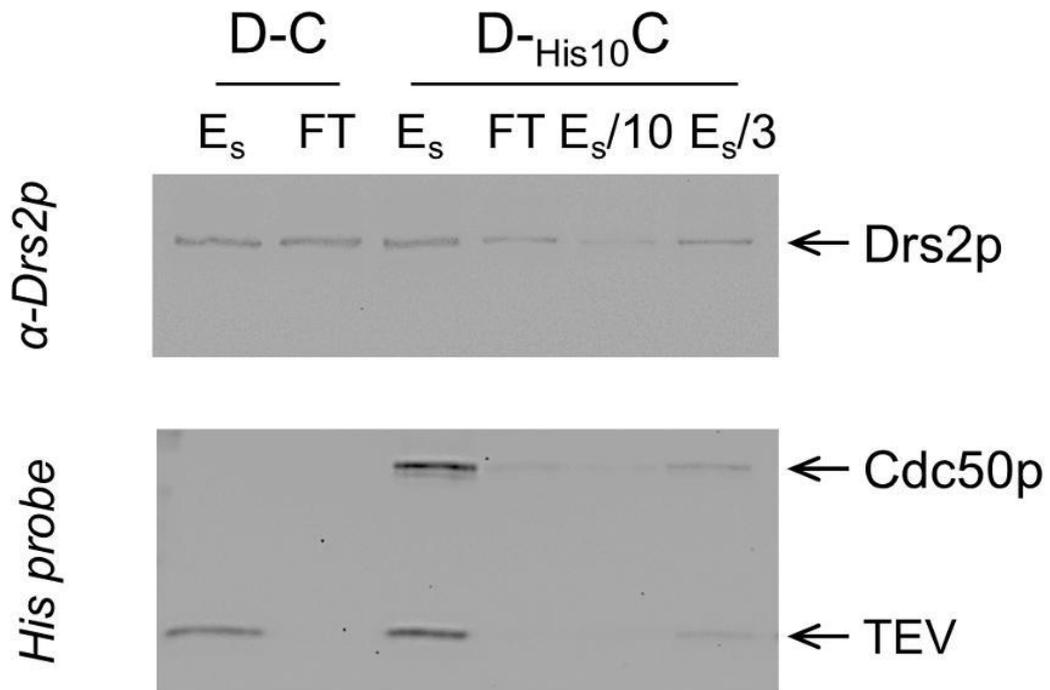
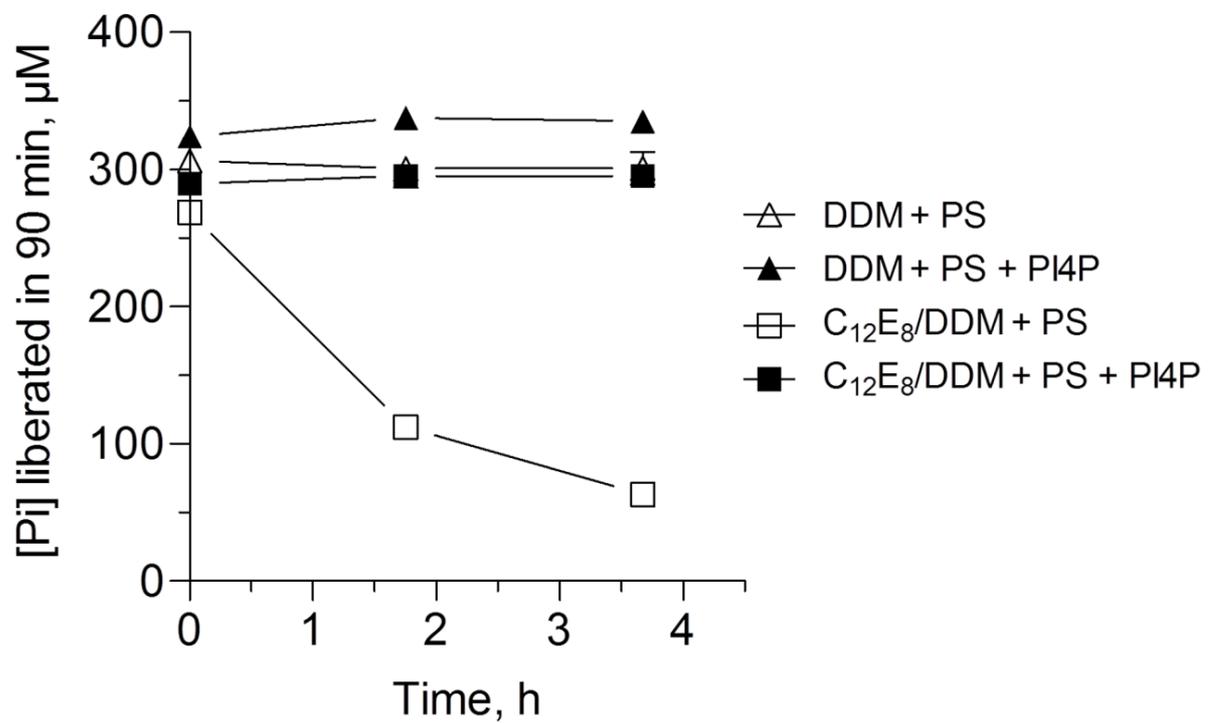


Figure S2. Protection by PI4P of the ATP hydrolysis ability of the purified Drs2p-Cdc50p complex



### **III.1.3.Résultats généraux et Discussion de l'article 2**

Dans cette étude, nous avons mis en place une procédure qui permet la purification de la flippase de levure Drs2p/Cdc50p, une étape majeure pour la caractérisation fonctionnelle et structurale du complexe Drs2p/Cdc50p.

Au vu des études précédentes montrant que les protéines CDC50 sont nécessaires pour l'adressage voire pour la fonction des ATPases-P4, l'idée de construire pour Drs2p et Cdc50p un vecteur de co-expression, comportant les deux gènes d'intérêt à la fois (protocole présenté dans Jacquot et al., 2012), était raisonnable, permettant ainsi l'expression coordonnée des produits de ces deux gènes, dans des levures croissant jusqu'à une haute densité cellulaire (le vecteur étant optimisé pour cet objectif). Le plus souvent, les stratégies utilisées pour l'expression sont au contraire basées sur la co-transformation des cellules avec des vecteurs d'expression ne portant chacun qu'un seul des deux gènes, ce qui ne permet pas de contrôler le nombre de copies de chaque vecteur dans les différentes cellules et peut donc conduire à une forte variation d'expression relative des deux gènes d'une cellule à l'autre.

Dans cette étude nous avons réexaminé l'effet du positionnement des étiquettes BAD et HIS<sub>10</sub> (du côté N- ou C-ter des protéines) sur le niveau d'expression et la fonctionnalité de Drs2p et Cdc50p. En effet certaines études ont suggéré que la position des étiquettes sur Drs2p pouvait altérer l'activité de la protéine purifiée (Zhou & Graham, 2009 ; Zhou et al., 2013). Dans notre étude, la position des tags n'a pas d'effet sur le niveau d'expression de Drs2p : les protéines d'intérêt présentent une expression comparable, et la restauration du phénotype sauvage à basse température est elle aussi comparable pour les différentes constructions (Fig. 1, Article 2). De plus, l'étude des propriétés fonctionnelles des différentes constructions, faite en analysant la capacité de Drs2p -ayant son tag côté N- ou C-terminal- à se phosphoryler ou à se déphosphoryler, montre que les propriétés fonctionnelles des différentes constructions sont similaires.

Étant donné que Drs2p ayant son tag côté C-terminal semble présenter un fragment de dégradation en quantité significative, et que Cdc50p ayant son tag côté

N-terminal est bien exprimée de façon quasi-exclusive sous sa forme glycosylée (Fig. 1, Article 2), notre choix s'est porté sur la préparation et l'étude de Drs2p et Cdc50p ayant leur tag du côté N-terminal (constructions ayant leurs étiquettes du côté 5').

La particularité de la procédure que nous avons mise en place pour la purification de Drs2p et de Cdc50p est que c'est une purification par chromatographie d'affinité permettant en une seule étape l'élimination de la majeure partie des autres protéines de levure, avec un rendement de purification pour Drs2p/Cdc50p de 1-2 mg de protéine par litre de culture cellulaire (Fig. 2, Article 2), résultat qui n'est pas si couramment décrit dans la littérature (par exemple, 10 µg seulement de Drs2p sont obtenus par litre de culture dans Zhou & Graham, 2009). De plus, cette procédure permet la purification d'un complexe entre Drs2p et Cdc50p : au moins 80 % du Drs2p produit est en complexe avec Cdc50p, avec une stœchiométrie d'association de 1:1 (mol :mol) (Fig. 3, Article 2), résultat jusqu'ici non documenté dans la littérature (Zhou & Graham, 2009 ; Lenoir et al., 2009 ; Coleman et al., 2011). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que le plasmide utilisé pour l'expression de nos protéines d'intérêt comporte à la fois le gène *DRS2* et *CDC50*, tous deux sous le contrôle du même promoteur, ce qui permet comme espéré l'expression coordonnée des gènes d'intérêt. La co-expression de Drs2p et Cdc50p, avec un plasmide de co-expression optimisé pour l'expression dans la levure et un système d'expression lui aussi optimisé (Jacquot et al, 2012), permet probablement un repliement correct des deux protéines, Cdc50p jouant bien son rôle de chaperon (Saito et al., 2004 ; Paulusma et al., 2008 ; Chen et al., 2006 ; Furuta et al., 2007). De plus, l'utilisation du DDM, un détergent non ionique réputé stabilisant pour de nombreuses protéines membranaires, pour la solubilisation et la purification du complexe, doit aider à garder nos protéines stables et fonctionnelles.

Les protéines purifiées sont de la taille attendue, comme en témoignent l'analyse par spectrométrie de masse et la chromatographie d'exclusion de taille, cette dernière permettant aussi l'élimination de la petite quantité d'agrégats que contient l'échantillon purifié, et donc l'obtention d'échantillon plus homogène (Fig. 4, Article 2).

La stabilité du complexe purifié en DDM est attestée par le fait que l'échantillon purifié présente les mêmes propriétés fonctionnelles que Drs2p en membrane du point de vue de sa capacité à se phosphoryler et à se déphosphoryler (Fig. 5 et Fig. 1, Article 2). A l'étape de déphosphorylation, en présence de PS mais en absence de PI4P, la déphosphorylation se fait de façon très lente : la présence de PI4P stimule la déphosphorylation, et le PI4P a donc un rôle de régulateur conforme à ce que l'on peut observer par ailleurs (Natarajan et al., 2009 ; Jacquot et al., 2012 ; Fig. 1 et Fig. 5, Article 2).

De façon particulièrement intéressante, on peut voir que l'activité ATPasique du complexe purifié est fortement stimulée par la PS et le PI4P (Fig. 6 et 7, Article 2), comme déjà rapporté par l'équipe de Graham (Zhou et al., 2013). Cependant, le PI4P et la PS sont absolument nécessaires à l'activité du complexe Drs2p/Cdc50p purifié et le facteur de stimulation est beaucoup plus important que dans l'étude de Zhou et al, ce sera encore plus le cas avec Drs2p protéolysée (voir plus tard l'Article 3). Ces résultats sont donc compatibles avec les données précédemment publiées par l'équipe de Graham (Zhou et al., 2013), suggérant que le PI4P lèverait au moins en partie une auto-inhibition préalablement exercée sur Drs2p. De plus, Drs2p exprimé et purifié seul (i.e. sans son partenaire Cdc50p) ne présente pas d'activité ATPasique PI4P-dépendante, ce qui corrobore les études précédentes qui montraient que Drs2p exprimé seul ne pouvait pas être phosphorylé (Jacquot et al., 2012) ou très peu (Lenoir et al., 2009), et qu'ATP8B1 et ATP8B2 ne se phosphorylent pas en absence de CDC50A (Bryde et al., 2010). Pour contrôle, nous avons également vérifié que Cdc50p exprimé et purifié seul ne présente bien sûr pas non plus d'activité ATPasique stimulée par le PI4P. Comme attendu de nouveau, le mutant Drs2p<sup>D560N</sup>/Cdc50p, pour lequel l'aspartate phosphorylable est muté, le mutant Drs2p<sup>E342Q</sup>/Cdc50p, pour lequel le glutamate impliqué dans la déphosphorylation de l'ATPase est muté (une mutation similaire inactive la flippase ATP8A2 (Coleman et al., 2012)) et l'ATPase-Ca<sup>2+</sup> Serca1a (Clausen et al., 2004), ne présentent pas d'activité ATPasique stimulée par le PI4P non plus (Fig. 6, Article 2).

L'affinité apparente du complexe Drs2p-Cdc50p pour le Mg<sup>2+</sup>-ATP est élevée : le K<sub>M</sub> du Mg<sup>2+</sup>-ATP pour la formation du phosphoenzyme est sub-micromolaire (Fig. 5, Article 2), et micromolaire pour l'activité ATPasique globale du complexe purifié en

présence de son régulateur le PI4P - qui lui-même a une forte affinité pour Drs2p- (Fig. 7, Article 2). Une autre équipe a naguère proposé une affinité millimolaire du  $Mg^{2+}$ -ATP pour Drs2p purifié (1,5 mM, voir Zhou & Graham, 2009), mais cette différence peut être expliquée par plusieurs raisons possibles : (i) le fait que dans ce travail de 2009 une partie de Drs2p n'est pas associée à son partenaire Cdc50p pourrait avoir altéré le bon repliement de Drs2p et/ou altéré sa fonction ; (ii) le détergent qui a été utilisé en 2009 (le  $C_{12}E_9$ , dont la structure est proche de celle du  $C_{12}E_8$ , largement utilisé avec SERCA1a) n'est pas forcément un bon détergent pour le fonctionnement de Drs2p : en effet, le  $C_{12}E_8$  inactive relativement rapidement le complexe Drs2p-Cdc50p (Fig. S2, Article 2 et Jacquot et al., 2012) ; et enfin (iii) ces mesures de 2009 ont été faites en absence de PI4P (et même en absence de PS).

Nous avons aussi examiné l'effet, sur l'activité ATPasique de notre complexe purifié, d'inhibiteurs classiques des ATPases de type P : l'orthovanadate et les composés fluorés (Fig. 7, Article 2). L'inhibition par le vanadate est faible (cela concorde avec les résultats de Zhou & Graham 2009). Il faut savoir que l'inhibition par l'orthovanadate n'opère efficacement que sur certaines conformations des ATPases de type P durant leur cycle catalytique (Lenoir et al., 2004 ; O'Neal et al., 1979 ; Pick, 1982), et le fait que le cycle catalytique global ne soit pas très sensible à l'orthovanadate n'est pas si surprenant que ça, surtout dans des conditions où on utilise une forte concentration d'ATP (1 mM) pour l'étude de l'activité ATPasique, où la flippase Drs2p/Cdc50p se trouve probablement le plus souvent dans des conformations qui ne sont pas très sensibles à l'orthovanadate. Les composés fluorés qui, de même, sont connus pour interagir avec l'état E2 des ATPases de type P, exercent une inhibition plus efficace sur notre complexe purifié. Comme les composés fluorés peuvent, au moins sur SERCA1a, stabiliser la structure de la protéine inactivée, alors qu'en absence d'inhibiteurs, SERCA1a s'inactive rapidement après ajout de détergent (Olesen et al., 2007 ; Toyoshima, 2007), on peut donc penser que les composés fluorés pourraient stabiliser Drs2p/Cdc50p pour des essais de cristallographie.

Nous nous sommes aussi intéressés à l'effet de certains lipides sur l'activité ATPasique du complexe purifié Drs2p/Cdc50p. En présence du PI4P l'activité la plus importante est mesurée en présence de PS (Fig. 7B, Article 2) ce qui va dans le sens

de la littérature. Par exemple l'étude du transport de NBD-PL dans les membranes du *trans*-Golgi isolées à partir d'une souche  $\Delta dnf1\Delta dnf2\Delta dnf3$  (Natarajan et al., 2004), ou encore l'étude du transport de NBD-PL par Drs2p reconstitué en protéoliposome, montre que Drs2p transporte préférentiellement la NBD-PS (Zhou & Graham, 2009). Par ailleurs, l'étude du transport de PL par différentes chimères, obtenues en remplaçant certains segments de Dnf1p (qui transporte plus spécifiquement la PC et la PE) par les segments correspondants de Drs2p (Baldrige & Graham, 2013b) montre une préférence de Drs2p pour le transport de la PS.

Dans nos conditions expérimentales l'activité ATPasique de notre complexe Drs2p/Cdc50p purifié est lente,  $30-60 \text{ nmol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ , plus lente que celle rapportée précédemment pour Drs2p (Zhou & Graham, 2009; Zhou et al., 2013) : une molécule de Drs2p hydrolyse 1 ATP toutes les deux minutes environ, contre 70 ATPs hydrolysés chaque minute selon l'équipe de Graham (Zhou & Graham, 2009). Elle est aussi bien plus lente que celle de beaucoup des ATPases P2 : dans les mêmes conditions expérimentales, l'activité ATPasique de SERCA1a est de quelques  $\mu\text{mol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ . Une autre ATPase-P4, ATP8A2 des membranes des photorécepteurs de la rétine de bœuf, présente une activité ATPasique de  $150 \mu\text{mol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ , elle aussi beaucoup plus importante que celle du complexe Drs2p/Cdc50p. La faible activité observée ici pour notre Drs2p est cependant cohérente avec l'observation, dans la présente étude comme dans celle faite précédemment par notre équipe (Jacquot et al., 2012), d'une vitesse de déphosphorylation très lente.

La raison d'une telle différence d'activité ATPasique pourrait être l'absence d'un cofacteur critique de Drs2p dans notre préparation purifiée. On sait que Gea2p s'associe avec Drs2p (Chantalat et al., 2004) et joue un rôle dans la régulation de Drs2p (Natarajan et al., 2009) ; sa présence pourrait être nécessaire pour une stimulation plus importante. Mais une étude faite sur l'effet de Gea2p sur l'activité ATPasique de Drs2p semble montrer que Gea2p n'exercerait pas de stimulation très significative de l'activité de Drs2p (Zhou et al., 2013). D'autres études se sont intéressées à la vitesse de transport de la PS : après reconstitution de Drs2p dans des protéoliposomes, une molécule de Drs2p transporte 3 molécules de PS chaque minute (Zhou & Graham, 2009). Sachant que la vitesse d'hydrolyse d'ATP par une

molécule du même Drs2p (mesure en détergent) était de 70 ATPs par minute (Zhou & Graham, 2009), et si on considère qu'il faut une molécule d'ATP pour transporter une molécule de PL, il n'y a guère de concordance. D'autres études sur le transport de la PS mais cette fois-ci sur des membranes de *trans*-Golgi ou de vésicules de sécrétion de la levure suggèrent elles aussi que le transport de la PS est lent, et se mesure sur des heures (Natarajan et al., 2004 ; Alder-Barens et al., 2006). Si on considère qu'un ATP hydrolysé doit correspondre à un lipide transporté, cela nous amène à penser que la lenteur de la vitesse d'hydrolyse d'ATP par notre complexe Drs2p/Cdc50p n'est pas déraisonnable.

Un autre élément allant dans ce sens est que Drs2p n'a peut-être pas besoin d'avoir une activité ATPasique importante pour remplir sa fonction de création d'une asymétrie transmembranaire, vu l'environnement membranaire de Drs2p, qui diffère fortement de l'environnement, par exemple, d'ATP8A2, dont on a précédemment évoqué la très forte activité ATPasique. Rappelons que ATP8A2 se trouve dans des membranes des photorécepteurs de la rétine. Il a été suggéré que dans ces membranes particulières où l'asymétrie membranaire est dissipée rapidement par des transporteurs de lipides indépendant de l'hydrolyse de l'ATP, tels que l'opsine, un élément susceptible de contrebalancer ce phénomène doit nécessairement être très actif, et c'est peut être ATP8A2 qui peut assumer ce rôle (Jacquot et al., 2012 ; Goren et al., 2014). Il faut tout de même noter que l'opsine présente une vitesse de transport de lipides vraiment très rapide, de l'ordre de 10000 lipides par secondes (Menon et al., 2011 ; Goren et al., 2014), et ce serait étonnant que même ATP8A2 puisse à elle seule contrebalancer ce transport.

Une autre explication possible du fait que l'activité ATPasique du complexe purifié Drs2p/Cdc50 dans notre laboratoire est plus lente que celle mesurée par d'autres laboratoires pourrait être liée à la suggestion de Graham et al, qui ont proposé que Drs2p était auto-inhibé par son extrémité C-terminale (Zhou et al., 2013). Dans notre laboratoire et celui de Graham il a été détecté des formes protéolysées de Drs2p, protéolyse probablement limitée aux extrémités. Si ces protéolyses sont moins importantes chez nous que dans le laboratoire de Graham, elles pourraient expliquer la plus faible activité trouvée dans notre laboratoire, qui traduirait alors une plus grande intégrité de la protéine. Cette possibilité sera

réexaminée plus loin (et confirmée), à l'occasion des investigations entreprises pour essayer de comprendre le rôle des extrémités N- et C-terminales dans la régulation de Drs2p (voir Article 3).

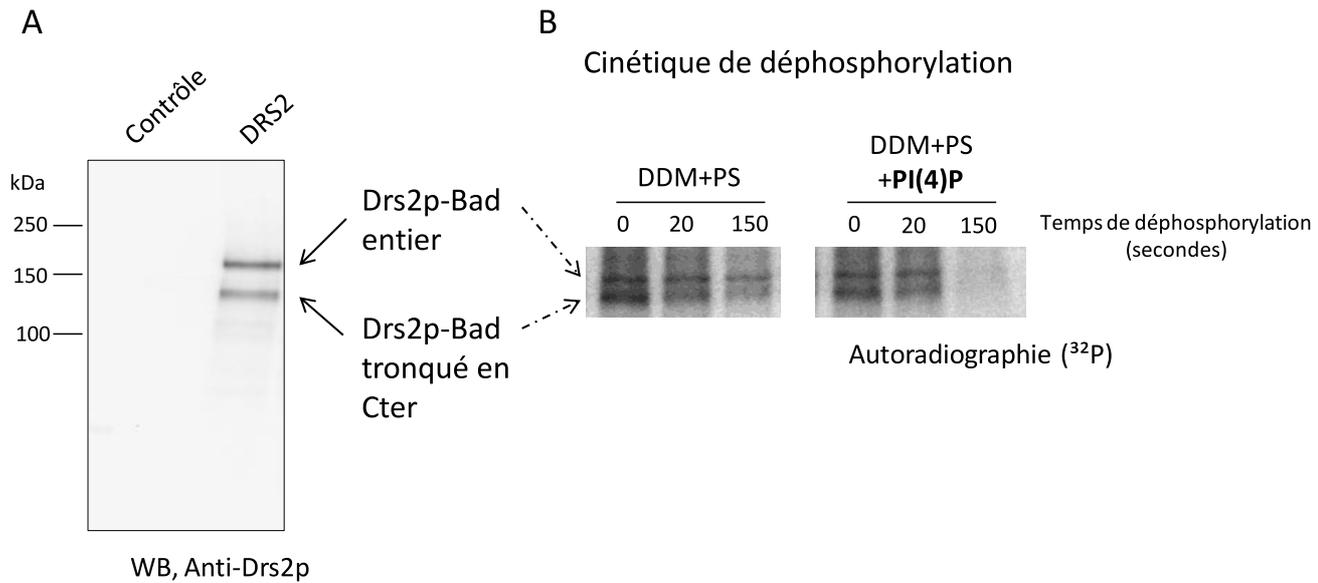
Mentionnons pour conclure ici que nous nous sommes intéressés aux conditions permettant au complexe Drs2p/Cdc50p purifié de rester stable et fonctionnel en présence de détergent. La majorité des ATPases de type P ont été cristallisées en présence de  $C_{12}E_8$ , car avec ce détergent la capacité de genèse de cristaux est supérieure à celle d'autres détergents (Gourdon et al., 2011; Morth et al., 2007; Pedersen et al., 2007). Et un résultat très encourageant de notre travail est que le complexe Drs2p-Cdc50p est fortement stabilisé par le PI4P en présence de  $C_{12}E_8$  et de DDM (Fig. 8, Article 2). Cette stabilisation pourrait être une étape importante pour l'obtention d'une structure cristallographique d'un complexe Drs2p/Cdc50p en présence de  $C_{12}E_8$ .

## **III.2. Étude de la régulation de l'activité du complexe Drs2p/dc50p par ses extrémités N- et C-terminales** (*Article 3, soumis : A high and PI4P-dependent ATPase activity for the Drs2p/Cdc50p flippase after removal of its N- and C-terminal extensions*)

### **III.2.1. Introduction de l'article 3**

Un deuxième axe de cette thèse a été d'étudier le rôle des extrémités N- et C-terminales dans la régulation de l'ATPase-P4, Drs2p, et de tenter de déterminer les segments de la protéine impliqués dans cette auto-régulation. De nombreuses autres ATPases de type P sont soumises à auto-régulation, et des résultats préliminaires dans notre laboratoire avaient suggéré que l'extrémité C-terminale de Drs2p semblait jouer un rôle dans l'auto-inhibition de Drs2p, avant même que cette hypothèse que nous avons envisagée ne soit publiée par l'équipe de Graham (Zhou et al., 2013) au début de ma thèse. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus vont donc être évoqués d'abord.

On peut en effet détecter deux formes de Drs2p (Fig. 15A) après son immunodétection par un anticorps dirigé contre Drs2p sur des membranes de levures contenant Drs2p et Cdc50p taggées en C-ter, une forme entière et une forme tronquée. La forme tronquée n'étant pas détectable avec un sonde biotine, la troncature a donc lieu au moins du côté C-terminal. Or, les propriétés catalytiques de ces deux formes ne semblent pas identiques. Lorsque la cinétique de déphosphorylation de Drs2p est analysée en visualisant la quantité de radioactivité associée aux deux formes de Drs2p, après séparation électrophorétique et autoradiographie (Fig. 15B), la cinétique de déphosphorylation mesurée en présence de PS mais en absence de PI4P est clairement plus rapide pour la forme tronquée de Drs2p que pour sa forme entière. En présence de PI4P, la déphosphorylation est accélérée pour les deux formes. La troncature, au moins de l'extrémité C-terminale de Drs2p, semble donc accélérer la déphosphorylation, comme si c'était sa partie C-terminale qui exerçait une auto-inhibition sur Drs2p.



**Figure 15: Cinétique de déphosphorylation de l'ATPase Drs2p entière ou tronquée (au moins en C-ter).** (A) Révélation de Drs2p étiquetée en C-ter et contenue dans des membranes de levures par un anticorps anti-Drs2p dirigé contre le domaine soluble de l'ATPase situé entre les TM4 et TM5. La bande la plus basse est forcément tronquée au moins en C-ter, vu que Drs2p présente un tag Bad côté C-terminal et que la bande la plus basse n'est pas détectée par la sonde biotine. (B) Les membranes exprimant Drs2p ont été incubées avec de l'ATP radioactif jusqu'à atteindre l'état stationnaire et la déphosphorylation a été déclenchée par addition d'un large excès d'ATP non radioactif. Une électrophorèse sur gel dénaturant, mais en milieu moins basique que dans les Laemmli standard, permet de protéger la liaison acyl-phosphate du dérivé phosphorylé et donc de visualiser par autoradiographie l'évolution de la déphosphorylation au cours du temps pour chacune des bandes initialement phosphorylées : la bande tronquée se déphosphoryle plus rapidement que la protéine intacte.

Pour tester cette possibilité d'auto-inhibition par les extrémités terminales de Drs2p, deux stratégies ont été mises en œuvre. La première est d'engendrer des constructions de versions tronquées de *DRS2* du côté 5' ou 3', de les exprimer, de les purifier, d'analyser l'effet de ces troncatures sur l'activité de Drs2p et donc d'identifier le rôle des extrémités N- et C-terminales sur la régulation du cycle catalytique de Drs2p. La seconde stratégie vise à soumettre Drs2p purifiée à une protéolyse ménagée, dont il s'avère qu'elle permet d'engendrer des versions de Drs2p débarrassées de leur extrémité N- et/ou C-terminale. Une analyse de l'activité de Drs2p et des versions de Drs2p coupées est faite afin de voir l'effet de ces coupures sur l'activité de l'ATPase-P4. D'autre part une analyse par spectrométrie de masse est effectuée après la protéolyse ménagée pour essayer d'identifier les peptides générés.

Les résultats de notre étude sont présentés dans l'article 3 (soumis).

