



HAL
open science

Caractérisation biochimique et structurale de la protéine IFITM3, un facteur de restriction antiviral du système immunitaire inné

Géraldine Mayeux

► To cite this version:

Géraldine Mayeux. Caractérisation biochimique et structurale de la protéine IFITM3, un facteur de restriction antiviral du système immunitaire inné. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAV007 . tel-01798230

HAL Id: tel-01798230

<https://theses.hal.science/tel-01798230v1>

Submitted on 23 May 2018

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE
GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Biologie Structurale et Nanobiologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Géraldine MAYEUX

Thèse dirigée par **Winfried WEISSEHORN**
et co-encadrée par **Pauline MACHEBOEUF**, Chercheur, CNRS

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

Caractérisation Biochimique et Structurale de la Protéine IFITM3, un Facteur de Restriction Antiviral du Système Immunitaire Inné

Thèse soutenue publiquement le **27 février 2018**,
devant le jury composé de :

Monsieur Marc JAMIN **Président**
Professeur Université Grenoble Alpes, Institut de Biologie Structurale,
Grenoble

Monsieur Olivier SCHWARTZ **Rapporteur**
Directeur de recherche, Institut Pasteur, Paris

Monsieur Andrea CIMARELLI **Rapporteur**
Directeur de recherche, Centre International de Recherche en
Infectiologie, Lyon

Monsieur Winfried WEISSEHORN **Directeur de thèse
et examinateur**
Professeur Université Grenoble Alpes, Institut de Biologie Structurale,
Grenoble

Remerciements

Je remercie tout d'abord le Professeur Winfried Weissenhorn pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer mon stage de Master 2 puis ma thèse au sein de son laboratoire. Je lui suis reconnaissante d'avoir donné de sa personne pour m'obtenir un financement et avoir ainsi rendu cette aventure possible.

Je remercie ensuite le docteur Pauline Macheboeuf, désignée en tant que co-encadrante de ma thèse, pour son précieux soutien dans les moments difficiles. Celui-ci a été déterminant et ses interventions m'ont permis de poursuivre mon chemin dans un climat plus favorable. Je la remercie également pour la relecture de ce manuscrit. Je remercie aussi Jean-Pierre Simorre et Cécile Breton, tous deux membres de mon comité de suivi de thèse, pour avoir veillé au bon déroulement de ma thèse.

J'aimerais également tout particulièrement remercier les personnes suivantes : Orso Subrini, Audrey Hessel et Béatrice Schaack pour m'avoir initiée à l'étude des protéines membranaires et pour m'avoir fait bénéficier, avec le plus grand altruisme, de leurs connaissances et de leur savoir-faire. Leurs conseils et leurs encouragements m'ont guidé tout au long de ma thèse une fois arrivée à l'IBS et ont sans nul doute grandement contribué à l'avancement de mes travaux ; Roberto Maya-Martinez et Jean-Pierre Simorre pour leur importante contribution à l'étude de la structure d'IFITM3 par RMN ; Christophe Moreau et Laura Lemel pour les expériences de formation de pores qu'ils ont menées avec ma protéine et enfin, Jean-Philippe Kleman pour son accueil et son aide dans l'observation des protéoliposomes par microscopie à fluorescence.

Je remercie ensuite Andrea Cimarelli, Marc Jamin et Olivier Schwartz, membres de mon jury de soutenance de thèse, pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Merci aussi à tous les membres du groupe EBEV présents et passés que j'ai côtoyé au cours de mes quatre années de thèse pour leur écoute, leurs conseils et tous les repas de midi partagés ensemble dans la convivialité et la bonne humeur. J'ai une pensée particulière pour Christophe Caillat, Nicolas Aschman et Nolwenn Miguet avec lesquels j'ai noué des liens amicaux plus forts. Merci Nolwenn pour ton aide au laboratoire et pour m'avoir aidé à poursuivre mon projet pendant mon congé maternité.

Enfin, je remercie ma famille pour leur compréhension, leur amour et leur soutien ainsi que mes amis qui, par l'intérêt qu'ils ont souvent manifesté à l'égard de mes travaux,

m'ont rendue fière et m'ont encourager à poursuivre mes travaux avec optimisme en dépit des frustrations et des désillusions rencontrées, consciente de la chance qui m'était offerte de me consacrer à un sujet qui me passionne et de pouvoir un jour peut-être contribuer, à mon échelle, à faire avancer la science.

Table des matières

Remerciements	3
Liste des abréviations	9
Introduction	13
1. <i>Présentation générale des protéines IFITM</i>	<i>15</i>
2. <i>Réponse du système immunitaire inné à l'infection virale</i>	<i>16</i>
3. <i>Contribution de la protéine IFITM3 à la réponse antivirale de l'immunité adaptative</i>	<i>18</i>
4. <i>Les familles IFITM et CD225/Dispanines</i>	<i>19</i>
5. <i>Domaines des protéines IFITM</i>	<i>20</i>
6. <i>Les gènes IFITM et leurs orthologues chez la souris</i>	<i>21</i>
7. <i>Découverte de la famille IFITM et de ses propriétés antivirales</i>	<i>22</i>
8. <i>Localisation des protéines IFITM</i>	<i>24</i>
9. <i>Topologies membranaires et modifications post-traductionnelles des protéines IFITM</i>	<i>26</i>
10. <i>Restriction du virus de la grippe A par IFITM3</i>	<i>32</i>
11. <i>Autres virus inhibés par les protéines IFITM</i>	<i>34</i>
12. <i>Mécanisme(s) d'action</i>	<i>41</i>
Enjeux et objectifs	49
Matériel et méthodes	53
1. <i>Clonage, expression et purification d'IFITM3</i>	<i>55</i>
1.1. <i>Clonage d'IFITM3 dans le plasmide d'expression pETM-11</i>	<i>55</i>
1.2. <i>Expression d'IFITM3 en bactérie <i>E.coli</i> souche C41 et purification des membranes cellulaires</i>	<i>55</i>
1.3. <i>Criblage de détergents pour la solubilisation et la purification d'IFITM3</i>	<i>56</i>
1.4. <i>Test de solubilisation et de purification d'IFITM3 en Cymal-5, Fos-Choline-12 et LAPAO</i>	<i>57</i>
1.5. <i>Solubilisation et purification d'IFITM3 en Fos-Choline-12</i>	<i>58</i>
2. <i>Caractérisation biochimique et biophysique d'IFITM3</i>	<i>59</i>
2.1. <i>Détermination de l'état oligomérique d'IFITM3 par SEC-MALLS</i>	<i>59</i>

2.2. Détermination de l'état oligomérique d'IFITM3 par pontage chimique.....	61
2.3. Analyse de la structure secondaire d'IFITM3 par dichroïsme circulaire.....	62
2.4. Etude de la dénaturation thermique d'IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12...	63
2.5. Protéolyse limitée d'IFITM3 à la trypsine.....	63
2.6. Analyse des échantillons de protéines, de liposomes et de nanodisques par microscopie électronique à coloration négative.....	63
3. Reconstitution d'IFITM3 en liposomes.....	64
3.1. Formation des liposomes.....	64
3.2. Titration des liposomes avec du Triton X-100.....	65
3.3. Reconstitution d'IFITM3 en protéoliposomes par déstabilisation des liposomes préformés.....	66
4. Observation des protéoliposomes par microscopie de fluorescence.....	67
4.1. Préparation et marquage fluorescent des liposomes.....	67
4.2. Marquage fluorescent de la protéine IFITM3.....	69
4.3. Formation de protéoliposomes fluorescents.....	68
5. Reconstitution de la protéine IFITM3 en nanodisques pour analyse par RMN....	68
5.1. Préparation des lipides POPC.....	68
5.2. Expression et purification de la protéine d'assemblage MSP.....	69
5.3. Expression et marquage isotopique ¹⁵ N et/ou ¹³ C d'IFITM3.....	71
5.4. Deutération de la protéine IFITM3.....	72
5.5. Purification de la protéine IFITM3 marquée et/ou deutérée à pH 10.....	72
5.6. Dénaturation et repliement de la protéine 15N IFITM3.....	73
5.7. Assemblage des nanodisques avec la protéine IFITM3 marquée et/ou deutérée..	73
6. Expériences de résonance magnétique nucléaire.....	75
7. Mise en évidence, par la méthode d'électrophysiologie TEVC, de la formation de pores membranaires par la protéine IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12.....	75
7.1. Procédure expérimentale.....	76
Résultats.....	79
1. Résumé des premières tentatives d'expression et de purification d'IFITM3.....	81
2. Résultats du criblage de détergents pour la solubilisation et la purification d'IFITM3.....	82
3. Test de solubilisation et de purification d'IFITM3 en Cymal-5, Fos-Choline-12 et LAPAO.....	84

4. Solubilisation et purification d'IFITM3 en Fos-Choline-12 (à plus grande échelle).....	87
5. Caractérisation biochimique et biophysique d'IFITM3.....	89
5.1. Détermination de l'état oligomérique d'IFITM3 par SEC-MALLS.....	89
5.2. Détermination de l'état oligomérique d'IFITM3 par pontage chimique.....	90
5.3. Observation par microscopie électronique à coloration négative de la protéine IFITM3 fortement concentrée en micelles de Fos-choline-12.....	92
5.4. Analyse par dichroïsme circulaire de la structure secondaire adoptée par IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12.....	93
5.5. Etude de la dénaturation thermique d'IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12...	94
6. Essais de cristallisation d'IFITM3 par diffusion de vapeur et en phase cubique de lipides.....	95
7. Reconstitution de la protéine IFITM3 en liposomes.....	96
7.1. Protéolyse limitée des protéoliposomes.....	98
7.2. Détermination de l'état oligomérique d'IFITM3 en protéoliposomes par pontage chimique.....	101
7.3. Observation des protéoliposomes par microscopie électronique à coloration négative.....	102
7.4. Observation des protéoliposomes par microscopie de fluorescence.....	106
8. Reconstitution de la protéine IFITM3 en nanodisques MSP1E3D1-POPC.....	111
9. Analyse par RMN de la protéine IFITM3 reconstituée en nanodisques MSP1E3D1-POPC.....	114
10. Analyse par RMN de la protéine IFITM3 reconstituée en nanodisques MSP1-POPC et MSP1D1ΔH5-POPC.....	117
10.1. Optimisation du spectre 2D 1H-15N HSQC de la protéine IFITM3 en nanodisques de taille moyenne MSP1-POPC.....	122
10.2. Attribution des résonances obtenues pour la protéine IFITM3 en nanodisques MSP1-POPC à pH 4 et à 30 °C.....	125
10.3. Prédiction de la structure secondaire adoptée par les régions attribuées d'IFITM3.....	128
10.4. Stratégies mises en œuvre pour parvenir à attribuer les résidus d'IFITM3 interagissant avec la membrane du nanodisque.....	130
11. Expérience de protéolyse limitée d'IFITM3 en nanodisques MSP1-POPC.....	134

<i>12. Détermination de l'état oligomérique d'IFITM3 en nanodisques MSP1E3D1-POPC et MSP1-POPC par pontage chimique.....</i>	<i>135</i>
<i>13. Mise en évidence, par la méthode d'électrophysiologie TEVC, de la formation de pores membranaires par la protéine IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12.....</i>	<i>137</i>
Discussion.....	141
<i>1. Influence de la Fos-Choline-12 sur le repliement adopté par IFITM3.....</i>	<i>143</i>
<i>2. Etats oligomériques adoptés par IFITM3 dans différents environnements.....</i>	<i>145</i>
<i>3. Hypothèses concernant la topologie membranaire adoptée par IFITM3 en liposomes et en nanodisques.....</i>	<i>146</i>
<i>4. Nouvelle information structurale apportée par l'analyse RMN d'IFITM3 reconstituée en nanodisques.....</i>	<i>149</i>
<i>5. Hypothèses concernant la ou les fonctions présumées d'IFITM3.....</i>	<i>150</i>
Références.....	155
Résumé.....	170

Liste des abréviations

AP : Actino**P**orine

AP-2 : « Adapter **P**rotein-**2** »

B-OG : Octyl β -D-Glucopyranoside

C12E8 : Octaethylene Glycol Monododecyl Ether

C12E9 : Polyoxyethylene(9)dodecyl Ether

C8E4 : Tetraethylene Glycol Monooctyl Ether

Cav : Calvéoline

CD225 / CD19 / CD21 / CD81 : « Cluster of **D**ifferentiation »

CHAPS : 3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate

CHAPSO: 3-((3-Cholamidopropyl) dimethylammonio)-2-hydroxy-1-propanesulfonate

CIL : « Conserved **I**ntracellular **L**oop »

CMC : Concentration **M**icellaire **C**ritique

Cymal-2 : **2**-Cyclohexyl-1-Ethyl- β -D-**M**altoside

Cymal-3 : **3**-Cyclohexyl-1-Propyl- β -D-**M**altoside

Cymal-4 : **4**-Cyclohexyl-1-Butyl- β -D-**M**altoside

Cymal-5 : **5**-Cyclohexyl-1-Pentyl- β -D-**M**altoside

DDM : n-Dodecyl β -D-**M**altoside

DLS : « **D**ynamic **L**ight **S**cattering »

DM : Decyl β -D-**M**altopyranoside

DMSO : Di**M**éthylSulf**O**xide

DO_{600nm} : **D**ensité **O**ptique mesurée à **600 nm**

EE : « **E**arly **E**ndosome »

EGS : Ethylène **G**lycol bis (Succinimidylsuccinate)

FC-12 : Fos-**C**holine-**12**

FHCC : Fièvre **H**émorragique de **C**rimée-**C**ongo

FI : Fraction **I**nsoluble

Fos-Choline-12 ou DPC : n-DodecylPhosphoCholine

FS : Fraction Soluble

FT : « Flow Through »

gp-41: glycoprotéine-41

HA : Hémagglutinine

HSQC : « Heteronuclear Single Quantum Coherence »

IFITM : « InterFeron-Induced TransMembrane protein »

IFN : Interféron ou « InterFeroN »

I-TASSER : « Iterative Threading Assembly Refinement »

IM: IntraMembranaire ou « IntraMembrane »

IPTG : IsoPropyl β-D-1-ThioGalactopyranoside

IRF-9 : « Interferon Regulatory Factor-9 »

ISG : « Interferon-Stimulated Gene »

ISGF3 : « Interferon-Stimulated Gene Factor 3 »

ISRE : « Interferon-Stimulated Response Element »

JAK1 : « JAnus Kinase 1 »

JSRV : « Jaagsiekte Sheep RetroVirus »

LAPAO : 3-Laurylamido-N,N'-Dimethylpropyl Amine Oxide

LASV : « LASsa Virus »

LDAO : N,N-Dimethyldodecylamine N-oxide

LE : « Late Endosome »

LS : « Light Scattering »

MAVC : « Machupo virus »

MEF : « Mouse Embryonic Fibroblast »

MES : acide 2-(N-Morpholino) EthaneSulfonique

MNG3 : Maltose Neopentyl Glycol-3

MSP : « Membrane Scaffold Protein »

MVB : « **M**ulti**V**esicular **B**odies »

Mw : « **M**olecular **W**eight »

MX1 : « **M**X Dynamin Like GTPase **1** »

NHS : **N**-HydroxySuccinimide

NLS : « **N**-LauroylSarcosine sodium salt »

NM : n-Nonyl- β -D-Maltopyranoside

NOE : « **N**uclear **O**verhauser **E**ffect »

NOESY : « **N**uclear **O**verhauser **E**ffect **S**pectroscop**Y** »

NPC : « **N**iemann **P**ick type **C** protein »

NTD: « **N**-**T**erminal **D**omain »

OAS1: « 2'-5'-**O**ligo**A**denylate **S**ynthetase **1** »

OGNG : **O**ctyl **G**lucose **N**eopentyl **G**lycol

OSBP : « **O**xy**S**terol **B**inding **P**rotein »

PAMP : « **P**athogen-**A**ssociated **M**olecular **P**attern »

PBS : « **P**hosphate **B**uffered **S**aline »

PCR : « **P**olymerase **C**hain **R**eaction »

PEG : **P**oly**E**thylène**G**lycol

PKR : « **P**rotein **K**inase **R** »

PM : **P**oids **M**oléculaire

POPC : 1-**P**almitoyl-2-**O**leoyl-*sn*-glycero-3-**P**hosho**C**holine

POPE : 1-**P**almitoyl-2-**O**leoyl-*sn*-glycero-3-**P**hosho**E**thanolamine

POPS : 1-**P**almitoyl-2-**O**leoyl-*sn*-glycero-3-**P**hosho-**L**-**S**erine

PRR : « **P**attern **R**ecognition **R**eceptor »

RI: « **R**efractive **I**ndex »

RMN : **R**ésonance **M**agnétique **N**ucléaire

RPE : **R**ésonance **P**aramagnétique **E**lectronique

SDS-PAGE : « **S**odium **D**odecyl **S**ulfate **P**oly**A**crylamide **G**el **E**lectrophoresis »

SEC-MALLS : « **S**ize **E**xclusion **C**hromatography-**M**ulti-**A**ngle **L**aser **L**ight **S**cattering »

SNP : « **S**ingle **N**ucleotide **P**olymorphism »

SRAS : **S**yndrome **R**espiratoire **A**igu **S**évère

STAT : « **S**ignal **T**ransducers and **A**ctivators of **T**ranscription »

T3DM : n-**T**ri**D**ecyl- β -**D**-**M**altopyranoside

T4DM : n-**T**etra**D**ecyl- β -**D**-**M**altopyranoside

TBE : « **T**otal **B**rain **E**xtract »

TEV : « **T**obacco **E**tch **V**irus »

TEVC : « **T**wo-**E**lectrode **V**oltage **C**lamp »

TLR : « **T**oll-**L**ike **R**eceptor »

Tm : « **M**elting **T**emperature »

TM : **T**rans**M**embranaire ou « **T**rans**M**embrane »

TRIM5 : « **T**RIpartite **M**otif-containing protein **5** »

TRM : « **T**issue-**R**esident **M**emory »

TSA : « **T**hermostability **S**hift **A**ssay »

TX100 : **T**riton **X**-**100**

TYK2 : « **T**Yrosine-specific **K**inase **2** »

U.A. : **U**nité **A**rbitraire

UCP2 : « **U**n**C**oupling **P**rotein **2** »

UDM : n-**U**ndecyl- β -**D**-**M**altopyranoside

UV: **U**ltra**V**iolet

VAPA : « **V**esicle-**A**ssociated membrane **P**rotein-associated protein **A** »

VIH-1 : **V**irus de l'**I**mmunodéficience **H**umaine de type 1

VRS : **V**irus **R**espiratoire **S**yncytial

VSV : **V**irus de la **S**tomatite **V**ésiculaire

Introduction

1. Présentation générale des protéines IFITM

Les protéines **IFITM1**, **2** et **3** (« **InterFeron-Induced TransMembrane** proteins ») constituent, comme leur nom l'indique, une famille de protéines transmembranaires dont l'expression est fortement amplifiée par les interférons de type 1 et 2 grâce à un élément **ISRE** (« **Interferon-Stimulated Response Element** ») présent dans le promoteur des gènes correspondants (Tartour et Cimarelli, 2015). Chez l'Homme, la famille IFITM comporte également deux autres membres IFITM5 et 10. Cependant, seules les protéines IFITM1, 2 et 3, sont induites par les interférons et exercent une activité antivirale, les qualifiant à ce titre de facteurs de restriction antiviraux. Ces protéines sont exprimées de façon ubiquitaire à un niveau basal et ont une activité constitutive au sein de toutes les cellules, notamment celles de la barrière épithéliale, constituant une première ligne de défense contre les infections virales (Bailey *et al.*, 2012). Les protéines IFITM1, 2 et 3 ont la propriété unique de restreindre l'infection par de nombreux virus pathogènes particulièrement dangereux pour l'homme tels que le virus de Marburg, le virus de la Dengue, le virus Ebola et le virus de la grippe, avant même que ces virus n'aient pu traverser la membrane cellulaire et atteindre le cytoplasme. Cette propriété les distingue des autres facteurs de restrictions antiviraux connus qui eux agissent à différentes étapes du cycle viral consécutives à l'entrée du virus. Cependant, les mécanismes moléculaires précis par lesquels les protéines IFITM exercent leurs actions antivirales n'ont pas encore été élucidés.

Les deux autres membres de la famille IFITM humaine, les protéines IFITM5 et 10, n'ont quant à elles aucune fonction antivirale connue. De plus, contrairement aux protéines IFITM1, 2 et 3, le promoteur de leurs gènes ne comprend pas d'élément ISRE, signifiant que leur expression n'est, par conséquent, pas induite par les interférons. La protéine IFITM5 est principalement exprimée à la membrane cellulaire des ostéoblastes et pourrait être impliquée dans la minéralisation osseuse. (Moffatt *et al.*, 2008 ; Hanagata *et al.*, 2011) Des mutations dans le gène *IFITM5* sont d'ailleurs responsables de l'ostéogenèse imparfaite de type 5 (Cho *et al.*, 2012 ; Semler *et al.*, 2012). Quant à la protéine IFITM10, ni son mode d'expression, ni sa fonction n'ont été investigués.

2. Réponse du système immunitaire inné à l'infection virale

Bien que les virus soient des parasites intracellulaires obligatoires, signifiant qu'ils ne peuvent survivre sans détourner à leur profit la machinerie cellulaire d'un hôte vivant, la plupart d'entre eux ne compromettent habituellement pas notre survie. Ceci s'explique par le fait que notre organisme n'est pas sans défense et déploie de nombreuses mesures destinées à limiter et à éradiquer les infections virales. Le système des interférons de type 1 (α/β) joue notamment un rôle central dans cette défense antivirale et est actif contre tous les types de virus (Haller *et al.*, 2006).

Afin de développer une réponse rapide et efficace contre une intrusion virale, celle-ci doit tout d'abord être décelée. Pour ce faire, la cellule hôte détecte la présence du virus grâce à des récepteurs, les **PRRs** (« **P**attern **R**ecognition **R**eceptors »), situés dans le cytosol et dans les endosomes, qui reconnaissent spécifiquement certaines molécules virales appelées **PAMPs** (« **P**athogen-**A**ssociated **M**olecular **P**atterns »). Par exemple, dans le cytosol, les ARN viraux double brin sont reconnus par les récepteurs RIG-I et MDA5 (famille de récepteurs RIG-I-like) (Yoneyama *et al.*, 2004 ; Andrejeva *et al.*, 2004). Tandis que dans les endosomes, les ARN viraux double brin sont reconnus par le récepteur **TLR3** (« **T**oll-**L**ike **R**eceptor 3»), les ARN viraux simple brin sont reconnus par les récepteurs TLR7 et 8 et les ADN double brin sont eux reconnus par les récepteurs TLR9 (Beutler, 2004 ; Bowie et Haga, 2005 ; Iwasaki et Medzhitov, 2004). La liaison de ces PAMPs viraux aux PRRs initie alors des cascades de signalisation, dont fait partie la voie NF- κ B, aboutissant à la synthèse et à la sécrétion dans le milieu extracellulaire environnant d'interférons de type I par la cellule hôte.

Les interférons de type I constituent une famille de cytokines appartenant au système immunitaire inné et agissant en première ligne de défense contre tous les types de virus. Les interférons de type I, α et β , ont un récepteur commun, IFNAR. IFNAR est un hétérodimère composé de deux sous unités, IFNAR 1 et 2, et est situé à la membrane des cellules productrices d'interférons et des autres cellules de l'organisme, susceptibles d'être de nouvelles cibles du virus. En circulant et en se liant à leur récepteur, les interférons α/β stimulent ainsi la réponse antivirale des cellules de façon autocrine et paracrine afin de limiter la propagation du virus. La liaison des interférons de type I à leur récepteur IFNAR induit le recrutement et l'activation des kinases **JAK1** (« **J**Anus **K**inase **1** ») et **TYK2** (« **T**Yrosine-specific **K**inase **2** ») qui à leur tour phosphorylent les protéines **STAT1** et **2** (« **S**ignal **T**ransducers and **A**ctivators of **T**ranscription »). Les protéines STAT1 et 2 phosphorylées

s'associent au facteur-9 de régulation d'interféron **IRF-9** (« **I**nterferon **R**egulatory **F**actor-**9** ») pour former un complexe de facteurs de transcription hétérotrimérique appelé **ISGF3** (« **I**nterferon-**S**timulated **G**ene **F**actor **3** »). ISGF3 est ensuite transloqué dans le noyau où il induit la transcription de plusieurs centaines de gènes stimulés par l'interféron, appelés **ISGs** (« **I**nterferon-**S**timulated **G**enes ») (de Veer *et al.*, 2001 ; Der *et al.*, 1998), en se liant aux éléments ISRE de leur région promotrice (Samuel, 2001 ; Stark *et al.*, 1998). Ces ISGs codent pour des protéines exerçant différentes activités antivirales, telles que, pour n'en citer que quelques-unes, les protéines MX1, OAS1, PKR, TRIM5, Tetherin, Viperin ainsi que les protéines IFITM1, 2 et 3 (Schoggins et Rice, 2011).

Cependant, certains virus ne constitueraient pas de dangereux pathogènes s'ils n'avaient pas évolués en développant des stratégies leur permettant d'échapper au contrôle des interférons. Ces stratégies incluent la suppression de la synthèse d'interférons, la régulation négative de leur signalisation ou encore l'inhibition de l'action antivirale de leurs protéines effectrices. Pour accomplir ces activités provirales, les virus utilisent des protéines virales non structurales (c'est-à-dire non présentes dans les particules virales mais exprimées dans les cellules infectées) et non essentielles à leur réplication, interagissant avec différents constituants viraux et cellulaires, et exerçant souvent plusieurs fonctions au sein des cellules infectées. Par exemple, la protéine NS1 du virus de la grippe A exerce plusieurs actions ciblant des points stratégiques de la défense antivirale cellulaire et qui toutes concourent à favoriser la multiplication virale. NS1 se lie notamment aux molécules d'ARN double brin et les séquestre dans le but d'empêcher l'activation du système des interférons (Wang *et al.*, 2000). Elle contribue également à favoriser la traduction des ARNm viraux au détriment des ARNm cellulaires (de la Luna *et al.*, 1995 ; Park et Katze, 1995) et inhibe la maturation de ces derniers (Lu *et al.*, 1994). Et enfin, NS1 participe à la régulation du cycle de réplication viral (Krug *et al.*, 2003). Par conséquent, il semble établi à présent que la capacité des virus à antagoniser l'action antivirale des interférons détermine directement leur degré de virulence et pourrait être à l'origine de la transmission interspèces de virus dits émergents ou réémergents à la recherche de nouveaux hôtes. En effet, il a été démontré que l'efficacité de ces actions virales antagonistes, permettant d'outrepasser la défense mise en place par les interférons, varie d'une espèce à l'autre (Bossert et Conzelmann, 2002 ; Parisien *et al.*, 2002). Une sélection de variations génétiques permettant à ces virus d'être transmis à l'Homme et de mieux échapper à sa réponse antivirale pourraient alors s'opérer au sein d'un hôte intermédiaire auquel ces virus sont bien adaptés (Munier *et al.*, 2010), expliquant dès lors la

survenue d'infections zoonotiques telles qu'illustrées par les épidémies de Coronavirus SRAS ou encore celles des virus Hendra, Nipah, Ebola et Marburg ; et justifiant la menace que représente la transmission du virus de la grippe aviaire H5N1 à l'Homme (Haller *et al.*, 2006).

3. Contribution de la protéine IFITM3 à la réponse antivirale de l'immunité adaptative

Wakim *et al.* ont découvert que, suite à une primo-infection par le virus de la grippe A, des lymphocytes/cellules T mémoire CD8⁺ résidentes (**TRM**, « **T**issue-**R**esident **M**emory **T** cells ») apparaissent dans les poumons (aux sites de la primo-infection) et expriment de façon constitutive et en grande quantité la protéine antivirale IFITM3. Ces cellules, persistant à long terme dans les tissus non lymphoïdes périphériques, maintiendraient l'expression d'IFITM3 déclenchée par l'infection virale, afin de les protéger et de garantir leur survie en cas de nouvelles expositions au virus de la grippe ainsi qu'à d'autres virus également restreints par IFITM3. Ces cellules seraient alors en mesure de contribuer à une élimination plus rapide des infections virales. Des cellules du même type exprimant IFITM3 en grande concentration ont également été observées dans le cerveau de souris infectées par le **V**irus de la **S**tomatite **V**ésiculaire (**VSV**). Bien qu'il ait été montré que l'expression d'IFITM3 dans ces cellules naïves puissent être stimulée aussi bien par la détection d'interférons (IFN) alpha que par une reconnaissance antigénique, le maintien de la surexpression de la protéine une fois l'infection résolue ne semble pas, par contre, être engendrée par des signaux locaux (tel que l'IFN- α) présents dans les poumons. Ces cellules possèderaient en réalité la propriété unique de déméthyliser le promoteur du gène *IFITM3* permettant dès lors l'expression constitutive de la protéine IFITM3 en grande quantité. En conclusion, la fonction antivirale de la protéine IFITM3 ne se limiterait pas seulement à l'immunité innée mais supporterait également l'immunité adaptative en lui conférant une résistance prophylactique aux infections virales, améliorant par conséquent la qualité de sa réponse (Wakim *et al.*, 2012).

4. Les familles IFITM et CD225/Dispanines

La famille de protéines IFITM fait elle-même partie d'une plus grande famille de protéines transmembranaires, les dispanines. Celles-ci ont en commun de présenter la même topologie membranaire, à savoir deux régions TransMembranaires ou **TM**, d'où leur nom, les dispanines, « span » signifiant travée en anglais. Les dispanines existent chez les eucaryotes et les bactéries et présentent une forte homologie de séquence ainsi que plusieurs motifs conservés, situés principalement au niveau de la boucle intracellulaire séparant les 2 TM ou hélices ainsi qu'au niveau de la première hélice transmembranaire (Sällman Almén *et al.*, 2012). Les protéines IFITM sont également caractérisées par la présence d'une région centrale hautement conservée, nommée CD225, correspondant au premier domaine associé à la membrane suivi de la boucle intracellulaire (**figure 1**), dont l'homologie de séquence est partagée par plus de 300 membres constituant la famille CD225/pfam04505 (John *et al.*, 2013). En plus des protéines IFITM 1 à 3, 5 et 10, la famille CD225 comprend sept autres membres chez l'humain, à savoir PRRT1, PRRT2, TMEM233, TMEM91, TUSC5, SYNDIG1, SYNDIG1L (Perreira *et al.*, 2013). Cependant, seules les protéines IFITM1, 2 et 3 possèdent des propriétés anti-virales reconnues. Alors que leur domaine CDD225 est lui hautement conservé, leur région N-terminale présente quant à elle des variations de séquence et de taille d'une protéine IFITM à l'autre qui pourraient expliquer leurs spécificités anti-virales respectives (**figure 1**) (John *et al.*, 2013). Quant aux sept autres protéines humaines de la famille CD225, peu de choses sinon rien n'est connu à propos de leur fonction (Perreira *et al.*, 2013). SYNDIG1L est suspectée d'être impliquée dans la pathogenèse de la maladie de Huntington (de Chaldée *et al.*, 2006) tandis qu'il a été établi que des mutations dans le gène PRRT2 sont responsables de la survenue de la dyskinésie kinésigénique paroxystique et du syndrome de convulsions infantiles-choréathétose (Lee *et al.*, 2012). Cependant, le mécanisme engendrant ces maladies reste inconnu.

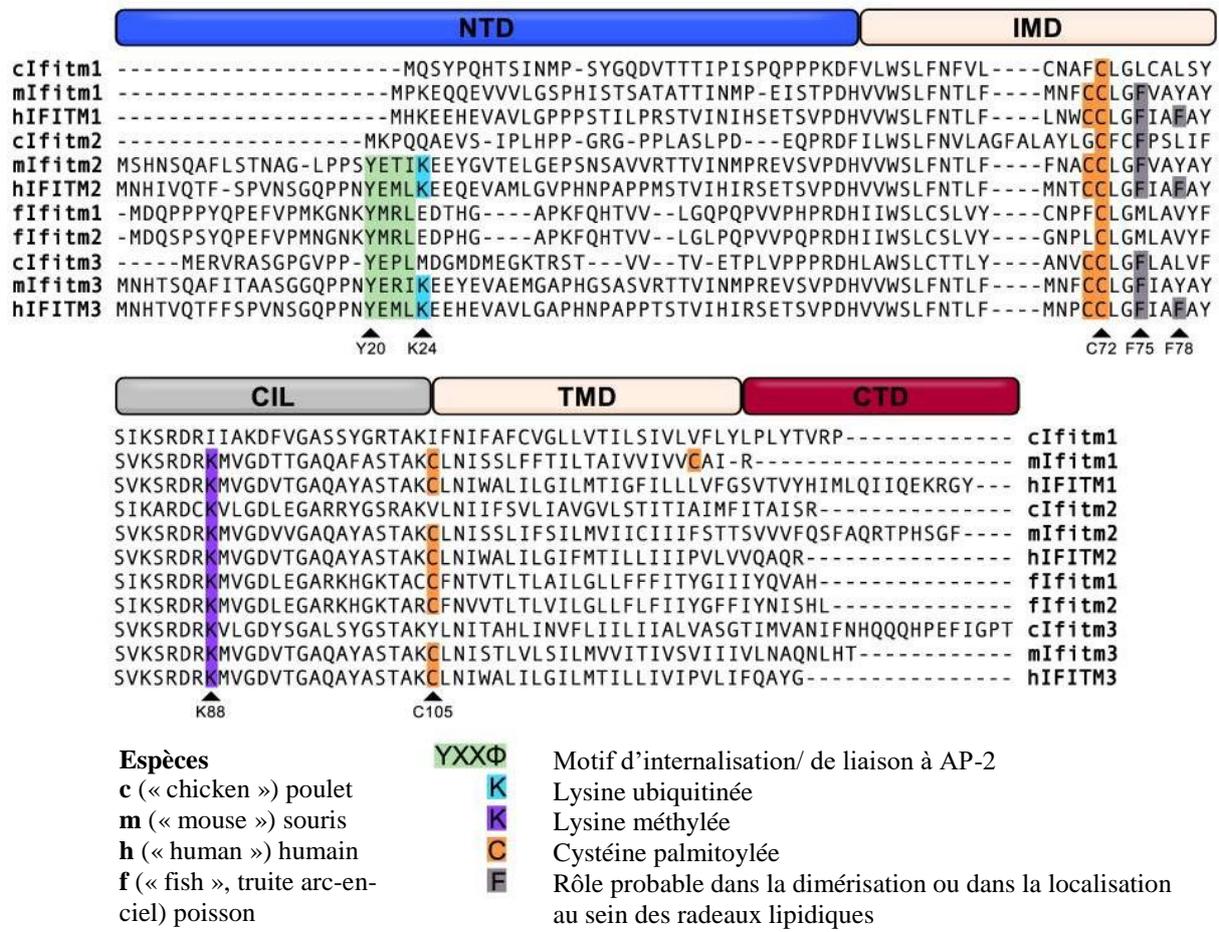


Figure 1 : Domaines des protéines IFITM représentés au-dessus de l'alignement de séquences des protéines IFITM de l'Homme, de la souris, du poulet et du poisson (ici, truite arc-en-ciel). Le motif d'internalisation ainsi que les acides aminés subissant des modifications post-traductionnelles ou étant potentiellement impliqués dans la dimérisation sont surlignés en couleur.

(figure adaptée de Bailey *et al.*, 2014).

5. Domaines des protéines IFITM

Les protéines IFITM peuvent être décomposées en cinq domaines se différenciant par leur degré d'hydrophobicité, leur localisation membranaire, ainsi que par leur conservation. Ces cinq domaines comprennent un domaine hydrophobe N-terminal variable (NTD, « N-Terminal Domain ») suivi d'un domaine hydrophobe transmembranaire ou intramembranaire conservé (IM1, « IntraMembrane » ou TM1, « TransMembrane »), suivi à son tour d'une boucle intracellulaire conservée (CIL, « Conserved Intracellular Loop »), puis d'un second domaine hydrophobe transmembranaire ou intramembranaire variable (IM2 ou TM2) et enfin, d'un court domaine C-terminal hautement variable (CTD, « C-Terminal Domain »)

(figure 1). Les domaines IM1 ou TM1, et CIL définissent ensemble le domaine CD225 dont l'homologie de séquence est partagée par plus de 300 membres eucaryotes et procaryotes de la famille CD225/pfam04505 tel qu'introduit plus haut.

Les protéines IFITM présentent en effet une très forte homologie de séquence entre elles : 91 % entre IFITM2 et IFITM3, et 59 % entre IFITM2 et IFITM1 (Tartour et Cimarrelli, 2015). Ces protéines diffèrent majoritairement par la longueur de leur domaine N-terminal, celui des protéines IFITM2 et 3 étant plus long que celui d'IFITM1 de 20 et 21 acides aminés respectivement (**figure 1**). Cette disparité pourrait expliquer les différences de distributions cellulaires et d'activités antivirales observées entre ces protéines telles qu'abordées plus bas.

6. Les gènes *IFITM* et leurs orthologues chez la souris

Les protéines IFITM sont codées chez l'homme par une famille de cinq gènes : *IFITM1*, *IFITM2*, *IFITM3*, *IFITM5* et *IFITM10*, tous situés sur le chromosome 11. Les gènes *IFITM1*, 2, 3 et 5 sont rassemblés au sein d'une région de 26.5 kb proche du télomère sur le bras court du chromosome 11 tandis que le gène *IFITM10* est situé 1.4 Mb plus loin en direction du centromère (**figure 2**) (Smith *et al.*, 2014).

Chez la souris, ces mêmes gènes sont situés sur le chromosome 7 et sont orthologues de leurs homologues humains. Le génome de la souris contient, en outre, deux autres gènes *Ifitm* : *Ifitm6* également situé sur le chromosome 7 et *Ifitm7* situé sur le chromosome 16. *Ifitm7* a probablement été rétrotranscrit sans intron à partir du gène *Ifitm1*. Chez les humains ainsi que chez la souris, le gène *IFITM4/Ifitm 4* constitue un pseudogène, qui comme son nom l'indique, ne conduit pas à l'expression d'une protéine. Tous les gènes humains ou murins codant des protéines IFITM contiennent deux exons codant séparés par un intron et la plupart d'entre eux sont aussi initiés par un exon non codant additionnel (**figure 2**) (Hickford *et al.*, 2012). Des gènes analogues ont également été retrouvés chez d'autres mammifères (Siegrist *et al.*, 2009), notamment chez les marsupiaux (Hickford *et al.*, 2012) et les espèces aviaires (Smith *et al.*, 2013).

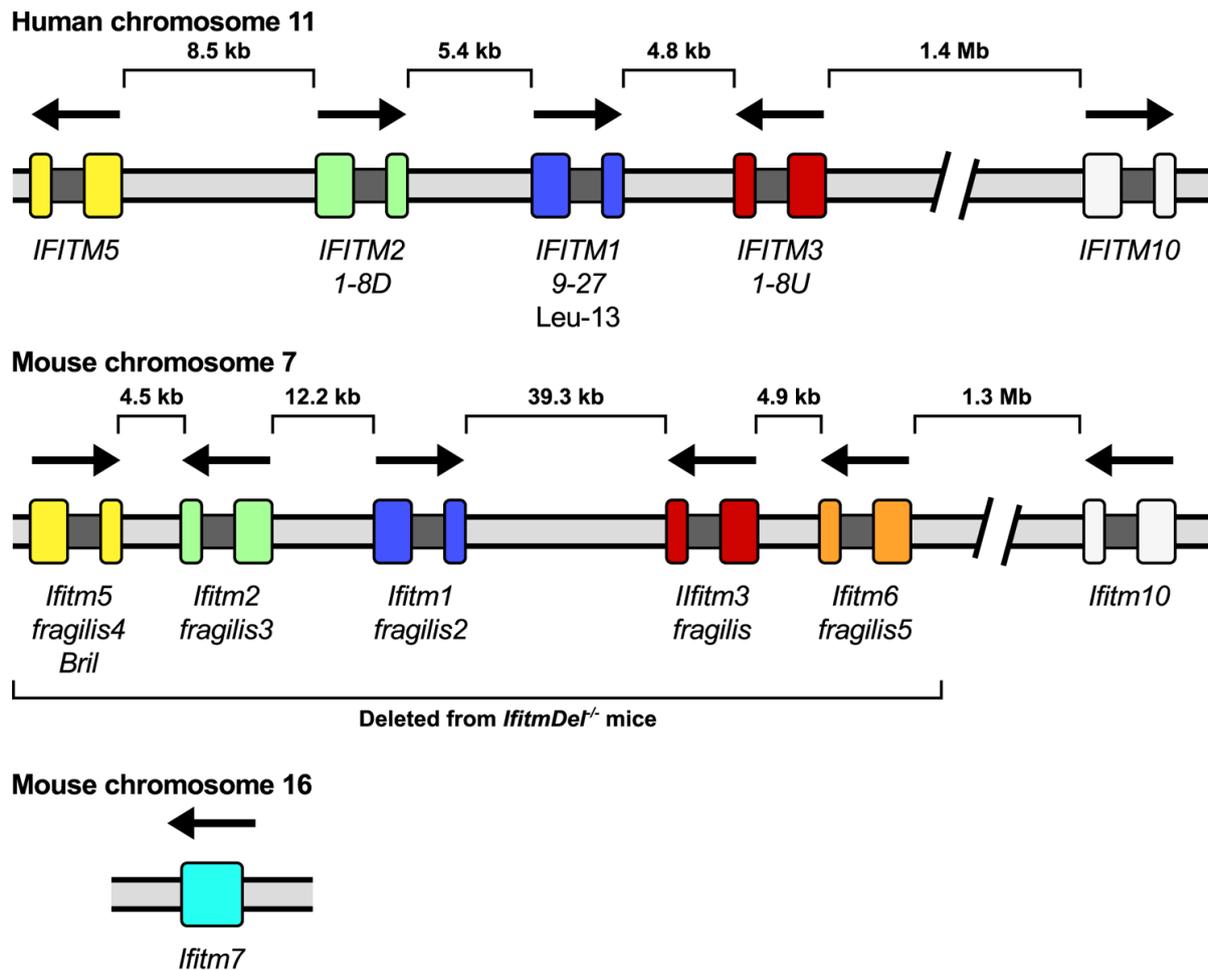


Figure 2 : Positions relatives des différents gènes IFITM sur les chromosomes humains et murins. Les exons des gènes sont représentés par des rectangles colorés tandis que leurs introns sont représentés par des carrés gris foncé situés entre les exons. Les flèches indiquent quant à elles le sens de la transcription (Bailey *et al.*, 2014).

7. Découverte de la famille IFITM et de ses propriétés antivirales

Trois gènes de la famille *IFITM* humaine, nommés 9-27 (*IFITM1*), 1-8D (*IFITM2*) et 1-8U (*IFITM3*) ont été découverts en 1991. Leur analyse a révélé que leur région promotrice contenait un ou plusieurs éléments ISRE, permettant de conclure que leur expression était hautement inductibles par les interférons de type I et II (Lewin *et al.*, 1991).

En 1995, Deblandre *et al.* ont démontré que le produit du gène 9-27 (*IFITM1*) est une protéine précédemment identifiée comme étant l'antigène Leu-13 (Deblandre *et al.*, 1995). Leu-13 a été initialement définie comme étant une petite protéine membranaire dont l'expression est induite par les interférons et qui s'associe, dans les leucocytes et les cellules

endothéliales, à d'autres protéines (tels que les composants CD19, CD21 et CD81/TAPA-1 du récepteur des lymphocytes B) (Matsumoto *et al.*, 1993) pour former un complexe à la surface cellulaire relayant des signaux d'agrégation et d'inhibition de la prolifération cellulaire (Evans *et al.*, 1990).

Un an plus tard, en 1996, Alber et Staeheli ont voulu déterminer si la protéine 9-27 (IFITM1 ou encore Leu-13) exerçait elle aussi une activité antivirale, tout comme d'autres protéines induites par les interférons, telle que MxA. Ces auteurs ont constaté que chez la souris, les cellules exprimant la protéine humaine 9-27 étaient moins sensibles à l'infection par le virus de la stomatite vésiculaire que les cellules contrôle n'exprimant pas la protéine, mais que son efficacité antivirale était moindre que celle de la protéine MxA testée en parallèle. En outre, les auteurs n'ont constaté aucune inhibition significative du virus de la grippe par la protéine 9-27. (Alber et Staeheli, 1996). Bien que ces conclusions soient aujourd'hui contestées par des études plus récentes, indiquant qu'au contraire, IFITM1 restreindrait plus efficacement le virus de la grippe que celui de la stomatite vésiculaire, Alber et Staeheli ont été les premiers à attribuer une fonction antivirale à une protéine IFITM.

Hormis une rapide mention, en 2003, de l'activité antivirale exercée par le gène 1-8 U (*IFITM3*) contre le virus de l'hépatite C (Zhu et Liu, 2003), ce n'est que 13 ans plus tard, en 2009, que les propriétés antivirales des protéines IFITM ont été redécouvertes et véritablement mises en avant. Auparavant, la plupart des études concernant les protéines IFITM s'intéressaient à leur rôle dans le développement, bien que leur forte induction par les interférons soit déjà connue (Tanaka *et al.*, 2005), et ce, jusqu'à ce qu'il ait été démontré que la délétion du locus *Ifitm* entier n'avait aucun impact sur le développement ou le phénotype apparent de souris *IfitmDel*^{-/-} (Lange *et al.*, 2008).

En 2009, Brass *et al.* ont donc identifié les protéines IFITM comme pouvant être de potentiels facteurs de restriction du virus de la grippe A lors d'un criblage par ARN interférence destiné à identifier les facteurs cellulaires modifiant la réplication du virus de la grippe. Ces auteurs ont ensuite validé leur hypothèse en constatant un accroissement de la réplication du virus de la grippe dans les cellules humaines lorsque IFITM3 était ciblée par de petits ARN interférents. Ils ont également démontré que la surexpression des protéines IFITM1, 2 et 3 inhibait la réplication de toutes les souches du virus de la grippe A examinées ainsi que celle des flavivirus du Nil Occidental et de la Dengue testés en parallèle. Ils ont observés, en outre, que les souris *IfitmDel*^{-/-} étaient d'une part, plus vulnérables à l'infection

par le virus de la grippe A et d'autre part, que l'effet antiviral des interférons de type 1 et 2 était moindre chez ces souris. Brass *et al.* ont ensuite poussé leurs investigations encore plus loin en montrant que seuls les rétrovirus pseudotypés, c'est-à-dire combinés, à différentes hémagglutinines (HA) virales (H1, H3, H5 et H7) pouvaient être efficacement restreints par les protéines IFITM1, 2 et 3, suggérant que les protéines IFITM pourraient cibler l'entrée des souches du virus de la grippe dans la cellule via leur protéine d'enveloppe HA. Les protéines IFITM ont alors été définies comme constituant une famille de facteurs de restriction antiviraux actifs contre deux familles de virus enveloppés, les familles *orthomyxoviridae* et *flaviviridae*, et participant de façon non négligeable à l'action antivirale des interférons de type 1 et 2 (Brass *et al.*, 2009).

8. Localisation des protéines IFITM

La protéine IFITM1 réside principalement dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique (Bradbury *et al.*, 1992) ainsi qu'à la membrane des endosomes précoces, tandis que les protéines IFITM2 et 3 sont majoritairement présentes à la membrane des endosomes tardifs, des lysosomes et des autolysosomes, soit au niveau des compartiments intracellulaires (Huang *et al.*, 2011 ; Feeley *et al.*, 2011). Cette distribution cellulaire des protéines IFITM pourrait être déterminée par leur domaine NTD respectif. La tyrosine 20 (Y20), appartenant au domaine NTD d'IFITM2 et 3 mais absente d'IFITM1, a notamment été identifiée comme étant un résidu clé ciblant IFITM3 aux membranes endolysosomales (**figure 1**). La mutation d'Y20 a eu pour effets de changer la localisation d'IFITM3, des compartiments endolysosomaux vers la membrane plasmique, et d'y induire son accumulation (Jia *et al.*, 2012). Y20 appartiendrait en effet à un motif Yxx ϕ (ϕ représentant un acide aminé à chaîne hydrophobe « imposante »), ici la séquence protéique 20-YEML-23, servant de signal de tri aux protéines, leur permettant d'être rapidement internalisées à partir de la membrane plasmique pour être ensuite adressées aux lysosomes. En outre, la découverte que cette tyrosine Y20 peut être phosphorylée par la tyrosine kinase Fyn suggère que l'activité de ce motif peut être régulée. Etant donné qu'il a été constaté que seule une faible proportion des protéines IFITM3 sont phosphorylées au sein de la cellule, on peut en déduire que la phosphorylation d'Y20 inhiberait la localisation d'IFITM3 au sein des membranes du système endolysosomal réprimant, par conséquent, ses fonctions antivirales. Il est en effet très probable que la phosphorylation d'Y20 empêche l'interaction du motif YEML avec la sous-

unité $\mu 2$ du complexe **AP2** (« Adapter Protein-2 ») impliqué dans le processus d'internalisation par endocytose clathrine-dépendante, ayant pour conséquence la rétention d'IFITM3 à la surface cellulaire (Jia *et al.*, 2012).

Il convient toutefois de garder à l'esprit que la quasi-totalité des études visant à déterminer la localisation des protéines IFITM au sein de la cellule ont été conduites avec des protéines IFITM étiquetées et/ou surexprimées et que ces modifications ont pu affecter dans une certaine mesure leur distribution cellulaire (Perreira *et al.*, 2013) et/ou leur activité. En effet, la surexpression de la protéine IFITM3 engendrerait d'une part, sa redistribution à la membrane plasmique et d'autre part, entraînerait un élargissement des vésicules cytoplasmiques telles que les endosomes tardifs et les lysosomes ainsi qu'une augmentation du nombre et de la taille des autolysosomes dans lesquels les particules virales sont piégées et transportées jusqu'à leur dégradation (Feeley *et al.*, 2011). De même, le type cellulaire ou tissulaire influencerait également la localisation des protéines IFITM. Par exemple, l'observation par imagerie confocale du tissu pulmonaire de souris infectées par le virus de la grippe A a confirmé la localisation endolysosomale d'Ifitm3 *in vivo* dans la plupart des types cellulaires (tels que les pneumocytes alvéolaires de type II, les cellules endothéliales, les fibroblastes et différents leucocytes), à l'exception des cellules ciliées des voies respiratoires supérieures dans lesquelles elle est apparue résider principalement à la membrane plasmique apicale et ciliée (Bailey *et al.*, 2012). Enfin, le professeur Farzan et son équipe ont observé que l'ajout d'une étiquette N-terminale destinée à rendre la protéine IFITM3 fluorescente avait eu des répercussions non seulement sur sa localisation cellulaire mais aussi sur l'efficacité de son action antivirale. La protéine ainsi modifiée est apparue de façon marquée et inhabituelle au niveau périnucléaire. Bien que sa capacité à restreindre le virus de Marburg n'ait pas été affectée, son action antivirale dirigée contre le virus de la grippe A s'est-elle, par contre, montrée amoindrie (C.C. Bailey, G. Zhong, I. Huang & M. Farzan, données non publiées).

9. *Topologies membranaires et modifications post-traductionnelles des protéines IFITM*

Après avoir fait l'objet de nombreux débats, la topologie membranaire des protéines IFITM n'est toujours pas clairement établie.

En raison d'éléments démontrant l'accessibilité d'épitopes situés aux extrémités N et C-terminales des protéines IFITM, leur topologie a tout d'abord été décrite comme étant celle adoptée par les protéines membranaires de type 3, à savoir deux domaines transmembranaires orientant dès lors les extrémités N et C-terminales de la protéine vers la lumière du réticulum endoplasmique ou vers l'espace extracellulaire, ayant été établi que le domaine CIL est obligatoirement intracellulaire, puisque lié par un anticorps reconnaissant sa séquence uniquement après perméabilisation de la cellule et non lorsque la cellule est intacte (Smith *et al.*, 2006) (**figure 3**). Parmi ces éléments figurent la reconnaissance à la membrane plasmique, par cytométrie en flux, d'étiquettes portées par les extrémités N ou C-terminales de protéines IFITM (Brass *et al.*, 2009 ; Weidner *et al.*, 2010 ; Li *et al.*, 2013), ainsi que la reconnaissance par un anticorps de la partie N-terminale de la protéine IFITM1 (antigène Leu-13) exprimée à la surface de leucocytes humains, cette reconnaissance induisant, par ailleurs, l'agrégation des cellules T (Chen *et al.*, 1984).