### **III.2.2. Article 3**

## A high and phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P)-dependent ATPase activity for the Drs2p/Cdc50p flippase after removal of its N- and C-terminal extensions

Hassina Azouaoui<sup>1</sup>, Cédric Montigny<sup>1</sup>, Thibaud Dieudonné<sup>1</sup>, Philippe Champeil<sup>1</sup>, Aurore Jacquot<sup>1</sup>, José Luis Vázquez-Ibar<sup>1</sup>, Pierre Le Maréchal<sup>2</sup>, Jakob Ulstrup<sup>3</sup>, Miriam-Rose Ash<sup>3</sup>, Joseph A. Lyons<sup>3</sup>, Poul Nissen<sup>3</sup>, Guillaume Lenoir<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, F-91198, Gif-sur-Yvette cedex, France. <sup>2</sup>Neuro-PSI – UMR CNRS 9197, Bâtiment 430, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay Cedex, France. <sup>3</sup>DANDRITE, Nordic-EMBL Partnership for Molecular Medicine, and PUMPKin, Danish national Research Foundation, Aarhus University, Department of Molecular Biology and Genetics, Gustav Wieds Vej 10C, 8000 Aarhus C, Denmark

Running title: *Limited proteolysis of the Drs2p/Cdc50p lipid flippase*

To whom correspondence should be addressed: Guillaume Lenoir, Institute for Integrative Biology of the Cell, Bâtiment 528, PC 103, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France, Telephone: +33 (0) 169087589; FAX: +33 (0) 169088139; E-mail: [guillaume.lenoir@i2bc.paris-saclay.fr](mailto:guillaume.lenoir@i2bc.paris-saclay.fr)

**Keywords:** Flippase, CDC50 protein, phosphatidylserine, phosphoinositide, inhibition mechanism, lipid-protein interaction, phosphorylation

---

### ABSTRACT

P4-ATPases, also known as phospholipid flippases, are responsible for creating and maintaining transbilayer lipid asymmetry in eukaryotic cell membranes. Here, we show that limited proteolysis of a purified yeast flippase, the Drs2p/Cdc50p complex, resulted in up to a 30-50-fold increase of its ATPase activity, which however remained dependent on phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P), a regulator of this lipid flippase, and specific to a phosphatidylserine substrate. Using thrombin as the protease, Cdc50p remained intact and in complex with Drs2p, which was cleaved at two positions, namely after R<sup>104</sup> and after R<sup>1290</sup>, resulting in a homogenous sample. The cleaved N-terminal residues (1-104) appear to be of little significance for activity, but region 1291-1302 of the C-terminal extension is critical for auto-inhibition of full-length Drs2p. The present results therefore reveal that trimming off appropriate regions of the terminal extensions of Drs2p can increase its ATPase activity in the presence of PI4P by an enormous factor, and demonstrate that

relief of such auto-inhibition remains compatible with subsequent regulation by PI4P. These experiments suggest that full activation of the Drs2p/Cdc50p flippase might follow a two-step mechanism, with preliminary release of a number of constraints, possibly through the binding of regulatory proteins or proteolysis in the *trans*-Golgi network, followed by full activation by PI4P.

---

Transbilayer lipid movement is essential to many aspects of cell function. For example, for proper expansion of biogenic membranes like the endoplasmic reticulum (ER) membrane, translocation of phospholipids toward the luminal leaflet accompanies synthesis on the cytosolic leaflet [1]. Energy-independent lipid transporters generally referred to as phospholipid ‘scramblases’ fulfill this activity [2–4]. At variance with phospholipid scramblases that equilibrate lipid concentrations in a relatively non-specific manner over the two leaflets of biological membranes, active transporters termed ‘flippases’ use the

chemical energy of ATP to catalyze uphill transport of specific lipids, thereby creating and maintaining phospholipid asymmetry in the membranes they are embedded in. One of the most prominent lipids actively transported by flippases is phosphatidylserine (PS), which is enriched in the cytosolic leaflet of membranes from the late secretory/endocytic pathways. PS asymmetry is critical as signaling proteins that contain stretches of basic residues, such as K-Ras, use the negatively charged headgroup of PS lipids as a docking site [5, 6]. Also, PS is the target of C2-domain containing proteins like protein kinase C and synaptotagmin, respectively involved in protein phosphorylation and membrane fusion. Conversely, dissipation of PS asymmetry at the plasma membrane is an early and very potent apoptotic signal that triggers recognition by macrophages [7].

The phospholipid flippases belong to the P4 subfamily of P-type ATPases (P4-ATPases) [8]. Some of the mammalian P4-ATPases are associated with pathological conditions. For instance, mutations in ATP8B1 are directly linked to intrahepatic cholestasis, a rare liver disease that in severe forms may progress toward liver failure and death before adulthood [9]. ATP8A2 mutations are causative of the rare cerebellar ataxia, mental retardation and disequilibrium syndrome [10].

Although the molecular mechanism of phospholipid transport through P4-ATPases has drawn much attention in the recent years (for recent reviews see [11, 12]), little is known about how lipid flippases work. Recent studies suggested that lipids flip across the membrane through a peripheral pathway, along the protein/lipid interface [13, 14]. However, this view is challenged by studies on another phospholipid-translocating P4-ATPase, the mammalian ATP8A2/CDC50A complex, suggesting that the lipid headgroup binding site might be more deeply buried into the ATPase helix bundle [15]. The yeast Drs2p is one of the most intensively studied P4-ATPases. When embedded in TGN membranes, in association with its ancillary subunit Cdc50p, it has been shown to translocate fluorescently labeled (with a NBD fluorescent moiety) PS at the energetic expense of ATP hydrolysis [16, 17]. This NBD-PS transport activity has been further demonstrated after

purification and reconstitution into proteoliposomes [18]. Up to now, only a few labs have succeeded in purifying a Drs2p/Cdc50p complex and to assay its ATPase activity [18, 19]. This activity, however, was found to be low compared to ATP8A2/CDC50A complex [20] or other P-type ATPases like the prototypic and thoroughly studied ion-translocating  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ - or  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases, and to be strictly dependent on phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) [19]. Compared with ATP8A2 and with most P2-ATPases, Drs2p contains relatively long N- and C-terminal extensions of up to  $\sim 190$ -200 amino acids on the N-side and  $\sim 130$ -140 amino acids on the C-side (Fig. 1A), to which various regulators of Drs2p are known to bind. The Arf-like protein Arl1p interacts with the N-terminus of Drs2p, stimulating Drs2p ATPase activity in purified TGN membranes [21]. Besides, both the guanine nucleotide exchange factor protein Gea2p and PI4P regulate the activity of Drs2p upon binding to its C-terminus [22, 23].

A recent study suggested that the C-terminal tail of Drs2p exerts an auto-inhibitory effect on Drs2p activity, an auto-inhibition that would be relieved by binding of PI4P [24]. Indeed, a relatively common feature of a number of P-type ATPases (e.g. plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases,  $\text{H}^+$ -ATPases) is that N-terminal and/or C-terminal extensions of a central core structure contribute significant auto-inhibition to the full-length protein activity, with regulators often releasing such auto-inhibition by binding to these peripheral extensions and thereby relieving their impact on binding events and domain movements required for catalytic activity [25–28].

We have earlier attempted to overexpress truncated forms of Drs2p (together with Cdc50p), in which portions of the Drs2p N- or C-terminus had been deliberately truncated. However, C-terminally truncated Drs2p was poorly expressed and solubilized from yeast membranes, and the glycosylation pattern of Cdc50p was altered, suggesting that C-terminal truncation of Drs2p had a deleterious impact on Drs2p/Cdc50p association. Obviously, such attempts may suffer from the possibility that one does not necessarily guess correctly at which exact point truncation should be performed for relieving auto-inhibition without inducing collateral effects. As an alternative approach, we therefore submitted the purified full-

length Drs2p/Cdc50p complex to limited proteolysis, anticipating that the presumably poorly structured extensions would be more susceptible to proteolysis than the well-organized domains of the central core, and that limited proteolysis under appropriate conditions would allow us to investigate the functional properties of a complex devoid of its regulatory extensions.

Here we show that thrombin treatment of the purified Drs2p/Cdc50p complex in the presence of PI4P results in formation of a polypeptide devoid of the first 104 N-terminal residues and of the last 65 C-terminal residues. We found that truncation of Drs2p stimulates ATPase activity to a very large and previously unrecognized extent, namely by 30-50 fold. Remarkably, stimulation of ATPase activity remained strongly dependent on PI4P, despite the fact that truncation in the C-terminus occurred only seventeen residues after the predicted PI4P-binding site. Our data thus provide the demonstration that activation of Drs2p/Cdc50p by PI4P is not mediated by PI4P alone and through a simple PI4P-induced displacement of the whole C-terminal tail. Instead, we propose a two-step mechanism where the C-terminal tail of Drs2p must be displaced before PI4P can exert its full, stimulatory role.

## RESULTS

*Proteases added to purified Drs2p/Cdc50p turning over in the presence of PI4P dramatically increase its ATP hydrolysis rate* — Secondary structure predictions suggest that the N- and C-termini of Drs2p are intrinsically disordered (Fig. 1B). Thus, our rationale was that limited proteolysis might be a convenient tool to remove these possibly auto-inhibitory extensions. To rapidly test whether limited proteolysis of the purified Drs2p/Cdc50p complex would lead to a significant increase of its ATPase activity, such proteolysis was first performed while simultaneously monitoring the ATPase activity of the complex, using a continuous assay based on NADH oxidation by a regenerating system (e.g. [29]).

As first illustrated in Fig. 1C, solubilized SERCA1a derived from sarcoplasmic reticulum membranes (a prototypic P2-type ATPase) displayed the expected robust activity, which

proved to be only poorly sensitive to PI4P under these conditions (see [30] for comparison). The activity of an intact purified Drs2p/Cdc50p complex was then assayed (Fig. 1C, trace (ii)), and as expected, its very low ATPase activity was hardly distinguishable from the background rate of NADH absorption changes, even after addition of PI4P which has been shown to be essential for activation of this intact complex [19]. However, when trypsin was added, a very large increase in the rate of NADH oxidation progressively took place, as if time-dependent activation of the complex were indeed occurring as a result of proteolysis. When the trypsin concentration was further increased 4-fold, ATP hydrolysis continued, indicating that under the present conditions and within this time scale, proteolysis by trypsin did not proceed beyond a point where further degradation would have impaired Drs2p enzymatic activity. The observed effect was specifically associated with Drs2p activation, as treatment with trypsin of the inactive E342Q mutant of Drs2p did not result in any increase of its activity (Fig. 1C, trace (iii)). Addition of trypsin to a Drs2p/Cdc50p complex turning over in the absence of PI4P remained only poorly efficient (Supplementary Fig. S1A).

The specific ATPase activity was stimulated about 30-50 fold after trypsin treatment, increasing from  $\sim 0.05$ - $0.07$  to  $\sim 2$ - $2.4 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ . When other proteases were used in the presence of PI4P, like chymotrypsin or the poorly specific proteinase K and subtilisin proteases, stimulation of the ATPase activity of the purified complex was also observed over a few minutes (Supplementary Fig. S1B), suggesting that the portions of the Drs2p/Cdc50p complex attacked by the various proteases are indeed especially exposed or disordered, and that the remaining proteolysis fragments displaying high ATPase activity are fairly resistant to further inhibitory degradation.

*Limited proteolysis of Drs2p/Cdc50p results in transient accumulation of two main types of Drs2p fragments, with increased PI4P-sensitive ATPase activity* — To identify the peptides formed as a result of proteolysis, the purified Drs2p/Cdc50p complex was treated, without significant dilution, with the various aforementioned proteases. After proteolysis was quenched, the proteolyzed samples were used for

studying their electrophoretic migration pattern as well as for determining their ATPase activity.

Fig. 2A and Supplementary Fig. S2A show results selected out of a number of different combinations of proteolysis periods and temperatures. Proteolysis of the ~ 150 kDa full-length Drs2p chain led to transient accumulation of large fragments (dubbed fragments 1 and 2 after treatment with thrombin, and fragments 1' and 2' after treatment with chymotrypsin), with little if any accumulation of smaller fragments in the 30-100 kDa range (Fig. 2A). Fragments formed after treatment with trypsin ran at about the same position as chymotryptic fragments 1' and 2' (Supplementary Fig. S2A). Extending the proteolysis period from 20 minutes to 60 minutes (Fig. 2A) or increasing the temperature from 4 °C to 20 °C (Supplementary Fig. S2A) favored disappearance of the larger fragments (1 and 1') and accumulation of the smaller fragments (2 and 2'), implying that the latter are relatively resistant to proteolysis. Interestingly, the presence of PI4P during proteolysis favored formation of the smaller fragments (lanes 8-9 in Fig. 2A and lanes 4-5 in Supplementary Fig. S2A). A specific feature of proteolysis by thrombin *versus* proteolysis by chymotrypsin or trypsin was that Cdc50p remained intact under these conditions (lanes 7-9 in Fig. 2A). The presence of PI4P during chymotrypsin digestion also protected Cdc50p from proteolysis (lanes 5-6 in Fig. 2A). The inactive E342Q variant of Drs2p was proteolyzed by chymotrypsin similarly to WT Drs2p (compare lanes 2 and 6 in Fig. 2A).

Irrespective of whether proteolysis was performed in the absence or presence of PI4P, the activity of WT Drs2p/Cdc50p in the presence of PI4P increased very significantly, in some cases up to a considerable extent, compared with the very low ATPase activity of the untreated complex. In the absence of PI4P, the increase in activity of the proteolyzed sample remained moderate (Fig. 2B and Supplementary Fig. S2B). In contrast, the E342Q variant remained inactive after its proteolysis by chymotrypsin (lanes 1-2 in Fig. 2B).

Zhou *et al* recently showed that the activity of Drs2p devoid of its whole C-terminus is comparable, in the absence or presence of PI4P, to that of full-length Drs2p in the presence of PI4P, suggesting that PI4P binding relieves auto-inhibition of the pump [24]. Our results are

therefore at variance, indicating that Drs2p activation upon proteolysis remains strongly dependent on PI4P, and we investigated the PI4P dependence in more detail. Evaluating the PI4P dependence of the activity of a sample resulting from proteolysis in the *absence* of PI4P was quite straightforward, either using a NADH-coupled assay or a phosphomolybdate procedure. Supplementary Fig. S3 shows that this sample (T-) has an increased ATPase activity that indeed remains highly sensitive to PI4P, although activation by PI4P is not instantaneous. However, evaluating the dependence on PI4P of the activity of a sample resulting from proteolysis in the *presence* of PI4P (T+) was more delicate: it required strong dilution of the sample, to reach a low enough PI4P final concentration, and it also required to leave sufficient time for PI4P dissociation from the diluted T+ sample, before testing the effect of back addition of PI4P. The continuous NADH coupled assay proved here to be particularly useful, as it made it possible to evidence that PI4P dissociation is rather slow, with a half-time of about 5 minutes at 30 °C (Fig. 3A, trace (ii)), and that subsequent PI4P binding does reactivate the proteolyzed sample. Thus, the T+ sample, too, is sensitive to PI4P. Proteolyzed samples were also found to remain sensitive to PS and the kinetics for PS dissociation (Fig. 3A, trace (iii)) were slightly faster than that for PI4P.

*Detailed characterization of the sensitivity of thrombin-treated Drs2p/Cdc50p complexes to various lipids as well as to ATP* — The apparent affinity for PI4P of the T- sample, in the presence of a quasi-saturating concentration of PS, was found higher than its apparent affinity for PS in the presence of a quasi-saturating concentration of PI4P (Fig. 3B), as previously found for intact Drs2p/Cdc50p complex [19]. Assuming comparable binding rates, the poorer apparent dissociation constant for PS compared with PI4P fits with its faster dissociation rate (Fig. 3A).

Note that the most relevant parameter to describe the effect of a particular concentration of lipid is the lipid/detergent ratio, a ratio reflecting the local lipid concentration within the hydrophobic micellar phase, rather than the lipid concentration in the aqueous volume. Indeed, results obtained under 'standard' DDM concentrations (0.5-1.5 mg/mL) and those obtained

at significantly higher DDM concentrations (3–4 mg/mL) fall on the same line (open *versus* closed symbols in Fig. 3B) if lipid concentrations are expressed as lipid/DDM ratios. In such terms, the  $K_M$  for activation by PI4P is about 0.005 g PI4P/g DDM (Fig. 3B). If expressed in terms of mol lipid/mol detergent ratio, this corresponds to less than 1 mole PI4P out of 200 moles DDM. We estimate that about 200 molecules of DDM surround the transmembrane region of the Drs2p/Cdc50p complex (unpublished results), so the  $K_M$  corresponds to less than one PI4P molecule in the immediate environment of Drs2p, emphasizing the strong affinity of the thrombin-treated Drs2p for PI4P.

Both PI4P and PI(4,5)P<sub>2</sub> have previously been shown to interact with a patch of basic residues, RMKKQR<sup>1273</sup>, which is therefore assigned as the binding site for PI4P on the C-terminal extension of Drs2p [23]. We investigated whether other phospholipids of the inositol lipid family could stimulate Drs2p ATPase activity to the same extent as PI4P. We found however that stimulation of the activity of a Drs2p/Cdc50p thrombin-treated T<sup>-</sup> sample was specific to PI4P as neither PI nor PI(4,5)P<sub>2</sub> were effective (Fig. 3C). The presence of the latter lipids did not prevent subsequent activation by PI4P (not shown).

Affinities of a T<sup>+</sup> sample for PI4P and PS were found similar to those of the T<sup>-</sup> sample, although maximal activities were higher. Addition of PE to a PS-depleted T<sup>+</sup> sample in the presence of PI4P only had marginal effect compared with PS (Fig. 3D).

We finally investigated other general catalytic properties of the thrombin-treated T<sup>+</sup> sample. Its  $K_M$  for MgATP was found to be ~ 5  $\mu$ M (Fig. 3E), close to that previously determined for phosphorylation of the intact complex (~ 10  $\mu$ M). We found only little further activation by millimolar concentrations of MgATP, unlike for the Ca<sup>2+</sup>-pump SERCA1a (Fig. 3E), which shows also modulatory binding modes for ATP [29, 31–33]. The sensitivity of the intact complex to inhibitors like orthovanadate or beryllium fluoride [19] was also retained after proteolysis, as tested in this case with the highly active fragment generated by chymotrypsin treatment, although overall ATPase activity was less sensitive to these inhibitors than

phosphoenzyme formation itself (data not shown). This is reminiscent of what is found for prototypical P-type ATPases, in which only certain conformations of the ATPase bind these inhibitors strongly.

*Drs2p activation by proteolysis is not the result of Cdc50p dissociation* — Cdc50 proteins are thought to play an intimate role during P4-ATPase-catalyzed lipid transport [34–38], and the affinity of Drs2p for Cdc50p has been suggested to fluctuate during lipid transport [37]. We thus asked whether Drs2p activation by proteolysis could have been the result of Cdc50p dissociation from the complex.

Subjecting the T<sup>+</sup> species to size-exclusion chromatography (SEC) made it possible to evaluate to what extent Drs2p and Cdc50p remain associated after proteolysis. The proteolyzed Drs2p/Cdc50p complex only contained very few aggregates and eluted as a sharp peak well separated from detergent micelles or thrombin (Fig. 4A). Elution after proteolysis was delayed to a volume slightly larger than that for the untreated sample but smaller than that for a solubilized SERCA1a/sarcoplipin complex [39], suggesting that most of the small fragments resulting from Drs2p proteolysis have dissociated from the large fragments, instead of remaining bound via weak interactions. In similar experiments, the mixture of fragments 1 and 2 in a T<sup>-</sup> sample eluted between untreated and T<sup>+</sup> samples (not shown).

For detection of Cdc50p in the eluted fractions, we resorted to a non-cleavable His<sub>10</sub>-tagged version of Cdc50p, co-expressed and purified together with Drs2p. This Drs2p/His<sub>10</sub>-Cdc50p sample (D/H<sub>C</sub>), either before or after thrombin treatment, behaved just as the one with untagged Cdc50p (D/C), judging from its sensitivity to thrombin treatment (Supplementary Fig. S4A), its SEC elution profiles (not shown), and the Drs2p elution pattern after SEC (Fig. 4B). Western-blot analysis of these eluted fractions clearly showed that the two subunits remained associated during SEC, for both intact and thrombin-treated D/H<sub>C</sub> complexes (Fig. 4B).

To further strengthen our conclusion, association between proteolyzed Drs2p and His<sub>10</sub>-Cdc50p was also explored by allowing His<sub>10</sub>-Cdc50p to interact with a Ni<sup>2+</sup> resin. For the thrombin-treated D/H<sub>C</sub> complex, like for the intact

D<sub>H</sub>C complex, both Drs2p and Cdc50p remained bound to the resin and therefore disappeared from the flow-through (Supplementary Fig. S4B). For the untagged D/C complex under the same conditions, unspecific adsorption of the complex on the Ni<sup>2+</sup> resin remained modest, confirming that Drs2p in the D<sub>H</sub>C complex had been fished out via the His-tagged Cdc50p, for both intact and proteolyzed samples (Supplementary Fig. S4B). Most of the ATPase activity of the thrombin-treated D<sub>H</sub>C complex was also retained on the Ni<sup>2+</sup> resin (Supplementary Fig. S4B), thereby excluding that stimulation of activity could be due to Drs2p dissociation from its associated subunit.

*Identification of the thrombin-derived proteolytic fragments* — We first analyzed the proteolysis products using N-terminal sequencing (left panels in Fig. 5). For untreated purified Drs2p, N-terminal residues were identified as GXGXGMND, in line with the fact that in our construct, four additional linking glycines together with one glycine from the TEV site are present upstream of the first residue. As to the various bands resulting from proteolysis with thrombin (fragments 1 and 2 in T<sup>-</sup> and fragment 2 in T<sup>+</sup>), their N-terminal first amino acids were identified as being A<sup>105</sup>VKPP in all cases. All thrombin-derived fragments therefore start at the same location, A<sup>105</sup>, immediately after R<sup>104</sup>. Although cleavage after R<sup>104</sup> fits with the generally accepted view that thrombin only cleaves peptides after an arginine, this cleavage site (...QSLR<sup>104</sup>AVKPP...) deviates significantly from the LVPR\*GS consensus sequence. To exclude that this cleavage could reveal the presence of some protease contaminant in our thrombin supply, we performed proteolysis in the presence of hirudin, a specific inhibitor of thrombin. As displayed in Supplementary Fig. S5, hirudin fully blocked proteolysis by thrombin, but did not alter the effect of proteolysis by chymotrypsin or trypsin, showing that cleavage at R<sup>104</sup> was due to thrombin itself. Note that attempts to identify the N-terminal residues of Drs2p fragments resulting from chymotryptic treatment only revealed untractable mixtures of amino acids, suggesting that these fragments were in fact rather heterogeneous.

To estimate the molecular masses of their Drs2p fragments, the thrombin-derived samples were then submitted to MALDI-TOF analysis

(right Panels in Fig. 5), after further purification on a SEC column. In all cases mass spectra revealed a major peak at 52.3±0.1 kDa, likely reflecting glycosylated Cdc50p. For untreated samples, the mass spectrum displayed a peak at an m/z value close to the one expected for full-length Drs2p, m/z ~ 153.9 kDa (theoretical mass = 154.0 kDa), as well as a peak corresponding to the doubly charged peptide (z=2) at m/z ~ 77.0 kDa. For T<sup>-</sup> samples, the mass spectrum revealed a large component at an m/z of ~ 141.6 kDa, as well as the companion peak (for z=2) at m/z ~ 70.9 kDa. As the calculated mass for the A<sup>105</sup>-I<sup>1355</sup> peptide is 141.9 kDa, this component in T<sup>-</sup> samples fits with fragment 1 resulting from a unique N-terminal truncation of Drs2p at position 105, and left untouched at its C-terminus. For T<sup>+</sup> samples, a major component was found at m/z ~ 134.5 kDa, with the companion peak (for z=2) at m/z ~ 67.3 kDa. Assuming that thrombin cleavage occurs after an arginine, and considering the previously determined N-terminal residue of fragment 2 (A<sup>105</sup>) as well as the limited number of arginine residues in the C-terminal region of Drs2p, the conclusion is that fragment 2 in the T<sup>+</sup> sample must end at R<sup>1290</sup>, the calculated mass of which is 134.7 kDa. Indeed, the arginine residues closest to R<sup>1290</sup> in Drs2p sequence are R<sup>1273</sup> and R<sup>1298</sup>, and masses for peptides ending at those residues should be 132.8 kDa and 135.7 kDa, respectively, well beyond experimental error. Remarkably, the mass spectrum of the T<sup>+</sup> sample reveals a minor peak at ~ 141.8 kDa, presumably corresponding to the small amount of fragment 1 in T<sup>+</sup>, and the mass spectrum of the T<sup>-</sup> sample also reveals a minor peak at ~ 134.5 kDa, presumably corresponding to the small amount of fragment 2 in T<sup>-</sup>.

Hence, a consistent picture appears to be as follows (Fig. 5D): cleavage by thrombin first occurs in the N-terminal region of Drs2p, after R<sup>104</sup>, giving rise to a peptide whose molecular mass is 141.9 kDa (fragment 1 in Fig. 2A). Subsequently, thrombin also cleaves the Drs2p chain after R<sup>1290</sup>, resulting in a peptide whose molecular mass is 134.7 kDa (fragment 2 in Fig. 2A). The main Drs2p peptide in T<sup>+</sup> samples is therefore lacking 104 residues from its N-terminus and 65 residues from its C-terminus.

*Increased overall activity of thrombin-treated Drs2p in the presence of PI4P correlates*

with a greatly stimulated rate of dephosphorylation for the A<sup>105</sup>-R<sup>1290</sup> peptide — Using a classical type of experiment in which <sup>32</sup>P-labelled phosphoenzyme is first formed from [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP before being chased with excess unlabeled MgATP (Fig. 6A), we previously found that dephosphorylation of the transiently formed phosphoenzyme species of an intact Drs2p/Cdc50p complex was slow, occurring on a time scale of minutes at 30 °C. Therefore, dephosphorylation is most probably rate-limiting for overall ATPase activity [19, 40]. For proteolyzed Drs2p/Cdc50p samples, we thus also monitored the rate of dephosphorylation of Drs2p. Since [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP hydrolysis is much faster for the proteolyzed sample, these dephosphorylation experiments were performed at 4 °C, in order to prevent complete exhaustion of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP within the first minute (see Supplementary Fig. S6).

Phosphoenzyme was first measured using a filtration protocol after acid quenching. For an intact Drs2p/Cdc50p complex, most of the phosphoenzyme formed remained stable over a few minutes after an ATP chase at 4 °C (Fig. 6B, left). For a T+ sample, the phosphoenzyme completely disappeared after the chase, within half a minute (Fig. 6B, right), consistent with the greatly increased ATPase activity of T+ samples at 4 °C (Supplementary Fig. S6). Remarkably, for the T- sample, only about half of the phosphoenzyme disappeared after the ATP chase, while the rest remained stable (Fig. 6B, center). In view of the fact that this T- sample contains significant amounts of both fragments 1 and 2, this suggested that one of these fragments might dephosphorylate quickly while the other retained slow dephosphorylation, almost as slow as for the intact Drs2p/Cdc50p complex. This would be consistent with the apparent correlation between stimulation of the overall ATPase activity and formation of the proteolytic fragment 2 (compare lanes 8 and 9 in Figs. 2A and 2B).

To distinguish between fragment 1 and fragment 2 as regards their ability to undergo phosphorylation and dephosphorylation, we subjected phosphorylated and ATP-chased samples to electrophoretic separation on acidic gels, i.e. under conditions that retain the alkali-labile acylphosphate bond of the phosphoenzyme (see e.g. [41]). In these experiments (Fig. 6C), the smaller of the two proteolytic fragments found in a

T- sample, as well as the quasi-unique fragment found in a T+ sample (the A<sup>105</sup>-R<sup>1290</sup> peptide in both cases), exhibited greatly increased dephosphorylation rates, whereas the rate of dephosphorylation of the larger fragment in T- (the A<sup>105</sup>-I<sup>1355</sup> peptide) was as slow as that for untreated Drs2p. These experiments clearly show that C-terminal cleavage of Drs2p at R<sup>1290</sup> is required to significantly accelerate dephosphorylation of the transient phosphoenzyme intermediate, explaining why the increased ATPase activity after thrombin treatment in the presence or absence of PI4P mainly correlates with formation of the A<sup>105</sup>-R<sup>1290</sup> fragment.

*Removing either the N-terminal 1-104 residues or the C-terminal 1303-1355 residues is not sufficient to fully stimulate Drs2p activity —*

To confirm that N-terminal cleavage of the first 104 residues of Drs2p alone is not sufficient for accelerating dephosphorylation of the transiently formed phosphoenzyme in fragment 1 (the A<sup>105</sup>-I<sup>1355</sup> peptide), we used a purified fraction highly enriched in a Drs2p form lacking the first 104 residues ( $\Delta$ N104). MALDI-TOF analysis of this sample confirmed that it corresponded to fragment 105-1355 (data not shown). This  $\Delta$ N104 form had an ATPase activity at 30 °C only moderately higher than that of the full-length Drs2p (open symbols in Fig. 7A and Supplementary Fig. S7A), and we could therefore perform phosphorylation and dephosphorylation experiments at 30 °C. As displayed in Fig. 7A, the kinetics of dephosphorylation for the main component of this  $\Delta$ N104 variant was essentially similar to that for full-length Drs2p, as revealed either by filtration experiments or after electrophoretic separation (Fig. 7A). Thus, the slightly faster rate of ATP hydrolysis by the  $\Delta$ N104 form was probably only due to the presence in  $\Delta$ N104 of a small amount of a shorter form of Drs2p, apparently dephosphorylating much more rapidly (dotted arrow in Fig. 7A), a fraction contributing to ATPase activity much more than it does to the phosphoenzyme level. Since  $\Delta$ N104 has been recovered from streptavidin beads by treatment with thrombin, this minor Drs2p form might in fact be cleaved at R<sup>1290</sup> too). This result is consistent with the view that there is essentially no auto-inhibition of full-length Drs2p by its N-terminal 1-104 residues. When the  $\Delta$ N104 variant was

subjected to thrombin treatment (either T- or T+), its ATPase activity rose considerably (Supplementary Fig. S7A), because of the concomitant increase in the fraction of enzyme cleaved at R<sup>1290</sup>. Our results therefore indicate that removing solely the first 104 residues of Drs2p does not alter much the functional properties of the Drs2p/Cdc50p complex, but that the concomitant removal of 65 C-terminal residues greatly stimulates its ATPase activity.

We then asked whether removing only the C-terminal end of Drs2p would be sufficient to relieve auto-inhibition of the complex. Toward this goal, we generated various C-terminally-shortened versions of Drs2p, based on the putative contents and organization of Drs2p C-terminal region [22]. Specifically, we selected variants (Fig. 7B) ending either immediately after the putative transmembrane segment 10 (Y<sup>1226</sup>), or before or after the Gea2p/PI4P binding site (S<sup>1249</sup> and R<sup>1273</sup>), or after the Vps36p homology domain (G<sup>1283</sup>), or, finally, at a position (G<sup>1302</sup>) thought to be similar to that of the C-terminal amino-acid of ATP8A2, a mammalian P4-ATPase that displays a very high ATP hydrolysis rate [20].

We first looked at the ability of these shortened variants to complement the cold-sensitive growth defect of  $\Delta$ *drs2* yeast cells. While the  $\Delta$ C1302 variant was able to complement this growth defect, further deletions up to amino acid 1226 were unable to do so (Fig 7B), suggesting that deletion beyond G1302 is detrimental to Drs2p activity. In subsequent co-expression attempts, we found that all variants were expressed, although in some cases at levels significantly lower than for WT Drs2p, including for the  $\Delta$ C1302 variant (data not shown), and in some cases with altered Cdc50p glycosylation pattern. All variants, however, were poorly solubilized by DDM, so that the purification yield of the various deletions turned out to be rather limited compared to wild-type Drs2p (data not shown).

We thus continued with the  $\Delta$ C1302 variant and compared its properties with those of WT enzyme. The purified  $\Delta$ C1302 variant was phosphorylated to a fair extent compared with full-length enzyme. Nevertheless, the more rapid exhaustion of ATP by  $\Delta$ C1302 (open symbols in Fig. 7C) suggested that its hydrolysis rate was faster than that of the full-length enzyme, as also

suggested by ATPase activity measurements (Supplementary Fig. S7B). The half time of dephosphorylation of the  $\Delta$ C1302 variant was indeed shorter than for the full-length enzyme, but only 2-fold shorter, as deduced from both filtration experiments (closed symbols in Fig. 7C) or after electrophoretic separation (Fig. 7C, right). Deletion of the final 53 residues of Drs2p therefore moderately stimulates its ATPase activity, but significantly less than the activation achieved for the A<sup>104</sup>-R<sup>1290</sup> peptide. Proteolysis by thrombin of the  $\Delta$ C1302 variant occurred in a manner similar to that for WT, with cleavage in the presence of PI4P (T+) apparently resulting in the same 105-1290 peptide as for WT and with concomitant increase in ATPase activity (Supplementary Fig. S7B). Remarkably, proteolysis of the 1-1302 variant under T- conditions only resulted in a modest relative increase in activity (Supplementary Fig. S7B), implying again that deletion of residues 1-104 does not fully relieve the residual auto-inhibition of Drs2p, even in the C-shortened  $\Delta$ C1302 variant. From this we conclude that an intact 1291-1302 region, in the absence or presence of the N-terminal 1-104 residues, is of critical importance for maintaining significant auto-inhibition of Drs2p.

## DISCUSSION

*Limited proteolysis of Drs2p C- and N-terminal extensions stimulates its ATPase activity:*

*general comments* — We demonstrate here that limited proteolysis of Drs2p, down to peptides with sizes only slightly larger than that of its central core, dramatically increases its ATP hydrolysis rate. Such stimulation was achieved upon proteolysis with various proteases, including thrombin, trypsin and chymotrypsin (Figs. 1-2 and Supplementary Figs. S1-S2). However, the functional consequences of trypsin and chymotrypsin treatment are less straightforward to interpret than those of thrombin treatment, because in the former cases Cdc50p is cleaved, preventing unambiguous interpretation of functional effects in terms of the sole Drs2p proteolysis. In addition, these less specific proteases probably cleave Drs2p at a larger number of sites compared with thrombin, making the resulting samples heterogeneous. We therefore mainly focused on

the result of Drs2p/Cdc50p proteolysis by thrombin. In this case, stimulation of ATPase activity unambiguously appears to be associated with truncation of N- and C-terminal extensions down to the A<sup>105</sup>-R<sup>1290</sup> fragment, as occurs after cleavage under T+ conditions (Fig. 6).

This T+ complex was indeed identified by N-terminal sequencing and MALDI-TOF (Fig. 5) as mostly consisting in Drs2p cleaved at a single N-terminal position (after R<sup>104</sup>) and a single C-terminal position (after R<sup>1290</sup>). The complex eluted as a homogeneous peak in gel filtration experiments, it retained both subunits of the original Drs2p/Cdc50p complex (Fig. 4), and its smaller Stokes radius compared with that of the intact complex probably implies that the small fragments resulting from proteolysis have dissociated from it. This A<sup>105</sup>-R<sup>1290</sup> Drs2p/Cdc50p complex might constitute an appealing sample for future crystallization attempts. Note that pre-treatment of the Drs2p/Cdc50p complex with BeFx prior to limited proteolysis did not significantly alter its electrophoretic pattern, and such BeFx-inhibited and proteolyzed samples might also be worth considering for crystallization purposes.

The fact that Drs2p activity can be stimulated by proteolysis unambiguously confirms the insightful suggestion by Graham's lab that the full-length Drs2p/Cdc50p complex is an auto-inhibited enzyme [24]. As Cdc50p remains intact during proteolysis by thrombin (Fig. 2), this auto-inhibition must be conveyed by the Drs2p extensions themselves. Also, because C- and N-terminal extensions were trimmed of preferentially upon proteolysis, irrespective of the particular protease used, it is likely that these portions of Drs2p are especially exposed or disordered in the full-length protein.

One question which remains to be solved is whether the dramatic ATPase activity increase evidenced in the present study was obtained because both N-ter and C-ter extensions were trimmed off by the proteolytic attack, or simply because the C-ter extension was trimmed off. In other words, do both N-ter and C-ter extensions of Drs2p, possibly in a synergistic manner, control auto-inhibition, and what are the critical regions involved? Although we currently have only partial answers to these questions, a clear fact is that trimming off the N-terminal first 104 residues only, as in fragment 1 or in the  $\Delta$ N104 truncated

form of Drs2p, is not sufficient for stimulating turnover (Fig. 6 and Fig. 7A), and that deleting the C-terminal last 53 residues only, as in the 1-1302 Drs2p variant, is only poorly efficient (Fig. 7C). Further deletion of residues 1-104 in this 1-1302 Drs2p variant does not fully stimulate ATPase activity either (Supplementary Fig. S7B). In contrast, trimming off both the N-terminal 1-104 residues and the C-terminal 1291-1355 residues relieves auto-inhibition very efficiently (Figs. 2-4 and Fig. 6). Thus, removing the segment encompassed by residues 1291-1302 on the C-terminal side appears to be critical for significant stimulation of Drs2p activity. In other words, truncation must apparently come rather close to the putative PI4P binding site (ending at R<sup>1273</sup>) to become effective. Similarly, N-terminal truncation might have to be more extensive than the mere deletion of residues 1-104 to become effective: in this regard, it is worth noting that the Arl1p binding site, starting at E<sup>153</sup> on the N-terminal extension of Drs2p, is indeed located closer to the central core of Drs2p than the R<sup>104</sup> residue.

In relation with this, we may emphasize here that after treatment with chymotrypsin or trypsin, Drs2p activity rose to a level even higher than after treatment with thrombin (Fig. 2 and Supplementary Fig. S2). A possible reason for this additional increase in ATPase activity might be that under those conditions, Cdc50p is attacked, too. But an equally conceivable explanation could be that the higher activity under those conditions is due to Drs2p being proteolyzed down to slightly shorter fragments, as in fact shown in Fig. 2 and Supplementary Fig. S2, resulting from either slightly more extensive truncation on the C-terminal side (e.g. from R<sup>1290</sup> to R<sup>1273</sup>, if sensitivity to PI4P is to be preserved), or from more extensive truncation on the N-terminal side (i.e. beyond R<sup>104</sup>). This remains to be clarified in detail.

The present data also allow us to suggest that the very low activity previously found for the purified Drs2p/Cdc50p complex [19] reflects the presence of an intact C-terminus, and, conversely, that any Drs2p/Cdc50p preparation with a high ATPase activity might well contain a significant fraction of C-terminally truncated enzyme, as previously suspected (see e.g. [24]). Such a situation is exemplified by our result with the  $\Delta$ N104 form (Fig. 7A). This might also be part of the reason why Zhou & Graham (2009) previously

found that Drs2p purified from a C-terminally tagged construct seemed to be inactive, in contrast with Drs2p purified from a N-terminally tagged construct. We in fact made a similar observation, but in our case, when excess trypsin was added during turnover, both samples progressively gained a high activity upon truncation with trypsin (Supplementary Fig. S8A). Simultaneously, a truncated fragment of Drs2p was significantly more abundant in complexes purified from N-terminally tagged constructs (Supplementary Fig. S8B). Thus, a fair reason for the higher activity of Drs2p/Cdc50p complexes purified from N-terminally tagged constructs is that their activity mainly derives from the more abundant and most probably very active truncated fragment(s) they contain. This would fit with the view that even the very low ATPase activities measured for intact samples purified from N-terminally tagged constructs are in fact too rapid to be consistent with the extremely slow rate of their dephosphorylation (unpublished results). If small amounts of truncated but very active Drs2p fragments indeed significantly contribute to the overall ATP hydrolysis, even though their minute presence in the purified complexes is insufficient to form significant amounts of phosphoenzyme at steady-state, this would imply that for intact Drs2p, stimulation by proteolysis is even higher than by the above mentioned factor of 30-50. Incidentally, these data suggest that for P-type ATPases exhibiting intrinsically low ATPase activity, phosphoenzyme measurements are probably more appropriate than the usual simple ATPase measurements for initial detection of intact forms of these P-type ATPases in crude membranes, as well as for their subsequent purification.

*The stimulated ATPase activity of proteolyzed samples retains sensitivity to PI4P and PS: possible implications for the mechanism underlying auto-inhibition relief* — Our results show that thrombin cleavage of Drs2p down to the A<sup>105</sup>-R<sup>1290</sup> fragment results in a species which not only displays a clearly increased ATPase activity but also retains the typical PS- and PI4P-dependence (Figs. 2-3) previously found for the intact Drs2p/Cdc50p complex [19]. Therefore, our results provide renewed light on the auto-inhibition

phenomenon previously suggested by Zhou and colleagues [24].

The data collected by these authors showed that deletion of 121 residues from the C-terminal end of Drs2p (from T<sup>1234</sup> to the end, which includes removal of the PI4P binding site) resulted in an ATPase activity now independent of PI4P, but that this activity was only stimulated up to the level of the intact enzyme activity in the presence of PI4P. At variance, we find that after thrombin treatment the ATPase activity measured in the absence of PI4P does not increase much, but the ATPase activity obtained in the presence of PI4P does, greatly (Figs. 1-3). Thus, it now appears that by deleting from the C-terminus fewer than 121 amino acids but more than 53, and perhaps by simultaneously deleting part of the N-terminus, it is possible to greatly increase the maximal activity of Drs2p without losing the stimulatory effect of PI4P and even to retain the ability to discriminate between PI4P and other phosphoinositides (Fig. 3B). In other words, the previously proposed auto-inhibition of Drs2p does not only apply to the particular state adopted by Drs2p in the absence of its lipid regulator, PI4P, but it more widely applies to intact Drs2p, the activity of which, even in the presence of PI4P, is kept badly low compared to what can be observed once inhibitory constraints have been released. Auto-inhibition, however, is not mainly dependent on integrity of the N- and C-terminal 1-104 or 1302-1355 extensions.

From a mechanistic point of view, the fact that Drs2p truncated down to R<sup>1290</sup> remains sensitive to PI4P means that stimulation exerted by PI4P binding is not mediated by some sort of displacement of the very ends of Drs2p, namely the M<sup>1</sup>-R<sup>104</sup> and R<sup>1291</sup>-I<sup>1355</sup> segments. We may rather envision that binding of PI4P displaces segments closer to the central core of Drs2p, like the R<sup>1273</sup>-R<sup>1290</sup> segment, thereby facilitating occlusion of PS into its transport site and stimulating the dephosphorylation step of the transport cycle. In relation with this, the fact that irrespective of the protease used, proteolysis of Drs2p down to fragments 2 or 2' (Fig. 2) was made faster by PI4P supports the idea that PI4P probably loosens locally interaction of this critical segment of Drs2p with its central core.

Therefore, our data suggest an updated, two-step model for how Drs2p auto-inhibition by

its terminal extensions can be relieved (Fig. 8). In a first step, a critical segment in the C-terminus, beyond the PI4P binding site (possibly in the 1273-1302 region), would need to be displaced from some inhibitory site, possibly located within or at the interface between the large A, N and P soluble domains (Fig. 8). Conceivably, constraints dependent on the permanent binding of this critical segment within its binding site could indeed restrict motions of the cytoplasmic domains, and thereby prevent fast Drs2p dephosphorylation. In line with the latter hypothesis we observed that stimulation of the ATPase activity upon thrombin treatment is associated with a large increase in the dephosphorylation rate for the 105-1290 proteolytic fragment (Fig. 6). The mechanism by which this critical segment could be displaced from this auto-inhibitory position remains unknown, but Gea2p and/or Arl1p, which have been shown to interact with Drs2p C- and N-termini, respectively [21, 22], might possibly fulfill this role, alone or in concert (Fig. 8). In a second step, PI4P binding would now be able to fully exert its stimulatory role, the preliminary displacement of Drs2p C-terminus making activation by PI4P much more potent (the converse might also be true, namely that PI4P binding first primes the pump for subsequent Arl1p/Gea2p binding). This view is supported by the fact that addition of both PI4P and Gea2p to purified TGN membranes were shown to provide synergistic activation of Drs2p [23]. From a physiological perspective, two-step activation could provide a tighter control on the flippase activity, by restricting lipid transport to TGN membranes where PI4P and Gea2p/Arl1p are located [42, 43].

As an alternative, or a complement, to a role for Gea2p in relieving auto-inhibition, we might envision proteolysis as a physiological process for relieving Drs2p auto-inhibition. Truncated forms of Drs2p have already been noticed in yeast membranes [22, 40], and the fact that limited proteolysis of Drs2p can relieve auto-inhibition without ruining PI4P sensitivity leaves yeast, despite the irreversible nature of proteolysis, with the possibility to regulate the proteolyzed Drs2p flippase activity *via* PI4P, even more efficiently than before proteolysis. Proteolysis might for instance be required in a physiological context for maturation of Drs2p after its access to the TGN. This mechanism would allow yeast not

to waste ATP before Drs2p access to this compartment, without ruining its ability to regulate Drs2p flippase activity *via* PI4P. In other words, full-length Drs2p protein might only be a kind of pro-flippase, before Drs2p has reached the TGN.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Materials* — Thrombin (bovine) was from Calbiochem (604980, >2000 U/mg). A recombinant specific thrombin inhibitor, Hirudin, was obtained from Hyphen BioMed (CM154). Chymotrypsin (C3142, >40 U/mg) and trypsin (T1005, >6000 U/mg) were from Sigma. DDM (D310) and LMNG (NG310) were from Anatrace, C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> (BL-8SY) was from Nikkol, and PI4P (840045P) and POPS (840024P), sometimes only noted here as PS, were from Avanti Polar Lipids. Drs2p was detected using an anti-Drs2p antibody (kind gift of Dr. Todd Graham), and His-tagged Cdc50p was detected with a His-probe.

*Expression and purification of the Drs2p/Cdc50p complex* — N-terminally biotin acceptor domain (BAD)-tagged Drs2p and His<sub>10</sub>-tagged Cdc50p were expressed in *Saccharomyces cerevisiae* membranes from a single co-expression pYeDP60 plasmid, as described in [19, 44]. The Drs2p/Cdc50p complex was affinity-purified on streptavidin beads, as previously described [19], except that protease inhibitors were omitted from the resin washing steps. The complex was released from the resin by TEV cleavage, in SSR buffer (50 mM MOPS-Tris pH 7.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 % glycerol) containing 0.5 mg/mL DDM and 0.025 mg/mL POPS. The protein concentration in the purified fractions was in the 0.12-0.32 mg/mL range, depending on whether a second purification step on a Ni<sup>2+</sup>-TED resin was included or not to eliminate the His-tagged TEV protease. In some cases (Fig. 4B), experiments were performed with purified material obtained after co-expression of WT BAD-tagged Drs2p with Cdc50p lacking the cleavage site between the 10-His tag and Cdc50p (D/H<sub>10</sub>C).

For size-exclusion chromatography (SEC)-FPLC, samples were run on an Äkta Purifier system at 8-12 °C, on a Superdex 200 10/300GL column (GE Healthcare, France). About 500 µL of purified complex at 150 µg/mL was injected. The mobile phase contained 50 mM MOPS-Tris at pH 7.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mg/mL DDM

and 0.05 mg/mL POPS. Both WT complex (D/C) and D<sub>H</sub>C were submitted to such SEC, with or without preliminary proteolysis treatment. Fractions collected after SEC, as well as initial input samples at ~ 150 µg/mL total protein, were loaded onto an 8 % SDS-PAGE for subsequent immunoblot analysis. Either 3 µL of the input sample (~ 135 ng of protein, i.e. ~ 100 ng of Drs2p and 35 ng of Cdc50p), or 20 µL for the collected fractions were loaded.

The ΔN104 form was purified after co-expression with Cdc50p of a full-length Drs2p construct comprising a C-terminal BAD tag preceded by a cleavage site for thrombin, using in this case a *Δpep4* yeast strain, built on W303-1a (*MATa, leu2-3, 112trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15*). ΔN104 protein samples were purified similarly to the above with minor modifications. Streptavidin bound Drs2p/Cdc50p complexes, in protease inhibitor free (except during membrane solubilization) SSR buffer + 0.5 mg/mL DDM and 0.025 mg/mL POPS, was cleaved from the resin overnight with 25 U (4 U/mL resin) of thrombin at 4 °C. The eluate was subsequently collected and concentrated to ~ 10 mg/mL and purified using size exclusion chromatography (SEC-FPLC) on a TSK G4000SW using an Äkta Purifier system at 4-10 °C with SSR + 0.5 mg/mL DDM as mobile phase. Fractions were collected, pooled and concentrated to 2-2.4 mg/mL and snap frozen in liquid nitrogen. N-terminal sequencing experiments revealed that thrombin had in fact cleaved the Drs2p construct not only at its inserted cleavage site, but also at an unexpected location within the Drs2p sequence, after R<sup>104</sup>.

*Limited proteolysis* — For most experiments in this report, DDM and POPS were added to purified Drs2p/Cdc50p complex in its SSR buffer with minimal dilution, up to 1 mg/mL and 0.05 mg/mL, respectively, and if relevant together with PI4P (generally up to 0.025 mg/mL). Proteolysis with chymotrypsin, thrombin, trypsin, proteinase K or subtilisin was performed at 20 °C or at 4 °C and was triggered by addition of a concentrated protease suspension (e.g. at 10-fold or 100-fold the desired final concentration). Proteolysis took place for various periods. At the end, the protease was quenched with minimal dilution, generally by adding 2 mM PMSF (as quenching with 2 mM PMSF was generally faster than quenching with a commercial cocktail of

inhibitors) or, for the experiments with trypsin, with twice as much trypsin inhibitor. The quenched aliquots were either used immediately or flash frozen in liquid nitrogen before subsequent use. For Fig. 1 experiments, protease was added to an ATP hydrolysis assay medium in which purified Drs2p/Cdc50p was already turning over in the presence of PI4P.

For SDS-PAGE analysis of the proteolytic fragments obtained after quenching the protease with PMSF, 10 µL aliquots of the protein samples were mixed with 10 µL of urea-containing loading buffer and heated at 30 °C for 10 minutes. When trypsin proteolysis had been stopped with trypsin inhibitor, samples were heated for 1 min at 96 °C. In all cases, samples were loaded onto either 12 % or 8 % acrylamide gels. Electrophoresis was generally kept running until the small molecular mass markers (20 kDa, 25 kDa, and in some cases 37 kDa) ran out of the gel.

*ATPase activity measurements* — Two different protocols were used. First, the rate of ATP hydrolysis was monitored continuously, *via* its coupling (thanks to the presence of pyruvate kinase, lactate dehydrogenase, phosphoenolpyruvate and NADH) to a drop of NADH absorption at 340 nm (e.g. [29]). In these experiments, 10-40 µL of the purified Drs2p/Cdc50p complex, resulting in final concentrations of 0.6-6 µg/mL in the various experiments, was generally added to a cuvette already containing 2 mL of the ATPase assay medium, which consisted in SSR supplemented with DDM as well as with POPS, PI4P or other lipids (concentrated lipid/DDM stock solutions were typically 10 mg/mL POPS or 5 mg/mL PI4P in 50 mg/mL DDM), at 30 °C. In all cases, addition of ADP at a final concentration of 10 µM led to the expected oxidation of 10 µM NADH (a fast change of ~ 0.06 AU in the OD at 340 nm). Conversion from NADH oxidation rates expressed in mAU/s to ATPase activities expressed in µmol. min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> was based on the extinction coefficient of NADH at 340 nm (~ 6 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>). For most experiments, photobleaching of NADH was reduced by inserting an MTO J310A filter that eliminates short wavelength UV exciting light, as excitation of the 260 nm absorption band of NADH is much more deleterious for light stability of NADH than excitation of its 340 nm band. This setup reduced the spontaneous rate of NADH

absorption changes down to  $\sim 0.01$  mAU/s, and made it possible to detect the very low activities of untreated Drs2p/Cdc50p complexes. NADH absorption traces have not been corrected for the small changes due to dilution.

Second, liberated Pi was directly detected thanks to its chromogenic reaction with molybdate [19], after the ATP hydrolysis reaction was quenched with SDS at given time points (33  $\mu$ L of reaction medium was mixed with 17  $\mu$ L of 10 % SDS). This protocol can monitor long reaction periods with small assay volumes in a 96-well plate format and possibly with high concentrations of purified samples, and is effective for characterizing very low ATPase activities, as found in non-proteolyzed complexes. For such measurements, protein samples were generally diluted only  $\sim 3$ -fold in the final assay medium.

Data corresponding to a typical experiment out of several similar ones were generally plotted with a confidence error bar (e.g. in Fig. 2 and Fig. 3).

*Phosphoenzyme formation from  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  and turnover-dependent dephosphorylation* — For phosphorylation experiments,  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  was added to ice-cold purified complex. Typically, 10  $\mu$ L  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  at 20  $\mu$ M and about 100  $\mu\text{Ci/mL}$  was added to 90  $\mu$ L of protein at 11  $\mu\text{g/mL}$ , and samples were then either left on ice or transferred to 30  $^{\circ}\text{C}$ . After the desired periods, the reaction was quenched under stirring by diluting 10  $\mu$ L aliquots into 1 mL of acid solution containing 500 mM TCA and 30 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . After about one hour aggregation on ice of the denatured proteins, samples were filtered on GSWP Millipore filters, extensively rinsed with acid (diluted 10-fold compared with the quenching solution), and counted by scintillation.

For dephosphorylation experiments, excess nonradioactive MgATP was added to the sample after 30 s or 1 min phosphorylation (typically, 10  $\mu$ L of MgATP at 20 mM was added to the 100  $\mu$ L of protein now at 10  $\mu\text{g/mL}$  and 2  $\mu$ M  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ), and after the desired period of subsequent turnover and therefore hydrolysis of the radioactive phosphoenzyme, 11  $\mu$ L aliquots were acid-quenched as before, and filtered.

Using intact Drs2p/Cdc50p complex, we had previously found that because of the very slow rate of ATP hydrolysis, phosphorylation and dephosphorylation experiments were best done at

30  $^{\circ}\text{C}$ , with phosphoenzyme turnover then occurring over a few minutes [19]. In the present experiments, however,  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  at an initial concentration of 2  $\mu$ M was rapidly exhausted by protease-treated Drs2p/Cdc50p complexes at 30  $^{\circ}\text{C}$  (Supplementary Fig. S6). To prevent complete exhaustion of  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  within the first minute in such situations, we therefore followed phosphorylation and dephosphorylation at 4  $^{\circ}\text{C}$ .

To study phosphorylation or dephosphorylation of the Drs2p/Cdc50p complex after electrophoretic separation of the various protein fragments, the phosphorylation reaction was quenched by diluting aliquots 1:1 into a urea- and SDS-containing quenching medium, and loaded them onto a 'Sarkadi' gel [41, 45], to avoid hydrolysis of the radioactive phosphoenzyme in alkaline Laemmli gels. Typically, 16  $\mu$ L of sample was mixed with 16  $\mu$ L of a twice-concentrated loading buffer (300 mM Tris-HCl at pH 6.8, 4 % SDS, 8 M Urea, 20 % glycerol, 20 mM EDTA and 1.4 M  $\beta$ -Mercaptoethanol), and 20  $\mu$ L of this mixture was loaded onto a Sarkadi gel. The stacking gel contained 4 % acrylamide, 65 mM Tris- $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH 5.5, 0.1 % SDS, 0.4 % ammonium persulfate, and 0.2 % TEMED, and the separating gel was a continuous 7 % gel, containing 65 mM Tris- $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH 6.5, 0.1 % SDS, 0.4 % ammonium persulfate, and 0.05 % TEMED. Gels were run in the cold room and the pre-cooled running buffer contained 0.1 % SDS and 170 mM MOPS-Tris at pH 6.0. Dried gels were subsequently stained with Coomassie Blue (or analyzed by Western blotting) before radioactivity of the various bands was measured, using a PhosphorImager equipment.

*N-terminal sequencing* — Proteolytic fragments separated on SDS-PAGE were transferred onto a PVDF membrane. The membrane was rinsed with water and then with 10 % methanol for a few seconds, before staining with Coomassie Blue in 1 % acetic acid and 40 % methanol. The membrane was then rapidly rinsed in water alone, before the colored bands for the various fragments were excised and dried. Sequencing of the amino acids resulting from N-terminal Edman degradation was performed using an Applied Biosystems gas-phase sequencer model 492. Phenyl-thio-hydantoin amino acid derivatives generated at each sequence cycle were identified and quantitated on-line with an Applied Biosystems Model 140C HPLC system using the

data analysis system for protein sequencing from Applied Biosystems (software Procise PC v2.1). Chromatography was used to identify and quantify the derivatized amino acid removed at each sequence cycle.

*Mass spectrometry* — Truncated fragments of SEC-purified Drs2p were identified by MALDI-TOF mass spectrometry, as previously described for the intact Drs2p/Cdc50p complex [19].

**Acknowledgements:** We thank Paulette Decottignies for her help with mass spectrometry experiments, Todd Graham for generously providing the  $\alpha$ -Drs2p antibody, Rosa López-Marqués for providing the *Apep4* strain, and Jean-Pierre Andrieu, from the platform of the Partnership for Structural Biology at the Institut de Biologie Structurale in Grenoble (PSB/IBS) for the N-terminal sequencing experiments. We also wish to thank Flemming Cornelius, Steven Karlsh, Hugo Adamo, Jean-Paul Rossi, Marc le Maire, Jesper Møller, and Jean-Luc Popot for stimulating discussions.