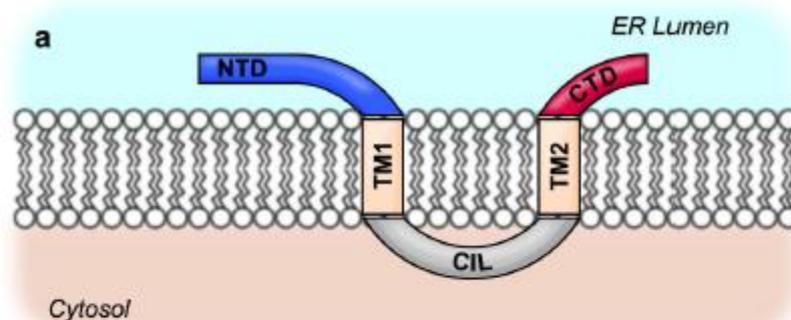


Figure 3 : Premier modèle de topologie membranaire (type 3) proposé pour les protéines IFITM (Bailey *et al.*, 2014)

Cette première théorie a ensuite été remise en question par la découverte de modifications post-traductionnelles touchant notamment les extrémités N et C-terminales des protéines IFITM et ne pouvant avoir lieu que dans le cytosol, telles que l'ubiquitination de la lysine 24 (Lys24) d'IFITM3 (Yount *et al.*, 2012), la phosphorylation de sa tyrosine 20, discutée plus haut (Jia *et al.*, 2012), ou encore la palmitoylation d'une cystéine C-terminale de

la protéine Ifitm1 murine (Hach *et al.*, 2013) (**figures 1 et 4**). De plus, il a été démontré qu'une protéine IFITM3 modifiée pour contenir un site de myristoylation à son extrémité N-terminale et un site de prénylation à son extrémité C-terminale, et restreignant la réplication du virus de la grippe A, est bien myristoylée et prénylée par des enzymes cytosoliques (Yount *et al.*, 2012). Un second modèle de topologie membranaire pour les protéines IFITM a alors été proposé par Yount *et al.*, dans lequel les domaines NTD, CIL et CTD font tous face au cytosol ayant pour conséquence que les régions hydrophobes les séparant ne traversent plus la membrane d'un bout à l'autre mais soient seulement insérées en son sein, définissant les protéines membranaires de type 1 (Yount *et al.*, 2012) (**figure 5**). La palmitoylation de trois cystéines (C71, 72 et 105) de la protéine IFITM3 humaine situées dans le domaine IM1 (C71 et C72) et à la jonction entre le CIL et le domaine IM2 (C105) plaide également en faveur d'un premier domaine hydrophobe intramembranaire ou associé à la membrane, d'autant plus que la palmitoylation de ces trois cystéines est requise pour que la protéine puisse pleinement exercer son activité antivirale. Ces palmitoylations permettraient l'adressage voire l'ancrage de la protéine à la membrane (Yount *et al.*, 2010). Tandis que l'ubiquitination des lysines d'IFITM3 situées dans le NTD (Lys 24) et dans le CIL (Lys83, Lys 88 et Lys104) n'aurait d'autre fonction que de réguler le niveau d'expression de la protéine, sa surexpression pouvant en effet être délétère au fonctionnement normal de la cellule en dehors de toute infection virale (Shan *et al.*, 2013) (**figure 1 et 4**). D'autres arguments en faveur de cette topologie ont également été avancés. La localisation d'IFITM3 au sein du feuillet cytosolique de la membrane la protégerait de la digestion par les enzymes lysosomales ainsi que de la neutralisation par les virus entrant. Cette topologie intramembranaire pourrait également modifier les propriétés biophysiques des membranes, mécanisme par lequel IFITM3 pourrait exercer son action antivirale (Perreira *et al.*, 2013).

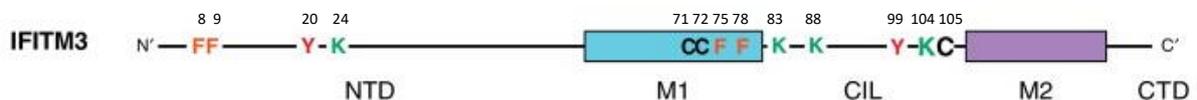


Figure 4 : Représentation linéaire de la protéine IFITM3 mettant en évidence ses acides aminés clés dont certains font l'objet de modifications post-traductionnelles (figure adaptée de Smith *et al.*, 2014).

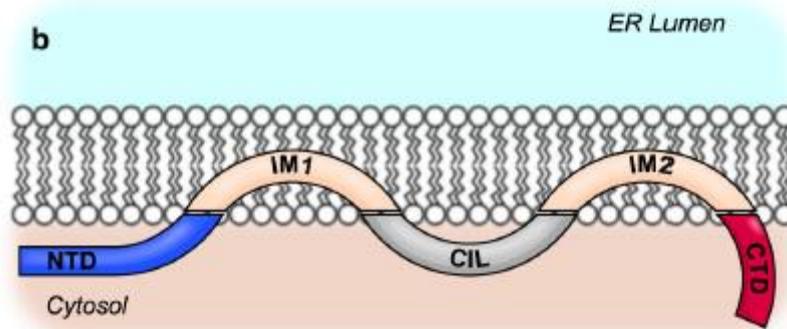


Figure 5 : Deuxième modèle de topologie membranaire (type 1) proposé pour les protéines IFITM (Bailey et *al.*, 2014)

Enfin, l'hypothèse d'une topologie membranaire intermédiaire aux deux autres a également été avancée sur la base de nouvelles investigations menées sur la protéine IFITM3 murine (Bailey et *al.*, 2013). Dans ce modèle, le domaine NTD serait cytosolique et le domaine CTD serait extracellulaire impliquant que le premier domaine hydrophobe soit intramembranaire et que le second soit transmembranaire, décrivant la topologie partagée par les protéines membranaires de type 2 (**figure 6**). Cette fois, les auteurs ont utilisé des cellules imperméabilisées afin de s'assurer que les anticorps fluorescents, utilisés pour reconnaître les étiquettes FLAG ajoutées aux extrémités N et C-terminales d'Ifitm3, ne puissent pas atteindre et reconnaître leurs épitopes si ceux-ci sont situés du côté intracellulaire de la membrane. L'analyse, par cytométrie en flux, de la fluorescence indirecte émise par les épitopes FLAG N et C-terminaux a alors révélé que bien que ces épitopes aient été tous deux détectés du côté extracellulaire de la membrane, le signal émis par l'épitope C-terminal était bien plus intense que celui émis pour l'autre épitope, suggérant que le domaine CTD d'Ifitm3 serait extracellulaire. Ensuite, afin de déterminer la proportion d'épitopes N et C-terminaux intra et extracellulaires, la protéine Ifitm3 a été marquée par deux autres étiquettes Myc (N-terminale) et C9 (C-terminale) et l'intensité de leur fluorescence respective a été observée par microscopie de fluorescence dans des cellules imperméabilisées ou non. La fluorescence indirecte émise par l'épitope N-terminal Myc n'est apparue de façon prononcée que dans des cellules intactes et perméables tandis que celle de l'épitope C-terminal C9 s'est révélée être d'égale intensité que les cellules aient été imperméabilisées ou non. En outre, l'adjonction d'un motif KDEL, lié par des chaperones séquestrant les protéines dans le Réticulum Endoplasmique (RE), à l'extrémité C-terminale d'Ifitm3 a eu pour conséquence de bloquer la protéine dans le RE, indiquant qu'Ifitm3 adopte une topologie membranaire exposant son

extrémité C-terminale à la lumière du RE. Et enfin, une dégradation C-terminale d'Ifitm3, probablement engendrée par des enzymes lysosomales, a également été observée. Quant aux domaines IM ou TM de la protéine, les auteurs ont déterminé que seul le domaine TM2 peut être exprimé seul et traverser la membrane, contrairement au domaine IM1 qui lui ne peut être exprimé seul et qui servirait plutôt de signal d'ancrage à la membrane. Tous ces éléments tendent à prouver que l'extrémité C-terminale d'Ifitm3 serait extracellulaire, ou encore orientée vers la lumière du RE, tandis que son extrémité N-terminale serait majoritairement intracellulaire. En effet, la détection par cytométrie en flux de l'extrémité N-terminale d'IFITM3 à la surface extracellulaire pourrait signifier qu'une autre conformation de la protéine existe soit, identique à celle adoptée par les protéines membranaires de type 3 soit, correspondant à une complète inversion de la protéine. Ces deux topologies pourraient permettre à la protéine Ifitm3 d'exercer des fonctions différentes, telles que la restriction virale ou bien l'adhésion cellule-cellule (Evans *et al.*, 1990 ; Chen *et al.*, 1984), en fonction du type cellulaire. Puisque par exemple, dans l'étude décrite ci-dessus, l'adoption par la protéine Ifitm3 d'une topologie membranaire de type 3 ou inversée n'a été observée que dans les cellules 293T (isolées de reins embryonnaires humains) et non dans les MEFs (« Mouse Embryonic Fibroblasts ») (Bailey *et al.*, 2013).

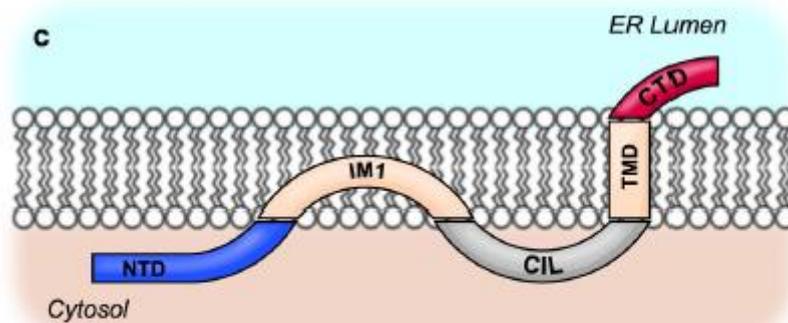


Figure 6 : Troisième modèle de topologie membranaire (type 2) proposé pour les protéines IFITM (Bailey *et al.*, 2014)

Cette topologie membranaire prédominante est également celle révélée par une étude structurale récente, combinant les approches de **RMN (Résonance Magnétique Nucléaire)** en solution et de **RPE (Résonance Paramagnétique Electronique)**. Cette étude a montré que la protéine IFITM3 en micelles de détergent adopterait la structure et la topologie suivante : deux courtes hélices alpha intramembranaires N-terminales connectées via une petite boucle

flexible à une longue hélice alpha transmembranaire C-terminale (**figure 7**) (Ling *et al.*, 2016).

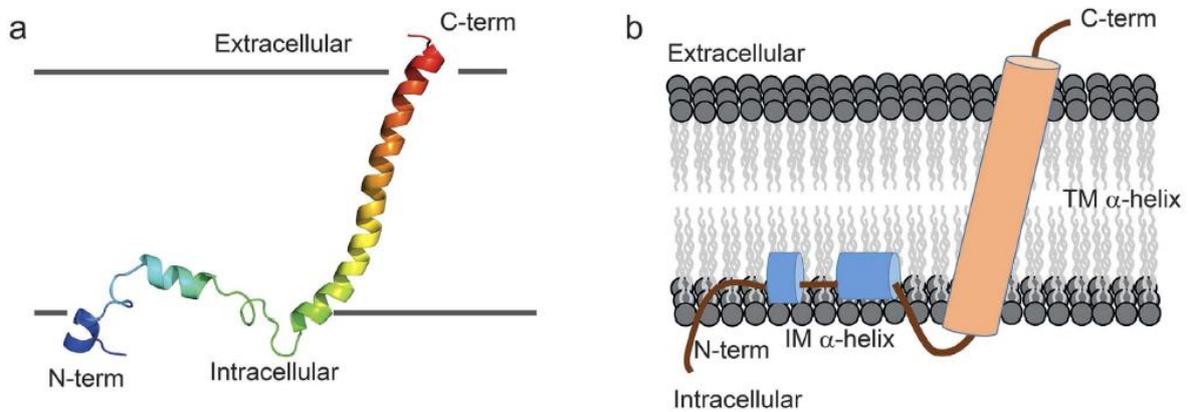


Figure 7 : (a) Structure des domaines hydrophobes de la protéine IFITM3 obtenue par analyse RMN en solution, comprenant deux courtes hélices α intramembranaires N-terminales suivies d'une longue hélice α transmembranaire C-terminale. (b) Représentation schématique de l'insertion de la protéine IFITM3 et de ses hélices au sein de la membrane (Ling *et al.*, 2016).

Yount et son équipe ont ensuite également mis en évidence l'existence de ces trois mêmes régions en hélice alpha au sein de la protéine IFITM3 humaine, en utilisant cette fois des programmes bioinformatiques de prédiction de la structure secondaire des protéines. L'analyse approfondie de la première hélice alpha N-terminale prédite (acides aminés 59 à 68, séquence VWSLFTNLFM), par un autre logiciel de prédiction de structure a par ailleurs révélé que celle-ci serait amphipathique, signifiant qu'une de ses faces serait hydrophobe et que l'autre serait hydrophile en raison de la nature (hydrophobe ou hydrophile) des acides aminés constituant chacune de ces faces. Après avoir démontré l'importance de cette hélice et de son caractère amphipathique pour l'activité antivirale d'IFITM3, ces auteurs ont alors proposé un nouveau modèle de topologie membranaire pour IFITM3, le dernier en date (**figure 8**) (Chesarino *et al.*, 2017).

A H:Helix; S:Strand; C:Coil

```

1                               50
IFITM3 Seq MNHTVQTFSPVNSGQPPNYEMLKEEHEVAVLGAPHNPAPPTSTVIHIRS
Prediction CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCSSCCCC
Conf Score 999889878998999999988887655666778999998888863340689

51           Hydrophobic Domain 1           100
IFITM3 Seq ETSVPDHVVWSLFNTLFMNPCCLGFIAPAYSVKSRDRKMVGDVTGAQAYA
Prediction CCCCCCCHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
Conf Score 99998626299999999723510099999998406778658999999999

101          Hydrophobic Domain 2          133
IFITM3 Seq STAKCLNIWALILGILMTILLIVIPVLIFQAYG
Prediction HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
Conf Score 9999999999999999999999999999999999999999999999999999999999999999

```

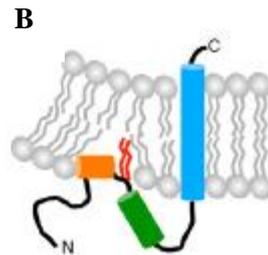


Figure 8 : (A) Résultats de la prédiction de structure secondaire d'IFITM3 générés par la méthode I-TASSER (« Iterative Threading Assembly Refinement ») sur la base de sa séquence en acides aminés. La séquence correspondant à l'hélice amphipathique est surlignée en orange (B) Modèle de topologie membranaire proposé le plus récemment pour la protéine IFITM3. Les hélices prédites en (A) sont représentées par des cylindres colorés tandis que la S-palmitoylation des cystéines 71 et 72 est représentée par des lignes rouges (Chesarino *et al.*, 2017).

10. Restriction du virus de la grippe A par IFITM3

Des études *in vitro*, menées sur des cultures cellulaires, ont montré que toutes les protéines IFITM liées à l'immunité, qu'elles soient humaines (IFITM1, 2 et 3) ou murines (Ifitm 1, 2 et 3, à l'exception d'Ifitm6 (Huang *et al.*, 2011)), sont capables de restreindre le virus de la grippe A et ce, concernant toutes les souches du virus testées à savoir H1N1, H3N2, H5N1, H7N1 et des isolats d'H7N9. Ces mêmes études suggèrent que la protéine IFITM3 restreindrait plus efficacement l'entrée du virus de la grippe A que les protéines IFITM1 et 2. De même, des études réalisées *in vivo* chez la souris indiquent qu'Ifitm3 joue un rôle prédominant dans le contrôle de l'infection par le virus de la grippe A suggérant que la contribution des deux autres protéines Ifitm1 et 2 serait faible voire nulle. En effet, des souris knock-out *Ifitm3*^{-/-} ou *IfitmDel*^{-/-} ont réagi de manière identique à l'infection par une souche pathogène du virus de la grippe A H1N1. Ces souris ont notamment perdu du poids plus rapidement que les souris de type sauvage et ont toutes dûes être euthanasiées tandis qu'environ 40% des souris de type sauvage sont parvenues à contrer l'infection et se sont rétablies. Des souris hétérozygotes *Ifitm3*^{+/-} et *IfitmDel*^{+/-} ont quant à elle développé une réponse intermédiaire à l'infection suggérant un effet dose-dépendant du gène *Ifitm3* (Bailey *et al.*, 2012). En outre, la délétion du locus *Ifitm* chez ces souris (*IfitmDel*^{-/-}) a également engendré une réduction de plus de 50 % de l'efficacité de la réponse antivirale induite par les interférons face à l'infection par le virus de la grippe signifiant que ces protéines effectrices jouent un rôle prépondérant dans la défense de notre organisme contre le virus de la grippe (Brass *et al.*, 2009).

Un autre argument en faveur du rôle central joué par IFITM3 dans la défense contre le virus de la grippe A est l'observation de la surreprésentation, chez des patients touchés par l'épidémie de grippe H1N1 survenue en 2009 ou par la grippe saisonnière de 2009-2010 et hospitalisés pour cette raison, d'une variation dans la séquence du gène IFITM3, nommée SNP (« Single Nucleotide Polymorphism ») rs 12252-C ou -C/C. Il s'agit du polymorphisme d'un seul nucléotide, une thymine (T) étant ici substituée par une cytosine (C) sur l'un ou sur les deux allèles du gène *IFITM3*. Dans cette étude, 5,7 % des 53 patients investigués en Grande-Bretagne possédaient les deux allèles rs 12252-C/C dans leur génome tandis que sur 1000 européens, seuls 0,3 % d'entre eux se sont avérés être hétérozygotes pour rs 12252-C (Everitt *et al.*, 2012). Cette variation génétique est donc rare chez les européens, ce qui pourrait expliquer en partie pourquoi d'autres études similaires menées au Portugal, en Espagne et au Royaume-Uni n'ont pas conclu à une association entre le variant rs 12252-C et

la sévérité de l'infection par le virus de la grippe (Mills *et al.*, 2014 ; Gaio *et al.*, 2016 ; Lopez-Rodriguez *et al.*, 2016). Cependant, elle est beaucoup plus fréquente chez les chinois Han (principale ethnie en Chine, constituant 92 % de la population chinoise) puisque jusqu'à 25 % d'entre eux possèderaient le génotype CC (Abecasis *et al.*, 2012). En outre, toutes les études menées en Chine ont confirmé l'existence d'une association entre le variant rs 12252-C et la gravité de l'infection par le virus de la grippe. Cependant, ce variant ne semblerait pas augmenter le risque de survenue de l'infection (Zhang *et al.*, 2013 ; Pan *et al.*, 2017). Une étude récente a notamment montré que le génotype CC était beaucoup plus fréquent chez les patients chinois infectés par le virus de la grippe et souffrant d'une infection respiratoire aiguë sévère que chez ceux également infectés mais ne présentant que les symptômes bénins caractéristiques de l'infection (61,59 % versus 27,16 %). Ces mêmes auteurs ont également conclu que le génotype CC augmenterait de 4,67 fois le risque de développer une infection sévère comparé aux deux autres génotypes CT et TT (Pan *et al.*, 2017).

Plusieurs polymorphismes d'un seul nucléotide ont été identifiés dans la région codante du gène IFITM3. Dans le cas du polymorphisme SNP rs 12252-C présent dans le premier exon du gène, la substitution d'une thymine par une cytosine entraînerait la création d'un nouveau site accepteur d'épissage générant une protéine variante d'IFITM3 déléetée de ses 21 premiers acides aminés N-terminaux (IFITM3 N Δ 21 – Code Ensembl : ENST00000526811). Bien que ce variant d'épissage n'ait pas été détecté dans les lignées cellulaires lymphoblastoïdes homozygotes pour rs 12252-C, celles-ci se sont montrées plus sensibles à l'infection par le virus de la grippe A et ont exprimé la protéine IFITM3 à des niveaux plus faibles que ceux exprimés par les mêmes cellules homozygotes pour le variant TT. En outre, des cellules humaines d'adénocarcinome A549, dans lesquelles a été exprimée la protéine IFITM3 N Δ 21, ont quant à elles échoué à restreindre la réplication du virus de la grippe A contrairement aux mêmes cellules exprimant la protéine IFITM3 non tronquée (Everitt *et al.*, 2012). En effet, la délétion de cette portion N-terminale engendrerait la perte d'un acide aminé clé pour la fonction de la protéine IFITM3, la tyrosine 20 (Y20) (**figure 1**). Cette tyrosine ferait partie d'une séquence signal d'internalisation à partir de la membrane plasmique permettant à la protéine IFITM3 d'atteindre les compartiments intracellulaires au sein desquels elle exerce son action antivirale, notamment contre le virus de la grippe A (Jia *et al.*, 2012). IFITM3 N Δ 21 ou Δ Y20 resterait donc localisée à la membrane plasmique ce qui aurait pour conséquence d'accroître son activité antivirale contre le virus de l'immunodéficienc e humaine de type 1 (VIH -1), entrant dans la cellule par fusion directe avec

la membrane plasmique, au détriment de celle qu'elle exerce contre d'autres virus pénétrant dans la cellule via la voie endolysosomale (Compton *et al.*, 2016).

11. *Autres virus inhibés par les protéines IFITM*

Le tableau 1 liste la plupart des virus restreints par les protéines IFITM et rassemble des informations concernant leur génome et leur mode d'entrée dans la cellule (type d'endocytose, site d'entrée, protéine de fusion impliquée). Une évaluation de la spécificité d'action des différentes IFITM contre ces virus y apparaît également. L'analyse de ces données a permis de mettre en évidence des caractéristiques communes aux différents virus inhibés par l'ensemble des protéines IFITM ainsi que par chaque protéine IFITM en particulier. Les protéines IFITM semblent ainsi restreindre majoritairement l'entrée des virus à ARN enveloppés (à la seule exception du réovirus qui lui est non enveloppé), quelle que soit la classe de leur protéine de fusion et leur site d'entrée dans la cellule. Cependant, IFITM1 pourrait cibler plus spécifiquement les virus entrant au niveau des endosomes précoces tandis qu'IFITM3 restreindrait plus efficacement ceux entrant au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes (Perreira *et al.*, 2013). Quant à la protéine IFITM2, elle agirait avec la même spécificité qu'IFITM3 bien qu'avec une moindre efficacité (Brass *et al.*, 2009). Ces observations sont en accord avec la distribution connue des protéines IFITM au sein de la cellule, elles agiraient donc logiquement là où elles se trouvent. En outre, l'efficacité antivirale d'IFITM3 ne semble pas diverger d'un type cellulaire à l'autre contrairement à celle d'IFITM1, suggérant que le mode d'action de cette dernière pourrait également être spécifique du type cellulaire (Perreira *et al.*, 2013).

Les virus préférentiellement restreints par IFITM3, c'est-à-dire ceux entrant dans la cellule hôte par fusion membranaire dans les endosomes tardifs et les lysosomes, ont en commun de fusionner à un faible pH (< à 6) et de nécessiter la présence d'une protéine de l'hôte, RAB7, associée aux endosomes tardifs et nécessaire à leur régulation. C'est notamment le cas du virus de la grippe A, du virus de la Dengue et d'autres flavivirus, ainsi que des *bunyaviridae* incluant le virus de la fièvre de la vallée du Rift. Cependant, parmi les bunyavirus, tous ne présentent pas la même sensibilité à l'action antivirale exercée par les protéines IFITM, bien qu'ils expriment une glycoprotéine de fusion similaire. Ainsi figurent par ordre de sensibilité croissante, le virus de Lacrosse, le virus de la fièvre de la vallée du Rift (uniquement restreint par IFITM2 et 3), le virus Andes et le virus Hantaan. De façon

surprenante, un autre bunyavirus, le virus de la **Fièvre Hémorragique de Crimée-Congo (FHCC)**, n'est lui aucunement sensible aux propriétés antivirales des protéines IFITM1, 2 et 3 (Mudhasani *et al.*, 2013).

Tableau 1 : Virus restreints par les protéines IFITMs

Groupe	Famille	Virus	Enveloppe	Endocytose	Site d'entrée	Protéine de fusion	Spécificité des IFITMs	Références
Groupe III (virus à ARN double brin)	<i>Reoviridae</i>	Réovirus	Non	Endocytose clathrine-dépendante	Endosomes tardifs (RAB7+/- RAB9+, pH 5,5)	/	IFITM3	Anafu <i>et al.</i> , 2013 ; Danthi <i>et al.</i> , 2013
Groupe IV (virus à ARN simple brin à polarité positive)	<i>Coronaviridae</i>	Coronavirus SRAS	Oui	Endocytose clathrine-dépendante	Lysosomes (pH 4,5)	Classe I (clivée par les cathepsines B et L)	Variable en fonction du type cellulaire	Huang <i>et al.</i> , 2011 ; Inoue <i>et al.</i> , 2007
	<i>Flaviviridae</i>	- Dengue - Fièvre hémorragique d'Omsk - Fièvre jaune - Nil Occidental	Oui	Endocytose clathrine-dépendante	Endosomes tardifs (RAB7+, pH 5,5)	Classe II	IFITM3 > IFITM1 > IFITM2	Brass <i>et al.</i> , 2009 ; Jiang <i>et al.</i> , 2010 ; Schoggins <i>et al.</i> , 2011 ; Chen <i>et al.</i> , 1999 ; Zaitseva <i>et al.</i> , 2010 ; Smit <i>et al.</i> , 2011 ; Chan <i>et al.</i> , 2012
		Hépatite C	Oui	Endocytose clathrine-dépendante	Endosomes précoces (RAB5+, pH 6,5)	Classe II	IFITM1 > IFITM2/IFITM3	Wilkins <i>et al.</i> , 2013 ; Narayana <i>et al.</i> , 2015
		Zika	Oui	Endocytose clathrine-dépendante	Endosomes précoces (RAB5+, pH 6,5)	Classe II	IFITM3 > IFITM1	Meertens <i>et al.</i> , 2017 ; Savidis <i>et al.</i> , 2016
	<i>Togaviridae</i>	- Sindbis - Virus de la forêt de Semliki (alphavirus)	Oui	Endocytose clathrine-dépendante	Endosomes précoces (RAB5+, pH 6,5)	Classe II	IFITM3 > IFITM2 Pas IFITM1	Weston <i>et al.</i> , 2016
Groupe V (virus à ARN simple brin à polarité)	<i>Bunyaviridae</i>	- Andes - Hantaan - La Crosse	Oui	- Endocytose clathrine-dépendante - Inconnue (Andes)	Endosomes tardifs (RAB7+, pH 5,5)	Classe II	IFITM1/IFITM2/IFITM3	Mudhasani <i>et al.</i> , 2013 ; Hollidge <i>et al.</i> , 2012 ; Arikawa <i>et al.</i> , 1985 ; McNulty <i>et al.</i> , 2013 ; Jin <i>et al.</i> , 2002 ; McCaughy <i>et al.</i> , 1999

négative)		Fièvre de la vallée du Rift	Oui	Endocytose calvéoline-dépendante (Cav1/dynamine2)	Endosomes tardifs (RAB7+, pH 5,5)	Classe II	IFITM2/IFITM3 Pas IFITM1	Mudhasani <i>et al.</i> , 2013 ; Harmon <i>et al.</i> , 2012
	<i>Filoviridae</i>	- Ebola - Marburg	Oui	Macropinocytose	Lysosomes (NPC1+, pH 4,5)	Classe I (clivée par les cathepsines B et L)	IFITM1/IFITM3 (dépend du type cellulaire)	Huang <i>et al.</i> , 2011 ; Hunt <i>et al.</i> , 2012 ; Carette <i>et al.</i> , 2011 ; Cote <i>et al.</i> , 2011
	<i>Orthomyxoviridae</i>	Grippe A	Oui	Endocytose clathrine-dépendante, macropinocytose	Endosomes tardifs (RAB7+, pH 5,5)	Classe I	IFITM3 > IFITM2 > IFITM1	Brass <i>et al.</i> , 2009 ; Huang <i>et al.</i> , 2011 ; Feeley <i>et al.</i> , 2011 ; Li <i>et al.</i> , 2013 ; Chen <i>et al.</i> , 1990 ; Leung <i>et al.</i> , 2012
	<i>Rhabdoviridae</i>	VSV (vésiculovirus)	Oui	Endocytose clathrine-dépendante	Endosomes précoces (RAB5+, pH 6,5)	Classe III	IFITM1/IFITM3 > IFITM2	Brass <i>et al.</i> , 2009 ; Li <i>et al.</i> , 2013 ; Mudhasani <i>et al.</i> , 2013 ; Harmon <i>et al.</i> , 2012 ; Weidner <i>et al.</i> , 2010 ; Finkelshtein <i>et al.</i> , 2013
		Rage (lyssavirus)	Oui	Endocytose clathrine-dépendante	Endosomes (pH optimal : 5.8-6)	Classe III	IFITM3 > IFITM2	Smith <i>et al.</i> , 2013 / Albertini <i>et al.</i> , 2012
Groupe VI (rétrovirus à ARN simple brin à polarité positive)	<i>Retroviridae</i>	JSRV (bêta rétrovirus)	Oui	Endocytose associée à la dynamine	Endosomes précoces (RAB5+, pH 6,5)	Classe I	IFITM1 > IFITM2/IFITM3 (dépend du type cellulaire)	Li <i>et al.</i> , 2013 ; Bertrand <i>et al.</i> , 2008 ; Cote <i>et al.</i> , 2009
		VIH-1 (lentivirus)	Oui	Inconnue	Surface cellulaire	Classe I	IFITM2/IFITM3 > IFITM1 IFITM3 ne restreint pas l'infection par le VIH-1 dans les cellules TZM-bl et HeLa	Yu <i>et al.</i> , 2015 ; Tartour <i>et al.</i> , 2014 ; Shi <i>et al.</i> , 2017

Au contraire, les virus restreints par IFITM1 dans les endosomes précoces fusionnent eux à un pH plus élevé (> à 6) et dépendent de la présence de la protéine RAB5 associée aux endosomes précoces, tels que le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), le virus de l'hépatite C et le rétrovirus Jaagsiekte ovin (« Jaagsiekte Sheep RetroVirus », JSRV). Cependant, les protéines IFITM inhiberaient l'entrée du VSV dans la cellule hôte bien moins efficacement que celle d'autres virus utilisant le même site d'entrée (Brass *et al.*, 2009 ; Weidner *et al.*, 2010). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le VSV ne fusionnerait pas directement avec la membrane délimitant les endosomes tardifs/corps multivésiculaires mais le ferait à partir de vésicules intraluminales avec lesquelles le virus aurait fusionné au préalable. Ce type de fusion serait restreint beaucoup moins efficacement par les protéines IFITM, semblant cibler spécifiquement la fusion entre les membranes virale et endolysosomale, et permettrait par conséquent au virus d'échapper, tout du moins en partie, à l'action antivirale exercée par les IFITM. Concernant le virus de l'Hépatite C, il a été démontré qu'IFITM1 pourrait restreindre l'entrée du virus dans les hépatocytes en perturbant les interactions séquentielles entre le virus et les co-récepteurs de l'hôte, en particulier CD81 (Wilkins *et al.*, 2013). Quant à IFITM2 et 3, elles complémenteraient l'action d'IFITM1 en inhibant les étapes tardives de l'entrée du virus, probablement en piégeant le virion dans la voie endosomale, le conduisant à sa dégradation dans les lysosomes (Narayana *et al.*, 2015).

Le VIH-1 ainsi que le virus respiratoire syncytial (VRS) se sont également montrés vulnérables à l'action antivirale des protéines IFITM alors que contrairement aux virus cités plus haut, ils fusionnent à la membrane plasmique. Il a notamment été mis en évidence que les souris *Ifitm3*^{-/-} étaient bien plus enclines à être infectées par le VRS que les souris de type sauvage (Everitt *et al.*, 2012). Il n'est cependant pas surprenant que le VRS soit sensible à l'action de la protéine IFITM3 puisque ce virus entre principalement au niveau de la membrane apicale des cellules respiratoires ciliées au sein de laquelle IFITM3 est présente en grande concentration (Bailey *et al.*, 2012 ; Zhang *et al.*, 2002). Néanmoins, on ne peut exclure que les IFITM restreignent ces virus à une autre étape du cycle viral que celle de leur entrée tel qu'il l'a été suggéré pour le VIH-1. En effet, les protéines IFITM, et en particulier IFITM2 et 3, interagiraient spécifiquement avec la glycoprotéine d'enveloppe Env du VIH dans les cellules productrices du virus. Cette interaction compromettrait la maturation ainsi que l'incorporation d'Env dans les virions, inhibant dès lors sa capacité à engendrer l'infection de cellule à cellule (Yu *et al.*, 2015). Il a également été proposé que les protéines IFITM seraient incorporées dans les particules virales et diminueraient leur infectiosité en altérant leur

pouvoir fusogène, affectant par conséquent leur entrée dans les cellules cibles (Compton *et al.*, 2014 ; Tartour *et al.*, 2014).

Le réovirus est le seul virus non enveloppé, connu à ce jour, inhibé par une protéine IFITM (Anafu *et al.*, 2013). Ne pouvant pas fusionner avec la membrane des endosomes tardifs, il la perce (Chandran *et al.*, 2002). Cependant, tout comme pour les filovirus (Chandran *et al.*, 2005) et le coronavirus **SRAS** (Syndrome **R**espiratoire **A**igu **S**évère) (Huang *et al.*, 2006), son entrée dans la cellule requièrerait l'action de cathepsines, dépendantes du pH acide, pour cliver ses protéines de capsides et permettre à son génome de pénétrer dans le cytoplasme (Ebert *et al.*, 2002). En outre, il a été démontré que la levée de cette dépendance aux protéases cellulaires permettait à ces virus d'échapper à leur restriction par les protéines IFITM (Huang *et al.*, 2011 ; Anafu *et al.*, 2013 ; Chandran *et al.*, 1998), renforçant l'idée que les IFITM ciblent des mécanismes d'entrée communs à différents virus.

Cependant, plusieurs virus remettent en cause ces conclusions à moins qu'ils ne constituent que des exceptions. Il s'agit notamment du coronavirus SRAS et des virus Ebola et Marburg. Bien qu'ils pénètrent dans la cellule à une étape tardive de la voie endolysosomale, ces virus ont été inhibés plus efficacement par IFITM1 que par IFITM3 (Huang *et al.*, 2011). Ces virus ont en commun de dépendre de l'activité enzymatique des cathepsines lysosomales pour activer leurs protéines de fusion (Huang *et al.*, 2006 ; Chandran *et al.*, 2005). Cependant, l'expression des IFITM n'a engendré aucun changement notable du niveau d'activité de la cathepsine L dans des lysats cellulaires ou encore de l'expression à la surface cellulaire du récepteur ACE2 du coronavirus SRAS (Huang *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2003). A l'inverse, seul le flavivirus Zika ou encore certains *togaviridae*, plus récemment étudiés et fusionnant au niveau des endosomes précoces, ont été restreints plus activement par IFITM3 que par IFITM1 (Meertens *et al.*, 2017 ; Monel *et al.*, 2017 ; Savidis *et al.*, 2016 ; Weston *et al.*, 2016). Les arénavirus, qu'ils soient de l'ancien (virus de Lassa et virus de la chorioméningite lymphocytaire) ou du nouveau monde (virus Machupo et virus Junin), se sont eux montrés résistants à l'action antivirale des protéines IFITM bien que, comme le bunyavirus FHCC également non restreint par les IFITM, ces virus fusionnent au niveau des endosomes tardifs à un pH de 5,5 (Brass *et al.*, 2009 ; Huang *et al.*, 2011 ; Mudhasani *et al.*, 2013). En outre, tout comme le VIH-1, le virus leucémogène murin de Moloney ainsi que le virus Sendai, sont des virus enveloppés fusionnant à la surface cellulaire sans dépendre du pH, cependant contrairement au VIH-1, ces virus échappent au contrôle des IFITM (Brass *et al.*, 2009 ; Hach *et al.*, 2013).

Enfin, il convient de garder à l'esprit que les observations décrites plus haut peuvent avoir été influencées par un certain nombre de facteurs et que, par conséquent, il est difficile d'en déduire des généralités. Tout d'abord, la sensibilité des virus aux propriétés antivirales des protéines IFITM peut varier en fonction du type cellulaire, de la charge virale, de la protéine IFITM impliquée et de son niveau d'expression, ainsi qu'en fonction des éventuelles conséquences indirectes de sa surexpression. En outre, concernant les études n'ayant utilisé que des virus vivants et non des rétrovirus pseudotypés, une éventuelle action des protéines IFITM à une autre étape du cycle viral que celle de l'entrée virale ne peut être exclue. Enfin, la réponse antivirale observée pourrait également résulter d'une interférence potentielle entre les protéines IFITM et d'autres facteurs de l'hôte impliqués dans l'entrée virale (Bailey *et al.*, 2014). On peut également imaginer que certains virus ou classes de virus aient développés des mécanismes permettant d'échapper au contrôle des protéines IFITM.

12. Mécanisme(s) d'action

D'une manière générale, les protéines IFITM empêchent la fusion des virus enveloppés avec les membranes des compartiments endolysosomaux, après que ces virus se soient liés à la surface cellulaire et ait été endocytés. Les IFITM restreignent donc l'accès des virus enveloppés au cytoplasme de la cellule. Ces virus se retrouvent alors piégés dans la voie endolysosomale jusqu'à leur destruction dans les lysosomes ou autolysosomes. Feeley *et al.* ont notamment observé, que dans les cellules infectées par le virus de la grippe A, le génome du virus s'accumulait dans des vésicules exprimant la protéine IFITM3 (Feeley *et al.*, 2011). Cette observation plaide en faveur de la rétention du virus dans les endosomes tardifs suite à l'inhibition de son entrée dans la cellule par IFITM3. Les protéines IFITM n'auraient, par ailleurs, aucun effet sur le processus d'internalisation des particules virales et en particulier sur le niveau d'expression des récepteurs cellulaires de surface dont se servent les virus pour être endocytés tels que l'acide sialique utilisé par le virus de la grippe A et le récepteur ACE2 utilisé par le coronavirus SRAS (Brass *et al.*, 2009 ; Huang *et al.*, 2011). De plus, aucune anomalie importante n'a pu être observée par microscopie concernant le transport de virions du virus de la grippe A ou de réovirus au sein des endosomes suite à leur internalisation (Brass *et al.*, 2009 ; Huang *et al.*, 2011 ; Anafu *et al.*, 2013 ; Feeley *et al.*, 2011). De même, tel qu'il a été montré pour le JSRV, l'expression des protéines IFITM n'a pas eu de conséquence sur la liaison de la protéine d'enveloppe Env du JRSV à son récepteur cellulaire Hyal2 et n'a pas non plus perturbé l'initiation de la fusion virale dépendante des changements de conformation de la protéine Env (Li *et al.*, 2013). En outre, cette inhibition virale a lieu quelle que soit la voie d'endocytose (dépendante ou non de la clathrine, de la calvéoline et/ou de la dynamine) ou encore quelle que soit la machinerie de fusion employées par ces virus (faisant intervenir n'importe laquelle des 3 classes de protéine de fusion virale et dépendante ou non du pH et des cathepsines lysosomales). Sur la base de ces éléments, différentes hypothèses quant au mécanisme d'action des protéines IFITM ont été avancées.

Tout d'abord, l'activité antivirale des protéines IFITM semble dépendre de leur localisation au site d'entrée des virus qu'elles restreignent. Plusieurs éléments vont dans ce sens. Le premier est que les protéines IFITM, et en particulier IFITM1 et 3, inhibent plus fréquemment et souvent plus efficacement les virus fusionnant dans les compartiments endolysosomaux où elles sont naturellement adressées, à savoir les endosomes précoces pour IFITM1 et les endosomes tardifs ainsi que les lysosomes pour IFITM3 (Mudhasani *et al.*,

2013 ; Lu *et al.*, 2011). Un autre élément renforçant le premier est que la relocalisation d'IFITM3 à la membrane plasmique, comme cela a été fait en mutant son motif N-terminal d'internalisation YXXF, a d'une part, eu pour conséquence d'inhiber son activité de restriction contre le virus de la grippe A (fusionnant dans les endosomes tardifs) mais n'a pas d'autre part, permis de la rendre (plus) active contre le VIH-1 fusionnant lui à la membrane plasmique (Jia *et al.*, 2012). Cette expérience démontre que la présence d'une protéine IFITM au site de fusion d'un virus est une condition nécessaire mais pas suffisante à l'exercice de son activité antivirale. Par ailleurs, certains virus fusionnant dans les compartiments cellulaires où sont naturellement présentes les IFITM, tels que les virus MACV (« Machupo virus ») (Huang *et al.*, 2011) et LASV (« Lassa virus ») (Pasqual *et al.*, 2011), ne sont pas non plus restreints par ces dernières.

Ensuite, d'autres observations suggèrent que les protéines IFITM agiraient en modifiant les propriétés physiques des compartiments de la voie endolysosomale de façon à les rendre hostiles à la fusion virale. Cette hypothèse permet notamment d'expliquer la faible aptitude des protéines IFITM à restreindre les virus entrant dans la cellule par fusion avec la membrane plasmique.

Ainsi, les protéines IFITM pourraient empêcher l'acidification des endosomes ayant pour conséquence d'inhiber l'activité des cathepsines cellulaires dépendante du pH acide. Le coronavirus SRAS et le réovirus sont tous deux restreints pas les protéines IFITM et ont en commun de dépendre, pour leur entrée dans la cellule, de la protéolyse de leur protéine de fusion (SRAS) ou de leur protéine de capsid (réovirus) par des cathepsines dont l'activité dépend du pH acide des endolysosomes. Anafu *et al.* ainsi que Huang *et al.* ont montré que si l'action de ces protéases était substituée par un traitement à la trypsine, ces virus fusionnaient directement à la membrane plasmique ou à un site proche de la membrane plasmique et échappaient par conséquent à l'action antivirale exercée par les protéines IFITM dans les endosomes (Huang *et al.*, 2011 ; Anafu *et al.*, 2013). Ces données suggèrent que les protéines IFITM pourraient agir en influant sur l'activité des cathepsines et ce, par exemple, en inhibant l'acidification des endosomes. Cependant, les auteurs de ces mêmes études n'ont mesuré aucune diminution significative de l'activité enzymatique des cathepsines L ou B dans des cellules exprimant IFITM3 (Huang *et al.*, 2011). De même, les résultats d'une autre étude ont également indiqué que l'activité des cathepsines ainsi que le processus d'acidification des endosomes n'étaient pas affecté par l'expression des protéines IFITM (Feeley *et al.*, 2011). Bien au contraire, les IFITM engendreraient une expansion et une acidification des

compartiments endosomaux (Huang *et al.*, 2011 ; John *et al.*, 2013). Néanmoins, une autre observation intéressante pourrait, au contraire, supporter ce modèle. Une étude a en effet montré que les étiquettes adjointes à l'extrémité C-terminale de la protéine IFITM3, habituellement dégradées dès leur exposition à la lumière lysosomale, restaient intactes dans les vésicules endolysosomales élargies et périnucléaires qui accompagnent la surexpression des protéines IFITM, indiquant une absence ou une inhibition de l'activité protéolytique au sein de ces compartiments (Bailey *et al.*, 2013).

Une autre hypothèse est que les protéines IFITM pourraient inhiber la fusion virale en modifiant les propriétés biophysiques des membranes endolysosomales. Il a en effet été proposé que les protéines IFITM pourraient bloquer la fusion de l'enveloppe virale avec les membranes cellulaires au stade de l'hémifusion d'une part, en diminuant la fluidité des membranes, et ce, par exemple, en modifiant leur composition lipidique, et d'autre part, en leur conférant une courbure positive spontanée. Les lipides ne seraient alors plus en mesure d'effectuer les mouvements nécessaires à l'accomplissement de l'hémifusion (Li *et al.*, 2013). De même, une diminution de la fluidité membranaire pourrait également entraver les mouvements de protéines associées à la membrane, tels que ceux des récepteurs de l'hôte auxquels se lient les virus de l'hépatite C et du VIH-1 et inhiber leurs interactions séquentielles avec les enveloppes virales (Perreira *et al.*, 2013).

L'insertion intramembranaire des domaines hydrophobes des IFITM pourrait à elle seule influencer sur la courbure de la membrane en comprimant son feuillet externe dans une direction défavorable à celle promouvant la fusion virale. De même, John *et al.* ont postulé que l'association entre les domaines IM1, impliquant les résidus phénylalanine 75 et 78 (**figures 1 et 4**), appartenant à des protéines IFITM adjacentes, serait nécessaire pour qu'IFITM3 puisse pleinement exercer son activité antivirale en altérant la fluidité membranaire et en rendant par conséquent la formation du pore de fusion énergétiquement défavorable (John *et al.*, 2013). Le modèle le plus récent de structure et de topologie membranaire de la protéine IFITM3 proposé par Chesarino *et al.* conforte ces dernières hypothèses. Ce modèle indique que le domaine IM1 serait plus précisément constitué de deux hélices alpha distinctes séparées par des résidus non structurés. La première hélice alpha serait amphipathique et le maintien de son intégrité et en particulier de son caractère amphipathique serait indispensable pour qu'IFITM3 puisse pleinement exercer son pouvoir de restriction contre de nombreux virus tels que le virus de la grippe A, le virus zika et le VIH. Une région amphipathique similaire a été détectée chez IFITM1 et semble également être déterminante pour sa fonction antivirale. Les auteurs de cette étude ont alors postulé que cette hélice

pourrait stabiliser les régions de courbure membranaire adjacentes aux sommets du diaphragme d'hémifusion, empêchant dès lors l'expansion de ce diaphragme et l'achèvement du processus de fusion (**figure 9**). Quant à la seconde hélice alpha, comprenant les résidus phénylalanine 75 et 78 identifiés comme étant impliqués dans la dimérisation d'IFITM3 (John *et al.*, 2013), elle pourrait permettre à deux protéines IFITM3 d'interagir et de combiner leur action de manière à renforcer encore le mécanisme d'inhibition de la fusion virale (Chesarino *et al.*, 2017).

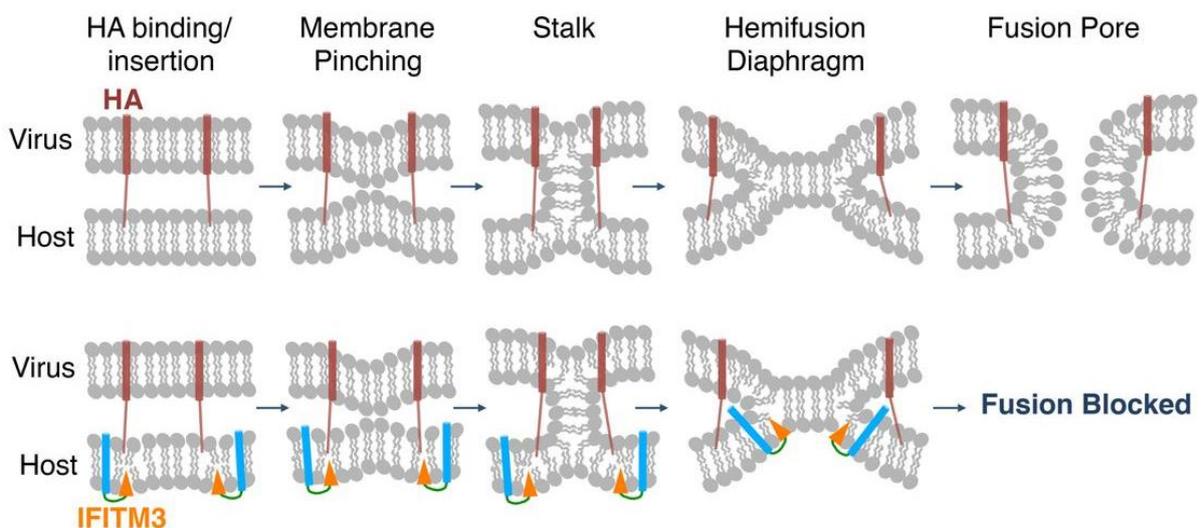


Figure 9 : Modèle d'inhibition de la fusion virale engendrée par l'hélice amphipathique de la protéine IFITM3. En l'absence d'IFITM3, la protéine de fusion du virus de la grippe A (l'hémagglutinine, HA) insère son peptide de fusion au sein de la membrane endosomale puis subi des changements de conformation, induits par le pH acide, qui placent les membranes virales et endosomales au contact l'une de l'autre (« Membrane Pinching »). Les membranes se mélangent alors, formant une « tige » (« stalk ») qui évolue ensuite vers la formation d'une structure appelée « diaphragme d'hémifusion » (« Hemifusion Diaphragm ») au sein de laquelle les feuillettes externes des deux membranes se touchent avant que le diaphragme ne se rompe et forme le pore de fusion (« Fusion Pore »). La présence d'IFITM3 au sein de la membrane endosomale bloquerait la fusion des deux membranes, virale et endosomale, au stade du diaphragme d'hémifusion. L'hélice amphipatique d'IFITM3 (triangle orange) serait exclue du diaphragme d'hémifusion cependant, elle pourrait agir au sommet du diaphragme en stabilisant la courbure membranaire présente à cet endroit, empêchant dès lors l'expansion du diaphragme et sa rupture en pore de fusion (Chesarino *et al.*, 2017).

Amini-Bavil-Olyaei et al. ont quant à eux proposé un mécanisme par lequel les protéines IFITM pourraient rigidifier les membranes endolysosomales en modifiant leur

composition lipidique (Amini-Bavil-Olyaei *et al.*, 2013). Ces auteurs ont démontré que les protéines IFITM pouvaient interagir, via leur domaine transmembranaire (TM2), avec **VAPA** (« **V**esicle-**A**ssociated membrane **P**rotein-associated protein **A** »), une protéine résidant notamment dans les vésicules intracellulaires et empêcher son association avec la protéine **OSBP** (« **O**xy**S**terol **B**inding **P**rotein »). La liaison de ces deux protéines, VAPA et OSBP, est nécessaire à la bonne régulation de l'homéostasie intracellulaire du cholestérol (Wyles *et al.*, 2002). En altérant la fonction de ces protéines, les IFITM induiraient une accumulation marquée de cholestérol au sein des endosomes tardifs et des corps multivésiculaires inhibant la fusion entre les membranes virales et endosomales (**figure 10**). L'enrichissement des membranes endolysosomales en cholestérol suite à la surexpression des protéines IFITM a par ailleurs également été objectivé par une autre étude (Lin *et al.*, 2013). Cependant plusieurs éléments mettent en doute ce mécanisme. Premièrement, le domaine TM2 des protéines IFITM, désigné ici comme étant le site d'interaction entre les protéines VAPA et IFITM3, est d'une part, peu conservé et d'autre part, l'importance de sa contribution à l'action antivirale des IFITM est controversée (Amini-Bavil-Olyaei *et al.*, 2013 ; John *et al.*, 2013). Et deuxièmement, cette accumulation de cholestérol ne semble concerner que les endosomes tardifs, qu'en est-il alors de l'action antivirale des protéines IFITM et en particulier, d'IFITM1, perpétrée dans les endosomes précoces ?

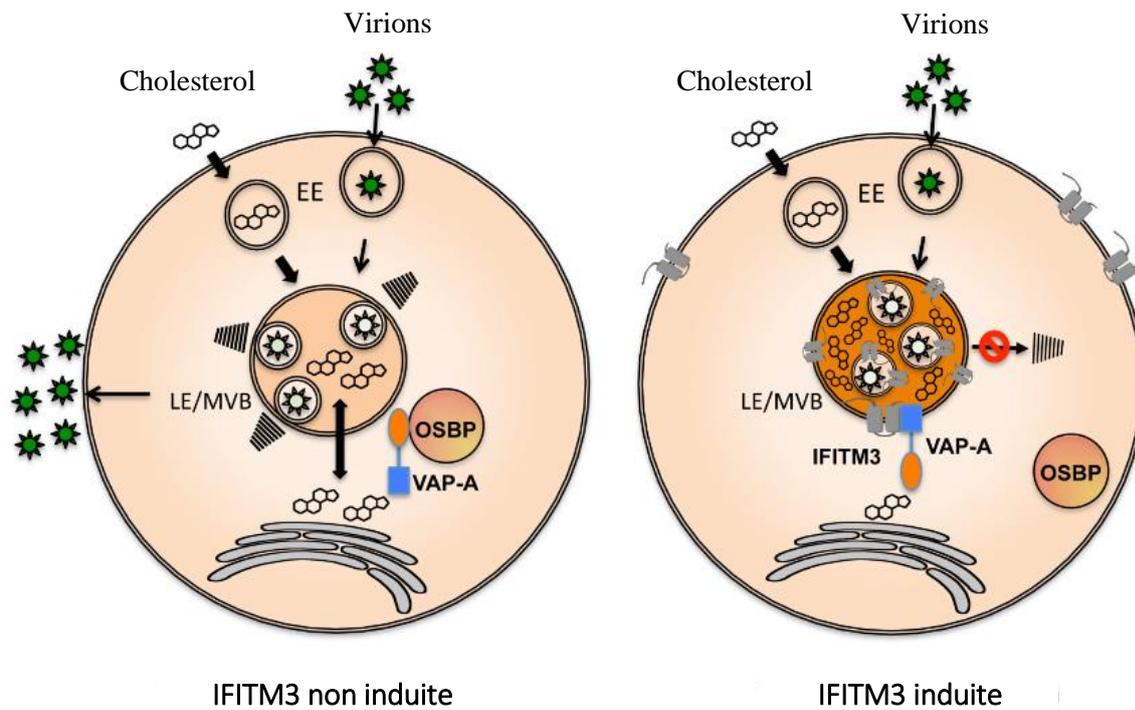


Figure 10 : Modèle d'inhibition de la fusion virale engendrée par l'accumulation de cholestérol au sein des endosomes tardifs (« **L**ate **E**ndosomes », **LE**) et des corps multivésiculaires (« **M**ulti**V**esicular **B**odies », **MVB**) suite à l'interaction d'IFITM3 avec la protéine VAPA. En l'absence d'induction d'IFITM3 (schéma de gauche), le cholestérol importé dans la cellule est hydrolysé dans les endosomes puis transporté dans le cytosol tandis que le cholestérol synthétisé *de novo* est lui transporté du réticulum endoplasmique (RE) aux autres organelles dont font partie les endosomes et les lysosomes. Suite à l'induction d'IFITM3 et à son interaction avec VAPA (schéma de droite), le couple VAPA/OSBP ne peut plus contribuer à cette régulation de l'homéostasie intracellulaire du cholestérol. Le cholestérol s'accumule alors au sein des endosomes tardifs (LE) et des corps multivésiculaires (MVB) ayant pour conséquence de bloquer la fusion de la membrane virale avec celle des compartiments LE/MVB ayant lieu en temps normal et empêchant dès lors les particules virales de libérer leur génome ou leur nucléocapside dans le cytosol.