**Conflict of Interest:** The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

**Author Contribution:** HA, CM, PC, and GL performed most of the experiments and analyzed the data. TD conducted experiments investigating the effect of proteolysis on Drs2p/Cdc50p association. AJ initiated the construction of truncated versions of Drs2p. PLM performed MALDI-TOF experiments. JLVI provided assistance with mass spectrometry experiments and edited the manuscript. JU, MRA, and JAL identified conditions to obtain Drs2p truncated at R104 and purified it. PN and JAL analyzed the data and edited the manuscript. GL designed the study and GL and PC wrote the manuscript. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

## REFERENCES

1. Sanyal, S., and Menon, A. K. (2009) Flipping lipids: why an' what's the reason for? *ACS Chem. Biol.* **4**, 895–909
2. Menon, I., Huber, T., Sanyal, S., Banerjee, S., Barré, P., Canis, S., Warren, J. D., Hwa, J., Sakmar, T. P., and Menon, A. K. (2011) Opsin is a phospholipid flippase. *Curr. Biol. CB.* **21**, 149–153
3. Goren, M. A., Morizumi, T., Menon, I., Joseph, J. S., Dittman, J. S., Cherezov, V., Stevens, R. C., Ernst, O. P., and Menon, A. K. (2014) Constitutive phospholipid scramblase activity of a G protein-coupled receptor. *Nat. Commun.* **5**, 5115
4. Malvezzi, M., Chalat, M., Janjusevic, R., Picollo, A., Terashima, H., Menon, A. K., and Accardi, A. (2013) Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipid scrambling by a reconstituted TMEM16 ion channel. *Nat. Commun.* **4**, 2367
5. Zhou, Y., Wong, C.-O., Cho, K., van der Hoeven, D., Liang, H., Thakur, D. P., Luo, J., Babic, M., Zinsmaier, K. E., Zhu, M. X., Hu, H., Venkatachalam, K., and Hancock, J. F. (2015) SIGNAL TRANSDUCTION. Membrane potential modulates plasma membrane phospholipid dynamics and K-Ras signaling. *Science.* **349**, 873–876
6. Yeung, T., Heit, B., Dubuisson, J.-F., Fairn, G. D., Chiu, B., Inman, R., Kapus, A., Swanson, M., and Grinstein, S. (2009) Contribution of phosphatidylserine to membrane surface charge and protein targeting during phagosome maturation. *J. Cell Biol.* **185**, 917–928
7. Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., and Henson, P. M. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* **148**, 2207–2216
8. Tang, X., Halleck, M. S., Schlegel, R. A., and Williamson, P. (1996) A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science.* **272**, 1495–1497
9. van der Mark, V. A., Elferink, R. P. J. O., and Paulusma, C. C. (2013) P4 ATPases: flippases in health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 7897–7922
10. Onat, O. E., Gulsuner, S., Bilguvar, K., Nazli Basak, A., Topaloglu, H., Tan, M., Tan, U., Gunel, M., and Ozcelik, T. (2013) Missense mutation in the ATPase, aminophospholipid transporter protein ATP8A2 is associated with cerebellar atrophy and quadrupedal locomotion. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG.* **21**, 281–285
11. López-Marqués, R. L., Poulsen, L. R., Bailly, A., Geisler, M., Pomorski, T. G., and Palmgren, M. G. (2015) Structure and mechanism of ATP-dependent phospholipid transporters. *Biochim. Biophys. Acta.* **1850**, 461–475
12. Montigny, C., Lyons, J., Champeil, P., Nissen, P., and Lenoir, G. (2016) On the molecular mechanism of flippase- and scramblase-mediated phospholipid transport. *Biochim. Biophys. Acta.* **1861**, 767–783
13. Baldrige, R. D., and Graham, T. R. (2013) Two-gate mechanism for phospholipid selection and transport by type IV P-type ATPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E358–367
14. Baldrige, R. D., and Graham, T. R. (2012) Identification of residues defining phospholipid flippase substrate specificity of type IV P-type ATPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E290–298
15. Vestergaard, A. L., Coleman, J. A., Lemmin, T., Mikkelsen, S. A., Molday, L. L., Vilsen, B., Molday, R. S., Dal Peraro, M., and Andersen, J. P. (2014) Critical roles of isoleucine-364 and adjacent residues in a hydrophobic gate control of phospholipid transport by the mammalian P4-ATPase ATP8A2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E1334–1343
16. Natarajan, P., Wang, J., Hua, Z., and Graham, T. R. (2004) Drs2p-coupled aminophospholipid translocase activity in yeast Golgi membranes and relationship to in vivo function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10614–10619
17. Alder-Baerens, N., Lisman, Q., Luong, L., Pomorski, T., and Holthuis, J. C. M. (2006) Loss of P4 ATPases Drs2p and Dnf3p disrupts aminophospholipid transport and asymmetry in yeast post-Golgi secretory vesicles. *Mol. Biol. Cell.* **17**, 1632–1642

18. Zhou, X., and Graham, T. R. (2009) Reconstitution of phospholipid translocase activity with purified Drs2p, a type-IV P-type ATPase from budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 16586–16591
19. Azouaoui, H., Montigny, C., Ash, M.-R., Fijalkowski, F., Jacquot, A., Grønberg, C., López-Marqués, R. L., Palmgren, M. G., Garrigos, M., le Maire, M., Decottignies, P., Gourdon, P., Nissen, P., Champeil, P., and Lenoir, G. (2014) A high-yield co-expression system for the purification of an intact Drs2p-Cdc50p lipid flippase complex, critically dependent on and stabilized by phosphatidylinositol-4-phosphate. *PLoS One*. **9**, e112176
20. Coleman, J. A., Vestergaard, A. L., Molday, R. S., Vilsen, B., and Andersen, J. P. (2012) Critical role of a transmembrane lysine in aminophospholipid transport by mammalian photoreceptor P4-ATPase ATP8A2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 1449–1454
21. Tsai, P.-C., Hsu, J.-W., Liu, Y.-W., Chen, K.-Y., and Lee, F.-J. S. (2013) Arl1p regulates spatial membrane organization at the trans-Golgi network through interaction with Arf-GEF Gea2p and flippase Drs2p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E668–677
22. Chantalat, S., Park, S.-K., Hua, Z., Liu, K., Gobin, R., Peyroche, A., Rambourg, A., Graham, T. R., and Jackson, C. L. (2004) The Arf activator Gea2p and the P-type ATPase Drs2p interact at the Golgi in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **117**, 711–722
23. Natarajan, P., Liu, K., Patil, D. V., Sciorra, V. A., Jackson, C. L., and Graham, T. R. (2009) Regulation of a Golgi flippase by phosphoinositides and an ArfGEF. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1421–1426
24. Zhou, X., Sebastian, T. T., and Graham, T. R. (2013) Auto-inhibition of Drs2p, a yeast phospholipid flippase, by its carboxyl-terminal tail. *J. Biol. Chem.* **288**, 31807–31815
25. Curran, A. C., Hwang, I., Corbin, J., Martinez, S., Rayle, D., Sze, H., and Harper, J. F. (2000) Autoinhibition of a calmodulin-dependent calcium pump involves a structure in the stalk that connects the transmembrane domain to the ATPase catalytic domain. *J. Biol. Chem.* **275**, 30301–30308
26. Baekgaard, L., Fuglsang, A. T., and Palmgren, M. G. (2005) Regulation of plant plasma membrane H<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-ATPases by terminal domains. *J. Bioenerg. Biomembr.* **37**, 369–374
27. Lopreiato, R., Giacomello, M., and Carafoli, E. (2014) The plasma membrane calcium pump: new ways to look at an old enzyme. *J. Biol. Chem.* **289**, 10261–10268
28. Ekberg, K., Palmgren, M. G., Veierskov, B., and Buch-Pedersen, M. J. (2010) A novel mechanism of P-type ATPase autoinhibition involving both termini of the protein. *J. Biol. Chem.* **285**, 7344–7350
29. Møller, J. V., Lind, K. E., and Andersen, J. P. (1980) Enzyme kinetics and substrate stabilization of detergent-solubilized and membraneous (Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup>)-activated ATPase from sarcoplasmic reticulum. Effect of protein-protein interactions. *J. Biol. Chem.* **255**, 1912–1920
30. Starling, A. P., East, J. M., and Lee, A. G. (1995) Phosphatidylinositol 4-phosphate increases the rate of dephosphorylation of the phosphorylated Ca(2+)-ATPase. *J. Biol. Chem.* **270**, 14467–14470
31. Champeil, P., le Maire, M., Andersen, J. P., Guillain, F., Gingold, M., Lund, S., and Møller, J. V. (1986) Kinetic characterization of the normal and detergent-perturbed reaction cycles of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. Rate-limiting step(s) under different conditions. *J. Biol. Chem.* **261**, 16372–16384
32. Clausen, J. D., McIntosh, D. B., Anthonisen, A. N., Woolley, D. G., Vilsen, B., and Andersen, J. P. (2007) ATP-binding modes and functionally important interdomain bonds of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase revealed by mutation of glycine 438, glutamate 439, and arginine 678. *J. Biol. Chem.* **282**, 20686–20697
33. Clausen, J. D., McIntosh, D. B., Woolley, D. G., and Andersen, J. P. (2008) Critical interaction of actuator domain residues arginine 174, isoleucine 188, and lysine 205 with modulatory nucleotide in sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* **283**, 35703–35714
34. Coleman, J. A., and Molday, R. S. (2011) Critical role of the beta-subunit CDC50A in the stable expression, assembly, subcellular localization, and lipid transport activity of the P4-ATPase ATP8A2. *J. Biol. Chem.* **286**, 17205–17216

35. Bryde, S., Hennrich, H., Verhulst, P. M., Devaux, P. F., Lenoir, G., and Holthuis, J. C. M. (2010) CDC50 proteins are critical components of the human class-1 P4-ATPase transport machinery. *J. Biol. Chem.* **285**, 40562–40572
36. Poulsen, L. R., López-Marqués, R. L., McDowell, S. C., Okkeri, J., Licht, D., Schulz, A., Pomorski, T., Harper, J. F., and Palmgren, M. G. (2008) The Arabidopsis P4-ATPase ALA3 localizes to the golgi and requires a beta-subunit to function in lipid translocation and secretory vesicle formation. *Plant Cell.* **20**, 658–676
37. Lenoir, G., Williamson, P., Puts, C. F., and Holthuis, J. C. M. (2009) Cdc50p plays a vital role in the ATPase reaction cycle of the putative aminophospholipid transporter Drs2p. *J. Biol. Chem.* **284**, 17956–17967
38. Takahashi, Y., Fujimura-Kamada, K., Kondo, S., and Tanaka, K. (2011) Isolation and characterization of novel mutations in CDC50, the non-catalytic subunit of the Drs2p phospholipid flippase. *J. Biochem. (Tokyo).* **149**, 423–432
39. Montigny, C., Decottignies, P., Le Maréchal, P., Capy, P., Bublitz, M., Olesen, C., Møller, J. V., Nissen, P., and le Maire, M. (2014) S-palmitoylation and s-oleoylation of rabbit and pig sarcolipin. *J. Biol. Chem.* **289**, 33850–33861
40. Jacquot, A., Montigny, C., Hennrich, H., Barry, R., le Maire, M., Jaxel, C., Holthuis, J., Champeil, P., and Lenoir, G. (2012) Phosphatidylserine stimulation of Drs2p·Cdc50p lipid translocase dephosphorylation is controlled by phosphatidylinositol-4-phosphate. *J. Biol. Chem.* **287**, 13249–13261
41. Lenoir, G., Picard, M., Gauron, C., Montigny, C., Le Maréchal, P., Falson, P., Le Maire, M., Møller, J. V., and Champeil, P. (2004) Functional properties of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase after proteolytic cleavage at Leu119-Lys120, close to the A-domain. *J. Biol. Chem.* **279**, 9156–9166
42. Balla, T. (2013) Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol. Rev.* **93**, 1019–1137
43. Chantalat, S., Courbeyrette, R., Senic-Matuglia, F., Jackson, C. L., Goud, B., and Peyroche, A. (2003) A novel Golgi membrane protein is a partner of the ARF exchange factors Gea1p and Gea2p. *Mol. Biol. Cell.* **14**, 2357–2371
44. Azouaoui, H., Montigny, C., Jacquot, A., Barry, R., Champeil, P., and Lenoir, G. (2016) Coordinated Overexpression in Yeast of a P4-ATPase and Its Associated Cdc50 Subunit: The Case of the Drs2p/Cdc50p Lipid Flippase Complex. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* **1377**, 37–55
45. Sarkadi, B., Enyedi, A., Földes-Papp, Z., and Gárdos, G. (1986) Molecular characterization of the in situ red cell membrane calcium pump by limited proteolysis. *J. Biol. Chem.* **261**, 9552–9557
46. Yang, Z. R., Thomson, R., McNeil, P., and Esnouf, R. M. (2005) RONN: the bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **21**, 3369–3376

## FOOTNOTES

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), by ANR grant ANR-14-CE09-0022 to GL (AsymLip), by the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) ANR-10-INSB-05, and by postdoctoral fellowship R171-2014-663 from the Lundbeck foundation to JAL.

## FIGURE LEGENDS

**FIGURE 1.** Trypsin added to purified Drs2p/Cdc50p during its turnover in the presence of PI4P dramatically increases its ATP hydrolysis rate. *A*, cartoon representing the predicted topology of Drs2p and Cdc50p. The cytosolic actuator (A, yellow), nucleotide binding (N, red), and phosphorylation (P,

blue) domains as well as the helical membrane domain (grey cylinders) are indicated. The binding sites for Arl1p, Gea2p and PI4P are represented; *B*, plot of disorder as calculated by the RONN server for full-length Drs2p [46]. Values below 0.5 indicate order while values above 0.5 indicate disorder. The dotted line shows order/disorder boundary. The disordered regions are predicted to lie between the N-terminus and residues around V<sup>106</sup> and between residues around S<sup>1247</sup> and the C-terminus of Drs2p. *C*, to measure ATPase activity, here at 30 °C, SERCA1a from SR membranes (trace (i)), a purified Drs2p/Cdc50p complex, either WT (trace (ii)) or the E342Q inactive mutant (trace (iii)), were added at a final concentration of ~ 4 µg/mL protein to continuously stirred optical assay cuvettes containing SSR buffer, 1 mg/mL DDM, 0.05 mg/mL POPS and 1 mM MgATP in the presence of a regenerating system. PI4P was added when indicated, at a concentration of 0.025 mg/mL, as well as trypsin at final concentrations of 10 µg/mL and 40 µg/mL. The drift in NADH absorption before addition of the ATPase was mainly due to photobleaching of NADH (see Experimental Procedures). Control addition of 10 µM ADP shows that the ATP-regenerating enzymes kept working efficiently despite the presence of trypsin.

**FIGURE 2.** Limited proteolysis of purified Drs2p/Cdc50p results in transient accumulation of two main types of Drs2p long fragments, with increased and PI4P-sensitive overall activity. To the purified WT Drs2p/Cdc50p complex at about 0.2 mg/mL protein in SSR buffer containing 0.5 mg/mL DDM, and 0.025 mg/mL POPS, additional DDM and POPS was added, up to 1 mg/mL and 0.05 mg/mL, respectively, together or not with PI4P at 0.025 mg/mL. A purified complex with the inactive E342Q Drs2p mutant was also used. Proteolysis (at 20 °C) was triggered by addition of either chymotrypsin (Ch) or thrombin (Thr), at final concentrations of 1 µg/mL and 40 U/mL (~ 20 µg/mL), respectively. Proteolysis took place for various periods in the absence or presence of PI4P, before quenching with PMSF and liquid nitrogen freezing. *A*, 2 µg of the proteolyzed samples were loaded onto an 8 % SDS-PAGE; *B*, for ATPase activity measurements, samples were diluted into a 2 mL SSR assay medium containing 0.75 mg/mL DDM, 0.05 mg/mL POPS, 1 mM MgATP and an ATP-regenerating system, in the presence (open bars) or absence (closed bars) of 0.025 mg/mL PI4P. When cleavage had been performed in the presence of PI4P (lanes 6 and 9), the activity plotted as the one in its absence was recorded after allowing for PI4P dissociation in a PI4P-free assay medium (see Fig. 3 and Supplementary Fig. S3).

**FIGURE 3.** Characterization of the phospholipid-dependence and the ATP-dependence of thrombin-treated samples. ATPase activities were measured using the NADH assay, in the presence of a regenerating system. *A*, a Drs2p/Cdc50p T+ sample was diluted 200-fold (10 µL in 2 mL) in a medium containing DDM and either PS and PI4P, or PS only, or PI4P only, at final concentrations of: (i) 1 mg/mL DDM, 0.05 mg/mL PS and 0.025 mg/mL PI4P; (ii) 0.75 mg/mL DDM and 0.05 mg/mL PS; (iii) 0.75 mg/mL DDM and 0.025 mg/mL PI4P. In (i), final addition of excess pure DDM micelles (up to a total DDM concentration of 4 mg/ml) resulted in a drop in enzyme activity, due to dilution of both PS and PI4P into the excess detergent. In (ii), PI4P was added after ~ 40 minutes delay, at concentrations of 2, 8, and then 24 µg/mL, together with some DDM from the stock solution (PI4P 5 mg/mL/DDM 50 mg/mL). In (iii), similarly, PS (together with some DDM) was added after ~ 35 minutes delay, at various final concentrations of 10, 30, 90 and 290 µg/mL. In the latter case, the final DDM concentration increased up to ~ 2.2 mg/mL (PS was added from a stock PS 10 mg/mL/DDM 50 mg/mL solution); *B*, for a T- sample, K<sub>M</sub> for PI4P (triangles) or PS (circles) was deduced from measurements performed either with 0.5-1.5 mg/mL (open symbols) or 3-4 mg/mL (closed symbols) of total DDM, keeping the companion lipid at a quasi-saturating level (for instance, the activating effect of PI4P in the presence of 1 mg/mL DDM was tested in the presence of 0.1 mg/mL PS, while its activating effect in the presence of 4 mg/mL DDM was tested in the presence of 0.4 mg/mL PS); *C*, activities were measured for a T- sample, in the presence of 0.025 mg/mL of various inositol phospholipid species, together with 0.1 mg/mL PS and 1 mg/mL DDM; *D*, same as (*B*), but for a T+ sample. Addition of PE to a PS-depleted sample, in the presence of PI4P, was also tested (squares); *E*, apparent affinity for MgATP of a T+ sample, in the presence of 1 mg/mL DDM, 0.05 mg/mL PS and 0.025 mg/mL PI4P (squares) as well as for SERCA1a from solubilized SR

membranes (triangles), in the presence of 20  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . In both cases the final concentration of ATPase was 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  protein.

**FIGURE 4.** Cdc50p does not dissociate from Drs2p upon proteolysis by thrombin. *A*, size exclusion chromatography on a Superdex 200 10/300GL column, with a mobile phase containing 0.5 mg/mL DDM and 0.05 mg/mL POPS. The double-arrow indicates the dead volume ( $V_0 \sim 8$  mL). The elution positions of standard proteins (thyroglobulin, 670 kDa (1),  $\gamma$ -globulin, 158 kDa (2), ovalbumin, 44 kDa (3), and myoglobin, 17.5 kDa (4)), as well as those for thrombin alone, eluting at  $\sim 16.1$  mL, or a solubilized SERCA1a/sarcoplipin complex, eluting at  $\sim 11.8$  mL, are indicated. The injected sample was either intact Drs2p/Cdc50p (dashed line) or Drs2p/Cdc50p that had been pretreated with thrombin in the presence of PI4P (T+, continuous line). Here, Drs2p had been co-expressed with WT Cdc50p (D/C). In similar experiments, it had been co-expressed with a non-cleavable His-tagged version of Cdc50p (D/H<sub>C</sub>), and this resulted in similar SEC profiles; *B*, Western-blot analysis of the fractions collected during SEC of D/C and D/H<sub>C</sub> complexes, using an antibody directed against Drs2p or a His-probe. ‘Input’ corresponds to the injected sample. The data plotted represent a typical experiment out of 2 independent ones.

**FIGURE 5.** Identification of the fragments resulting from thrombin cleavage. N-terminal sequencing (left) and MALDI-TOF mass spectrometry results (right), together with deduced sequences and corresponding calculated masses of the main fragments, for an intact purified Drs2p/Cdc50p complex (*A*), a T- sample (*B*), and a T+ sample (*C*). Note that the masses found for these fragments are slightly different from what would be inferred from the electrophoretic pattern; *D*, cartoon illustrating the location of the thrombin cleavage sites on the Drs2p chain. The data plotted represent a typical experiment out of 2 independent ones.

**FIGURE 6.** The A<sup>105</sup>-R<sup>1290</sup> Drs2p fragment displays an increased dephosphorylation rate. Intact Drs2p/Cdc50p, T- or T+ samples, diluted to 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in SSR with 1 mg/mL DDM, 0.05 mg/mL PS and 0.025 mg/mL PI4P, were supplemented with 2  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP for phosphorylation and subsequent dephosphorylation after an ATP chase, in both cases on ice. *A*, principle of the experiment; *B*, time course of phosphorylation (open squares) and dephosphorylation (closed triangles) after an ATP chase occurring at  $t = 0.5$  min, as followed by filtration after acid quenching and scintillation counting; *C*, similar phosphorylation and dephosphorylation experiment, but now followed by loading quenched samples onto an acidic gel and imaging the various radioactive bands in a PhosphorImager.

**FIGURE 7.** Removing residues 1-104 or 1303-1355 is not sufficient to fully stimulate Drs2p activity. *A*, phosphorylation and dephosphorylation of the full-length Drs2p/Cdc50p complex (WT) or a  $\Delta\text{N}104$  fragment were measured at 30 °C, either after acid quenching and filtration (left, open symbols for phosphorylation and closed symbols for dephosphorylation after ATP chase), or after separation of the phosphorylated bands on acidic gels and radioactivity imaging (right); *B*, (left) end-points selected for expression of various C-terminally shortened Drs2p variants; ‘extra C-ter’ refers to the extreme C-terminus of Drs2p that is not present in the mammalian ATP8A2; (right), restoration of the cold-sensitive growth defect of *Adrs2* cells by plasmid-borne Drs2 variants. In this case, Drs2p was not co-expressed together with Cdc50p. Serial yeast dilutions were spotted on S5A medium in the presence of 1 % fructose [19]; *C*, the N-terminally BAD-tagged 1-1302 Drs2p variant was co-expressed with Cdc50p, purified, and diluted to about the same protein concentration as a WT Drs2p sample. As for panel (*A*), phosphorylation and dephosphorylation after ATP chase, at 30 °C, were measured either after acid quenching and filtration (left), or after separation on acidic gels and radioactivity imaging (right).

**FIGURE 8.** Schematic of the proposed mechanism for Drs2p/Cdc50p auto-inhibition relief. Before reaching its final destination, namely TGN membranes, the Drs2p flippase is found auto-inhibited, at least by its C-terminus. Once it has reached the Golgi, the C-terminal extension of Drs2p would be displaced from its inhibitory site by a currently unknown mechanism but possibly involving Gea2p and/or Arl1p,

*Limited proteolysis of the Drs2p/Cdc50p lipid flippase*

turning the transporter to a primed state. From this primed state only, PI4P would exert its full stimulatory effect, perhaps by facilitating occlusion of PS into its transport site, hence resulting in downhill dephosphorylation through conformational changes altering the environment of the phosphorylated aspartate. Cdc50p is omitted for clarity. The region of the C-terminus important for auto-inhibition is symbolized by a white rectangle and the phosphorylated catalytic aspartate of the P-domain is represented. The Gea2p binding site is represented as a pink square. Although we can't exclude a role for Arl1p in auto-inhibition relief, our data do not support a role for the N-terminus in auto-inhibition of Drs2p/Cdc50p, and the possible implication of Arl1p is therefore not illustrated.