EE = « **E**arly **E**ndosomes », endosomes précoces
 (Figure adaptée de Amini-Bavil-Olyaei *et al.*, 2013)

Lin *et al.* ont quant à eux eu l'idée de tester l'influence de deux agents antifongiques, l'amphotéricine B et la nystatine, sur l'activité antivirale des protéines IFITM. Ces molécules ont été choisies en raison de leur mécanisme d'action commun, elles se lient aux stérols membranaires et forment des canaux de fuite ionique. Elles auraient notamment pour effet d'abolir les gradients d'ions sodium existant de part et d'autre des membranes endolysosomales. Contrairement à IFITM1, l'activité antivirale des protéines IFITM2 et 3 contre le virus de la grippe A s'est montrée fortement impactée dans les cellules traitées avec

ces antifongiques. La seule perturbation des gradients de sodium, non induite par la formation de pores membranaires, n'a par contre eu aucun impact sur l'activité de l'ensemble des protéines IFITM. D'autres hypothèses quant au mécanisme d'inhibition de l'activité des IFITM par ces molécules antifongiques ont donc été proposées, telles que la perturbation d'autres gradients ioniques ou du cholestérol ou encore la déstabilisation de complexes de protéines IFITM hautement ordonné, restaurant ainsi la fluidité membranaire (Lin *et al.*, 2013).

En conclusion, bien que ces études n'aient pas permis d'élucider le(s) mécanisme(s) précis par le(s)quel(s) les protéines IFITM exercent leur activité antivirale, elles semblent cependant toutes plaider en faveur d'une action des protéines IFITM au niveau du site de fusion de l'enveloppe virale avec les membranes endolysosomales. La diminution de la fluidité membranaire, via une action locale ou à distance des IFITM, est jusqu'à présent l'hypothèse privilégiée. Cependant, ce mode d'action pourrait également interférer avec d'autres processus physiologiques dépendant de la fluidité membranaire et garantissant le bon fonctionnement de la cellule tels que l'endocytose, le trafic et la fusion vésiculaires ainsi que la cytokinèse. Toutefois, la possibilité que les protéines IFITM puissent agir à d'autres étapes du cycle de réplication viral que celle de l'entrée et ce, peut-être par d'autres mécanismes, reste envisageable comme le suggère l'inhibition du VIH-1 par IFITM3. Quant au fait que certains virus, constituant pourtant des cibles potentielles pour les IFITM, soient totalement insensibles aux propriétés antivirales des IFITM, suggère que ces virus ont pu évoluer en développant des mécanismes leur permettant d'antagoniser le(s) mécanisme(s) d'action des IFITM.

Enjeux et Objectifs

Depuis le début du siècle, un nombre inquiétant d'épidémies de virus émergents ou réémergents ont eu lieu à travers le monde telles que celles du coronavirus SRAS (2003), du virus de la grippe A H1N1 (2009), du virus Ebola (2014) ou encore du virus Zika (2016). En raison de la multiplication de ces épidémies, de leurs graves conséquences tant pour la santé humaine que pour l'économie mondiale, et de la menace que ces virus continuent de représenter, la nécessité de trouver de nouvelles stratégies permettant de contrer rapidement et efficacement ces infections virales se fait de plus en plus pressante.

En raison du large spectre d'activité antivirale des protéines IFITM, leur étude est devenue un thème de recherche privilégié et incontournable dans la lutte contre les infections virales. En effet, les protéines IFITM ne restreignent pas moins de 9 familles différentes de virus, dont certains constituent de dangereux pathogènes pour l'Homme et ont été à l'origine d'épidémies aux conséquences dramatiques, tel que le virus Ebola. Comprendre la façon dont les protéines IFITM restreignent ces virus pourrait permettre, par exemple, de développer des composés mimant leurs activités antivirales ou encore d'induire l'expression d'une protéine IFITM en particulier dans un type cellulaire choisi et ce, indépendamment de la voie des interférons, dans le but de protéger la population humaine mais aussi peut-être les animaux responsables de ces zoonoses. Ensuite, au regard des conclusions des différentes études traitant de l'activité antivirale des protéines IFITM, il apparaît que parmi les membres de la famille IFITM, la protéine IFITM3 est sans nul doute celle présentant l'activité antivirale la plus systématique. C'est également celle qui restreint le plus efficacement le virus de la grippe A, soulignant son importance, puisque la grippe A est l'infection épidémique qui tue, chaque année, le plus de personnes en France. Pour toutes ces raisons, IFITM3 a donc été naturellement choisie comme modèle de référence pour étudier l'ensemble de la famille IFITM.

Comme l'indique le titre de ma thèse, mon travail a été dédié à la caractérisation biochimique et structurale de la protéine IFITM3. Dans les grandes lignes, les objectifs de mon travail de thèse, définis en 2013, étaient les suivants : déterminer la forme oligomérique, la topologie membranaire ainsi que la structure tridimensionnelle de la protéine IFITM3 humaine sous sa forme active. L'objectif ultime étant d'être en mesure de se servir de cette structure pour élucider le mécanisme d'action antiviral de la protéine IFITM3. Depuis, de nouvelles avancées, concernant notamment la structure secondaire et le mode d'insertion membranaire présumés de la protéine IFITM3, sont apparues dans la littérature. Cependant, bien que ces nouvelles données aient permis de préciser et de compléter les connaissances

antérieures, elles n'ont toujours pas permis d'aboutir à des certitudes. En outre, la dimérisation de la protéine, bien qu'envisagée, n'est toujours pas fermement établie. Quant au mécanisme d'action exact de la protéine, celui-ci ne fait toujours l'objet que de modèles. Les objectifs de mon travail de thèse sont, par conséquent, toujours d'actualité. Par ailleurs, la résolution par **R**ésonance **M**agnétique **N**ucléaire (**RMN**) de la structure tridimensionnelle de la protéine IFITM3 insérée au sein de la membrane de nanodisques, à laquelle je me suis attelée, devrait constituer un argument de poids dans la détermination de sa structure. Principalement parce que la structure obtenue serait celle de la protéine entière, reconstituée dans un environnement proche de son environnement membranaire natif. En effet, contrairement aux détergents, les membranes artificielles sont capables de mimer les propriétés biophysiques des membranes cellulaires naturelles offrant, par conséquent, de plus grandes chances d'y étudier les protéines sous leur forme active. L'obtention de cette structure pourrait également permettre l'obtention d'un consensus concernant la structure et la topologie membranaire d'IFITM3. Cette structure constituerait alors une base solide sur laquelle d'autres études destinées à élucider la fonction de la protéine pourraient reposer. Et enfin, cette structure pourrait servir de modèle de référence pour l'ensemble de la famille CD225 à laquelle IFITM3 appartient et qui comporte plus de 300 autres protéines.

Matériel et Méthodes

1. Clonage, expression et purification d'IFITM3

1.1. Clonage d'IFITM3 dans le plasmide d'expression pETM-11

La séquence d'ADN codant la protéine IFITM3 contenue dans le plasmide pLIM14_Mistic-IFITM3 a tout d'abord été amplifiée par **PCR** (« Polymerase Chain Reaction ») à l'aide de 2 amorces, sens et anti-sens, portant respectivement à leur extrémité 5' les sites de restriction des enzymes NcoI et HindIII (New England Biolabs). Le produit de cette réaction d'amplification ainsi que le vecteur d'expression, pETM-11 (auteur : G.Stier, EMBL, Heidelberg - plasmide d'origine : pBR322), ont ensuite été tous deux digérés par les enzymes de restriction NcoI et HindIII puis ligués ensemble par l'action de la ligase T4 (New England Biolabs) permettant dès lors l'expression de la protéine recombinante suivante (**figure 11**) :

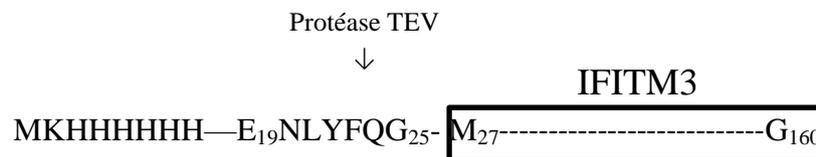


Figure 11: Schéma de la construction d'IFITM3 clonée dans le vecteur pETM-11

Séquence en acides aminés de la protéine recombinante IFITM3 :

MKHHHHHHHPMSDYDIPTTENLYFQGAMGNQTVQTFSPVNSGQPPNYEMLKEEHEV
AVLGAPHNPAPPTSTVIHIRSETSVPDHVVWSLFNTLFMNPCCLGFI AFAYSVKSRDR
KMVGDTVGAQAYASTAKCLNIWALILGILMTILLIVIPVLIFQAYG

1.2. Expression d'IFITM3 en bactérie *E.coli* souche C41 et purification des membranes cellulaires

Une pré-culture de cellules compétentes C41 (DE3) transformées avec le vecteur pETM-11_IFITM3 a été utilisée pour inoculer au 1/50^{ième} 1 L de milieu **LB** (Luria Broth, Sigma-Aldrich) supplémenté de 50 µg/ml de kanamycine (Euromedex). Les cellules ont ensuite été mises en culture sous agitation à 37 °C jusqu'à ce que la densité optique de la culture, mesurée à 600 nm (DO_{600 nm}), atteigne une valeur comprise entre 0,7 et 0,8 U.A. L'expression de la protéine recombinante IFITM3 a alors été induite par l'addition d'1 mM d'IPTG (Euromedex) et les cellules ont été placées sous agitation à 18 °C pendant environ 20h.

Les cellules ont ensuite été centrifugées à 10543 g (6500 rpm) pendant 15 min. Le culot de cellules ainsi obtenu a alors été repris dans 20 ml de tampon de lyse (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) supplémenté d'une tablette d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases Complete® (ROCHE). Les cellules ont ensuite été lysées au cours d'un cycle de sonication de 6 min (1 sec « on », 1 sec « off ») à une amplitude de 70 %. Ce lysat a alors été centrifugé à 1000 g pendant 10 min afin de culotter les débris cellulaires. Seul le surnageant a été conservé et a ensuite été centrifugé à 75600 g (25000 rpm) pendant 45 min afin de culotter les membranes cellulaires.

1.3. Criblage de détergents pour la solubilisation et la purification d'IFITM3

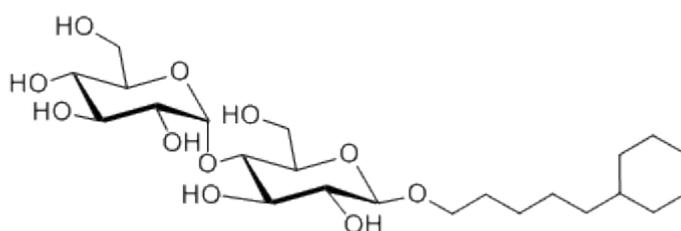
Le culot comprenant les membranes cellulaires a tout d'abord été repris dans 20 ml de tampon (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl) à l'aide d'un homogénéisateur Potter-Elvehjem. Le criblage de détergents pour la solubilisation et la purification d'IFITM3 a ensuite été réalisé par Anne-Marie Villard, membre de la plateforme RoBioMol de l'IBS, de la manière suivante : 500 µl de membranes à 1 mg/ml ont été incubés sur la nuit à 4 °C en présence de 50 µl de résine d'agarose Ni-NTA et du détergent testé, à une concentration équivalente à sa **Concentration Micellaire Critique (CMC) + 20 mM**. La résine a ensuite été lavée deux fois avec 1 ml de tampon de lavage (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 50 mM imidazole et détergent testé) puis les protéines retenues par la résine ont été éluées avec 100 µl de tampon d'éluion (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 300 mM imidazole et détergent testé). 8 µl de l'éluion obtenue avec chaque détergent ont ensuite été chargés sur gels de polyacrylamide Mini-PROTEAN® TGX™ 4-12% (Bio-Rad). Le tableau ci-dessous reprend la liste des 24 détergents ou combinaisons de détergents testés ainsi que les concentrations auxquelles ils ont été utilisés pour les étapes de solubilisation et de purification d'IFITM3 (**tableau 2**).

	Détergent	Solubilisation	Purification		Détergent	Solubilisation	Purification
1	CHAPS	28 mM	10 mM	13	LAPAO	21,5 mM	3,5 mM
2	Cymal-2	125 mM	122 mM	14	NLS	35 mM	16,6 mM
3	Cymal-3	55 mM	36,5 mM	15	TX100	20 mM	2,2 mM
4	Cymal-4	28 mM	9,6 mM	16	MNG3	10 mM	2 mM
5	Cymal-5	22 mM	4,4 mM	17	Echange	C8E4 : 28 mM	C12E9 : 2,05 mM
6	Fos-Choline-12	21,5 mM	3,5 mM	18	C12E8	20 mM	2,1 mM
7	B-OG	38 mM	20 mM	19	C12E9	20,5 mM	2,05 mM
8	Echange	NM : 26 mM	Cymal-5 : 4,4 mM	20	T3DM	20 mM	2 mM
9	DDM	20 mM	2,17 mM	21	T4DM	20 mM	2 mM
10	DM	21,8 mM	3,8 mM	22	N-Dodecyl-B-D-Thiomaltopyranoside	1 %	0,1 %
11	UDM	20,6 mM	2,6 mM	23	OGNG	0,75 %	0,17 %
12	LDAO	21 mM	3 mM	24	N-Nonyl-B-D-Gluopyranoside	1 %	0,1 %

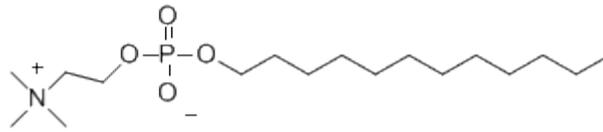
Tableau 2 : Liste des 24 détergents ou combinaisons de détergents testés ainsi que les concentrations auxquelles ils ont été utilisés pour la solubilisation et la purification d'IFITM3

1.4. Test de solubilisation et de purification d'IFITM3 en Cymal-5, Fos-Choline-12 et LAPAO

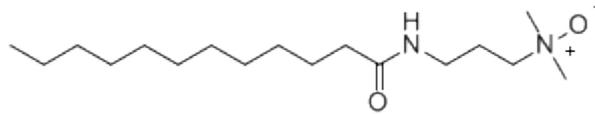
Suite aux résultats du criblage de détergents, le culot de membranes cellulaires a été repris, à l'aide d'un homogénéisateur Potter-Elvehjem, dans 20 ml de tampon de solubilisation (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoéthanol) contenant l'un des détergents suivants : 22 mM de Cymal-5 (5-Cyclohexyl-1-Pentyl- β -D-Maltoside) ; 21,5 mM de Fos-Choline-12 (n-Dodecylphosphocholine) ou 21,5 mM de LAPAO (3-Laurylamido-N,N'-Dimethylpropyl Amine Oxide) (Anatrace) (**figure 12**). Après une incubation d'environ 20h sous agitation à 4 °C, la solution a été centrifugée à 75600 g (25000 rpm) pendant 45 min afin de recueillir le surnageant contenant la protéine IFITM3 solubilisée par le détergent.



Cymal-5 (5-Cyclohexyl-1-Pentyl- β -D-Maltoside)



Fos-Choline-12 ou **DPC** (n-Dodecylphosphocholine)



LAPAO (3-Laurylamido-N,N'-Dimethylpropyl Amine Oxide)

Figure 12 : Formules topologiques des détergents Cymal-5, Fos-Choline-12 et LAPAO

IFITM3 a ensuite été purifiée en deux étapes :

- Une étape de chromatographie d'affinité sur résine de nickel. Pour ce faire, 2 ml de résine Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) ont été préalablement équilibrés avec du tampon A (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM β-mercaptoéthanol) contenant le détergent ayant servi à la solubilisation d'IFITM3 (soit, 4,4 mM de Cymal-5 ; 3,5 mM de Fos-Choline-12 ou 3,5 mM de LAPAO). Le surnageant a ensuite été incubé avec la résine pendant 3h sous agitation à 4 °C. Après retrait du surnageant, la résine a alors été lavée avec ce même tampon A supplémenté de 50 mM d'imidazole puis les protéines liées à la résine, dont IFITM3, en ont été éluées avec 300 mM d'imidazole.
- Une étape de chromatographie d'exclusion de taille lors de laquelle 50 µl de l'éluat de la résine de nickel ont été déposés sur une colonne Superdex 200 5/150 GL (GE Healthcare Life Sciences) et élués dans du tampon A contenant le détergent utilisé lors de la solubilisation et de la première étape de purification d'IFITM3 soit, 4,4 mM de Cymal-5 ; 3,5 mM de Fos-Choline-12 ou 3,5 mM de LAPAO.

1.5. Solubilisation et purification d'IFITM3 en Fos-Choline-12

Le culot de membranes cellulaires a été repris, à l'aide d'un homogénéisateur Potter-Elvehjem, dans 20 ml de tampon de solubilisation (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM β-mercaptoéthanol et 21,5 mM Fos-Choline-12). Après une incubation d'environ 20h sous agitation à 4 °C, la solution a été centrifugée à 75600 g (25000 rpm) pendant 45 min afin de recueillir le surnageant contenant la protéine IFITM3 solubilisée par le détergent.

IFITM3 a ensuite été purifiée par :

- Chromatographie d'affinité sur résine de nickel. Le surnageant a été déposé sur une colonne de nickel sépharose HisTrap HP de 5 ml (GE Healthcare Life Sciences) préalablement équilibrée avec du tampon A (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoéthanol et 3,5 mM Fos-Choline-12). La résine de la colonne a ensuite été lavée une première fois avec le tampon A puis une seconde fois avec le tampon A supplémenté de 10 mM d'imidazole. Enfin, IFITM3 a été éluée de la résine avec le tampon A supplémenté de 300 mM d'imidazole.
- Chromatographie d'exclusion de taille. Après concentration, l'élué de résine de nickel a alors été chargé en plusieurs injections de 500 μ l, sur une colonne Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences) et éluée dans du tampon A à 4 °C.

Ce protocole a aussi été effectué en utilisant du tampon PBS pH 7,4 en lieu et place du tampon 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl.

2. *Caractérisation biochimique et biophysique d'IFITM3*

2.1. Détermination de l'état oligomérique d'IFITM3 par SEC-MALLS

La méthode **SEC-MALLS** (« **S**ize **E**xclusion **C**hromatography-**M**ulti-**A**ngle **L**aser **L**ight **S**cattering ») a été utilisée afin de déterminer le poids moléculaire et par conséquent, l'état oligomérique adopté par IFITM3 à l'issue de sa purification par chromatographie d'exclusion de taille en micelles de Fos-Choline-12. Il s'agit d'une chromatographie d'exclusion de taille (SEC) au cours de laquelle sont mesurés, l'absorbance **UV** (**U**ltra**V**iolet), la diffusion statique de la lumière laser (« **L**ight **S**cattering », **LS**) et l'index de réfraction (« **R**efractive **I**ndex », **RI**). La mesure de ces trois paramètres est ensuite utilisée pour calculer la masse moléculaire de la protéine d'intérêt, l'intensité de la lumière diffusée (ratio Rayleigh) par une protéine étant directement proportionnelle au produit de sa masse moléculaire moyenne et de sa concentration. Ici, IFITM3 se trouvant en détergent, la quantité de micelles de Fos-Choline-12 (δ) lui étant associée a tout d'abord été déterminée à partir des données d'index de réfraction et d'absorbance UV selon l'équation suivante (1) :

$$\begin{aligned} & \frac{1}{1+\delta} \left(\frac{dn}{dc} \right)_{\text{protein}} + \frac{\delta}{1+\delta} \left(\frac{dn}{dc} \right)_{\text{detergent}} \\ &= \frac{\Delta RI}{\Delta UV_{280}} \left(\left(\frac{1}{1+\delta} \right) A_{280,\text{protein}} + \left(\frac{\delta}{1+\delta} \right) A_{280,\text{detergent}} \right) \end{aligned} \quad (1)$$

Une fois la quantité de détergent (δ) associée à IFITM3 connue, l'incrément d'indice de réfraction (dn/dc) du complexe protéine-détergent a pu être calculé (équation 2) puis a servi à déterminer la masse moléculaire du couple protéine-détergent (équation 3).

$$(dn/dc)_{\text{complex}} = \left(\frac{1}{1+\delta} \right) (dn/dc)_{\text{protein}} + \left(\frac{\delta}{1+\delta} \right) (dn/dc)_{\text{detergent}} \quad (2)$$

$$M_W = \frac{\Delta LS}{K \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \left(\frac{\Delta RI}{(dn/dc)} \right)} = \frac{\Delta LS}{K \left(\frac{dn}{dc} \right) \Delta RI} \quad (3)$$

Enfin, la valeur δ a une nouvelle fois été utilisée pour déterminer les contributions respectives d'IFITM3 et des micelles de Fos-Choline-12 à la masse moléculaire du complexe (équation 4) (Slotboom *et al.*, 2008).

$$M_{W,\text{complex}} = (1+\delta) M_{W,\text{protein}} \quad (4)$$

En pratique, 55 μ l de protéine IFITM3 à 10 mg/ml ont été injectés à un débit de 0,5 ml/min sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille S200 increase 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences), préalablement équilibrée avec du tampon PBS pH 7,4 contenant 3,5 mM de Fos-Choline-12, et connectée à un détecteur multiangulaire à diffusion de la lumière (MALLS, Wyatt Dawn Heleos II), à un réfractomètre (Wyatt Optilab T-rex) et à un détecteur UV (Hitachi Elite LaChrom UV detector). Les signaux acquis par ces trois détecteurs tout au long de l'élution (soit environ 23 ml) ont ensuite été importés dans le logiciel ASTRA version 6 (Wyatt Technologies). Le module « protein conjugate » du logiciel a alors été utilisé pour déterminer les masses moléculaires du couple IFITM3/Fos-Choline-12, de la protéine IFITM3 et des micelles de Fos-Choline-12 qui lui sont associées. Pour ce faire, le pic d'élution à analyser a été défini et les valeurs d'incrément d'indice de réfraction (dn/dc) des protéines (0,185 ml/g) et de la Fos-Choline-12 (0,1398 ml/g) ainsi que les valeurs d'absorbance à 280 nm d'IFITM3 [1,120 mL/(mg cm)] et de la Fos-Choline-12 [0 mL/(mg cm)] ont été utilisées afin de calculer, au travers du pic, les masses moléculaires (« Molecular

Weight », **Mw**) du complexe IFITM3-Fos-Choline-12, d'IFITM3 et des micelles de Fos-Choline-12 associées à la protéine et également afin de renseigner sur la mono-dispersité du pic (Slotboom *et al.*, 2008).

2.2. Détermination de l'état oligomérique d'IFITM3 par pontage chimique

Deux agents de pontage chimique, l'EGS [Ethylène Glycol bis (Succinimidylsuccinate)] et le glutaraldehyde, ont été utilisés afin de mettre en évidence l'oligomérisation d'IFITM3 en détergent. L'EGS est un agent de pontage chimique lipophile utilisé pour conjuguer des protéines aussi bien en solution, qu'au sein de membranes, puisqu'elles lui sont perméables. L'EGS possède deux groupements esters NHS (N-HydroxySuccinimide) situés à chacune de ses extrémités et séparés par 16.1 angstroem (« spacer arm length ») (**figure 13**). Ces groupements peuvent réagir à pH 7-9 avec les groupements amines primaires (NH₂) des lysines ou avec ceux des extrémités N-terminales des protéines et ainsi lier de façon covalente deux protéines interagissant faiblement (par le biais d'interactions hydrophobes ou électrostatiques par exemple) ou se trouvant à proximité l'une de l'autre. Deux protéines ou plus peuvent alors être liées par ces pontages covalents et les complexes protéiques ainsi stabilisés peuvent être détectés sur gel SDS-PAGE. Le glutaraldehyde est, quant à lui, un agent de pontage chimique hydrosoluble formant lui aussi des pontages chimiques covalents avec les groupements amines des protéines. Cependant, la distance séparant ses deux groupements carbonyle (C=O) réactionnels est plus courte que celle séparant les deux groupements NHS de l'EGS, environ 5 angströems contre 16,1 (**figure 14**).

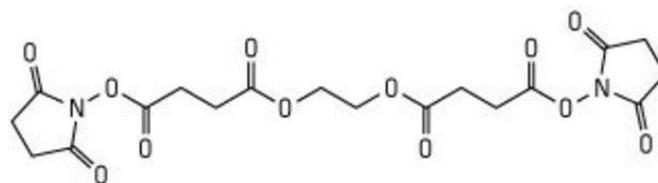


Figure 13 : Structure chimique de l'EGS

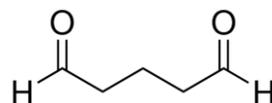


Figure 14 : Structure chimique du glutaraldehyde

Pour cette expérience, la protéine IFITM3, purifiée par chromatographie d'exclusion de taille et éluée aux alentours de 13,5 ml dans du tampon PBS pH 7,4, a été concentrée jusqu'à environ 1 mg/ml. Différents échantillons d'IFITM3 ont ensuite été incubés pendant 15 min à température ambiante avec différentes concentrations (0 ; 0,5 et 1 mM) d'EGS (Thermo Fisher Scientific) ou de glutaraldehyde (Sigma-Aldrich). La réaction de pontage chimique a ensuite été stoppée en faisant bouillir le mélange en présence de bleu de Laemli pendant 5 min. Les échantillons ont alors été analysés sur un gel SDS-PAGE.