Figure 1

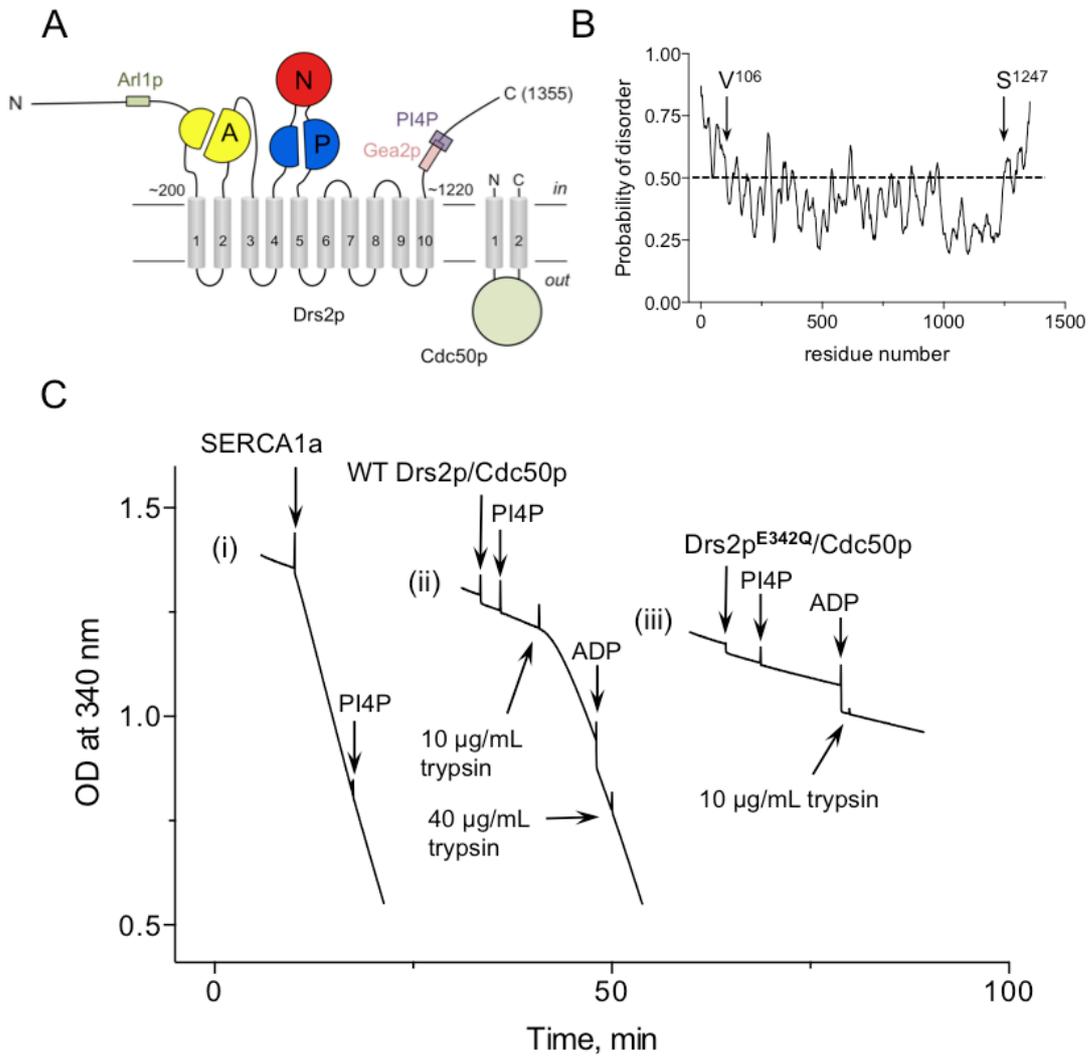


Figure 2

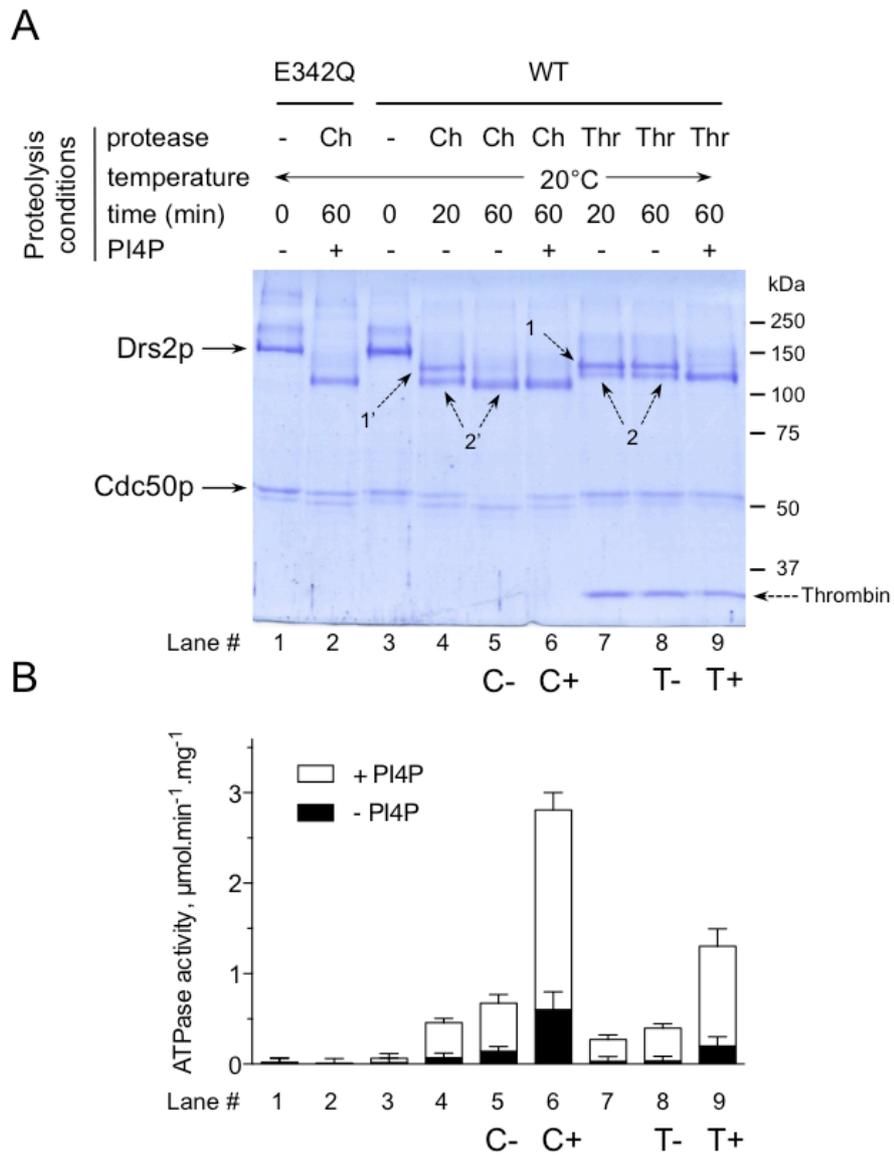


Figure 3

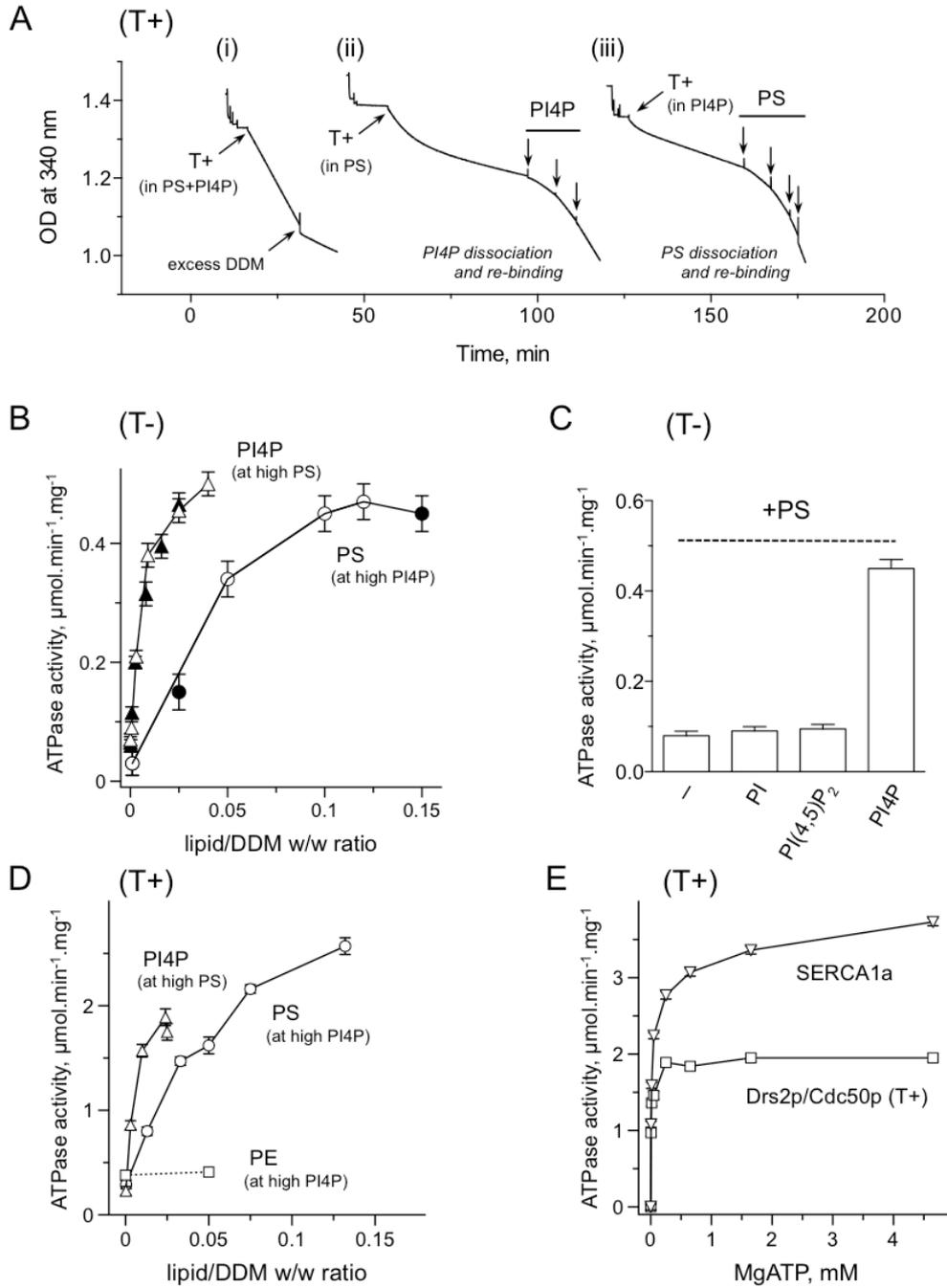


Figure 4

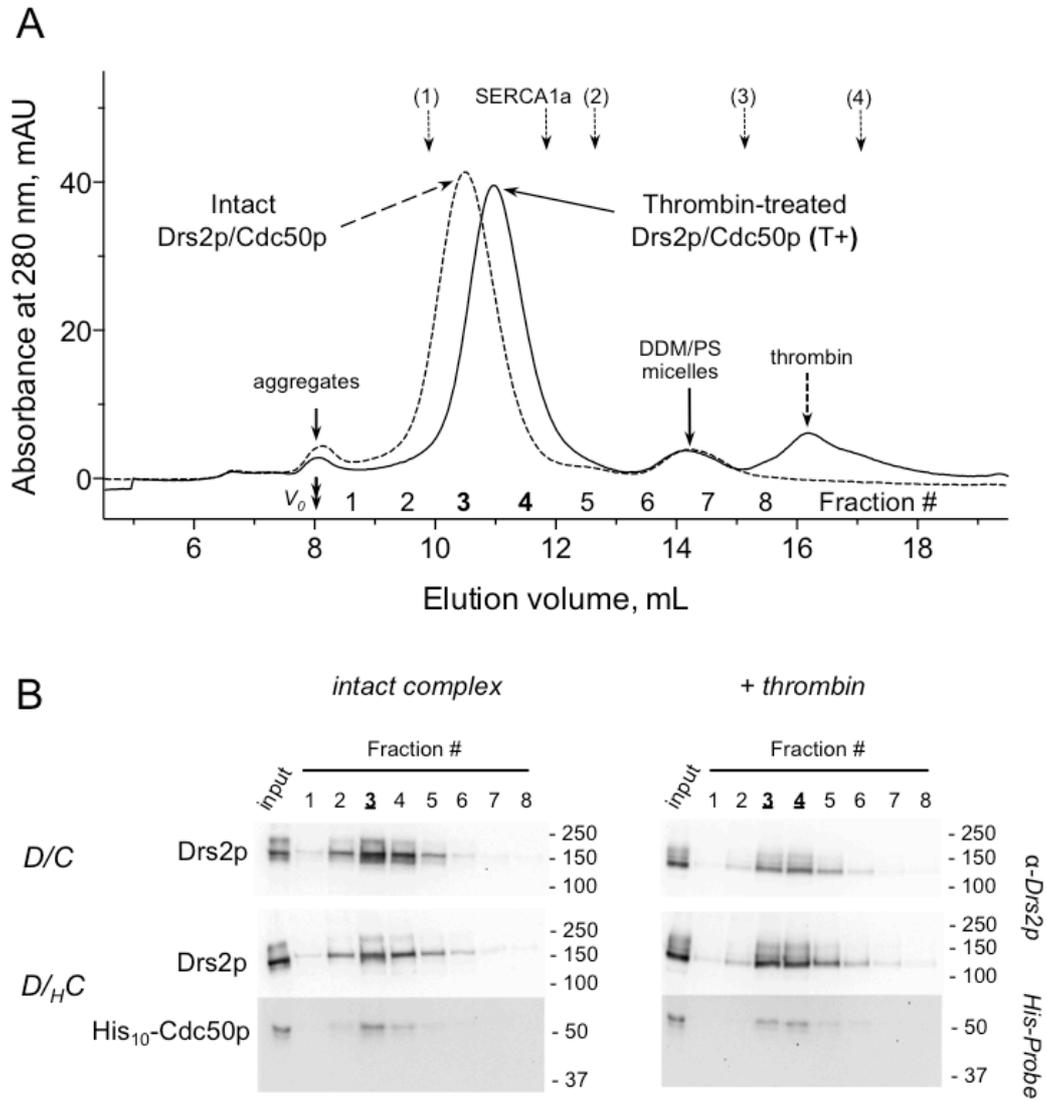


Figure 5

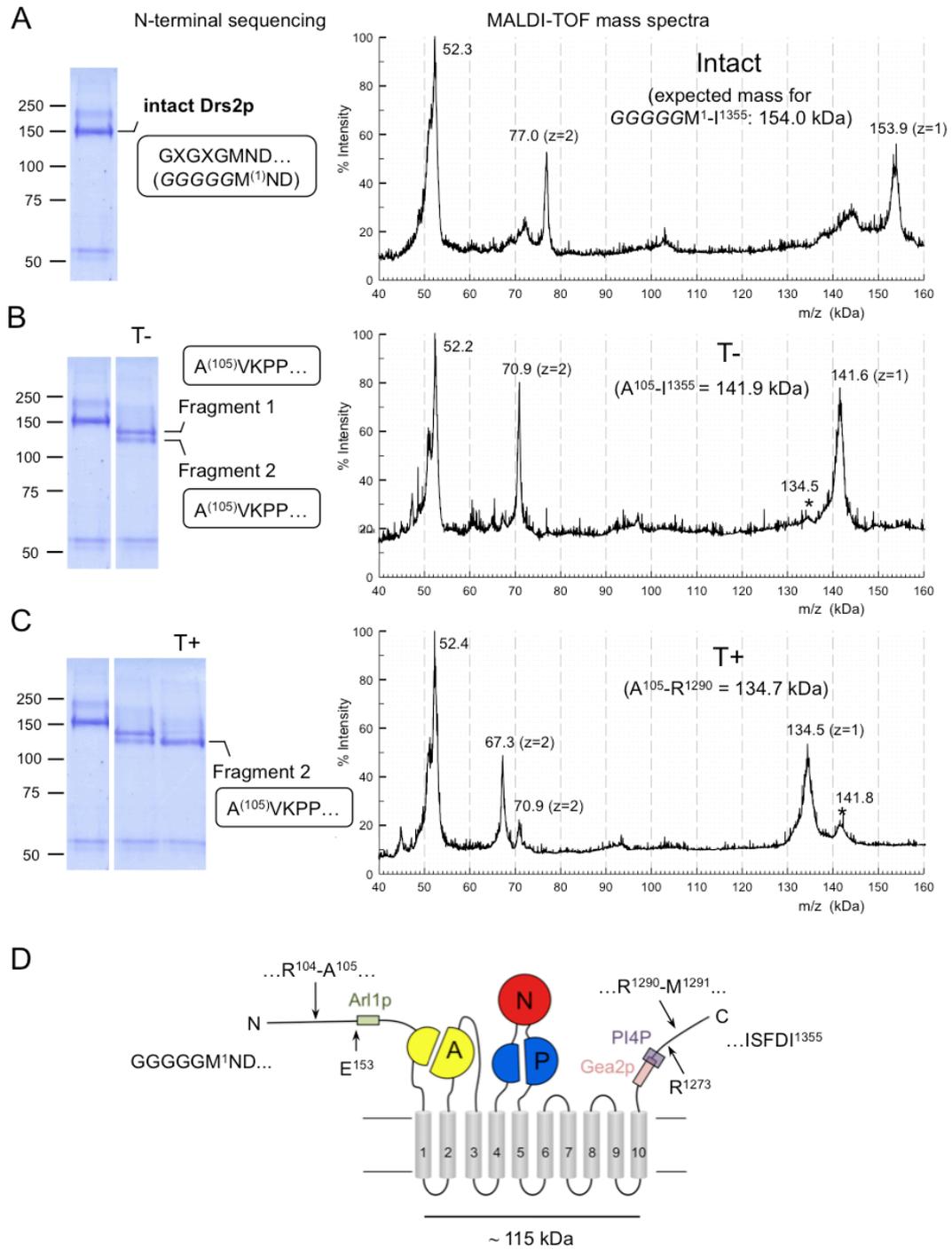


Figure 6

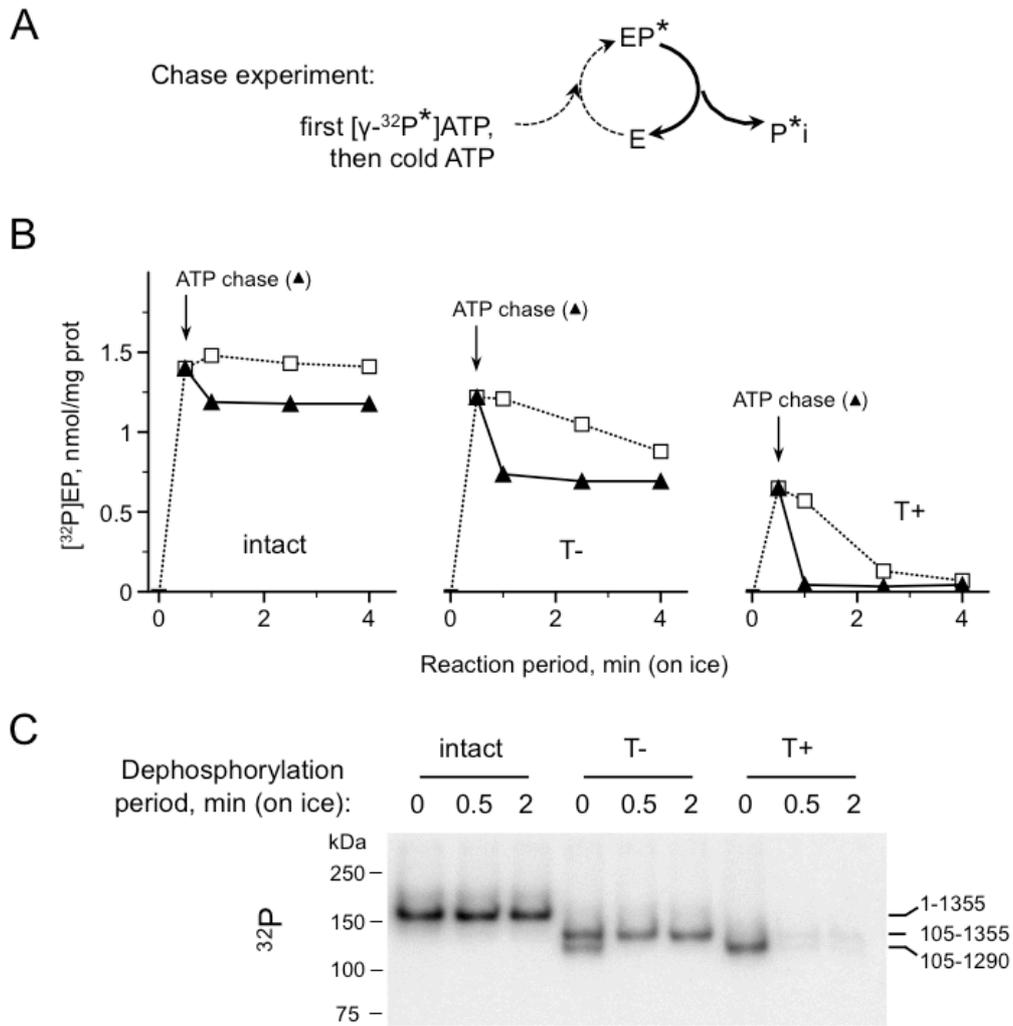


Figure 7

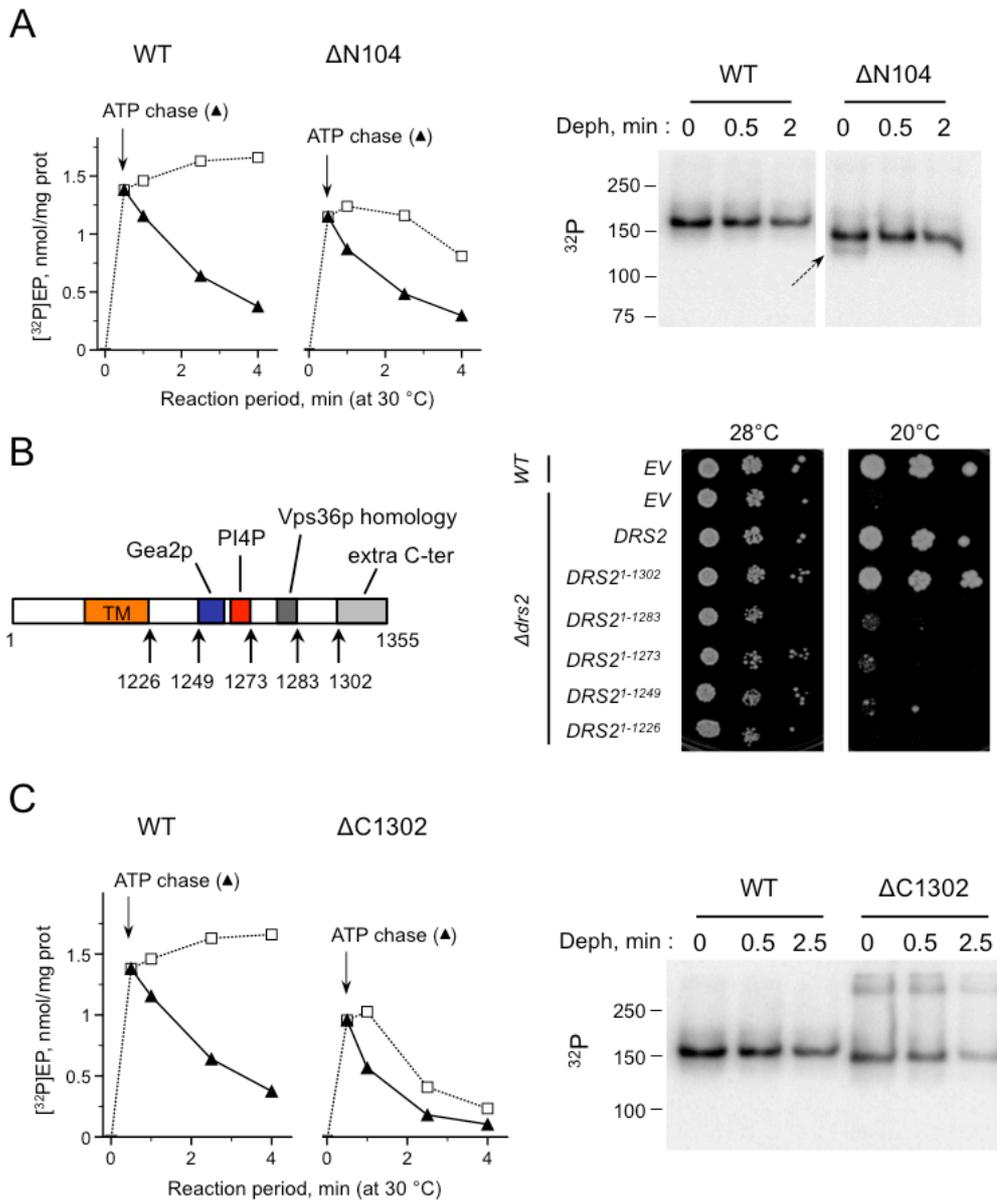
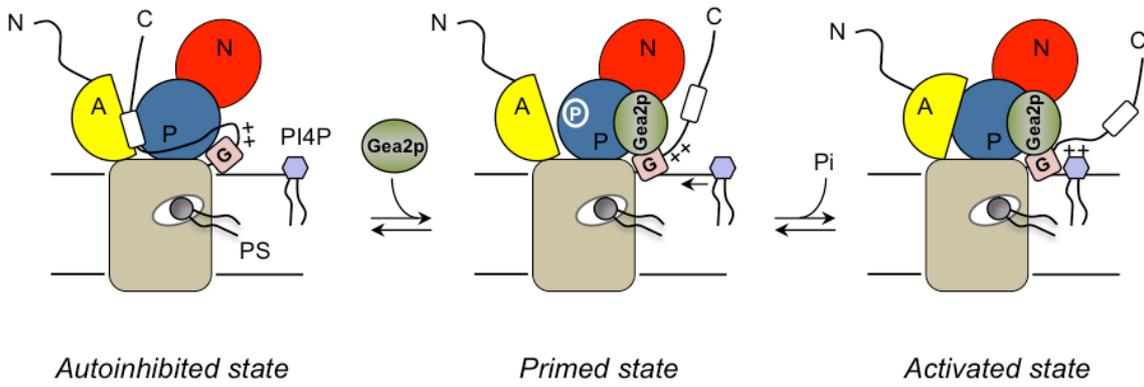


Figure 8

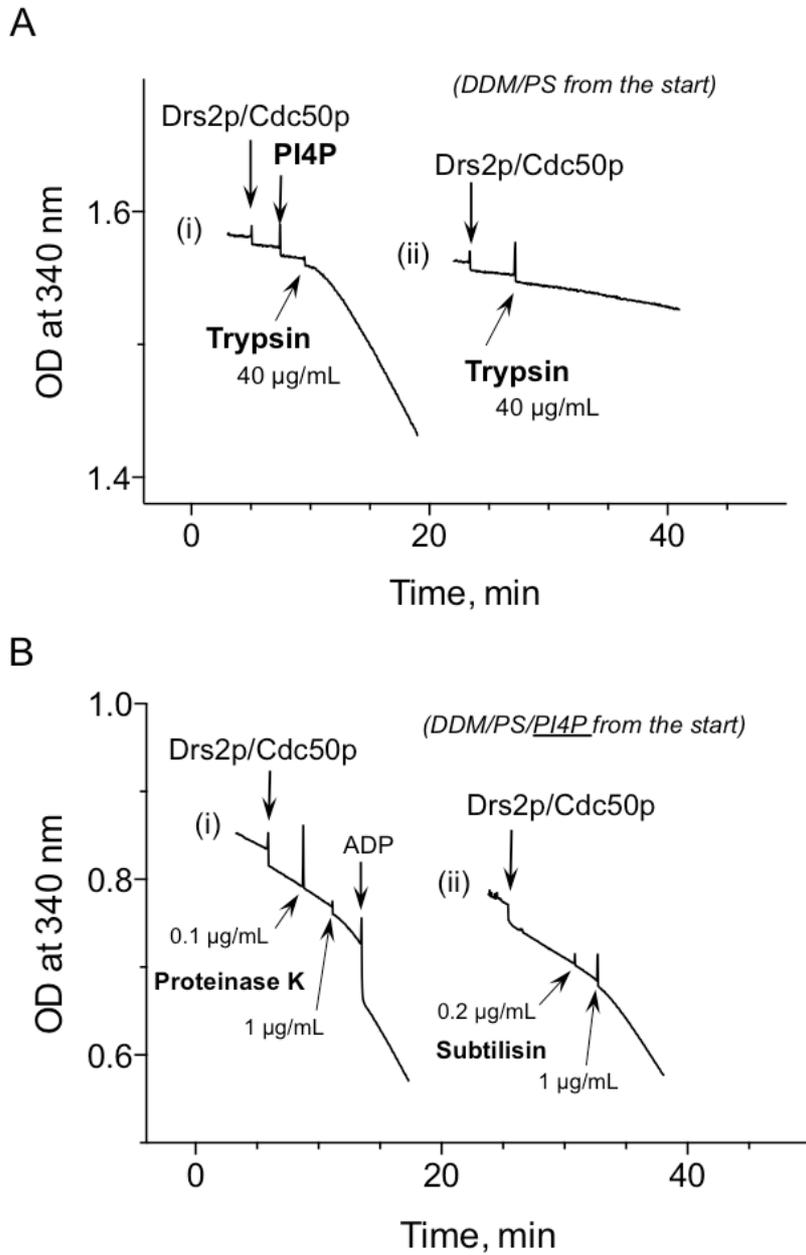


**Supplementary information for the manuscript:**

A high and phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P)-dependent ATPase activity for the Drs2p/Cdc50p flippase after removal of its N- and C-terminal extensions

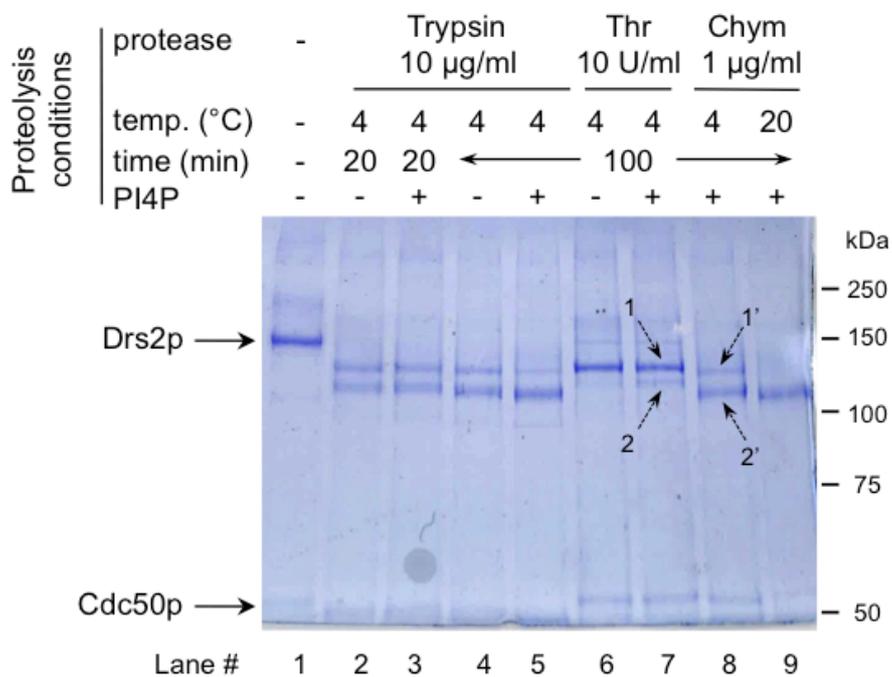
By:

**Hassina Azouaoui<sup>1</sup>, Cédric Montigny<sup>1</sup>, Thibaud Dieudonné<sup>1</sup>, Philippe Champeil<sup>1</sup>, Aurore Jacquot<sup>1</sup>, José Luis Vázquez-Ibar<sup>1</sup>, Pierre le Maréchal<sup>2</sup>, Jakob Ulstrup<sup>3</sup>, Miriam-Rose Ash<sup>3</sup>, Joseph A. Lyons<sup>3</sup>, Poul Nissen<sup>3</sup>, Guillaume Lenoir<sup>1</sup>**

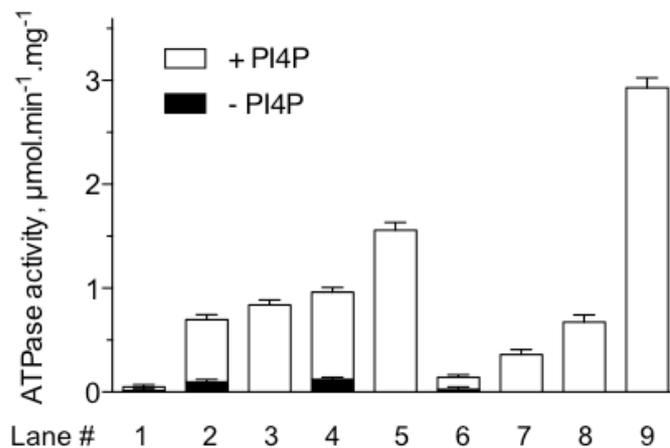


**Supplementary Figure S1 (complement to Figure 1).** Proteolysis during turnover, using trypsin or poorly selective proteases. Same general protocol as the one for Fig. 1. *A*, the Drs2p/Cdc50p complex was added at about 1 µg/mL. In (i), PI4P was then added, followed by trypsin. In (ii), trypsin was added to Drs2p/Cdc50p complex turning over in the absence of PI4P. An MTO J310A filter was here present, to minimize NADH photobleaching; *B*, here, the MTO filter was not present (as in the experiments illustrated in Fig. 1, hence a much higher basal drift in NADH absorbance), and the initial assay medium contained PI4P from the start. Either proteinase K (i) or subtilisin (ii) was added, as indicated, as well as 10 µM ADP in (i).

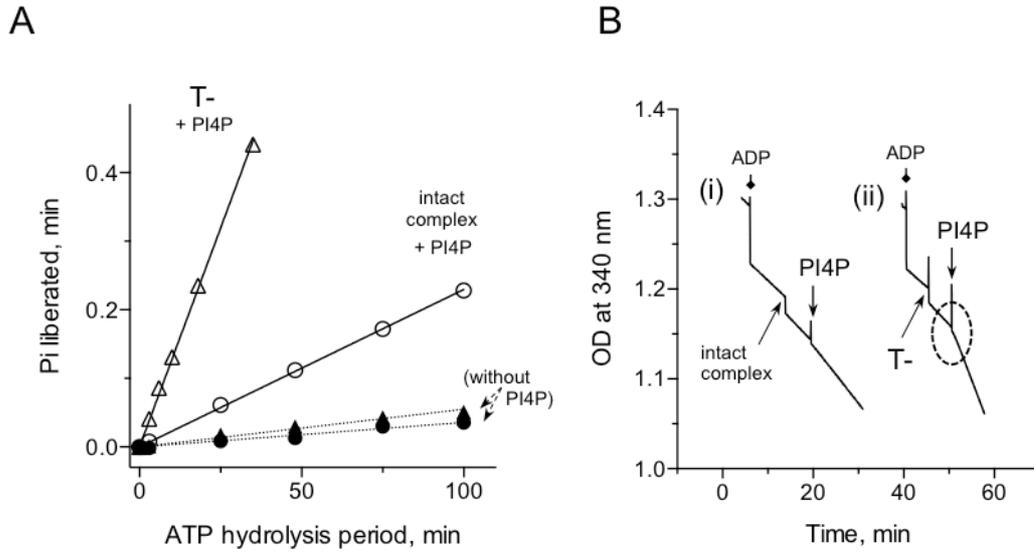
A



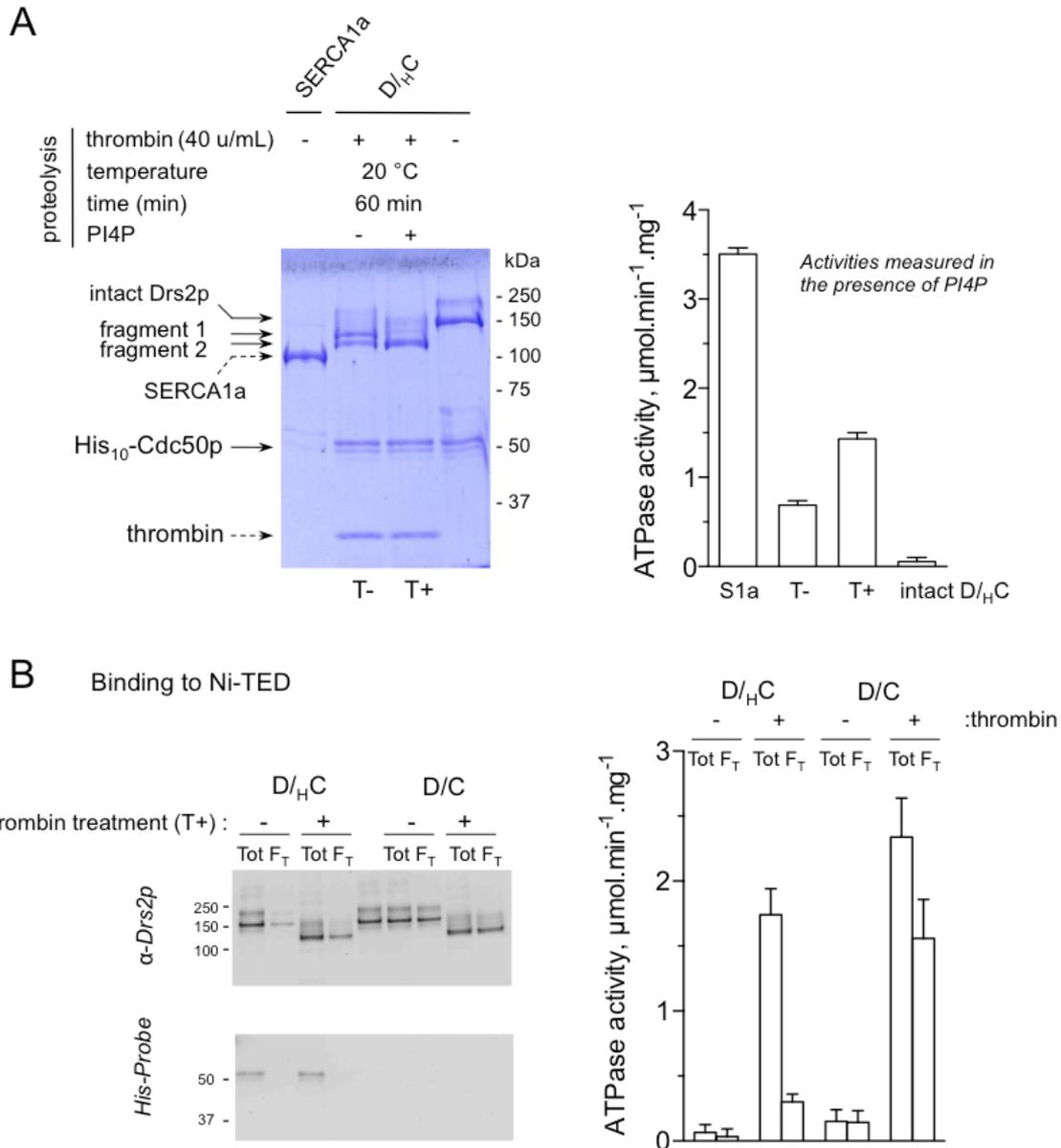
B



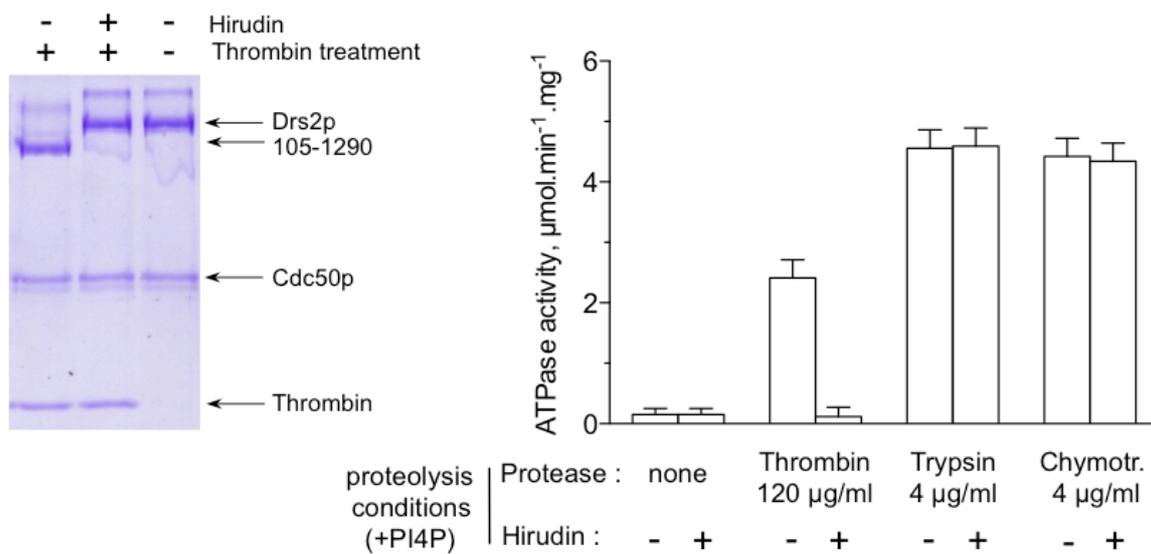
**Supplementary Figure S2 (complement to Figure 2).** Limited proteolysis of Drs2p/Cdc50p by trypsin, chymotrypsin or thrombin results in transient accumulation of two types of Drs2p long fragments, with increased PI4P-sensitive activity. Same general protocol as for Fig. 2, using different proteases and different proteolysis conditions. At the end of the incubation period, proteolysis was quenched by adding either trypsin inhibitor to trypsin-treated samples or PMSF to the other samples. To avoid uncontrolled proteolysis during electrophoretic separation, as the trypsin inhibitor is known to dissociate from trypsin in the presence of SDS, samples were heated to 96  $^{\circ}\text{C}$  for one minute before being loaded onto the gel. *A*, Coomassie Blue staining of samples recovered after proteolysis and loaded onto SDS-PAGE; *B*, the ATPase activity of those samples in (*A*) which had been treated in the absence of PI4P was determined as for Fig. 2, after their dilution into an ATPase assay medium containing 1 mM MgATP, an ATP-regenerating system, as well as DDM and POPS, and to which PI4P was also added if desired. When cleavage had been performed in the presence of PI4P, activity was here only measured in its presence (open bars).



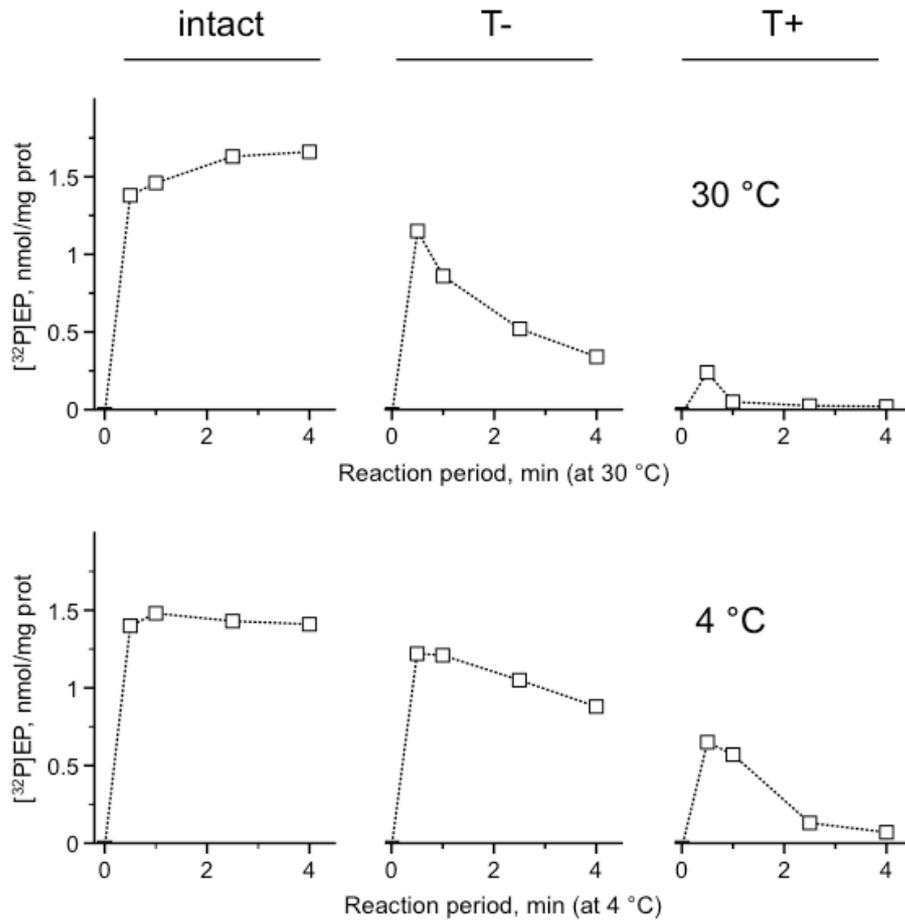
**Supplementary Figure S3 (complement to Figure 3).** Lipid-dependence of the ATPase activity of thrombin-treated T<sup>-</sup> sample. ATPase activity measurements with intact and T<sup>-</sup> samples, using either the molybdate assay (*A*) or the NADH assay (*B*). *A*, intact (circles) and T<sup>-</sup> (triangles) samples were diluted 3-fold and ATPase activity was measured in the absence (closed symbols) or presence (open symbols) of 0.025 mg/mL PI4P. In all cases the assay medium (in the absence of regenerating system) was supplemented with 1 mg/mL DDM and 0.05 mg/mL PS; *B*, for the NADH assay, intact (i) and T<sup>-</sup> (ii) samples were diluted 50-fold, and the assay medium was supplemented with an ATP-regenerating system as well as 0.75 mg/mL DDM and 0.05 mg/ml PS. After addition of 10  $\mu$ M ADP, for control of the regenerating system, the Drs2p/Cdc50p complexes were added, followed by 0.025 mg/mL PI4P together with 0.25 mg/mL DDM.



**Supplementary Figure S4 (complement to Figure 4).** Drs2p activation in the thrombin-cleaved T+ Drs2p/His<sub>10</sub>Cdc50p complex is not the result of Cdc50p dissociation. *A*, proteolysis of the Drs2p/His<sub>10</sub>Cdc50p complex (D<sub>H/C</sub>) by thrombin, under the same conditions as those for WT (D/C) samples in lanes 8 and 9 of Fig. 2 (T- and T+ samples). The D<sub>H/C</sub> T+ sample is the one also used for the experiments illustrated in main Fig. 4. Left: SDS-PAGE migration pattern; right: resulting ATPase activities; *B*, thrombin-treated T+ samples (both D<sub>H/C</sub> and D/C) were incubated with Ni<sup>2+</sup>-TED resin. 0.5 mL of T+ sample at 0.15 mg protein/mL was incubated with 8.5 mg of pre-equilibrated Ni<sup>2+</sup>-TED resin for 45 minutes at 4 °C in SSR buffer containing 0.5 mg/mL DDM, 0.025 mg/mL POPS. Unbound material was recovered by centrifugation for 5 min at 500 g. Total samples (Tot) and Flow-through (F<sub>T</sub>) were examined by immunoblotting (left), as well as for their ATPase activities in the presence of PI4P (right). The results with untagged Cdc50p (D/C) confirm that non-specific adsorption of Drs2p to the resin is only modest under these conditions.

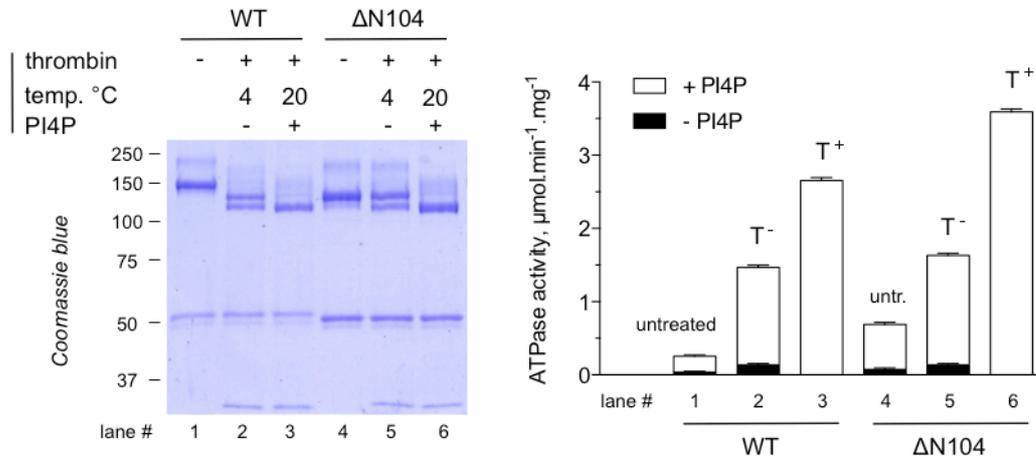


**Supplementary Figure S5 (complement to Figure 5).** Hirudin-dependence of the effect of proteolytic cleavage. Left: SDS-PAGE analysis of Drs2p/Cdc50p purified samples treated by thrombin in the absence or presence of Hirudin. Right: ATPase activities, measured as previously but here after proteolysis by thrombin, trypsin or chymotrypsin for 1 hour at 20 °C in the presence of PI4P, and in the absence or presence of Hirudin. If present, Hirudin was used at a 4-fold higher concentration, in terms of anti-thrombin units (160 ATU/mL), than the concentration of thrombin used (40 U/mL).

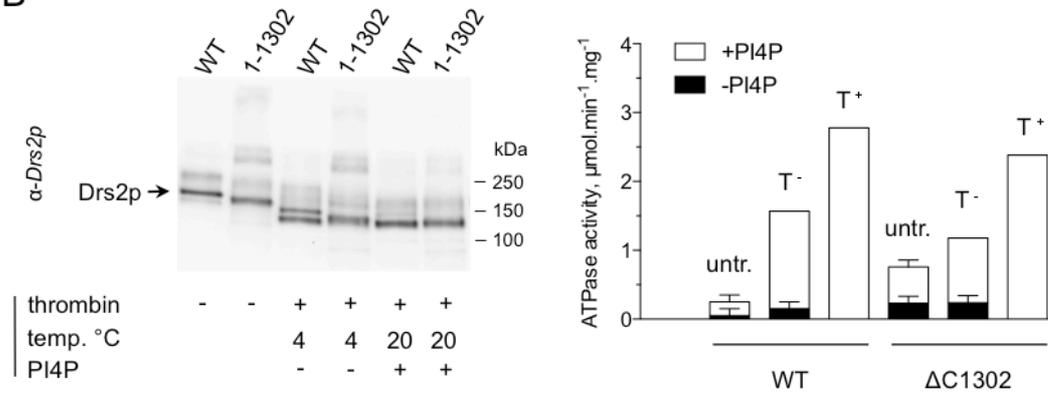


**Supplementary Figure S6 (complement to Figure 6).** Phosphoenzyme measurements with proteolyzed samples cannot be performed at 30 °C, because of fast exhaustion of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. The conditions are identical to that for Fig. 6B, except for the temperature. Only the phosphorylation is plotted.

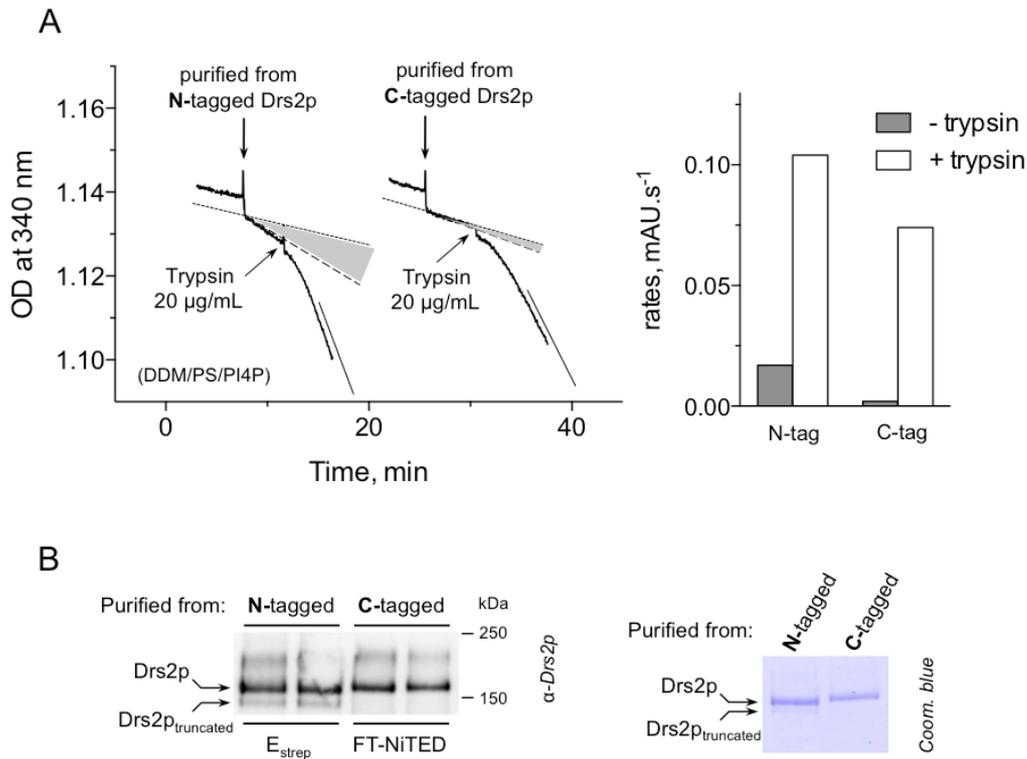
A



B



**Supplementary Figure S7 (complement to Figure 7).** Proteolysis of variants with either shortened N- or C-terminus. *A*,  $\Delta$ N104, as well as the WT complex, were submitted to thrombin treatment in the absence (T<sup>-</sup>) or presence (T<sup>+</sup>) of PI4P. Left: SDS-PAGE of the various samples (8 % acrylamide gel), stained with Coomassie Blue. Right: ATPase activities of untreated, T<sup>-</sup>, and T<sup>+</sup> samples, measured in the absence (closed bars) or presence (open bars) of PI4P. *B*, the  $\Delta$ C1302 variant, as well as the WT complex, were submitted to thrombin treatment in the absence (T<sup>-</sup>) or presence (T<sup>+</sup>) of PI4P. Left: Western-blot analysis using an  $\alpha$ -Drs2p antibody of WT and  $\Delta$ C1302, either before (untreated) or after treatment with thrombin in the absence (T<sup>-</sup>) or presence (T<sup>+</sup>) of PI4P. Right: ATPase activity of the same samples, measured in the absence (closed bars) or presence (open bars) of PI4P.



**Supplementary Figure S8.** Truncated forms contribute significant activity to so-called ‘intact’ purified complexes derived from N-terminally-tagged Drs2p constructs. *A*, ATPase activity of Drs2p/Cdc50p complexes purified from either N-terminally-tagged (left) or C-terminally-tagged (right) constructs, as measured with the NADH assay in the presence of DDM, PS and PI4P. At some point, as in Fig. 1, trypsin was added to relieve auto-inhibition of the activity of the core region in these Drs2p samples. The bars on the right quantitate the rates of NADH oxidation (*i.e.* ATPase activities, expressed here in mAU.s<sup>-1</sup>) that can be deduced from these traces; *B*, the gel on the right shows a Coomassie Blue stained gel for these two samples; the concentration of the sample purified from C-terminally tagged Drs2p was slightly lower than the concentration of the other sample, which accounts for the difference in activity after trypsin addition in panel A. The gel on the left shows Western-blot analysis of these two samples, clearly revealing the more prominent truncated form of Drs2p in the sample purified from N-terminally tagged Drs2p.

### **III.2.2. Résultats généraux et Discussion de l'article 3**

Dans cette partie, nous avons étudié l'effet de la protéolyse ménagée et de troncatures réalisées par mutagenèse dirigée sur le fonctionnement du complexe purifié Drs2p/Cdc50p.

La protéolyse ménagée a été réalisée par différentes protéases dont la trypsine, la chymotrypsine et la thrombine (Figs. 1 et 2, et Figs. supplémentaires 1 et 2, Article 3). La protéolyse du complexe Drs2p/Cdc50p, en particulier par la trypsine et la chymotrypsine, montre une stimulation importante de l'activité ATPasique du complexe. Néanmoins, l'interprétation de l'effet de la protéolyse sur le complexe par la trypsine et la chymotrypsine n'est pas chose aisée car dans ce cas là, et contrairement à la protéolyse par la thrombine, Cdc50p est également protéolysée. Pour simplifier l'interprétation des conséquences fonctionnelles de la protéolyse de Drs2p, nous nous sommes concentrés sur les effets de la protéolyse par la thrombine.

La protéolyse ménagée effectuée par la thrombine en présence de PI4P (dans les conditions dites T+) (Figs. 2 et 6, Article 3) donne naissance à un fragment tronqué des côtés N- et C-terminaux de Drs2p, le fragment A<sup>105</sup>-R<sup>1290</sup>. Ce fragment montre sans équivoque une activité ATPasique beaucoup plus importante que celle du complexe Drs2p/Cdc50p intact (Figs. 2 et 6, Article 3). L'analyse de ce fragment par chromatographie d'exclusion par la taille montre un pic homogène contenant Drs2p clivé (A<sup>105</sup>-R<sup>1290</sup>) et son partenaire Cdc50p associé (Fig. 4, Article 3). L'identification du premier acide aminé (A<sup>105</sup>) par lequel commence ce fragment issu de la protéolyse par la thrombine, a été faite par séquençage N-terminal (Fig. 5, Article 3). Pour déterminer précisément l'identité du fragment obtenu dans les conditions de protéolyse T+, des analyses par spectrométrie de masse MALDI-TOF ont été effectuées (Fig. 5, Article 3) ; le résultat est que ce fragment est aussi clivé au niveau de son extrémité C-terminale, après l'acide aminé R<sup>1290</sup>. Ce fragment de protéolyse présente donc toujours son site putatif de fixation au PI4P.

Sachant que Cdc50p reste intact et lié à Drs2p clivé, la stimulation de l'activité ATPasique dans les conditions T+ (Figs. 2 et 6, Article 3), suggère donc que les

extrémités N- et C-terminales ont un rôle auto-inhibiteur. Cela confirme la thèse de l'équipe de Graham (Zhou et al., 2013) qui suggère que l'extrémité C-terminale de Drs2p est auto-inhibitrice.

Maintenant, il serait intéressant de savoir si cette auto-inhibition est exercée par l'une des extrémités terminales ou si au contraire les deux extrémités terminales participent à l'auto-inhibition. L'analyse de l'activité ATPasique du mutant Drs2p tronqué seulement du côté N-terminal, le  $\Delta N104$  (les 104 premiers résidus de Drs2p ont été tronqués donnant lieu au fragment 105-1355) (Fig. supplémentaire 7a, Article 3) montre que la stimulation de l'activité est faible, une observation confirmée par l'étude de la cinétique de déphosphorylation du fragment  $\Delta N104$  (Fig. 7a, Article 3). Par ailleurs, l'étude d'un mutant tronqué seulement du côté C-terminal,  $\Delta C1302$  (les 53 derniers résidus de Drs2p ont été tronqués donnant lieu au fragment 1-1302) montre que l'activité ATPasique en présence de ce mutant est un peu plus élevée que celle du complexe intact, mais significativement moins importante que celle du complexe protéolysé dans les conditions T+ (Fig. supplémentaire 7b, Article 3). L'analyse de la vitesse de déphosphorylation du fragment  $\Delta C1302$  confirme ce résultat (Fig. 6, Fig. supplémentaire 7b, Article 3). Autrement dit, la troncature des 104 premiers résidus ou des 53 derniers résidus de Drs2p n'affecte guère son activité. Ces résultats suggèrent donc soit qu'il est nécessaire de tronquer à la fois les extrémités N- et C-terminales, soit que la séquence C-terminale qui s'étend des résidus 1291 à 1302 est critique pour l'autorégulation de Drs2p. De plus, ces résultats suggèrent que pour avoir une stimulation efficace de l'activité de Drs2p, le clivage doit s'effectuer dans une région proche du site putatif de fixation au PI4P (site se terminant au résidu R1273) (Fig. 5 d, Article 3). Il est donc peu probable que l'activation par le PI4P soit le résultat d'un déplacement de la partie distale de l'extrémité C-terminale, comme on aurait pu l'imaginer, surtout suite au papier de Graham de 2013. Par "déplacement" (ou décrochage) on sous-entend que l'inhibition est due au fait que la région C-terminale 1291-1355 est fixée de manière non identifiée sur une partie catalytique de l'enzyme et l'inhibe et le déplacement serait donc le relâchement de cette fixation.

Dans l'article 2 (Azouaoui et al., 2014), l'activité ATPasique du complexe purifié Drs2p/Cdc50p était lente contrairement à celle observée dans d'autres études

(Zhou & Graham, 2009 ; Zhou et al., 2013) ; cela peut refléter le fait que notre échantillon purifié présente un Drs2p qui possède toujours ses extrémités N- et C-terminales intactes, à l'inverse du complexe purifié par l'équipe de Graham, qui pourrait présenter un degré de protéolyse plus important.

L'activité ATPasique d'un complexe purifié Drs2p/Cdc50p initialement étiqueté en N-terminal est significativement plus importante que celle d'un complexe initialement étiqueté en C-terminal (résultats non publiés et Fig. supplémentaire 8a, Article 3). Cependant, après protéolyse par la trypsine, l'activité mesurée est similaire, quelle que soit la position initiale de l'étiquette (Fig. supplémentaire 8a, Article 3). Ceci suggère donc que le complexe initialement étiqueté en C-terminal n'est pas moins actif, et que des fragments de protéolyse présents en plus ou moins grande concentration dans chacun des deux échantillons pourraient contribuer à cette activité ATPasique différente. C'est effectivement ce que nous observons : l'échantillon purifié initialement étiqueté en N-terminal montre la présence très claire d'un fragment de protéolyse, ce qui n'est pas le cas pour l'échantillon initialement étiqueté en C-terminal (Fig. supplémentaire 8b, Article 3). Cela pourrait expliquer une activité ATPasique du Drs2p étiqueté côté N-terminal plus importante, avec un ou plusieurs fragments de protéolyse qui seraient très actifs. Cela pourrait aussi expliquer le fait que l'équipe de Graham, a observé que Drs2p étiquetée du côté C-terminal semblait être inactive contrairement à Drs2p étiquetée du côté N-terminal (Zhou & Graham, 2009).

L'activité ATPasique du complexe protéolysé dans les conditions T+ est très importante, avec peu d'accumulation de la forme EP de Drs2p (Fig. supplémentaire 6, Article 3), cela s'expliquant par le fait que la vitesse de déphosphorylation est importante (Fig. 6, Article 3). A l'inverse, le complexe Drs2p/Cdc50p intact, du fait de sa vitesse de déphosphorylation lente, accumule une forte proportion d'enzyme sous forme phosphorylée à l'état stationnaire. Ceci est une illustration du fait que les 2 tests fonctionnels que sont la mesure de l'activité ATPasique et la mesure du dérivé phosphorylé formé sont deux tests complémentaires : si on veut vérifier la fonctionnalité d'une ATPase-P présentant une activité ATPasique lente voire très lente (ne reflétant pas forcément une ATPase inactive), la mesure de l'accumulation de la forme EP est la plus appropriée comme test initial afin de vérifier si la protéine

est fonctionnelle (ce test présentant l'avantage d'être utilisable sur des membranes exprimant la protéine, sans qu'il y ait besoin de purification).

L'équipe de Graham a suggéré que l'extrémité C-terminale de Drs2p est auto-inhibitrice (Zhou et al., 2013). Il a montré que Drs2p dépourvu de ses 121 derniers résidus du côté C-terminal (troncature proche du 10<sup>ème</sup> segment transmembranaire de Drs2p, qui devient donc dépourvue de son site de fixation au PI4P) présentait une activité ATPasique, désormais insensible au PI4P, plus importante que la protéine intacte. On parle dans cette étude d'une stimulation de l'activité ATPasique d'un facteur ~ 3-4, pour atteindre 0,4  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  (Fig. 4, Zhou et al., 2013). Dans notre étude, les fragments de protéolyse obtenus, que cela soit par traitement à la thrombine, à la trypsine ou encore à la chymotrypsine (Figs. 1, 2, et 3, Figs. supplémentaires 2 et 7, Article 3), présentent, en absence de PI4P, une activité ATPasique un peu plus importante que celle de Drs2p intact, mais restent sensibles au PI4P qui stimule largement l'activité de ces fragments de protéolyse. On obtient, dans notre cas une stimulation par le PI4P d'un facteur 30-50 dans le cas du fragment de protéolyse obtenu dans les conditions T+.