D'autres expériences de pontage chimique ont été réalisées avec la protéine IFITM3, exprimée aux membranes de bactéries *E.coli* souche C41, reconstituée en liposomes **POPC** (1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-glycero-3-PhosphoCholine) - **POPS** (1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-glycero-3-Phospho-L-Serine) et reconstituée en nanodisques de taille moyenne (**MSP1**, « **M**embrane **S**caffold **P**rotein **1** » - POPC) et de grande taille (MSP1E3D1- POPC), selon le même mode opératoire que celui décrit pour IFITM3 en Fos-Choline-12. Cependant, des concentrations plus importantes d'EGS et de glutaraldehyde ont été utilisées lors des expériences de pontage chimique réalisées avec IFITM3 en liposomes (0 ; 0,5 ; 1 ; 5 et 10 mM) et en nanodisques (0 ; 1 ; 5 mM). En outre, les résultats de ces expériences ont été visualisés par « western blot » effectué soit, avec un anticorps anti-IFITM3 (pour les expériences menées avec IFITM3 en membranes bactériennes et en liposomes) soit, avec un anticorps anti-histidine (pour les expériences menées avec IFITM3 en nanodisques).

2.3. Analyse de la structure secondaire d'IFITM3 par dichroïsme circulaire

Une mesure du dichroïsme circulaire dans l'UV lointain (195-260 nm, zone d'absorption de la liaison peptidique) a été réalisée avec 9 μ M (0,16 mg/ml) de protéine IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12 afin d'obtenir des informations sur la structure secondaire qu'elle adopte dans ce détergent. Avant d'effectuer cette mesure, le tampon PBS de la protéine a été échangé par dialyse contre un tampon contenant 20 mM de phosphate de sodium (NaP) et 150 mM de fluorure de sodium (NaF), les ions chlorures présents dans le tampon PBS absorbant fortement dans l'UV lointain. Les valeurs de dichroïsme circulaire ainsi mesurées (en millidegrés) à chaque longueur d'onde par le spectropolarimètre CD Jasco J-810 (Jasco) ont ensuite été introduites dans le serveur Web « Capito – CD Analysis & Plotting Tool » en indiquant la concentration en protéine (9 μ M), son nombre d'acides aminés (160) ainsi que l'épaisseur de la cuvette utilisée (1 mm) afin de calculer les valeurs d'ellipticité moyenne par résidu (« mean residue ellipticity », θ en $10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$).

L'estimation de la proportion d'hélices alpha, de feuillets bêta ou encore de structures désordonnées composant la structure secondaire d'IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12 a alors été déterminée par le programme Capito (Wiedemann *et al.*, 2013).

2.4. Etude de la dénaturation thermique d'IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12

Une expérience de dénaturation thermique de la protéine IFITM3 (1 mg/ml) purifiée par chromatographie d'exclusion de taille dans du tampon (PBS pH 7,4 ; 1 mM 2-mercaptoéthanol ; 3,5 mM Fos-Choline-12) a été menée avec le système Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies). Au cours cette expérience, 15 µl d'échantillon placés dans un capillaire UV (NanoTemper Technologies) à 20 °C ont été soumis à une augmentation de la température de l'ordre de 2 °C/min jusqu'à atteindre la température de 90 °C et l'intensité de la fluorescence émise par le ou les résidu(s) tryptophane de la protéine a été mesurée à 350 nm (F350) et à 330 nm (F330) afin de suivre son état de repliement en fonction de l'augmentation de la température. La courbe de dénaturation thermique d'IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12 a ensuite été établie en suivant l'évolution du ratio F350/F330 en fonction de l'augmentation de la température.

2.5. Protéolyse limitée d'IFITM3 à la trypsine

La protéine IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12, en protéoliposomes (POPC-POPS) ou en nanodisques (MSP1-POPC) a été incubée avec de la trypsine [Boehringer Mannheim (GmbH)] au ratio massique d'1/20^{ième} (1 trypsine : 20 IFITM3) pendant 5, 15, 60 ou encore 120 min. Après chaque temps d'incubation, un échantillon de protéine a été prélevé et chauffé à 90 °C pendant 5 min dans du bleu de Laemli afin de stopper la réaction de protéolyse. Tous les échantillons ont ensuite été analysés sur gel SDS-PAGE.

2.6. Analyse des échantillons de protéines, de liposomes et de nanodisques par microscopie électronique à coloration négative

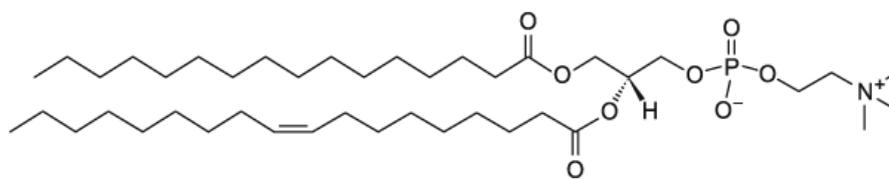
Les échantillons de protéines, liposomes et nanodisques ont été préparés pour leur analyse par microscopie électronique à coloration négative en utilisant la technique de « flottaison » de carbone. Pour ce faire, les échantillons ont été absorbés sur un film de carbone sur mica, puis colorés avec du sodium silico tungstate et transférés sur une grille de cuivre de 400 mesh. Les images ont ensuite été prises à de faibles doses d'électrons (<10 e-/Å²), à un

grossissement pouvant varier de 13000 à 60000 fois et avec des valeurs de défocus comprises entre 1,2 et 2,5 μm , sur un microscope électronique FEI Tecnai 12 120 kV LaB6 utilisant une caméra Gatan Orius 1000.

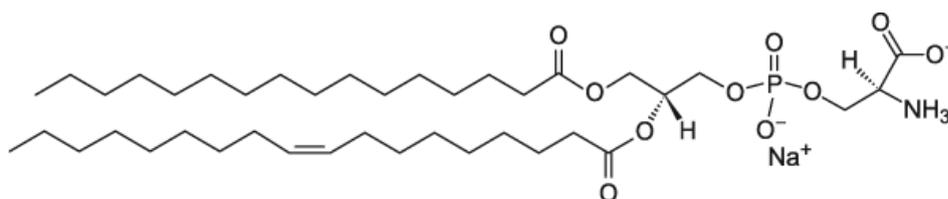
3. *Reconstitution d'IFITM3 en liposomes*

3.1. Formation des liposomes

Un stock de liposomes à une concentration de 10 mg/ml composés à 80 % de lipides POPC et à 20 % de lipides POPS a tout d'abord été constitué. Les lipides POPC et POPS (Avanti Polar Lipids) (**figure 15**) étant au départ stockés à une concentration de 25 mg/ml dans du chloroforme, le bon volume de chaque lipide, permettant d'en obtenir la concentration finale souhaitée, a alors été transféré à l'aide d'une seringue Hamilton dans un ballon d'évaporation en verre. Le chloroforme dans lequel étaient solubilisés les lipides a ensuite été évaporé sous un léger flux d'azote gazeux puis placé dans un dessiccateur sous vide pendant une nuit afin d'éliminer les dernières traces résiduelles de chloroforme. Le film lipidique ainsi formé a alors été repris dans 1 ml de tampon PBS pH 7,4. Afin de former les liposomes et de leur faire adopter le diamètre souhaité, les lipides ont été extrudés, c'est à dire passés 15 fois au travers d'une membrane de polycarbonate (Whatman® Nuclepore™ Track-Etched Membranes, Sigma-Aldrich) ayant des pores de 0,8 μm puis 15 fois au travers d'une membrane de polycarbonate ayant des pores de 0,4 μm .



POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)



POPS (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine)

Figure 15. Formules topologique des lipides POPC et POPS

La polydispersité et le diamètre des liposomes ont ensuite été mesurés par **DLS**, « **Dynamic Light Scattering** » (Instrument DynaPro NanoStar – Wyatt Technology). Pour cette analyse, les liposomes ont été dilués 1000 fois dans du tampon PBS pH 7,4 puis 100 µl d'échantillon ont été placés dans une cuvette en plastique (Wyatt Technology). Les paramètres, tels que la nature du solvant, la concentration de l'échantillon et le rapport dn/dc (0,083 mL/g) ont été renseignés dans le logiciel Dynamics (Wyatt Technology) qui contrôle l'instrument. Ensuite, trois jeux de données ont été collectés à 25 °C à raison de 10 acquisitions/jeux de données. Le diamètre moyen mesuré devait être proche de 0,4 µm et l'indice de polydispersité inférieure à 20 % pour que l'échantillon soit considéré comme relativement monodisperse et que le stock de liposomes soit utilisé pour y reconstituer la protéine IFITM3. Si ces valeurs n'étaient pas atteintes, les liposomes étaient à nouveau extrudés, tel que décrit précédemment, et soumis une nouvelle fois aux mêmes mesures.

La qualité des liposomes a également été analysée par microscopie électronique à coloration négative, afin d'évaluer leur taille et leur homogénéité mais également afin de visualiser le caractère uni ou multi-lamellaire des liposomes ainsi que leur éventuelle coalescence.

3.2. Titration des liposomes avec du Triton X-100

Une courbe de titration des liposomes avec des concentrations croissantes de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) a ensuite été établie afin de déterminer la concentration en détergent qui sature les liposomes (R_{sat}) et celle qui les solubilise complètement (R_{sol}) (Geertsma et al., 2008). Pour cette expérience, les liposomes ont été dilués dix fois avec du tampon PBS pH 7,4 (concentration finale : 1 mg/ml). La densité optique à 550 nm a ensuite été mesurée avant l'ajout de Triton X-100, puis après chaque nouvel ajout d'1 mM de Triton X-100 jusqu'à ce que la densité optique atteigne la valeur de zéro correspondant à la solubilisation totale des liposomes (R_{sol}). Une courbe de titration a ensuite été générée en reportant sur un graphique les valeurs de densité optique mesurées à 550 nm en fonction de la concentration en Triton X-100. Cette courbe permet de suivre l'évolution de l'état physique des liposomes en fonction des quantités croissantes de détergents auxquelles ils sont exposés et donne une indication de la concentration de détergent à laquelle IFITM3 doit être ajoutée pour initier le processus de reconstitution de la protéine (Geerstma *et al.*, 2008)

3.3. Reconstitution d'IFITM3 en protéoliposomes par déstabilisation des liposomes préformés

Aux liposomes ont ainsi été ajoutés dans l'ordre, le Triton X-100 (dont la concentration à ajouter a été définie par la courbe de titration établie tel qu'indiqué plus haut), la protéine IFITM3 solubilisée en Fos-Choline-12 et du tampon PBS pH 7,4 afin d'obtenir le volume final souhaité. Différents ratios massiques lipides : protéine ont été testés afin de définir le ratio permettant de saturer les liposomes en protéine IFITM3. Après 15 min d'incubation sous agitation à température ambiante, 40 mg de billes adsorbantes (Bio-Beads SM-2, Bio-Rad), préalablement lavées au méthanol et rincées à l'eau, ont été ajoutés au mélange. Le même ajout de billes adsorbantes a ensuite été répété après 30 min d'incubation sous agitation à température ambiante ainsi qu'après 1 h, une nuit et 2 h d'incubation sous agitation à 4 °C. Au total, 160 mg de billes adsorbant les détergents ont donc été ajoutés au mélange.

Ces billes ont ensuite été retirées du mélange en perçant, dans le fond du tube, de petits trous d'une taille inférieure à celle des billes et en centrifugeant le tube placé dans un tube Falcon de 15 ml à 300 g pendant 2 min. Seul le mélange sans les billes est alors passé au travers des trous et a été récupéré dans le tube Falcon.

Lorsque le volume de la réaction (20 µl), utilisé pour certaines expériences, était trop faible pour permettre l'ajout de Bio-Beads, les détergents ont alors été retirés par dialyse. Pour ce faire, l'échantillon a été placé dans un tube GeBAflex-Mini (Gene Bio-Application) ayant un seuil de coupure de 8 KDa et a été dialysé contre 1 L de tampon PBS pH 7,4 pendant 2 h à 4 °C puis contre 3 L de ce même tampon pendant 3 jours à 4 °C.

L'incorporation d'IFITM3 dans les liposomes a ensuite été vérifiée en contrôlant la position de la protéine au sein d'un gradient de sucrose après ultracentrifugation. Le gradient de sucrose, constitué de 5 couches de 500 µl de tampon PBS pH 7,4 contenant de bas en haut 40, 30, 20, 10 et 0 % de sucrose, a été coulé dans un tube Ultra-Clear de 5 ml (Beckman Coulter). 250 µl d'échantillon à tester (IFITM3/liposomes/protéoliposomes) et 250 µl de tampon PBS pH 7,4 contenant 80 % de sucrose ont été mélangés pour former la première couche au fond du tube. Le gradient a ensuite été ultracentrifugé à 45 000 rpm pendant 2 h à 4 °C (ultracentrifugeuse Optima XPN-80 et rotor SW 55 Ti – Beckman Coulter). Chaque couche du gradient a ensuite été collectée et analysée sur gel SDS-PAGE. La couche du gradient identifiée sur gel SDS-PAGE comme contenant les protéoliposomes a alors été

analysée par microscopie électronique à coloration négative afin d'observer d'éventuels effets de la protéine IFITM3 sur les liposomes.

4. Observation des protéoliposomes par microscopie de fluorescence

4.1. Préparation et marquage fluorescent des liposomes

400 µl de lipides « Brain Extract Total » (Avanti Polar Lipids) (stock à 25 mg/ml dans du chloroforme), dont la composition est décrite dans le tableau ci-dessous (**tableau 3**), ainsi que 5 µl de fluorochrome rouge PKH26 (Sigma-Aldrich) (stock à 1 mM dans de l'éthanol) ont été mélangés dans un petit flacon en verre puis placés au fond d'un ballon d'évaporation en verre. Le chloroforme solubilisant les lipides a ensuite été évaporé sous un léger flux d'azote gazeux puis celui-ci a été placé, entouré d'aluminium, dans un dessiccateur sous vide pendant une nuit à température ambiante afin d'éliminer les dernières traces résiduelles de chloroforme. Le film lipidique ainsi formé a ensuite été repris dans 1 ml de tampon PBS 1x pH 7,4. Afin de former les liposomes et de leur faire adopter le diamètre souhaité, les lipides ont été extrudés tel qu'expliqué précédemment. Une fois formés, les liposomes ont été ultracentrifugés à 100 000 g pendant 20 min afin de les culotter et de se débarrasser de l'excès de fluorochrome PKH26 non associé aux liposomes, retrouvé dans le surnageant (Inoki *et al.*, 2000). Enfin, le culot de liposomes a été repris dans 1 ml de tampon PBS 1 x pH 7,4 puis les liposomes ont été conservés à 4 °C à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation.

Composition en phospholipides du « Brain Total Extract »	
Phospholipide	% massique
PC	9,6
PE	16,7
PI	1,6
PS	10,6
PA	2,8
Inconnu	58,7
Total	100

Tableau 3 : Composition en phospholipides du « Brain Total Extract » communiquée par le fabricant Avanti Polar Lipids

4.2. Marquage fluorescent de la protéine IFITM3

Les esters NHS (ou esters succinimidiques) de l'Alexa Fluor 488 se lient aux amines primaires des protéines pour former des conjugués présentant une fluorescence à 525 nm (verte) sous excitation à 490 nm. Le marquage d'IFITM3 avec ce colorant a été réalisé en ajoutant 3 µl d'Alexa Fluor 488 (15,5 mM dans du DMSO) à 100 µl de protéine IFITM3 décongelés (à 580 µM), puis en incubant ce mélange à l'abri de la lumière pendant une nuit à 4 °C. Ensuite, afin de se débarrasser de l'excès de colorant non lié à IFITM3, le mélange a été injecté sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences). Sur le profil d'élution correspondant, l'absorbance à 280 nm a permis de suivre l'élution de la protéine IFITM3 tandis que l'absorbance à 494 nm a permis de suivre l'élution de l'Alexa Fluor 488, la valeur de l'absorbance à 280 nm et à 494 nm étant fonction de la concentration d'IFITM3 et d'Alexa, respectivement. La co-élution d'IFITM3 et de l'Alexa a permis de conclure qu'une certaine quantité du fluorophore s'était bien conjuguée à la protéine. Après migration au travers d'un gel SDS-PAGE des fractions d'élution correspondant à la protéine IFITM3 marquée, ce gel SDS-PAGE a été analysé par un système d'imagerie (Gel Doc XR, Bio-Rad) afin de visualiser la fluorescence émise par les bandes correspondant à la protéine marquée et d'en évaluer visuellement l'intensité.

4.3. Formation de protéoliposomes fluorescents

Des protéoliposomes ont été formés à partir de différents ratios massiques de la protéine IFITM3 et des liposomes marqués, à savoir 1 : 1000, 1 : 100 et 1 : 10. Le protocole qui a été suivi pour les produire est le même que celui décrit plus haut pour la reconstitution d'IFITM3 en protéoliposomes par déstabilisation des liposomes préformés.

5. Reconstitution de la protéine IFITM3 en nanodisques pour analyse par RMN

5.1. Préparation des lipides POPC

2 ml de lipides POPC (**figure 15**) solubilisés dans du chloroforme à une concentration de 25 mg/ml ont été déposés au fond d'un ballon d'évaporation en verre. Le dépôt, au fond du ballon, d'un film lipidique homogène a ensuite été obtenu tel que décrit précédemment. Ce film lipidique a alors été repris dans 5 ml de tampon PBS pH 7.4 contenant 30 mM de sodium

cholate (Anatrace) puis a été congelé à -20 °C afin de constituer le stock de lipides POPC (à une concentration de 13,15 mM) à partir duquel les nanodisques ont été assemblés.

5.2. Expression et purification de la protéine d'assemblage MSP

Trois variants de la protéine MSP, MSP1E3D1, MSP1 et MSP1D1ΔH5 différant par le nombre de leurs hélices, ont été utilisés afin d'assembler des nanodisques de différents diamètres (**tableau 4**). Par comparaison avec la protéine MSP1, MSP1E3D1 contient 3 hélices supplémentaires tandis que la protéine MSP1D1ΔH5 est déléetée de son hélice H5.

Variant	PM (Daltons)	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)	Contenu en hélices	Diamètre des nanodisques générés (nm)	Référence
MSP1E3D1	32731 (29982)*	29910 (26930)*	HisTev-H0.5-H2-H3-H4-H5-H6- H4 - H5 - H6 -H7-H8-H9-H10	12,9	Bayburt et Sligar, 2010
MSP1	25309 (23329)*	25440 (23950)*	HisTev-H1-H2-H3-H4-H5-H6-H7-H8-H9-H10	9,7	Denisov <i>et al.</i> , 2004
MSP1D1ΔH5	21468 (19488)*	19940 (18450)*	HisTev-H0.5-H2-H3-H4- H5 -H6-H7-H8-H9-H10	8,4	Hagn <i>et al.</i> , 2013

*Sans étiquette 6 histidines

Tableau 4 : Informations utiles concernant les protéines d'assemblage MSP1E3D1, MSP1 et MSP1D1ΔH5

Séquences en acides aminés des protéines MSP1E3D1, MSP1 et MSP1D1ΔH5 :

MSP1E3D1

MGHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGSTFSKLREQLGPVTQEFWDNLEKETEGLRQEMS
 KDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEMELRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLS
 PLGEEMRDRARAHVDALRTHLAPYLDDFQKKWQEEMELRQKVEPLRAELQEGAR
 QKLHELQEKLSPLGEEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELQRQLAARLEALKENGG
 RLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNQ

MSP1

MGSSHHHHHENLYFQGLKLLDNWDSVTSTFSKLREQLGPVTQEFWDNLEKETEG
 LRQEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEMELRQKVEPLRAELQEGARQKLHEL

QEKLSPLGEEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELQRRLAARLEALKENGGARLAEYH
AKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQ

MSP1D1ΔH5

MGSSHHHHHENLYFQGSTFSKLREQLGPVTQEFWDNLEKETEGLRQEMSKDLEEV
KAKVQPYLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLGEEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDEL
RQRRLAARLEALKENGGARLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESFKV
SFLSALEEYTKKLNTQ

Les séquences de ces trois protéines ont été clonées dans le vecteur pET28a (EMD Biosciences). Elles sont toutes les trois précédées d'une étiquette 6 histidines N-terminale suivie d'un site de clivage à la protéase TEV.

Une pré-culture de cellules compétentes *E.coli* souche BL21 (DE3), transformées par le vecteur pET28a contenant la séquence codant pour la protéine d'intérêt (MSP1E3D1, MSP1 ou MSP1D1ΔH5), a été utilisée pour inoculer 1 L de milieu de culture LB additionné de 50 µg/ml de kanamycine. Les cellules en culture ont ensuite été placées sous agitation à 37 °C jusqu'à ce que la DO_{600nm} soit égale à 0,7 U.A. L'expression de la protéine d'intérêt par les cellules a alors été induite par l'ajout d'1 mM d'IPTG pendant 4 h sous agitation à 37 °C.

Les cellules ont ensuite été centrifugées à 10543 g (6000 rpm) pendant 20 min. Le culot de bactéries ainsi obtenu a été repris dans du tampon PBS pH 7,4 puis centrifugé à nouveau à 5945 g pendant 10 min. Le surnageant a été éliminé et le culot bactérien a été congelé à -80 °C jusqu'à son utilisation.

Après décongélation sur glace, le culot bactérien a été repris dans 20 ml de tampon PBS pH 7,4 supplémenté d'1 % de Triton X-100, de 0,2 mg/ml de lysosyme (Euromedex), d'1 µl d'endonucléase (Pierce Universal Nuclease) et d'une tablette d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases « Complete EDTA-free ». Les bactéries ont ensuite été lysées lors d'un cycle de sonication d'une durée totale de 12 min (2 secondes à une amplitude de 80 % suivies de 10 secondes de repos). Le lysat a alors été centrifugé à 75600 g (25000 rpm) pendant 45 min. Le surnageant a été récupéré puis déposé sur une colonne de nickel sépharose HisTrap HP de 5 ml préalablement équilibrée avec 50 ml de tampon B (40 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 300 mM NaCl ; 1 % de Triton X-100). La résine a ensuite été successivement lavée avec 25 ml de tampon B suivis de 25 ml de tampon C (40 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 300 mM NaCl ; 50 mM sodium cholate ; 10 mM imidazole) puis de 25 ml de tampon D (40 mM Tris-HCl pH

7,4 ; 300 mM NaCl ; 20 mM imidazole). Enfin, la protéine MSP a été éluée de la résine avec 25 ml de tampon E (40 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 300 mM NaCl ; 300 mM imidazole).

L'étiquette poly-histidine de la protéine MSP éluée de la résine de nickel a ensuite été clivée par l'ajout de la protéase TEV à un ratio massique de 1 TEV: 20 MSP pendant une nuit à 4 °C. Le mélange a ensuite été dialysé pendant 2 h à 4 °C contre 4 L de tampon F (20 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 150 mM NaCl) afin de se débarrasser de l'imidazole, puis le mélange a à nouveau été déposé sur la résine de nickel préalablement équilibrée avec 50 ml de tampon F. La protéase TEV pourvue d'une étiquette poly-histidine ainsi que le peu de protéine MSP dont l'étiquette poly-histidine n'a pas été clivée se sont liés à la résine, tandis que la protéine MSP clivée n'a pas été retenue par la résine.

Les fractions, non retenues et de lavage de la résine, contenant la MSP clivée ont été mélangées puis dialysées contre 2 L de tampon PBS pH 7,4 pendant une nuit à 4 °C. La protéine MSP a ensuite été concentrée à l'aide d'une unité d'ultrafiltration Amicon Ultra ayant un seuil de coupure de 10 kD (Dutscher) puis a été congelée à -80 °C jusqu'à son utilisation.

5.3. Expression et marquage isotopique ^{15}N et/ou ^{13}C d'IFITM3

Une pré-culture de cellules compétentes *E.coli* souche BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, préalablement transformées par le vecteur pETM-11 contenant la séquence codant pour la protéine IFITM3, a tout d'abord été initiée dans 10 ml de milieu LB additionné de 50 µg/ml de kanamycine. Après 7 à 8 h de croissance cellulaire à 37 °C sous agitation, cette pré-culture a été centrifugée à 4000 rpm pendant 10 min afin de culotter les cellules. Le culot cellulaire a ensuite été repris dans 20 ml de milieu de culture minimum M9 (voir **tableau 5** décrivant sa composition et sa préparation) auxquels ont été ajoutés 50 µg/ml de kanamycine. En fonction du type de marquage souhaité, ce milieu de culture a été préparé avec du D-glucose (si IFITM3 ne devait être enrichie qu'en isotope ^{15}N) ou avec du D-glucose ^{13}C (si IFITM3 devait être enrichie en isotopes ^{15}N et ^{13}C). Les cellules ont alors été adaptées au milieu minimum M9 par dilutions successives, en les faisant croître à 37 °C sous agitation puis en les culottant et en les reprenant dans un volume de milieu de culture plus important (soit, 40 ml puis 200 ml et enfin 500 ml). Une fois les cellules diluées dans 500 ml de milieu de culture M9, celles-ci ont été placées à 37 °C sous agitation (150 rpm) jusqu'à ce que leur $\text{DO}_{600\text{nm}}$ atteigne une valeur comprise entre 0.8 et 1 U.A. L'expression par les cellules de la protéine

IFITM3 simplement marquée ^{15}N ou doublement marquée ^{15}N , ^{13}C a alors été induite par l'ajout d'1 mM d'IPTG sous agitation à 20 °C jusqu'au lendemain matin.

Ingrédient	Quantité
Na_2HPO_4	6 g
KH_2PO_4	3 g
NaCl	0,5 g
$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)	1 g
<i>Ajout d'eau Milli-Q jusqu'à un volume final d'1L Litre de culture autoclavé Puis ajout des ingrédients suivants :</i>	
D-Glucose ou D-Glucose ^{13}C (U-13C6, 99 %) (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)	2 g
MgSO_4 (1 M)	1 ml
CaCl_2 (0,1 M)	1 ml
MnCl_2 (0,1 M)	1 ml
ZnSO_4 (50 mM)	1 ml
FeCl_3 (100 mM)	500 μl
Vitamines (tablette d'un cocktail de vitamines)	2 ml
Kanamycine (50 mg/ml)	1 ml

Tableau 5 : Mode opératoire et ingrédients nécessaires à la préparation d'1L de milieu de culture minimum M9

5.4. Deutération de la protéine IFITM3

Afin d'aboutir à l'expression d'une protéine IFITM3 100 % deutérée, certaines étapes du protocole d'expression et de marquage de la protéine, décrites ci-dessus, ont été effectuées en présence de D_2O ou eau lourde. C'est le cas notamment de la troisième étape de dilution, lorsque le culot bactérien a été repris dans 40 ml de milieu minimum M9, l'eau (H_2O) utilisée pour la préparation de ce milieu a été substituée à 50 % par de l'eau lourde (D_2O). Tandis que les milieux utilisés lors des deux dernières étapes, lorsque les culots cellulaires ont été repris dans 200 ml et 500 ml de milieu minimum M9, ont été préparés à partir de 100 % d'eau lourde et d'ingrédients deutérés (à l'exception du Na_2HPO_4 , du KH_2PO_4 et du NaCl). De l'IPTG deutéré a également été utilisé pour induire l'expression de la protéine.

5.5. Purification à pH 10 de la protéine IFITM3 marquée et/ou deutérée

Le protocole suivi pour purifier IFITM3 à pH 10 est rigoureusement identique à celui décrit pour la purification de la protéine à pH 7,4 si ce n'est que partout où il est utilisé, le tampon PBS pH 7,4 a été substitué par un tampon contenant 50 mM de CAPS pH 10 et 150 mM de NaCl .

5.6. Dénaturation et repliement de la protéine ¹⁵N IFITM3

Deux culots cellulaires, provenant chacun d'1 litre de culture de cellules C41 ayant préalablement exprimé ¹⁵N-IFITM3 pendant environ 18h à 20 °C, ont tout d'abord chacun été repris dans 20 ml de tampon de lyse (PBS pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoéthanol) additionné d'une tablette d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Les cellules ont ensuite été lysées lors d'un cycle de sonication de 6 min au total (1 sec « on », 1 sec « off ») à une amplitude de 70 % puis centrifugées à 75600 g (25 000 rpm) pendant 45 min. Chaque culot comprenant les membranes, ainsi généré, a été repris dans 20 ml de tampon PBS pH 7,4 contenant 8 M d'urée tandis que 8 M d'urée ont été ajoutés directement au surnageant. Après 2h30 d'incubation sous agitation à température ambiante, toutes les solutions ont été centrifugées à 48384 g (20 000 rpm) pendant 40 min. Tous les surnageants ainsi obtenus ont alors été déposés sur une colonne de nickel HisTrap HP de 5 ml, préalablement équilibrée avec du tampon PBS pH 7,4 contenant 8 M d'urée et 10 mM d'imidazole. La résine a ensuite été lavée avec ce même tampon d'équilibration additionné de 4,5 mM de Fos-Choline-12. Un gradient de concentration, étalé sur 8 volumes colonne, allant de 8 M d'urée à 0 M d'urée a alors été appliqué à la résine de manière à promouvoir le repliement d'IFITM3 en présence de son détergent. La résine a ensuite été lavée avec du tampon PBS pH 7,4 contenant 10 mM d'imidazole et 4,5 mM de Fos-Choline-12 et enfin IFITM3 a été éluée de la résine au cours d'un gradient de concentration en imidazole allant de 10 à 300 mM.

Les fractions d'éluion de la résine de nickel, identifiées sur gel SDS-PAGE comme contenant IFITM3, ont alors été concentrées jusqu'à 500 µl à l'aide d'une unité d'ultrafiltration Amicon Ultra ayant un seuil de coupure de 10 kD puis injectées sur une colonne de chromatographie d'exclusion stérique Superdex 200 10/300 GL Increase dans du tampon PBS pH 7,4 contenant 1 mM de β-mercaptoéthanol et 3,5 mM de Fos-Choline-12. Sur le profil d'éluion ainsi obtenu, les fractions du pic correspondant au volume d'éluion habituel d'IFITM3 (13,5 ml) ont été sélectionnées puis concentrées jusqu'à 160 µl (soit le volume du tube capillaire devant contenir l'échantillon) avant analyse par RMN.

5.7. Assemblage des nanodisques avec la protéine IFITM3 marquée et/ou deutérée

Les lipides POPC solubilisés en sodium cholate, la protéine d'assemblage (MSP1E3D1, MSP1 ou MSP1D1ΔH5) et la protéine IFITM3 solubilisée en DPC et purifiée à pH 7,4 ou à pH 10 ont été mélangés en respectant l'un des ratios molaires donnés dans le

tableau ci-dessous (**tableau 6**). La concentration finale du mélange en sodium cholate devant être comprise entre 12 et 40 mM (Ritchie *et al.*, 2009), ce mélange a été, si besoin, supplémenté en conséquence avec du tampon PBS pH 7.4 contenant 50 mM de sodium cholate. Après 15 min d'incubation sur glace, 0,5 g/ml de billes adsorbantes, préalablement lavées au méthanol et rincées à l'eau, ont été ajoutées au mélange afin d'en soustraire les détergents et d'initier le processus d'auto-assemblage des nanodisques. Après une nuit d'incubation sous agitation à 4 °C, les billes ont été retirées du mélange tel que décrit précédemment.

Nanodisques	MSP1E3D1 : POPC : IFITM3	MSP1 : POPC : IFITM3	MSP1D1ΔH5 : POPC : IFITM3
Ratio molaire	1 : 60 : 0,3	1 : 35 : 0,1	1 : 25 : 0,5
		1 : 35 : 0,15	

Tableau 6 : Tableau indiquant selon quels ratios molaires la protéine d'assemblage MSP, les lipides POPC et la protéine d'intérêt IFITM3 ont été mélangés pour former les nanodisques

Les nanodisques pleins, contenant la protéine IFITM3, ont ensuite été séparés des nanodisques vides, n'ayant pas incorporé la protéine, par chromatographie d'affinité sur résine de nickel. Pour ce faire, le mélange contenant les nanodisques a été incubé, pendant 2h sous agitation à 4 °C, avec de la résine de nickel Ni Sepharose 6Fast Flow, préalablement équilibrée avec du tampon PBS pH 7,4. Ce mélange nanodisques-résine a ensuite été transféré dans une colonne et la fraction du mélange non retenue par la résine a été éluée par gravité, constituant le « Flow Through » (FT). La résine a ensuite été lavée une première fois avec du tampon PBS pH 7,4 puis une seconde fois avec du tampon PBS pH 7,4 contenant 10 mM d'imidazole. La protéine d'assemblage MSP n'étant pas pourvue d'une étiquette poly-histidine, les nanodisques vides ne se sont pas liés à la résine et ont par conséquent été retrouvés dans le « Flow Through » ainsi que dans les lavages. Les nanodisques pleins ont quant à eux été retenus par la résine grâce à l'étiquette poly-histidine d'IFITM3 et en ont été élués avec du tampon PBS pH 7,4 contenant 300 mM d'imidazole.

Les nanodisques contenant IFITM3, élués de la résine de nickel, ont ensuite été concentrés jusqu'à un volume de 500 µl, à l'aide d'une unité d'ultrafiltration Amicon Ultra ayant un seuil de coupure de 30 kD. Les nanodisques ainsi concentrés ont été injectés sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille Superdex 200 10/300 GL puis en ont été élués dans du tampon PBS pH 7,4. Les fractions correspondant au profil d'éluion des

nanodisques ont été collectées puis concentrées à nouveau, tel que décrit précédemment, jusqu'au volume souhaité pour l'analyse par RMN.

Lorsque l'étude des nanodisques par RMN devait être effectuée à pH 4, les nanodisques ont tout d'abord été concentrés jusqu'à un volume de 1 ml, puis ont été dilués 20x dans du tampon contenant 50 mM d'acétate de sodium et 25 mM de chlorure de potassium à pH 4, avant d'être reconcentrés jusqu'au volume souhaité pour leur analyse par RMN.

6. *Expériences de Résonance Magnétique Nucléaire*

L'état de la protéine IFITM3 dans différentes conditions a tout d'abord été évalué par RMN (Résonance Magnétique nucléaire) en solution lors d'expériences 2D de type HN-HSQC. Ces expériences ont été enregistrées en utilisant un échantillon enrichi en isotope ^{15}N , aux températures de 5, 10, 20, 30 et 40 °C sur des spectromètres fonctionnant aux fréquences de 700 et 850 MHz. Après avoir défini la condition la plus favorable à l'étude d'IFITM3 par RMN, des expériences à triple résonance telles que HNCOC, HNCACO, CBCANH et CBCAcoNH ont été conduites avec la protéine IFITM3 doublement marquée ^{15}N , ^{13}C et deutérée afin de procéder à l'attribution de sa chaîne principale. D'autres expériences telles que HcCH-Tocsy, HccoNH, hCCH-Tocsy et HCccoNH ont ensuite été réalisées avec un échantillon de protéine IFITM3 doublement marquée ^{15}N , ^{13}C afin d'attribuer ses chaînes latérales. Les expériences destinées à attribuer la chaîne principale ainsi que les chaînes latérales d'IFITM3 ont été enregistrées sur les spectromètres 850 et 950 MHz de la plateforme RMN de l'IBS. Enfin, le traitement et l'analyse des données de RMN ainsi obtenues ont été faits à l'aide des logiciels TopSpin et ccpNmr Analysis respectivement.

7. *Mise en évidence, par la méthode d'électrophysiologie TEVC, de la formation de pores membranaires par la protéine IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12*

La technique d'électrophysiologie « Two-Electrode Voltage Clamp » (TEVC) a été développée pour étudier les canaux ioniques exprimés dans de très grandes cellules telles que l'ovocyte de Xénope (~1 mm de diamètre). Deux électrodes sont impliquées dans cette

technique : une est utilisée pour mesurer le voltage (maintenu à -50mV dans nos conditions expérimentales) et l'autre permet d'injecter le courant nécessaire pour atteindre le voltage désiré (**figure 16**).

Le TEVC permet de mesurer en temps réel le courant généré par le mouvement de charges se produisant au travers de la membrane plasmique de l'ovocyte et généré soit par des canaux ioniques, des pores ou des fuites ioniques dues à une déstabilisation de la bicouche lipidique.

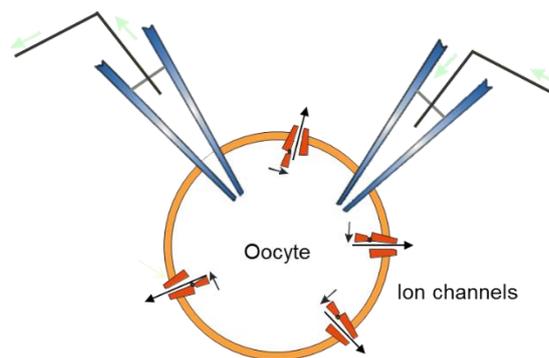


Figure 16 : Technique TEVC « Two-Electrode Voltage Clamp » sur un ovocyte de xénope exprimant des canaux ioniques

7.1. Procédure expérimentale

Les électrodes utilisées sont en argent/chlorure d'argent et sont placées dans des capillaires de borosilicate (Kimble Product Inc.), d'une résistance de 0.2-0.8 M Ω , remplis avec une solution de 3 M KCl.

Le groupe Channels à l'IBS possède un robot automatisé pour l'analyse TEVC appelé « Robot HiClamp » (Multichannel Systems). Ce robot présente de nombreux avantages puisqu'il permet le criblage d'un grand nombre de cellules dans un temps relativement rapide, et que le volume de ligand requis est réduit (200 μ L contre plus de 20 ml pour la version manuelle).

Le robot possède un plateau mobile composé de 3 zones: 1 pour la plaque 96 puits contenant les ovocytes; 1 pour la plaque 96 puits contenant les solutions testées; et 1 contenant une zone de flux continu pour le lavage des ovocytes avant mesure. Les ovocytes sont transférés, à l'aide d'une pompe de succion, de la plaque à un panier avec fil d'argent servant d'électrode de référence. Le robot réalise automatique un empalement des électrodes dans l'ovocyte puis le potentiel de membrane est imposé à -50 mV (**figure 17**). Avant de

tester les solutions de protéine, la cellule est placée dans la station de lavage, et est lavée par le tampon "physiologique" ND96, (91 Mm NaCl, 2mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂.6H₂O, 5mM HEPES, pH 7.4). Après cette étape, l'ovocyte est incubé dans les puits d'une plaque 96 puits contenant les solutions de ligands (**figure 18**).

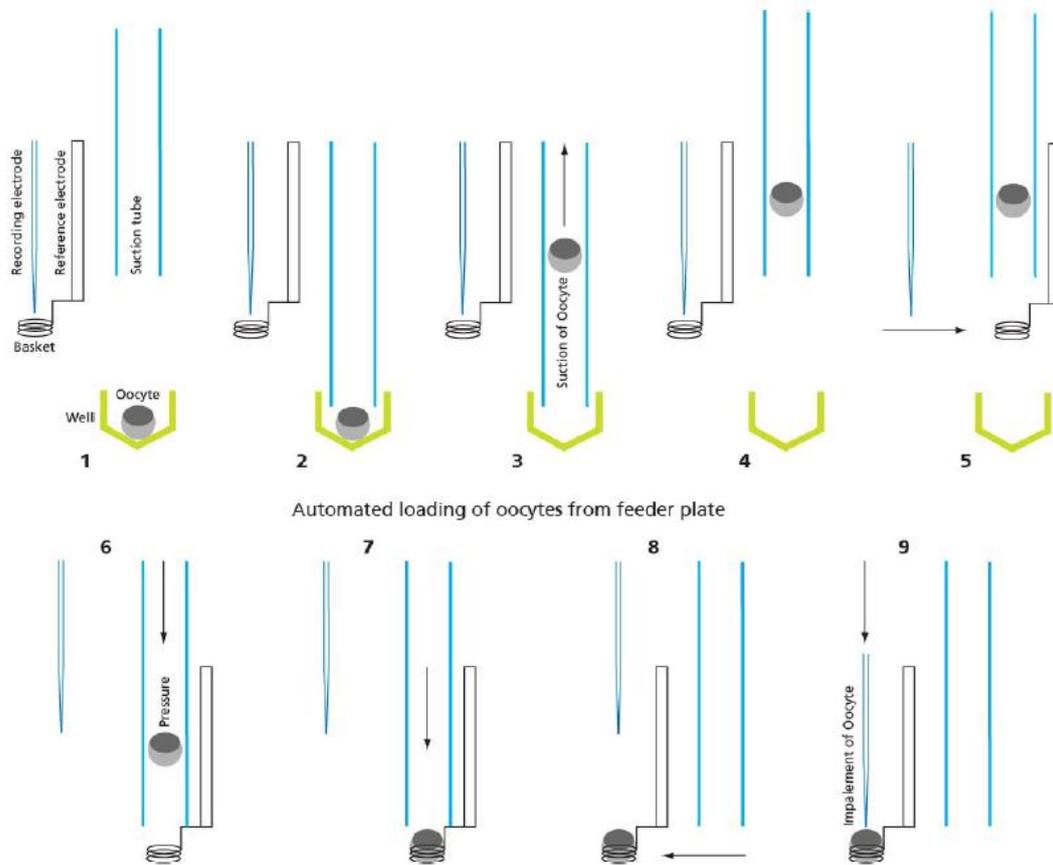


Figure 17 : Transport automatisé de l'ovocyte de la plaque 96 puits dans laquelle il se trouve au panier. **1.** Ovocyte dans le puit sélectionné. **2.** Descente du tube de suction dans le puit. **3.** Aspiration de l'ovocyte. **4.** Déplacement du tube de suction vers le panier. **5.** Positionnement du tube de suction directement au-dessus du panier. **6.** Emission de l'ovocyte par le tube de suction. **7.** Ovocyte placé dans le panier. **8.** Déplacement du panier contenant l'ovocyte et positionnement en-dessous des électrodes TEVC. **9.** Abaissement des électrodes et empalement de l'ovocyte pour enregistrement.

(Figure issue du manuel HiClamp, Multichannel Systems)

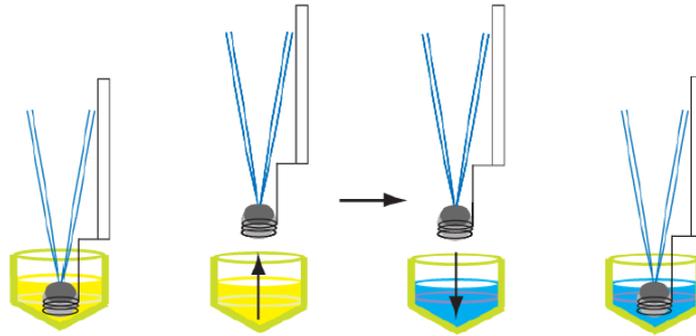


Figure 18 : Déplacement du panier contenant l'ovocyte empalé par les électrodes d'un puit à l'autre de la plaque contenant les solutions à tester (figure issue du manuel HiClamp, Multichannel Systems).

Résultats

1. Résumé des premières tentatives d'expression et de purification d'IFITM3

Le premier objectif à atteindre était de parvenir à mettre au point un protocole permettant d'exprimer et de purifier la protéine IFITM3 sous une forme soluble et en quantité suffisante pour pouvoir procéder à sa caractérisation biochimique et structurale.

J'ai tout d'abord commencé par exprimer IFITM3 avec un partenaire de fusion, Mistic, dans la souche de bactéries *E.coli* BL21. Mistic est une protéine chaperonne qui a été utilisée ici pour transporter IFITM3 aux membranes et y promouvoir son insertion (Roosild *et al.*, 2005). Cependant, une fois la protéine Mistic-IFITM3 exprimée et purifiée sous une forme soluble en DDM, tous les moyens mis en œuvre pour séparer complètement les deux protéines l'une de l'autre, après clivage de la protéine de fusion ont échoué. Seulement une très faible quantité de protéine IFITM3 pouvait être séparée de Mistic par chromatographie échangeuse d'anions. 100 µl de protéine IFITM3 à une concentration de 12 mg/ml ont ainsi été purifiés à partir de 12 L de culture cellulaire et des micro-cristaux ont tout de même été obtenus à deux reprises dans la même condition (10 % PEG 1000 – 10 % PEG 8000) avec 2,5 mg/ml et 12 mg/ml de protéine IFITM3. L'un d'entre eux a diffracté les rayons X dans une seule direction à une résolution de 16 angströms. En outre, les premières expériences de caractérisation biophysique d'IFITM3 en micelles de DDM par la méthode SEC-MALLS, par électrophorèse en gels natifs ainsi que par microscopie électronique à coloration négative, ont révélé que la protéine y demeurait sous la forme d'un mélange d'oligomères pouvant être défavorable à sa cristallisation. Plusieurs de ces formes oligomériques ont été isolées par chromatographie échangeuse d'ions et élution en gradient de force ionique mais en quantités trop faibles pour procéder à leur caractérisation. En conclusion, en raison de la difficulté à purifier des quantités décentes de protéine IFITM3 de cette façon, d'autres approches visant à purifier IFITM3 en plus grande quantité ont alors été tentées. IFITM3 a notamment été exprimée seule (sans son partenaire de fusion Mistic) en cellules *E.Coli* souche C41, cependant les quelques détergents testés ne sont pas parvenus à l'extraire efficacement des membranes.

J'ai alors changé de système d'expression et ai exprimé la protéine IFITM3 en cellules d'insecte « *spodoptera frugiperda* » (SF21), au sein desquelles certaines modifications post-traductionnelles peuvent avoir lieu, telles que la palmitoylation des cystéines (Fröhlich *et al.*, 2014). IFITM3 y a été exprimée avec et sans signal de sécrétion de la mélittine d'abeille,

ce signal est habituellement ajouté aux protéines recombinantes pour faciliter leur translocation dans le RE et dans le cas des protéines membranaires, pour favoriser leur intégration dans les membranes. Cependant, avec ou sans signal de sécrétion, la protéine y a été très faiblement exprimée. En outre, lors de sa première étape de purification par chromatographie d'affinité sur résine de nickel, IFITM3 en micelles de DDM a été éluée de la résine avec seulement 10 mM d'imidazole, ce qui d'une part n'était pas un bon présage quant à son repliement et ce qui d'autre part n'a pas permis de la séparer des contaminants. Pour ces raisons, cette approche a par conséquent été rapidement abandonnée.

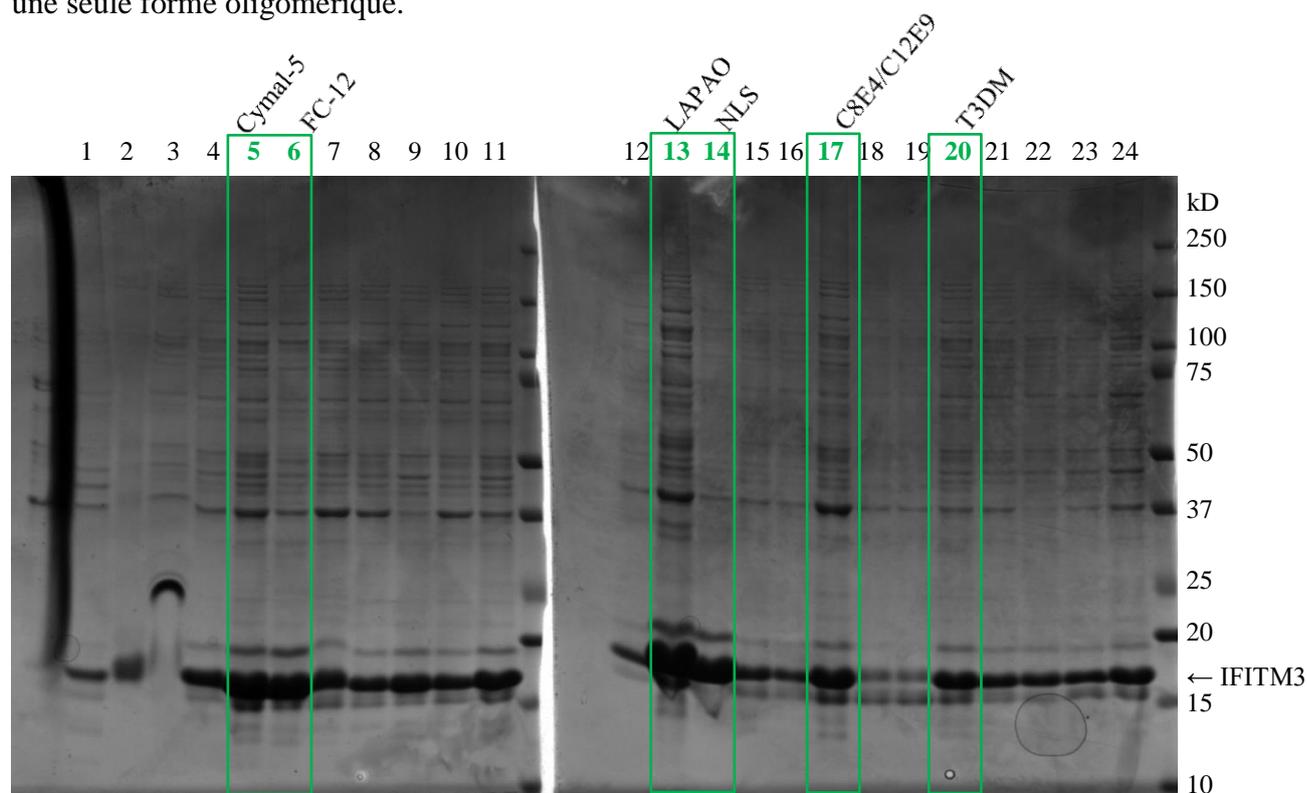
Un dernier système d'expression a alors été testé, il s'agit de l'expression d'IFITM3 *in vitro*, en système dit « cell-free » dans lequel les protéines recombinantes sont produites en solution, en dehors de cellules vivantes, en utilisant la machinerie de transcription et de traduction biomoléculaire extraite de cellules. Les trois mêmes problèmes majeurs ont une nouvelle fois été rencontrés à savoir, un rendement d'expression jugé trop faible pour l'étude structurale de la protéine, la présence de nombreux contaminants dont il est difficile de se séparer et l'obtention d'un mélange d'oligomères d'IFITM3 en micelles de DDM, objectivé par un pic d'élution très large à l'issue de la purification de la protéine par chromatographie d'exclusion de taille.

En conclusion, parmi ces trois systèmes d'expression, c'est en bactéries que les meilleurs rendements d'expression ont été obtenus. D'autre part, bien que le DDM soit un détergent largement plébiscité pour la cristallisation des protéines membranaires possédant des hélices alpha (Parker et Newstead, 2016), celui-ci ne semble pas convenir à l'étude d'IFITM3 et promeut la formation de gros assemblages d'IFITM3. C'est pourquoi, j'ai décidé de revenir à l'expression d'IFITM3 en souche de bactéries *E.coli* C41 et de faire appel à la plateforme de criblage de détergents de l'IBS afin de trouver un détergent permettant de solubiliser IFITM3 des membranes et de la purifier sous une seule forme oligomérique.

2. Résultats du criblage de détergents pour la solubilisation et la purification d'IFITM3

Parmi les 24 détergents ou combinaisons de détergents testés, six (Cymal-5, Fos-Choline-12, LAPAO, NLS, C8E4/C12E9 et T3DM) ont permis de solubiliser et de purifier la protéine IFITM3, exprimée à la membrane de cellules *E.Coli* souche C41, en plus grandes

quantités, tel qu'observé, sur le gel SDS-PAGE, par l'épaisseur des bandes correspondant à IFITM3 dans ces détergents (**figure 19**). Comparé aux quatre autres détergents ou combinaisons de détergents, moins de contaminants ont été observés suite à la solubilisation et à la purification d'IFITM3 en NLS et en T3DM. Cependant, le NLS est un détergent anionique dénaturant les protéines, celui-ci n'a donc pas été choisi. LeT3DM et les détergents C8E4/C12E9 n'étant, quant à eux, pas disponibles au laboratoire, ce sont finalement le Cymal-5, la Fos-Choline-12 et le LAPAO qui ont été choisis puis testés afin de déterminer si l'un d'entre eux pourrait permettre de purifier la protéine IFITM3 en grande quantité et sous une seule forme oligomérique.



Puit n°	Détergent	Puit n°	Détergent	Puit n°	Détergent	Puit n°	Détergent
1	CHAPS	7	B-OG	13	LAPAO	19	C12E9
2	Cymal-2	8	Echange	14	NLS	20	T3DM
3	Cymal-3	9	DDM	15	TX100	21	T4DM
4	Cymal-4	10	DM	16	MNG3	22	N-Dodecyl-B-D-Thiomaltopyranoside
5	Cymal-5	11	UDM	17	Echange	23	OGNG
6	Fos-Choline-12	12	LDAO	18	C12E8	24	N-Nonyl-B-D-Gluopyranoside

Figure 19 : Gel SDS-PAGE montrant le résultat de la solubilisation et de la purification d'IFITM3 avec chacun des 24 détergents ou combinaisons de détergents testés listés dans le tableau ci-dessus (le criblage de détergents et le gel SDS-PAGE ont été réalisés par la plateforme RoBioMol de l'IBS)

3. Test de solubilisation et de purification d'IFITM3 en Cymal-5, Fos-Choline-12 et LAPAO

Après que la protéine IFITM3, exprimée à la membrane de cellules *E.coli* C41, en ait été extraite par l'un de détergents suivants : le Cymal-5, la Fos-Choline-12 ou le LAPAO ; celle-ci a été purifiée par chromatographie d'affinité sur résine de nickel en présence du détergent ayant servi à la solubiliser. Le résultat de la solubilisation d'IFITM3 ainsi que ceux des différentes étapes de sa purification sur résine de nickel ont ensuite été analysés sur gel SDS-PAGE (**figure 20**). Si l'on compare, pour chaque détergent testé, l'épaisseur de la bande correspondant à IFITM3 avant (FI, Fraction Insoluble = membranes bactériennes contenant IFITM3) et après sa solubilisation (FS, Fraction Soluble = IFITM3 en micelles de détergent), le rendement d'extraction obtenu avec chaque détergent testé apparaît comme étant très satisfaisant. Bien que le rendement de solubilisation obtenu avec la Fos-Choline-12 semble être légèrement supérieur à ceux obtenus avec les deux autres détergents, il est difficile de les départager sur ce point. Concernant la purification d'IFITM3 sur résine de nickel, si l'on en juge par la quantité de protéine IFITM3 visible dans le FT (« Flow Through ») sur le gel SDS-PAGE, une quantité non négligeable ne s'est pas liée à la résine et ce, indépendamment du détergent choisi. Quant au résultat de l'élution de la résine de nickel, il ne semble pas non plus varier drastiquement d'un détergent à l'autre. Seule une bande, située entre 10 et 15 kD sur le gel SDS-PAGE, apparaît de façon plus marquée dans l'élution obtenue avec la Fos-Choline-12 (**figure 20**). Il pourrait s'agir soit, d'un contaminant soit, d'une dégradation d'IFITM3.