Il apparaît donc qu'une troncature trop importante de l'extrémité C-terminale de Drs2p (des 121 derniers résidus), produit une enzyme moins active car non stimulable par le PI4P. Par ailleurs, une troncature trop limitée (des 53 derniers résidus,  $\Delta\text{C1302}$ ) ne permet pas de rendre le complexe purifié fortement activable par le PI4P. On peut imaginer qu'un mode de régulation efficace doit produire une enzyme tronquée ou non mais gardant sa stimulation par le PI4P (et non à d'autres phosphoinositides (Fig. 3, Article 3)). Autrement dit, la coupure protéolytique que nous avons identifiée et qui active fortement le complexe purifié, suggère un rôle important pour la séquence 1291-1302 dans l'auto-inhibition du complexe. La levée de l'auto-inhibition de Drs2p pourrait se traduire par un déplacement de cette séquence, qui, n'exerçant plus d'auto-inhibition, libérerait la partie catalytique de Drs2p. De plus, on peut imaginer que le segment situé entre R<sup>1273</sup> et R<sup>1290</sup>, soit impliqué dans l'activation par le PI4P, la fixation de ce dernier facilitant peut-être l'accès de la PS (le substrat de Drs2p) à son site de liaison, ce qui stimulerait l'étape de déphosphorylation du cycle catalytique et donc le transport de la PS.

En conclusion, nos résultats nous font penser à un modèle d'auto-inhibition de Drs2p par ses extrémités terminales qui s'effectuerait en deux étapes. On sait que Drs2p interagit avec Arl1p à son extrémité N-terminale (Tsai et al., 2013) et avec Gea2p à son extrémité C-terminale (Chantalat et al., 2004). De ce fait, on peut imaginer que l'interaction de ces facteurs avec les extrémités terminales, individuellement ou simultanément, permette le déplacement de ces extrémités ce qui diminuerait la contrainte exercée sur les régions catalytiques de Drs2p par une "partie critique" (Fig. 8, Article 3). Une autre possibilité pourrait être celle d'une protéolyse cellulaire régulatrice de Drs2p. Dans un second temps, le PI4P fixé à son site pourrait exercer pleinement son rôle de stimulateur.

On peut imaginer également un ordre inverse pour ces différents événements. Le PI4P pourrait se fixer à son site en premier et la fixation de Arl1p et/ou Gea2p suivrait, déplaçant les extrémités terminales pour une stimulation maximale de Drs2p par le PI4P. Du point de vue physiologique, cette activation en deux étapes pourrait fournir un contrôle strict du transport de phospholipides au niveau des membranes du *trans*-Golgi.

# **IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Dans ce travail de thèse il était question de répondre à deux objectifs, d'une part purifier Drs2p et Cdc50p sous forme de complexe fonctionnel, et d'autre part, étudier le rôle régulateur éventuel des extrémités N- et C-terminales de Drs2p.

La purification a été mise au point de telle sorte à ce qu'elle se fasse en une seule étape permettant la co-purification de Drs2p et de Cdc50p tout en éliminant la majeure partie des contaminants, et produisant finalement 1-2 mg de complexe purifié par litre de culture cellulaire. Jamais Drs2p n'a été purifié avec de tels rendements et ceci est intéressant dans la perspective de la cristallogénèse du complexe. Ce rendement de purification pourrait d'ailleurs être augmenté avec la mise en place de l'expression des protéines d'intérêt en fermenteur. De plus, cette procédure permet la purification d'un complexe Drs2p/Cdc50p avec une stœchiométrie d'association de 1:1. Ce qui est intéressant avec cette procédure, c'est qu'elle permet d'obtenir un complexe clairement actif. De façon remarquable, le complexe Drs2p/Cdc50p, en présence de son substrat préféré la PS, ne présente une activité ATPasique significative qu'en présence de PI4P. L'une des conclusions principales des travaux de cette thèse est donc que le PI4P est essentiel à l'activité ATPasique de la flippase. La présence seule de la PS ne stimule pas l'activité ATPasique ; la flippase serait bloquée dans une certaine conformation et c'est la fixation du PI4P qui permettrait, au moins en partie, de la débloquent. Le PI4P étant un régulateur important du trafic membranaire, ces données appuient le rôle de cette flippase dans la régulation du trafic membranaire. Rappelons également que Drs2p ne peut être fonctionnel qu'en présence de son partenaire Cdc50p, ce qui corrobore les données publiées décrivant le rôle chaperon de Cdc50p et sa probable implication dans le transport des phospholipides par Drs2p.

Les mesures d'activité ATPasique du complexe purifié Drs2p/Cdc50p ont permis l'étude de l'affinité du complexe pour le  $Mg^{2+}$ -ATP : l'affinité est de l'ordre du micromolaire, contrairement à des données récemment publiées qui montrent une affinité de l'ordre du millimolaire. Cette affinité plus importante peut refléter une meilleure intégrité de notre complexe. D'autre part, ces mesures d'activité ont permis l'étude de l'effet de certains lipides sur l'activité du complexe : l'activité en présence de PS est la même quelle que soit la chaîne aliphatique (nous n'avons cependant testé que deux de ces chaînes), ce qui suggère que la flippase reconnaît plus

spécifiquement la tête polaire du PL. Il serait intéressant dans l'avenir de tester non seulement l'effet de la PS, mais également d'autres variantes de chaînes aliphatiques, ou encore l'effet de la seule tête polaire des différents phospholipides (par exemple la phosphosérine) sur l'activité de la flippase. Ceci permettrait de discriminer sans ambiguïté une reconnaissance spécifique de Drs2p de telle ou telle tête polaire, et non de la chaîne aliphatique.

L'activité ATPasique du complexe Drs2p/Cdc50p est lente par rapport à celles rapportées par la littérature. Cela pourrait évidemment s'expliquer par le fait que Drs2p aurait besoin d'un cofacteur critique, qui manquerait dans notre préparation purifiée : on sait par exemple que Gea2p s'associe avec Drs2p et joue un rôle dans sa régulation, d'où peut-être la nécessité de sa présence pour une stimulation plus importante de Drs2p. Mais une étude a montré que l'effet de Gea2p sur l'activité ATPasique de Drs2p n'était pas très significatif. D'autres études montrent que le transport de la PS au niveau du trans-Golgi est en fait très lent, s'étalant sur des heures. Cela nous amène à penser que la lenteur de la vitesse d'hydrolyse d'ATP par notre complexe Drs2p/Cdc50p n'est pas déraisonnable. Une vitesse lente d'hydrolyse de l'ATP pourrait aussi s'expliquer par le fait que Drs2p est présente dans un environnement où on n'a probablement pas besoin d'avoir une activité importante pour que Drs2p remplisse sa fonction de création d'asymétrie membranaire. Une autre explication possible pourrait être liée à la suggestion de l'équipe de Graham, qui a proposé que Drs2p était auto-inhibé par son extrémité C-terminale. Il a été détecté dans notre laboratoire et celui de Graham des formes protéolysées de Drs2p. Une activité ATPasique de notre complexe purifié moins importante que celle mesurée par l'équipe de Graham pourrait éventuellement indiquer que les protéolyses sont moins importantes dans notre cas avec un Drs2p purifié possédant toujours ses extrémités N- et C-terminales intactes, ce qui reflèterait une plus grande intégrité de notre complexe.

Nos résultats appuient cette dernière hypothèse : la protéolyse ménagée de Drs2p montre une stimulation importante de l'activité ATPasique du complexe, d'un facteur 30-50. Une activité qui n'est stimulable de façon significative qu'en présence du PI4P. Sans oublier le partenaire Cdc50p qui reste toujours associé à Drs2p protéolysé. La forme de Drs2p protéolysée pleinement active a été identifiée par

séquençage N-terminal et spectrométrie de masse, qui révèlent une protéine Drs2p dépourvue d'une partie des extrémités N- et C-terminales (A<sup>105</sup>-R<sup>1290</sup>), ayant cependant toujours son site de fixation au PI4P. Nos résultats suggèrent que l'extrémité C-terminale a un rôle auto-inhibiteur, ce qui confirme la thèse de l'équipe de Graham. Nous allons cependant au-delà des résultats de Graham en montrant que le PI4P n'est très certainement pas l'élément qui permet de lever cette auto-inhibition.

Nous avons observé un désaccord apparent entre les cinétiques de déphosphorylation et la vitesse d'hydrolyse de l'ATP par le complexe purifié Drs2p/Cdc50p intact : la cinétique de déphosphorylation est tellement lente (de l'ordre de quelques minutes :  $t_{1/2}$  de 3-4 minutes) qu'elle est incompatible avec l'activité ATPasique mesurée, même faible (30 nmol de Pi/mg de Drs2p/minute). L'une des hypothèses est que notre échantillon purifié est hétérogène, contenant une fraction majoritaire de Drs2p intacte contribuant à la mesure de déphosphorylation, et une fraction minoritaire Drs2p protéolysé contribuant à l'activité ATPasique. Cette fraction, parce que minoritaire, ne contribuerait pas significativement à la formation de dérivé phosphorylé. Cette hypothèse est fortement appuyée par nos résultats. Par conséquent, ces deux tests fonctionnels, la mesure de l'activité ATPasique et la mesure du dérivé phosphorylé formé, sont deux tests complémentaires et si on veut vérifier la fonctionnalité d'une ATPase-P qui présente une activité ATPasique lente voire très lente : la mesure du dérivé phosphorylé formé est plus appropriée comme test initial pour vérifier la fonctionnalité de la protéine, et cela même directement sur des membranes exprimant la protéine.

Nos résultats suggèrent soit l'implication simultanée des extrémités N- et C-terminales dans l'auto-inhibition de Drs2p soit l'implication de la région C-terminale (1291-1355) seule dans l'auto-inhibition, région qui, fixée de manière non identifiée sur une ou plusieurs régions de Drs2p impliquées dans la catalyse, inhiberait l'enzyme. Le déplacement de cette région auto-inhibitrice, donc le relâchement de cette fixation, lèverait l'auto-inhibition. Notons que nos résultats suggèrent que la région C-terminale 1291-1302 est une zone particulièrement critique pour l'auto-inhibition de Drs2p. De plus on peut imaginer que la région C-terminale 1273-1291, qui est proche du site de fixation du PI4P, serait impliquée dans l'activation de Drs2p

par le PI4P : après fixation du PI4P, il y aurait une sorte de relâchement ou de déplacement de cette région C-terminale 1273-1291, facilitant peut être l'accès du substrat, la PS, à son site de liaison. En effet, la liaison du ligand transporté de la face exoplasmique à la face cytosolique pour une ATPase de type P est connue pour déclencher une réorganisation du domaine catalytique et la déphosphorylation de l'enzyme. La liaison de la PS stimulerait l'étape de déphosphorylation du cycle catalytique et donc le transport de la PS.

Pour essayer de discriminer les deux hypothèses que sont l'implication des deux extrémités N- et C-terminales dans l'auto-régulation ou l'implication seule de l'extrémité C-terminale, des troncatures C-terminales de Drs2p ont été réalisées :  $\Delta 1283$ ,  $\Delta 1273$ ,  $\Delta 1249$ ,  $\Delta 1226$ , mais cette étude n'a pas complètement abouti, probablement à cause du mauvais repliement de ces mutants lors de leur expression. Ce que nous proposons pour la suite de cette thèse c'est de construire au moins deux versions de Drs2p, avec un site de coupure à la protéase TEV inséré juste après les résidus 1290 (car la région 1291-1302 semble être critique pour l'auto-inhibition) ou juste après 1273 (car la région 1273-1290, qui est proche du site de fixation au PI4P, semble être impliquée dans l'activation de Drs2p par le PI4P). Nous pourrions de la sorte exprimer des versions intactes de Drs2p, ne faire la protéolyse que pendant la purification, et enfin faire une étude fonctionnelle pour voir l'effet de ces troncatures sur l'activité de Drs2p et donc étudier leur implication éventuelle dans l'auto-régulation de Drs2p. Pour voir si l'extrémité N-terminale exerce une auto-inhibition sur Drs2p, il serait également intéressant de tester différentes troncatures de l'extrémité N-terminale, en particulier des versions tronquées de part et d'autre du site de fixation de Arl1p (le premier résidu du site de fixation de Arl1p est le résidu E<sup>153</sup>).

Nos résultats suggèrent un modèle d'auto-inhibition de Drs2p par ses extrémités terminales qui s'effectue en deux étapes (Fig. 8, Article 2).

Hypothèse 1: comme on sait que Drs2p interagit avec Arl1p à son extrémité N-terminale et avec Gea2p à son extrémité C-terminale, on peut imaginer dans un premier temps, que l'interaction de Drs2p avec ces facteurs, individuellement ou simultanément, permette le déplacement des extrémités terminales libérant ainsi la partie catalytique de Drs2p de la contrainte exercée par ces extrémités. Une autre

possibilité est celle d'une protéolyse cellulaire régulatrice de Drs2p ou encore l'intervention de Arl1p et/ou Gea2p et de la protéolyse cellulaire de façon concomitante. Dans un second temps, le PI4P fixé à son site pourrait exercer pleinement son rôle de stimulateur.

Hypothèse 2: la fixation du PI4P à son site précède la protéolyse cellulaire et/ou la fixation de Arl1p et/ou Gea2p, qui, déplaçant les extrémités terminales, permettraient une stimulation maximale de Drs2p par le PI4P.

Cette activation en deux étapes pourrait fournir un contrôle strict du transport de phospholipides au niveau des membranes du trans-Golgi.

L'obtention d'un complexe purifié avec une protéine Drs2p intacte ou coupée (à différents endroits) ouvre la possibilité de faire des essais de reconstitution en protéoliposomes pour étudier le transport de NBD-lipides et déterminer quelle forme de Drs2p est impliquée dans le transport. Nous devrions également essayer d'identifier, à l'aide de la mutagénèse dirigée, les résidus importants impliqués dans le transport des PL (cela a déjà commencé à être documenté par d'autres équipes), mais aussi ceux impliqués dans l'interaction entre Drs2p et Cdc50p. Ce qui serait complémentaire des essais de reconstitution en protéoliposomes est l'étude dans un premier temps du transport de PL sur des vésicules de trans-Golgi isolées, sur-exprimant ou pas Drs2p intacte ou coupé.

Les extrémités N- et C-terminales de Drs2p sont prédites pour être flexibles et non structurées, donc peu favorables à la cristallisation, d'où l'intérêt d'avoir une version coupée de Drs2p qui pourrait dans l'avenir faciliter l'obtention de la structure tridimensionnelle du complexe. Les conditions optimales de cristallisation restent cependant à établir. Dans cette optique, nous avons commencé par la recherche des conditions optimales pour stabiliser le complexe, et nous avons trouvé que le PI4P stabilise fortement le complexe en présence de  $C_{12}E_8$  et de DDM ; le  $C_{12}E_8$ , dans le cas des ATPases de type P, est réputé comme étant un détergent avec une capacité de genèse de cristaux supérieure à celle d'autres détergents. Quant aux inhibiteurs qui pourraient être efficaces pour bloquer la flippase dans une conformation donnée, dans notre cas ce sont les composés fluorés qui ont le plus d'effet. Tout cela reste à approfondir.

Les procédures mises en place pour favoriser l'étude du fonctionnement de Drs2p pourrait enfin être étendues à d'autres ATPases-P4, notamment humaines, dont les mutations sont impliquées dans diverses pathologies.

# V. BIBLIOGRAPHIE

## **A**

**Abe, F.** (2007). Exploration of the effects of high hydrostatic pressure on microbial growth, physiology and survival: perspectives from piezophysiology. *Biosci Biotechnol Biochem*, 71(10):2347-57.

**Alder-Baerens, N.**, Lisman, Q., Luong, L., Pomorski, T. and Holthuis, J.C. (2006). Loss of P4 ATPases Drs2p and Dnf3p disrupts aminophospholipid transport and asymmetry in yeast post-Golgi secretory vesicles. *Mol Biol Cell*, 17(4):1632-42.

**Asahi, M.**, Sugita, Y., Kurzydowski, K., De Leon, S., Tada, M. and al (2003). Sarcolipin regulates sarco(endo)plasmic reticulum CA<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) by binding to transmembrane helices alone or in association with phospholamban. *Proc. Natl. Sci. USA*, 100:5040-45.

**Axelsen, K.B.** and Palmgren, M.G. (1998). Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol*, 46(1):84-101.

**Azouaoui, H.**, Montigny, C., Ash, M. R., Fijalkowski, F., Jacquot, A., Grønberg, C., López-Marqués, R. L., Palmgren, M. G., Garrigos, M., le Maire, M., Decottignies, P., Gourdon, P., Nissen, P., Champeil, P., Lenoir, G. (2014). A high-yield co-expression system for the purification of an intact Drs2p-Cdc50p lipid flippase complex, critically dependent on and stabilized by phosphatidylinositol-4-phosphate. *PLoS One*, 9(11):e112176.

**Azouaoui, H.**, Montigny, C., Jacquot, A., Barry, R., Champeil, P., Lenoir, G. (2016). Coordinated Overexpression in Yeast of a P4-ATPase and Its Associated Cdc50 Subunit: The Case of the Drs2p/Cdc50p Lipid Flippase Complex. *Methods Mol Biol*, 1377:37-55.

## **B**

**Baldrige, R. D.**, Graham, T. R. (2012). Identification of residues defining phospholipid flippase substrate specificity of type IV P-type ATPases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(6):E290-8.

**Baldrige, R. D.**, Xu,P. and Graham,T. R. (2013)**a**. Type IV P-type ATPases distinguish mono- versus diacyl phosphatidylserine using a cytofacial exit gate in the membrane domain. *J Biol Chem*, 288(27):19516-27.

**Baldrige, R. D.** and Graham T. R. (2013)**b**. Two-gate mechanism for phospholipid selection and transport by type IV P-type ATPases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(5):E358-67.

**Behnia, R.** and Munro, S. (2005). Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature*, 438(7068):597-604

**Bohdanowicz, M.** and Grinstein, S. (2013). Role of phospholipids endocytosis, phagocytosis, and macropinocytosis. *Physiol Rev*, 93(1):69-106

**Bretscher, M. S.** (1972). Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nat new biol*, 236, 11-12.

**Bretscher, M. S.** (1973). Membrane structure: some general principles. *Science*, 181(4100):622-9.

**Bryde, S.**, Hennrich, H., Verhulst, P.M., Devaux, P.F., Lenoir, G. and Holthuis, J. C. (2010). CDC50 proteins are critical components of the human class-1 P4-ATPase transport machinery. *J Biol Chem*, 285(52):40562-72

**Bull, L. N.**, van Eijk, M. J., Pawlikowska, L., DeYoung, J. A., Juijn, J. A., Liao, M., Klomp, L. W., Lomri, N., Berger, R., Scharschmidt, B. F., Knisely, A. S., Houwen, R. H. and Freimer, N. B. (1998). A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis. *Nat Genet*, 18(3):219-24.

## **C**

**Cacciagli, P.**, Haddad, M. R., Mignon-Ravix, C., El-Waly, B., Moncla, A., Missirian, C., Chabrol, B. and Villard, L. (2010). Disruption of the ATP8A2 gene in a patient with a t(10;13) de novo balanced translocation and a severe neurological phenotype. *Eur J Hum Genet*, 18(12):1360-3.

- Catty, P.**, de Kerchove d'Exaerde, A. and Goffeau, A. (1997). The complete inventory of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* P-type transport ATPases. *FEBS Lett*, 409, 325-332.
- Chantalat, S.**, Park, S. K., Hua, Z., Liu, K., Gobin, R., Peyroche, A., Rambourg, A., Graham, T. R. and Jackson, C. L. (2004). The Arf activator Gea2p and the P-type ATPase Drs2p interact at the Golgi in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, 117(Pt 5):711-22.
- Chen, C. Y.**, Ingram, M. F., Rosal, P. H. and Graham, T. R. (1999). Role for Drs2p, a P-type ATPase and potential aminophospholipid translocase, in yeast late Golgi function. *J Cell Biol*, 147(6):1223-36.
- Chen, S.**, Wang, J., Muthusamy, B. P., Liu, K., Zare, S., Andersen, R. J. and Graham, T. R. (2006). Roles for the Drs2p-Cdc50p complex in protein transport and phosphatidylserine asymmetry of the yeast plasma membrane. *Traffic*, 7, 1503-1517.
- Chen, B.**, Jiang, Y., Zeng, S., Yan, J., Li, X., Zhang, Y., Zou, W. and Wang, X. (2010) Endocytic sorting and recycling require membrane phosphatidylserine asymmetry maintained by TAT-1/ CHAT-1. *PLoS Genet*, 6, e1001235.
- Chen, Y. Z.**, Mapes, J., Lee, E. S., Skeen-Gaar, R. R., Xue, D. (2013). Caspase-mediated activation of *Caenorhabditis elegans* CED-8 promotes apoptosis and phosphatidylserine externalization. *Nat Commun*, 4:2726.
- Clausen, J. D.**, Vilsen, B., McIntosh, D. B., Einholm, A. P. and Andersen, J. P. (2004). Glutamate-183 in the conserved TGES motif of domain A of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase assists in catalysis of E2/E2P partial reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(9):2776-81.
- Coleman, J. A.**, Kwok, M. C. and Molday, R. S. (2009). Localization, purification, and functional reconstitution of the P4-ATPase Atp8a2, a phosphatidylserine flippase in photoreceptor disc membranes. *J Biol Chem*, 284(47):32670-9.
- Coleman, J. A.**, Molday, R. S. (2011). Critical role of the beta-subunit CDC50A in the stable expression, assembly, subcellular localization, and lipid transport activity of the P4-ATPase ATP8A2. *J Biol Chem*, 286(19):17205-16.

**Coleman, J. A.**, Vestergaard, A. L., Molday, R. S., Vilsen, B. and Andersen, J. P. (2012). Critical role of a transmembrane lysine in aminophospholipid transport by mammalian photoreceptor P4-ATPase ATP8A2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(5):1449-54.

## **D**

**Darland-Ransom, M.**, Wang, X., Sun, C. L., Mapes, J., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Xue, D. (2008). Role of *C. elegans* TAT-1 protein in maintaining plasma membrane phosphatidylserine asymmetry. *Science*, 320(5875):528-31.

**Devaux, P. F.**, Herrmann, A., Ohlwein, N., Kozlov, M. M. (2008). How lipid flippases can modulate membrane structure. *Biochim Biophys Acta*, 1778(7-8):1591-600.

**de Saint-Jean, M.**, Delfosse, V., Douguet, D., Chicanne, G., Payrastre, B., Bourguet, W., Antonny, B. and Drin, G. (2011). Osh4p exchanges sterols for phosphatidylinositol 4-phosphate between lipid bilayers. *J Cell Biol*, 195(6):965-78.

**Dhar, M.**, Webb, L. S., Smith, L., Hauser, L., Johnson, D. and West, D. B. (2000). A novel ATPase on mouse chromosome 7 is a candidate gene for increased body fat. *Physiol Genomics*, 4(1):93-100.

**Dhar, M. S.**, Yuan, J. S., Elliott, S. B. and Sommardahl, C. (2006). A type IV P-type ATPase affects insulin-mediated glucose uptake in adipose tissue and skeletal muscle in mice. *J Nutr Biochem*, 17(12):811-20.

**Ding, J.**, Wu, Z., Crider, B. P., Ma, Y., Li, X., Slaughter, C., Gong, L., Xie, X. S. (2000). Identification and functional expression of four isoforms of ATPase II, the putative aminophospholipid translocase. Effect of isoform variation on the ATPase activity and phospholipid specificity. *J Biol Chem*, 275(30):23378-86.

## **E**

**Ekberg, K.**, Palmgren, M. G., Veierskov, B. and Buch-Pedersen, M. J. (2010). A novel mechanism of P-type ATPase autoinhibition involving both termini of

phosphatidylethanolamine. *J biol chem*, 285, 7344-7350.

**Eppens, E. F.**, van Mil, S. W., de Vree, J. M., Mok, K. S., Juijn, J. A., Oude Elferink, R. P., Berger, R., Houwen, R. H. and Klomp, L. W. (2001). FIC1, the protein affected in two forms of hereditary cholestasis, is localized in the cholangiocyte and the canalicular membrane of the hepatocyte. *J Hepatol*, 35(4):436-43.

**Ezanno, P.**, Cribier, S. and Devaux, P. F. (2010). Asymmetrical stress generated by the erythrocyte lipid flippase triggers multiple bud formation on the surface of spherical giant liposomes. *Eur Biophys J*, 39(8):1277-80.

## **E**

**Fadok, V. A.**, Bratton, D.L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A. and Henson, P. M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*, 405, 85-90.

**Farge, E.**, Ojcius, D. M., Subtil, A. and Dautry-Varsat, A. (1999). Enhancement of endocytosis due to aminophospholipid transport across the plasma membrane of living cells. *Am J Physiol*, 276(3 Pt 1):C725-33.

**Flamant, S.**, Pescher, P., Lemercier, B., Clément-Ziza, M., Képès, F., Fellous, M., Milon, G., Marchal, G., Besmond, C. (2003). Characterization of a putative type IV aminophospholipid transporter P-type ATPase. *Mamm Genome*, 14(1):21-30.

**Flesch, F. M.**, Brouwers, J. F., Nievelstein, P. F., Verkleij, A. J., van Golde, L. M., Colenbrander, B. and Gadella, B. M. (2001). Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci*, 114(Pt 19):3543-55.

**Furuta, N.**, Fujimura-Kamada, K., Saito, K., Yamamoto, T. and Tanaka, K. (2007). Endocytic recycling in yeast is regulated by putative phospholipid translocases and the Ypt31p/32p-Rcy1p pathway. *Mol Biol Cell*, 18(1):295-312.

## **G**

**Gall, W. E.**, Geething, N. C., Hua, Z., Ingram, M. F., Liu, K., Chen, S. I. and Graham, T. R. (2002). Drs2p-dependent formation of exocytic clathrin-coated vesicles in vivo. *Curr Biol*, 12(18):1623-7.

**Geering, K.** (2001). The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases. *J Bioenerg Biomembr*, 33(5):425-38.

**Geering, K.** (2006). FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290(2):F241-50.

**Geering, K.** (2008). Functional roles of Na,K-ATPase subunits. *Curr Opin Nephrol Hyperten*, 526-32.

**Gietz, R. D.**, Schiestl, R. H., Willems, A. R., Woods, R. A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11: 355–360.

**Graham, T. R.** and Burd, C. G. (2011). Coordination of Golgi functions by phosphatidylinositol 4-kinases. *Trends Cell Biol*, 113-21.

**Groen, A.**, Romero, M. R., Kunne, C., Hoosdally, S. J., Dixon, P. H., Wooding, C., Williamson, C., Seppen, J., Van den Oever, K., Mok, K. S., Paulusma, C. C., Linton, K. J. and Oude Elferink, R. P. (2011). Complementary functions of the flippase ATP8B1 and the floppase ABCB4 in maintaining canalicular membrane integrity. *Gastroenterology*, 1927-37.e1-4.

**Goren, M. A.**, Morizumi, T., Menon, I., Joseph, J. S., Dittman, J. S., Cherezov, V., Stevens, R. C., Ernst, O. P., Menon, A. K. (2014). Constitutive phospholipid scramblase activity of a G protein-coupled receptor. *Nat Commun*, 5:5115.

**Gorter, E.** and Grendel, F. (1925). On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J Exp Med*, 41(4):439-43.

**Gourdon, P.**, Liu, X. Y., Skjørringe, T., Morth, J. P., Møller, L. B., Pedersen, B. P., Nissen,

P. (2011). Crystal structure of a copper-transporting PIB-type ATPase. *Nature*, 475(7354):59-64.

**Gürtler, A.**, Kunz, N., Gomolka, M., Hornhardt, S., Friedl, A. A., McDonald, K., Kohn, J. E., Posch, A. (2013). Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Anal Biochem*, 433(2):105-11.

## **H**

**Hannun, Y. A.** and Obeid, L. M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 139-50.

**Hanson, P.K.**, Malone, L., Birchmore, J. L. and Nichols, J. W. (2003). Lem3p is essential for the uptake and potency of alkylphosphocholine drugs, edelfosine and miltefosine. *J Biol Chem*, 278(38):36041-50.

**Hicks, A. A.**, Pramstaller, P. P., Johansson, A., Vitart, V., Rudan, I., Ugoicsai, P., Aulchenko, Y., Franklin, C. S., Liebisch, G., Erdmann, J., Jonasson, I., Zorkoltseva, I. V., Pattaro, C., Hayward, C., Isaacs, A., Hengstenberg, C., Campbell, S., Gnewuch, C., Janssens, A. C., Kirichenko, A. V., König, I. R., Marroni, F., Polasek, O., Demirkan, A., Kolcic, I., Schwienbacher, C., Igl, W., Biloglav, Z., Witteman, J. C., Pichler, I., Zaboli, G., Axenovich, T. I., Peters, A., Schreiber, S., Wichmann, H. E., Schunkert, H., Hastie, N., Oostra, B. A., Wild, S. H., Meitinger, T., Gyllenstein, U., van Duijn, C. M., Wilson, J. F., Wright, A., Schmitz, G., Campbell, H. (2009). Genetic determination of circulating sphingolipid concentrations in European population. *PLoS Genet*, 5(10):e1000672.

**Holthuis, J. C.**, Pomorski, T., Raggars, R. J., Sprong, H. and Van Meer, G. (2001). The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport. *Physiol Rev*, 81(4):1689-723.

**Holthuis, J. C.**, Levine, T. P. (2005). Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(3):209-20.

**Hua, Z.** and Graham TR. (2003). Requirement for neo1p in retrograde transport from the

Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, 4971-83.

## J

**Jacquot, A.**, Montigny, C., Hennrich, H., Barry, R., le Maire, M., Jaxel, C., Holthuis, J., Champeil, P., Lenoir, G. (2012). Phosphatidylserine stimulation of Drs2p·Cdc50p lipid translocase dephosphorylation is controlled by phosphatidylinositol-4-phosphate. *J Biol Chem*, 13249-61.

## K

**Kay, J. G.**, Koivusalo, M., Ma, X., Wohland, T. and Grinstein, S. (2012). Phosphatidylserine dynamics in cellular membranes. *Mol Biol Cell*, 23(11):2198-212.

**Kato, U.**, Emoto, K., Fredriksson, C., Nakamura, H., Ohta, A., Kobayashi, T., Murakami-Murofushi, K., Kobayashi, T. and Umeda, M. (2002). A novel membrane protein, Ros3p, is required for phospholipid translocation across the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 277(40):37855-62.

**Levano, K.**, Punia, V., Raghunath, M., Debata, P. R., Curcio, G. M., Mogha, A., Purkayastha, S., McCloskey, D., Fata, J. and Banerjee, P. (2012). Atp8a1 deficiency is associated with phosphatidylserine externalization in hippocampus and delayed hippocampus-dependent learning. *J Neurochem*, 120(2):302-13.

**Kinnunen, P. K.** and Holopainen, J. M. (2000). Mechanisms of initiation of membrane fusion: role of lipids. *Biosci Rep*, 20(6):465-82.

**Kol, M. A.**, van Laak, A. N., Rijkers, D. T., Killian, J. A., de Kroon, A. I. and de Kruijff, B. (2003). Phospholipid flop induced by transmembrane peptides in model membranes is modulated by lipid composition. *Biochemistry*, 42(1):231-7.

**Kühlbrandt, W.** (2004). Biology, Structure and Mechanism of P-type ATPases. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 5, 282-295.

## L

**Ladner, C. L.**, Yang, J., Turner, R. J. and Edwards, R. A. (2004). Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Anal Biochem*, 326(1):13-20.

**Lemmon, M. A.** (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9: 99–111.

**Lenoir, G.**, Menguy, T., Corre, F., Montigny, C., Pedersen, P. A., Thinès, D., le Maire, M., Falson, P. (2002). Overproduction in yeast and rapid and efficient purification of the rabbit SERCA1a Ca(2+)-ATPase. *Biochim Biophys Acta*, 1560(1-2):67-83.

**Lenoir, G.**, Picard, M., Gauron, C., Montigny, C., Le Maréchal, P., Falson, P., Le Maire, M., Møller, J. V. and Champeil, P. (2004). Functional properties of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase after proteolytic cleavage at Leu119-Lys120, close to the A-domain. *J Biol Chem*, 279(10):9156-66.

**Lenoir, G.**, Williamson, P., Puts, C. F. and Holthuis, J. C. (2009). Cdc50p plays a vital role in the ATPase reaction cycle of the putative aminophospholipid transporter Drs2p. *J Biol Chem*, 284(27):17956-67.

**Li, H.**, Wetten, S., Li, L., St Jean, P. L., Upmanyu, R., Surh, L., Hosford, D., Barnes, M. R., Briley, J. D., Borrie, M., Coletta, N., Delisle, R., Dhalla, D., Ehm, M. G., Feldman, H. H., Fornazzari, L., Gauthier, S., Goodgame, N., Guzman, D., Hammond, S., Hollingworth, P., Hsiung, G. Y., Johnson, J., Kelly, D. D., Keren, R., Kertesz, A., King, K. S., Lovestone, S., Loy-English, I., Matthews, P. M., Owen, M. J., Plumpton, M., Pryse-Phillips, W., Prinjha, R. K., Richardson, J. C., Saunders, A., Slater, A. J., St George-Hyslop, P. H., Stinnett, S. W., Swartz, J. E., Taylor, R. L., Wherrett, J., Williams, J., Yarnall, D. P., Gibson, R. A., Irizarry, M. C., Middleton, L. T. and Roses, A. D. (2008). Candidate single-nucleotide polymorphisms from a genomewide association study of Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 65(1):45-53.

**Lim, H. W. G.**, Wortis, M. and Mukhopadhyay, R. (2002). Stomatocyte-discocyte-echinocyte sequence of the human red blood cell: evidence for the bilayer- couple hypothesis from membrane mechanics. *Proc Natl Acad Sci U S A*,

99(26):16766-9.

**Lingwood, D.** and Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327(5961):46-50.

**Liu, K.**, Surendhran, K., Nothwehr, S. F. and Graham, T. R. (2008). P4-ATPase requirement for AP-1/clathrin function in protein transport from the trans-Golgi network and early endosomes. *Mol Biol Cell*, 19(8):3526-35.

**López-Marqués, R. L.** , Poulsen, L. R. , Hanisch, S. , Meffert, K. , Buch-Pedersen, M. J. , Jakobsen, M. K. , Pomorski, T. G. and Palmgren, M. G. (2010). Intracellular targeting signals and lipid specificity determinants of the ALA/ALIS P4-ATPase complex reside in the catalytic ALA alpha-subunit. *Mol Biol Cell*, 21(5):791-801.

**López-Marqués, R. L.**, Poulsen, L. R. and Palmgren, M. G. (2012). A putative plant aminophospholipid flippase, the Arabidopsis P4 ATPase ALA1, localizes to the plasma membrane following association with a  $\beta$ -subunit. *PLoS One*, 7(4):e33042.

**López-Marqués, R. L.**, Poulsen, L. R., Bailly, A., Geisler, M. , Pomorski, T. G., Palmgren, M. G. (2014)a. *BiochimBiophys Acta*, 1850(3):461-75

**López-Marques, R. L.**, Theorin, L., Palmgren, M. G. and Pomorski, T. G. (2014)b. P4-ATPases: lipid flippases in cell membranes. *Pflugers Arch*, 466(7):1227-40.

**Lutsenko, S.** and Kaplan, J. H. (1993). An essential role for the extracellular domain of the Na,K-ATPase beta-subunit in cation occlusion. *Biochemistry*, 32(26):6737-43.

## **M**

**Mattle, D.**, Sitsel, O., Autzen, H. E., Meloni, G., Gourdon, P. and Nissen, P. (2013). On allosteric modulation of P-type Cu(+)-ATPases. *J Mol Biol*, 425(13):2299-308.

**Menon, I.**, Huber, T., Sanyal, S., Banerjee, S., Barré, P., Canis, S., Warren, J. D., Hwa, J., Sakmar, T. P. and Menon, A. K. (2011). Opsin is a phospholipid flippase. *Curr Biol*, 21(2):149-53.

- Mercer, J.** and Helenius, A. (2008). Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science*, 320(5875):531-5.
- Møller, J. V.**, Lind, K. E. and Andersen, J. P. (1980). Enzyme kinetics and substrate stabilization of detergent-solubilized and membraneous (Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup>)-activated ATPase from sarcoplasmic reticulum. Effect of protein-protein interactions. *J Biol Chem*, 255, 1912–1920.
- Møller, J. V.**, Juul, B. and le Maire, M. (1996). Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta*, 1286(1):1-51.
- Montigny, C.**, Decottignies, P., Le Maréchal, P., Capy, P., Bublitz, M., Olesen, C., Møller, J. V., Nissen, P. and le Maire, M. (2014). S-palmitoylation and s-oleoylation of rabbit and pig sarcolipin. *J Biol Chem*, 289(49):33850-61.
- Montigny, C.**, Lyons, J., Champeil, P., Nissen, P. and Lenoir, G. (2016). On the molecular mechanism of flippase- and scramblase-mediated phospholipid transport. *Biochim Biophys Acta.*, 1861(8 Pt B):767-83.
- Morth, J. P.**, Pedersen, B. P., Toustrup-Jensen, M. S., Sørensen, T. L. , Petersen, J., Andersen, J. P., Vilsen, B. and Nissen, P. (2007). Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature*, 450(7172):1043-9.
- Moser von Filseck, J.**, Čopič, A., Delfosse, V., Vanni, S., Jackson, C. L., Bourguet, W., Drin, G. (2015). Intracellular transport. Phosphatidylserine transport by ORP/Osh proteins is driven by phosphatidylinositol 4-phosphate. *Science*, 349(6246):432-6.
- Müller, P.**, Pomorski, T. and Herrmann, A. (1994). Incorporation of phospholipid analogues into the plasma membrane affects ATP-induced vesiculation of human erythrocyte ghosts. *Biochem Biophys Res Commun*, 199(2):881-7.
- Muthusamy, B. P.**, Raychaudhuri, S., Natarajan, P., Abe, F., Liu, K., Prinz, W. A. and Graham, T. R. (2009). Control of protein and sterol trafficking by antagonistic activities of a type IV P-type ATPase and oxysterol binding protein homologue. *Mol Biol Cell*, 20(12):2920-31.

## **N**

**Nakano, K.**, Yamamoto, T., Kishimoto, T., Noji, T. and Tanaka, K. (2008). Protein kinases Fpk1p and Fpk2p are novel regulators of phospholipid asymmetry. *Mol Biol Cell*, 19(4):1783-97.

**Natarajan, P.**, Wang, J., Hua, Z. and Graham, T. R. (2004). Drs2p-coupled aminophospholipid translocase activity in yeast Golgi membranes and relationship to in vivo function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(29):10614-9.

**Natarajan, P.**, Liu, K., Patil, D. V., Sciorra, V. A., Jackson, C. L. and Graham, T. R. (2009). Regulation of a Golgi flippase by phosphoinositides and an ArfGEF. *Nat Cell Biol*, 11(12):1421-6.

## **O**

**Odermatt, A.**, Becker, S., Khanna, V. K., Kurzydowski, K., Leisner, E., Pette, D., MacLennan, D. H. (1998). Sarcolipin regulates the activity of SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *J Biol Chem.*, 273(20):12360-9.

**O'Neal, S. G.**, Rhoads, D. B. and Racker, E. (1979). Vanadate inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and other ATPases. *Biochem Biophys Res Commun*, 89(3):845-50.

**Odorizzi, G.**, Babst, M. and Emr, S. D. (2000). Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends Biochem Sci*, 25(5):229-35.

**Olesen, C.**, Picard, M., Winther, A. M., Gyrupe, C., Morth, J. P., Oxvig, C., Møller, J. V. and Nissen, P. (2007). The structural basis of calcium transport by the calcium pump. *Nature*, 450(7172):1036-42.

**Op den Kamp, J. A.** (1979). Lipid asymmetry in membranes. *Annu Rev Biochem*, 48:47-71.

## **P**

**Palmgren, M. G.** and Nissen, P. (2011). P-type ATPases. *Annu Rev Biophys*, 40:243-66.

**Paulusma, C. C.**, Groen, A., Kunne, C., Ho-Mok, K. S., Spijkerboer, A. L., Rudi de Waart, D., Hoek, F. J., Vreeling, H., Hoeben, K. A., van Marle, J., Pawlikowska, L., Bull, L. N., Hofmann, A. F., Knisely, A. S. and Oude Elferink, R. P. (2006). Atp8b1 deficiency in mice reduces resistance of the canalicular membrane to hydrophobic bile salts and impairs bile salt transport. *Hepatology*, 44(1):195-204.

**Paulusma, C. C.**, Folmer, D. E., Ho-Mok, K. S., de Waart, D. R., Hilarius, P. M., Verhoeven, A. J. and Oude Elferink, R. P. (2008). ATP8B1 requires an accessory protein for endoplasmic reticulum exit and plasma membrane lipid flippase activity. *Hepatology*, 47(1):268-78.

**Pedersen, B. P.**, Buch-Pedersen, M. J., Morth, J. P., Palmgren, M. G. and Nissen, P. (2007). Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature*, 450(7172):1111-4.

**Picard, M.**, Toyoshima, C., Champeil, P. (2006). Effects of inhibitors on luminal opening of Ca<sup>2+</sup> binding sites in an E2P-like complex of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase with Be<sup>2+</sup>-fluoride. *J Biol Chem*, 281: 3360–3369.

**Pick, U.** (1982). The interaction of vanadate ions with the Ca-ATPase from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 257(11):6111-9.

**Pomorski, T.**, Lombardi, R., Riezman, H., Devaux, P. F., van Meer, G. and Holthuis, J. C. (2003). Drs2p-related P-type ATPases Dnf1p and Dnf2p are required for phospholipid translocation across the yeast plasma membrane and serve a role in endocytosis. *Mol Biol Cell*, 14(3):1240-54.

**Pomorski, T.**, Holthuis, J. C., Herrmann, A. and van Meer, G. (2004). Tracking down lipid flippases and their biological functions. *J Cell Sci*, 117(Pt 6):805-13.

**Pouny, Y.**, Weitzman, C., Kaback, H. R. (1998). In vitro biotinylation provides quantitative recovery of highly purified active lactose permease in a single step. *Biochemistry*, 37(45):15713-9.

**Poulsen, L. R.**, López-Marqués, R. L., McDowell, S. C., Okkeri, J., Licht, D., Schulz, A., Pomorski, T., Harper, J. F. and Palmgren, M. G. (2008)**a**. The Arabidopsis P4-ATPase ALA3 localizes to the Golgi and requires a beta-subunit to function in lipid translocation and secretory vesicle formation. *Plant Cell*, 20(3):658-76.

**Poulsen, L. R.**, López-Marqués, R. L. and Palmgren, M. G. (2008)**b**. Flippases: still more questions than answers. *Cell Mol Life Sci*, 65(20):3119-25.

**Puts, C. F.** and Holthuis, J. C. (2009). Mechanism and significance of P4 ATPase-catalyzed lipid transport: lessons from a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pump. *Biochim Biophys Acta*, 1791(7):603-11.

**Puts, C. F.**, Lenoir, G., Krijgsveld, J., Williamson, P. and Holthuis, J. C. (2010). A P4-ATPase protein interaction network reveals a link between aminophospholipid transport and phosphoinositide metabolism. *J Proteome Res*, 9(2):833-42.

**Puts, C. F.**, Panatala, R., Henrich, H., Tsareva, A., Williamson, P. and Holthuis, J. C. (2012). Mapping functional interactions in a heterodimeric phospholipid pump. *J Biol Chem*, ;287(36):30529-40.

## **R**

**Rauch, C.** and Farge, E. (2000). Endocytosis switch controlled by transmembrane osmotic pressure and phospholipid number asymmetry. *Biophys J*, 78(6):3036-47.

**Riekhof, W. R.** and Voelker, D. R. (2006). Uptake and utilization of lyso-phosphatidylethanolamine by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 281(48):36588-96.

**Riekhof, W. R.**, Wu, J., Gijón, M. A., Zarini, S., Murphy, R. C. and Voelker, D. R. (2007). Lysophosphatidylcholine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of P-type

ATPases in transport and a broad specificity acyltransferase in acylation. *J Biol Chem*, 282(51):36853-61.

**Ripmaster, T. L.**, Vaughn, G. P. and Woolford, J. L. Jr. (1993). DRS1 to DRS7, novel genes required for ribosome assembly and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 7901-12.

**Rosing, J.**, Tans, G., Govers-Riemslog, J. W., Zwaal, R. F. and Hemker, H. C. (1980). The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *J Biol Chem*, 255(1):274-83.

**Ruud, A. F.**, Nilsson, L., Richard, F., Larsen, M. K., Bessereau, J. L. and Tuck, S. (2009). The *C. elegans* P4-ATPase TAT-1 regulates lysosome biogenesis and endocytosis. *Traffic*, 10(1):88-100.

## **S**

**Saito, K.**, Fujimura-Kamada, K., Furuta, N., Kato, U., Umeda, M. and Tanaka, K. (2004). Cdc50p, a protein required for polarized growth, associates with the Drs2p P-type ATPase implicated in phospholipid translocation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 15(7):3418-32.

**Sakane, H.**, Yamamoto, T. and Tanaka, K. (2006). The functional relationship between the Cdc50p-Drs2p putative aminophospholipid translocase and the Arf GAP Gcs1p in vesicle formation in the retrieval pathway from yeast early endosomes to the TGN. *Cell Struct Funct*, 31(2):87-108.

**Sangiorgio, V.**, Pitto, M., Palestini, P. and Masserini, M. (2004). GPI-anchored proteins and lipid rafts. *Ital J Biochem*, 53(2):98-111.

**Santiago-Tirado, F. H.** and Bretscher, A. (2011). Membrane-trafficking sorting hubs: cooperation between PI4P and small GTPases at the trans-Golgi network. *Trends Cell Biol*, 21(9):515-25.

**Sanyal, S.**, Menon, A. K. (2009) Flipping lipids: why an' what's the reason for. *ACS Chem*

*Biol*, 4(11):895-909.

**Sciorra, V. A.**, Audhya, A., Parsons, A. B., Segev, N. , Boone, C. and Emr, S. D. (2005) Synthetic genetic array analysis of the PtdIns 4-kinase Pik1p identifies components in a Golgi-specific Ypt31/rab-GTPase signaling pathway. *Mol Biol Cell*, 16(2):776-93.

**Sebastian, T. T.**, Baldrige, R. D., Xu, P. and Graham, T. R. (2012). Phospholipid flippases: building asymmetric membranes and transport vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 1821(8):1068-77.

**Segawa, K.**, Kurata, S., Yanagihashi, Y., Brummelkamp, T. R., Matsuda, F. and Nagata, S. (2014). Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science*, 344(6188):1164-8.

**Seigneuret, M.** and Devaux, P. F. (1984). ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(12):3751-5.

**Shimizu, T.** (2009). Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 49:123-50.

**Schultz, L. D.**, Hofmann, K. J., Mylin, L. M. et al (1987). Regulated overproduction of the GAL4 gene product greatly increases expression from galactose-inducible promoters on multi-copy expression vectors in yeast. *Gene*, 61:123–133.

**Siggs, O. M.**, Arnold, C. N., Huber, C., Pirie, E., Xia, Y., Lin, P., Nemazee, D. and Beutler, B. (2011)**a**. The P4-type ATPase ATP11C is essential for B lymphopoiesis in adult bone marrow. *Nat Immunol*, 12(5):434-40.

**Siggs, O. M.**, Schnabl, B., Webb, B. and Beutler, B. (2011)**b**. X-linked cholestasis in mouse due to mutations of the P4-ATPase ATP11C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(19):7890-5.

**Singer-Krüger, B.**, Lasić, M., Bürger, A. M., Hausser, A., Pipkorn, R. and Wang, Y. (2008). Yeast and human Ysl2p/hMon2 interact with Gga adaptors and mediate their

subcellular distribution. *EMBO J*, 27(10):1423-35.

**Singer, S. J.**, Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023):720-31.

**Skou, J. C.** (1957). The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. 1957. *Biochim Biophys Acta*, 1000:439-46.

**Skou, J. C.** (1998). Nobel Lecture. The identification of the sodium pump. *Biosci Rep*, 18(4):155-69.

**Smith, P. K.**, Krohn, R. I., Hermanson, G. T. et al (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150:76–85.

**Smithn A. T.**, Barupala, D., Stemmler, T. L. and Rosenzweig, A. C. (2015). A new metal binding domain involved in cadmium, cobalt and zinc transport. *Nat Chem Biol*, 11(9):678-84.

**Sørensen, D. M.**, Buch-Pedersen, M. J., Palmgren, M. G. (2010). Structural divergence between the two subgroups of P5 ATPases. *Biochim Biophys Acta*, 1797(6-7):846-55.

**Soupe, E.**, Kemaladewi, D. U. and Kuypers, F. A. (2008). ATP8A1 activity and phosphatidylserine transbilayer movement. *J Receptor Ligand Channel Res*, 1:1-10.

**Stefan, C. J.**, Manford, A. G., Baird, D., Yamada-Haff, J., Mao, Y., Emr, S. D. (2011). Osh proteins regulate phosphoinositide metabolism at ER-plasma membrane contact sites. *Cell*, 144(3):389-401.

**Stevens, H. C.**, Malone, L. and Nichols, J. W. (2008). The putative aminophospholipid translocases, DNF1 and DNF2, are not required for 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-phosphatidylserine flip across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 283(50):35060-9.

**Suzuki, T.** and Wang, J. H. (1986). Stimulation of bovine cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump and blocking of phospholamban phosphorylation and dephosphorylation by a phospholamban monoclonal antibody. *J Biol Chem*, 261(15):7018-23.

## I

**Tachev, K. D.**, Danov, K. D. and Kralchevsky, P. A. (2004). On the mechanism of stomatocyte-echinocyte transformations of red blood cells: experiment and theoretical model. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 34(2):123-40.

**Takahashi, Y.**, Fujimura-Kamada, K. , Kondo, S. and Tanaka, K. (2011). Isolation and characterization of novel mutations in CDC50, the non-catalytic subunit of the Drs2p phospholipid flippase. *J Biochem*, 149(4):423-32.

**Takatsu, H.**, Baba, K. , Shima, T., Umino, H., Kato, U., Umeda, M., Nakayama, K. and Shin, H. W. (2011). ATP9B, a P4-ATPase (a putative aminophospholipid translocase), localizes to the trans-Golgi network in a CDC50 protein-independent manner. *J Biol Chem*, 286(44):38159-67.

**Takatsu, H.**, Tanaka, G., Segawa, K., Suzuki, J., Nagata, S., Nakayama, K. and Shin, H. W. (2014). Phospholipid flippase activities and substrate specificities of human type IV P-type ATPases localized to the plasma membrane. *J Biol Chem*, ;289(48):33543-56.

**Takeda, M.**, Yamagami, K. and Tanaka, K. (2014). Role of phosphatidylserine in phospholipid flippase-mediated vesicle transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 13(3):363-75.

**Tanaka, K.**, Fujimura-Kamada, K. and Yamamoto, T. (2011). Functions of phospholipid flippases. *J Biochem*, 149(2):131-43.

**Tang, X.**, Halleck, M. S., Schlegel, R. A. and Williamson, P. (1996). A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science*, 272(5267):1495-7.

**Toyoshima, C.**, Nakasako, M., Nomura, H. and Ogawa, H. (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*, 405(6787):647-55.

**Toyoshima, C.** and Nomura, H. (2002). Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature*, 418(6898):605-11.

**Toyoshima, C.**, Asahi, M., Sugita, Y. , Khanna, R., Tsuda, T., MacLennan, D. H. (2003).

Modeling of the inhibitory interaction of phospholamban with Ca<sup>2+</sup> ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:467-72.

**Toyoshima, C.** (2007). Ion pumping by calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Adv Exp Med Biol*, 592:295-303.

**Tsai, P. C.**, Hsu, J. W., Liu, Y. W., Chen, K. Y. and Lee, F. J. (2013). Arl1p regulates spatial membrane organization at the trans-Golgi network through interaction with Arf-GEF Gea2p and flippase Drs2p. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(8):E668-77.

**Tsivkovskii, R.**, MacArthur, B. C. and Lutsenko, S. (2001). The Lys1010-Lys1325 fragment of the Wilson's disease protein binds nucleotides and interacts with the N-terminal domain of this protein in a copper-dependent manner. *J Biol Chem*, 276(3):2234-42.

## **U**

**Ueno, S.**, Takeda, K., Noguchi, S., Kawamura, M. (1997). Significance of the beta-subunit in the biogenesis of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biosci Rep*, 17(2):173-88.

**Ujhazy, P.**, Ortiz, D., Misra, S., Li, S., Moseley, J., Jones, H. and Arias, I. M. (2001). Familial intrahepatic cholestasis 1: studies of localization and function. *Hepatology*, 34(4 Pt 1):768-75.

## **V**

**van der Mark, V.A.**, Elferink, R. P. and Paulusma, C. C. (2013). P4 ATPases: flippases in health and disease. *Int J Mol Sci*, 14(4):7897-922.

**van der Velden, L. M.**, Wichers, C. G., van Breevoort, A. E. , Coleman, J. A. , Molday, R. S. , Berger, R., Klomp, L. W. and van de Graaf, S. F. (2010). Heteromeric interactions required for abundance and subcellular localization of human CDC50 proteins and class 1 P4-ATPases. *J Biol Chem*, ;285(51):40088-96.

**van Meer, G.**, Voelker, D. R. and Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(2):112-24.

**Verhulst, P. M.**, van der Velden, L. M., Oorschot, V., van Faassen, E. E., Klumperman, J., Houwen, R. H., Pomorski, T. G., Holthuis, J. C. and Klomp, L. W. (2010). A flippase-independent function of ATP8B1, the protein affected in familial intrahepatic cholestasis type 1, is required for apical protein expression and microvillus formation in polarized epithelial cells. *Hepatology*, 51(6):2049-60.

**Verkleij, A. J.**, Zwaal, R. F., Roelofsen, B., Comfurius, P., Kastelijn, D. and van Deenen, L. L. (1973). The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim Biophys Acta*, 323(2):178-93.

**Vestergaard, A. L.**, Coleman, J. A., Lemmin, T., Mikkelsen, S. A., Molday, L. L., Vilsen, B., Molday, R. S., Dal Peraro, M. and Andersen, J. P. (2014). Critical roles of isoleucine-364 and adjacent residues in a hydrophobic gate control of phospholipid transport by the mammalian P4-ATPase ATP8A2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(14):E1334-43.

## **W**

**Wang, Y. J.**, Wang, J., Sun, H. Q., Martinez, M., Sun, Y. X., Macia, E., Kirchhausen, T., Albanesi, J. P., Roth, M. G. and Yin, H. L. (2003). Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell*, 114(3):299-310.

**Wang, L.**, Beserra, C. and Garbers, D. L. (2004). A novel aminophospholipid transporter exclusively expressed in spermatozoa is required for membrane lipid asymmetry and normal fertilization. *Dev Biol*, 267(1):203-15.

**Wang, J.**, Sun, H. Q., Macia, E., Kirchhausen, T., Watson, H., Bonifacino, J. S. and Yin, H. L. (2007). PI4P promotes the recruitment of the GGA adaptor proteins to the trans-Golgi network and regulates their recognition of the ubiquitin sorting signal. *Mol Biol Cell*, 18(7):2646-55.

**Whiteley, N. M.** and Berg, H. C. (1974). Amidination of the outer and inner surfaces of the human erythrocyte membrane. *J Mol Biol*, 87(3):541-61.

**Wicky, S.**, Schwarz, H. and Singer-Krüger, B. (2004). Molecular interactions of yeast Neo1p, an essential member of the Drs2 family of aminophospholipid translocases, and its role in membrane trafficking within the endomembrane system. *Mol Cell Biol*, 24(17):7402-18.

**Williamson, P.** (2016). Phospholipid Scramblases. *Lipid Insights*, 8(Suppl 1):41-4.

## **X**

**Xu, P.**, Okkeri, J., Hanisch, S., Hu, R. Y., Xu, Q., Pomorski, T. G., Ding, X. Y. (2009). Identification of a novel mouse P4-ATPase family member highly expressed during spermatogenesis. *J Cell Sci*, 122(Pt 16):2866-76.

**Xu, P.**, Baldrige, R. D., Chi, R. J., Burd, C. G. and Graham, T. R. (2013). Phosphatidylserine flipping enhances membrane curvature and negative charge required for vesicular transport. *J Cell Biol*, 202(6):875-86.

## **Y**

**Yabas, M.**, Teh, C. E., Frankenreiter, S., Lal, D., Roots, C. M., Whittle, B., Andrews, D. T., Zhang, Y., Teoh, N. C., Sprent, J., Tze, L. E., Kucharska, E. M., Kofler, J., Farrell, G. C., Bröer, S., Goodnow, C. C. and Enders, A. (2011). ATP11C is critical for the internalization of phosphatidylserine and differentiation of B lymphocytes. *Nat Immunol*, 441-9.

## **Z**

**Zachowski, A.**, Henry, J. P. and Devaux, P. F. (1989). Control of transmembrane lipid asymmetry in chromaffin granules by an ATP-dependent protein. *Nature*, 340(6228):75-6.

**Zhou, X.**, Graham, TR. (2009). Reconstitution of phospholipid translocase activity with

purified Drs2p, a type-IV P-type ATPase from budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(39):16586-91.

**Zhou, X.**, Sebastian, T. T. and Graham, T. R. (2013). Auto-inhibition of Drs2p, a yeast phospholipid flippase, by its carboxyl-terminal tail. *J Biol Chem*, 288(44):31807-15.

Extérieur

Membrane cellulaire

Intérieur



PL

Flipper la  
supère flippase