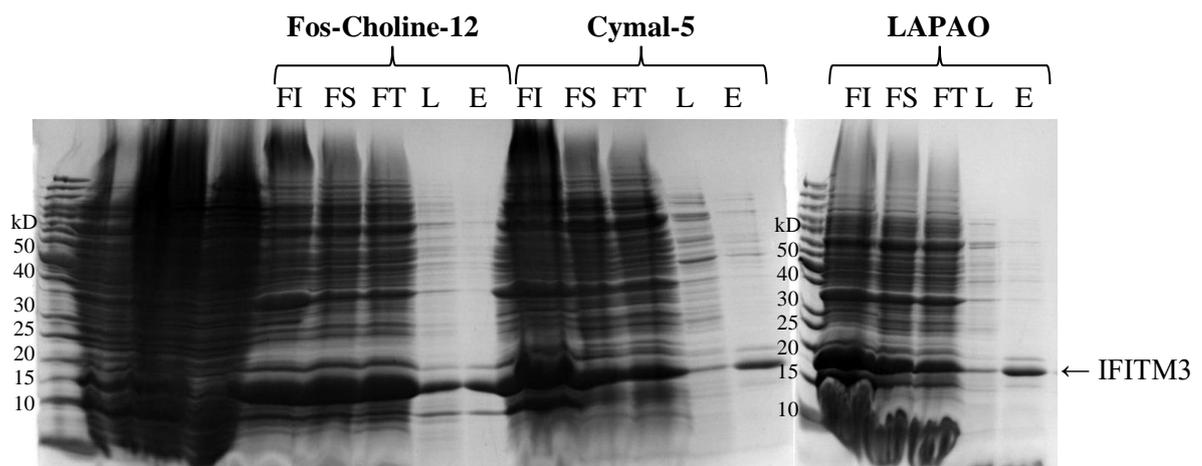
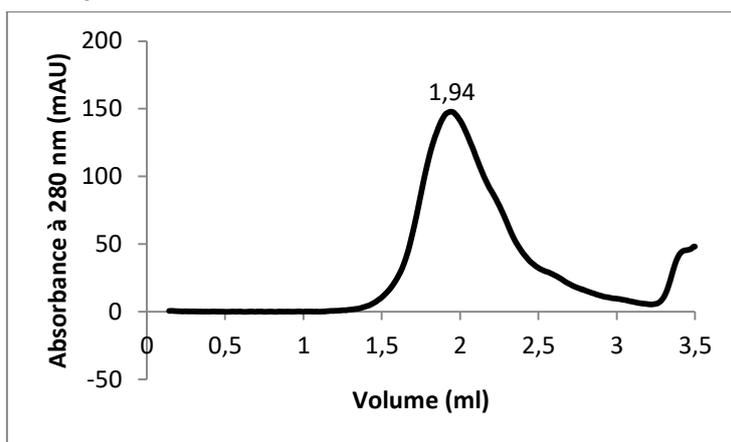


Figure 20 : Gel SDS-PAGE des étapes de purification d'IFITM3 par chromatographie d'affinité sur résine de nickel en Fos-Choline-12, Cymal-5 et LAPAO

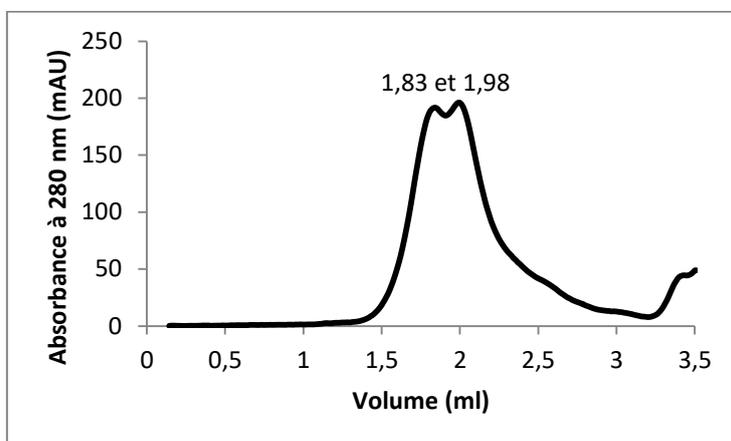
(FI = Fraction Insoluble, membranes contenant IFITM3 ; FS = Fraction Soluble, IFITM3 en micelles de détergent ; FT = « Flow Through », fraction non retenue sur la résine ; L = Lavage ; E = Elution)

La protéine IFITM3 éluée de la résine de nickel a ensuite fait l'objet d'une étape de purification par chromatographie d'exclusion de taille. Pour chaque détergent testé, un échantillon de l'éluat d'IFITM3 a été injecté sur une colonne Superdex 200 5/150 GL. Sur le profil d'éluat obtenu en Cymal-5, le pic correspondant à IFITM3 est relativement large et présente un épaulement (**figure 21A**). La largeur du pic pouvant refléter la présence de plusieurs formes oligomériques d'IFITM3 en micelles de Cymal-5, ce détergent n'a pas été jugé satisfaisant. Ensuite, sur le profil d'éluat obtenu en LAPAO, IFITM3 est représentée par deux pics non résolus (**figure 21B**). Il pourrait s'agir de deux espèces oligomériques différentes de la protéine voire plus. Le LAPAO n'ayant pas permis d'isoler une seule forme oligomérique de la protéine, celui-ci n'a pas non plus été retenu. Enfin, sur le profil d'éluat obtenu en Fos-Choline-12, le pic correspondant à IFITM3 est plus étroit et bien qu'il présente un épaulement de part et d'autre (**figure 21C**), ce pic pourrait correspondre à une seule forme oligomérique d'IFITM3. Le restant de l'éluat obtenu en Fos-Choline-12 a alors été concentré jusqu'à un volume de 500 µl puis injecté sur une colonne Superdex 200 10/300 GL. Le profil d'éluat ainsi obtenu concorde avec celui généré suite au passage de l'échantillon sur la colonne Superdex 200 5/150 GL utilisée à des fins analytiques (**figure 21 et 22**). Ici, le profil d'éluat montre un pic principal éluant à 13,2 ml associé à sa gauche à un autre pic plus petit éluant à 11,3 ml qui pourrait correspondre à une autre forme oligomérique d'IFITM3 (**figure 22**). Afin de vérifier cette hypothèse, IFITM3 a été solubilisée et purifiée en micelles de Fos-Choline-12 à plus grande échelle, puis a fait l'objet de plusieurs expériences de caractérisation biochimique destinées à définir l'état oligomérique ainsi que le repliement qu'elle adopte dans ce détergent.

A. Cymal-5



B. LAPAO



C. Fos-Choline-12

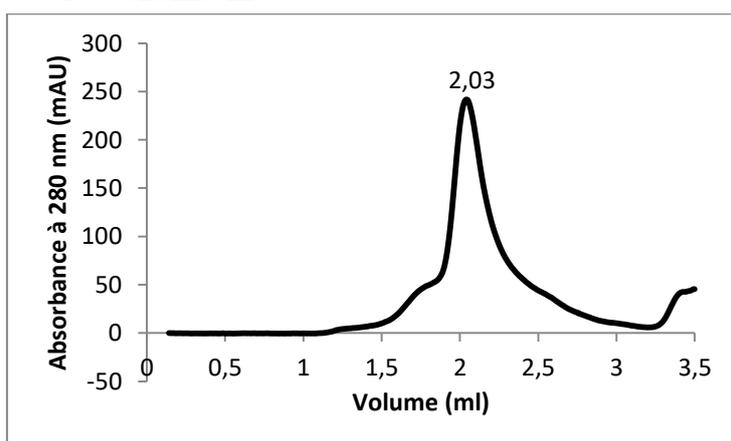


Figure 21 : Chromatogrammes obtenus après injection de 50 μ l de protéine IFITM3, purifiée par chromatographie d'affinité sur résine de nickel, sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille Superdex 200 5/150 GL dans du tampon 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoéthanol contenant l'un des détergents suivants : (A) 4,4 mM de Cymal-5, (B) 3,5 mM de LAPAO ou (C) 3,5 mM de Fos-Choline-12

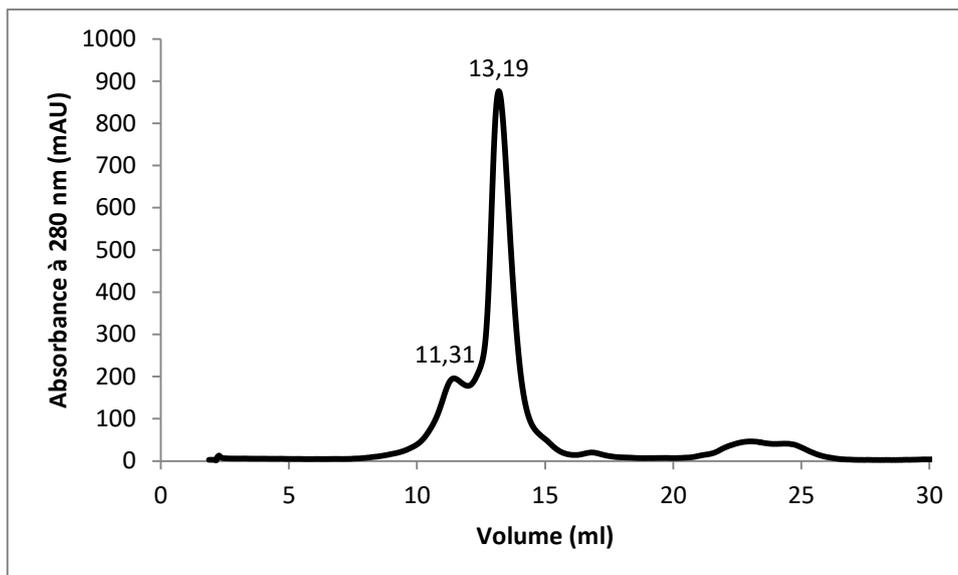


Figure 22 : Chromatogramme obtenu après injection de 500 μ l de protéine IFITM3, purifiée par chromatographie d'affinité sur résine de nickel, sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille Superdex 200 10/300 GL dans du tampon 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoéthanol et 3,5 mM de Fos-Choline-12

4. Solubilisation et purification d'IFITM3 en Fos-Choline-12 (à plus grande échelle)

La protéine IFITM3 a ensuite été solubilisée et purifiée en micelles de Fos-Choline-12, à partir du culot membranaire provenant d'un litre de culture cellulaire ayant exprimé la protéine et ce, en suivant le protocole décrit dans le matériel et méthodes. A l'issue de la purification d'IFITM3 par chromatographie d'affinité sur résine de nickel, quatre injections de 500 μ l de la fraction d'élution la plus concentrée en protéine ont été effectuées sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille Superdex 200 Increase 10/300 GL. Le profil d'élution montre que chaque injection de protéine a engendré l'apparition de 2 pics (**figure 23**). L'un éluant à 10,5 ml et l'autre à 13,5 ml. Toutes les fractions correspondant au 2^{ème} pic (13,5 ml) ont alors été concentrées jusqu'à un volume de 500 μ l avant d'être réinjectées sur la colonne. Le même pic est alors réapparu sur le profil d'élution (**figure 24**). Ce pic correspond à celui obtenu directement à partir d'une concentration inférieure en protéine (**figure 22**). Ceci suggère qu'une concentration en protéine plus importante, obtenue à l'issue de la purification par chromatographie d'affinité sur résine de nickel, pourrait promouvoir la formation d'une espèce oligomérique supérieure visualisée sur le profil d'élution soit, par un

épaulement (**figure 22**) situé à gauche du pic, soit par l'apparition d'un second pic éluant plus tôt et distinct du premier (**figure 23**).

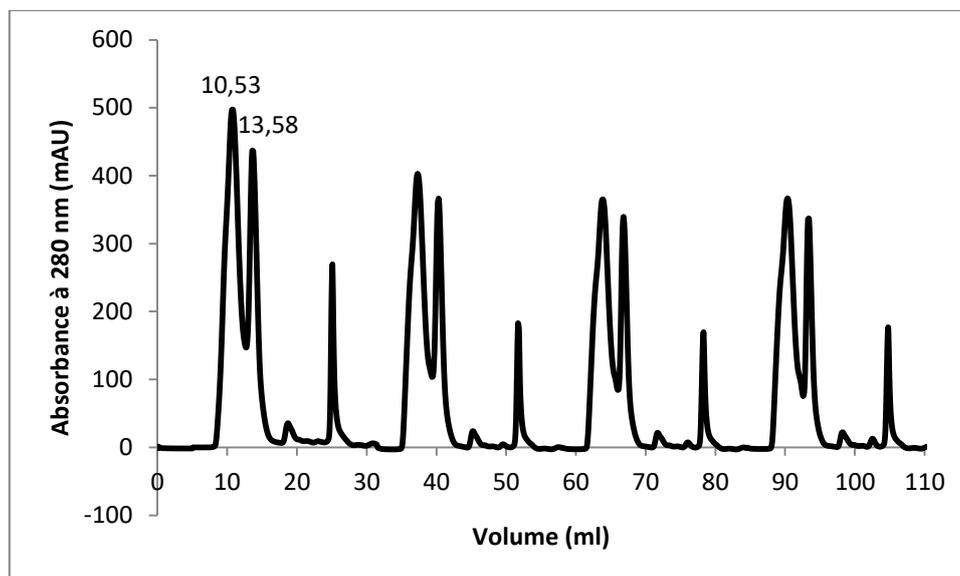


Figure 23 : Chromatogramme résultant de 4 injections de 500 μ l de protéine IFITM3, purifiée par chromatographie d'affinité sur résine de nickel, sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille Superdex 200 Increase 10/300 GL dans du tampon PBS pH 7,4 ; 1 mM β -mercaptoéthanol et 3,5 mM de Fos-Choline-12

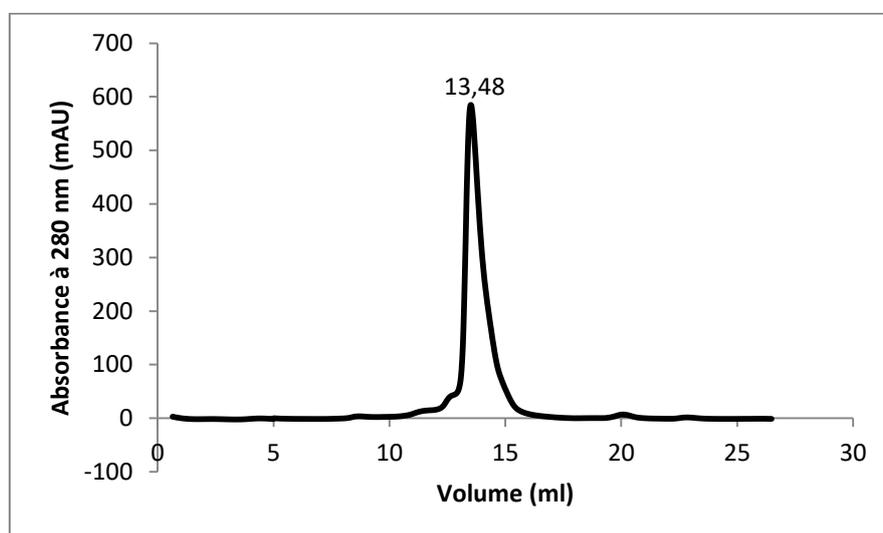


Figure 24 : Chromatogramme obtenu après ré-injection de 500 μ l de protéine IFITM3, concentrée à partir des fractions correspondant aux 2^{ème} pics d'éluion apparus sur le chromatogramme précédent, sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille Superdex 200 Increase 10/300 GL dans du tampon PBS pH 7,4 ; 1 mM β -mercaptoéthanol et 3,5 mM Fos-Choline-12

5. Caractérisation biochimique et biophysique d'IFITM3

5.1. Détermination de l'état oligomérique d'IFITM3 par SEC-MALLS

La méthode SEC-MALLS (« Size Exclusion Chromatography-Multi-Angle Laser Light Scattering ») a été utilisée afin de déterminer le poids moléculaire et par conséquent, l'état oligomérique adopté par IFITM3 à l'issue de sa purification par chromatographie d'exclusion de taille en micelles de Fos-Choline-12 (**figure 24**). Les masses moléculaires qui ont été calculées par le programme ASTRA sont de 51,63 kD pour le couple protéine-détergent, de 31,48 kD pour les micelles de Fos-Choline-12 associées à IFITM3 et de 20,15 kD pour IFITM3 (**figure 25**). La masse moléculaire obtenue pour IFITM3 éluant à 13,5 ml est donc légèrement supérieure à sa masse moléculaire théorique qui est de 17,8 kD. Néanmoins, cette expérience a permis de conclure qu'IFITM3 était bien présente sous sa forme monomérique en micelles de Fos-Choline-12. En outre, la valeur du rapport Mw/Mn (ou index de polydispersité) obtenu pour IFITM3, soit 1,004, indique que la distribution du poids moléculaire d'IFITM3 au sein de l'échantillon est plutôt monodisperse.

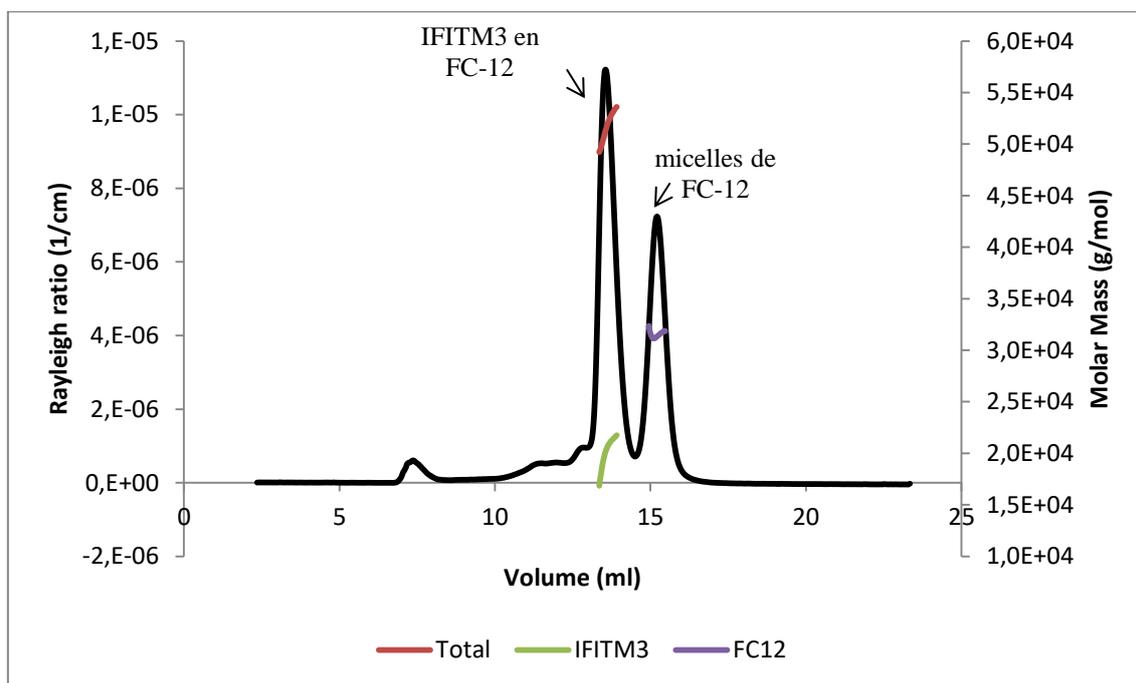


Figure 25 : Chromatogramme SEC-MALLS de la protéine IFITM3 (10 mg/ml) en micelles de Fos-Choline-12 éluant à 13,5 ml sur lequel sont rapportées les valeurs du ratio Rayleigh et des masses moléculaires calculées pour IFITM3, les micelles de FC-12 qui lui sont associées et le couple protéine-détergent (apparaissant respectivement en pointillés verts, mauves et rouges sur le chromatogramme) en fonction du volume d'éluant

5.2. Détermination de l'état oligomérique d'IFITM3 par pontage chimique

Deux agents de pontage chimique, l'EGS et le glutaraldehyde, ont été utilisés afin de mettre en évidence l'oligomérisation d'IFITM3 en Fos-Choline-12, tel qu'observé, par la présence d'un second pic, sur le profil d'éluion de la protéine obtenu par chromatographie d'exclusion de taille (**figure 23**), et identifier quelle(s) espèce(s) oligomérique(s) est/sont formée(s).

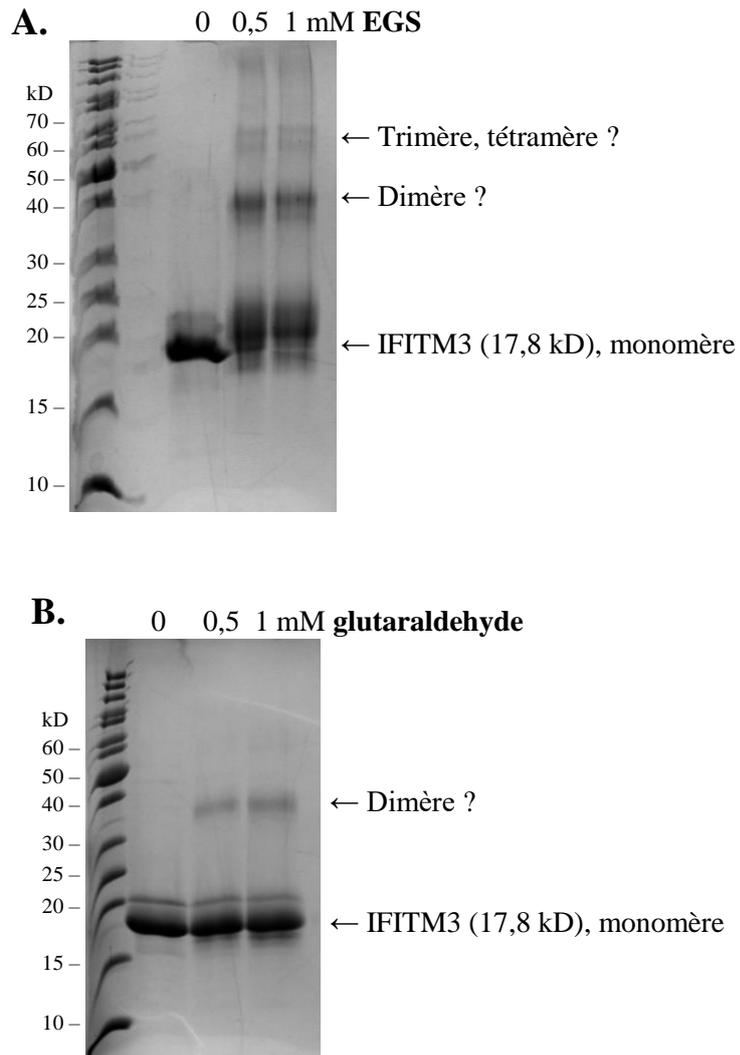


Figure 26 : Gels SDS-PAGE montrant le résultat de l'expérience de pontage chimique menée en présence d'un échantillon de la protéine IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12 et de différentes concentrations (0 ; 0,5 ; 1 mM) d'EGS (**A**) ou de glutaraldehyde (**B**)

L'ajout d'EGS et de glutaraldehyde à l'échantillon de protéine IFITM3 ont tous deux entraîné l'apparition, sur les gels SDS-PAGE correspondant, d'une bande ayant un poids moléculaire pouvant correspondre à celui d'un dimère formé par IFITM3, soit environ 36 kD

(figure 26A et B). L'ajout d'EGS a également entraîné l'apparition sur le gel d'autres bandes beaucoup moins intenses de plus haut poids moléculaire, situées entre les marqueurs de poids moléculaire 55 et 70 kD (**figure 26A**). Ces bandes pourraient correspondre à la formation d'un trimère voire d'un tétramère d'IFITM3. La différence de longueur entre les molécules d'EGS et de glutaraldehyde (16,1 versus 5 angströms) pourrait expliquer pourquoi ces bandes de plus haut poids moléculaire ne sont pas apparues en présence de glutaraldehyde. Cette formation de multimères pourrait aussi être engendrée par une concentration plus importante en protéine, l'échantillon d'IFITM3 ayant servi à réaliser l'expérience de pontage chimique en présence d'EGS semblant plus concentré sur le gel SDS-PAGE que celui ayant servi à réaliser l'expérience en présence de glutaraldehyde (**figure 26A et B**). Néanmoins, la même conclusion peut être tirée avec les deux agents de pontages chimiques, la protéine IFITM3 pourrait former un dimère en micelles de Fos-Choline-12.

La même expérience de pontage chimique a ensuite été menée sur un échantillon de membranes bactériennes (provenant de cellules *E.coli* souche C41) au sein desquelles IFITM3 a été exprimée. Différentes concentrations d'EGS leur ont été appliquées (0 ; 0,5 et 1 mM) en suivant le même protocole que celui utilisé pour la protéine en micelles de détergent, puis le résultat du pontage chimique a été visualisé en détectant par « western blot » la présence de la protéine IFITM3 avec un anticorps anti-IFITM3 (**figure 27**). Sur la membrane de transfert sont apparues, en plus de la bande correspondant au monomère d'IFITM3, deux autres bandes. La première, majoritaire, située entre 35 et 40 kD, pourrait correspondre à la forme dimérique d'IFITM3 tandis que la deuxième, située légèrement au-dessus de 55 kD, pourrait correspondre à sa forme trimérique (**figure 27**). Ces résultats concordent avec ceux obtenus pour IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12 écartant une éventuelle influence du détergent sur l'état oligomérique adopté par IFITM3 en solution.

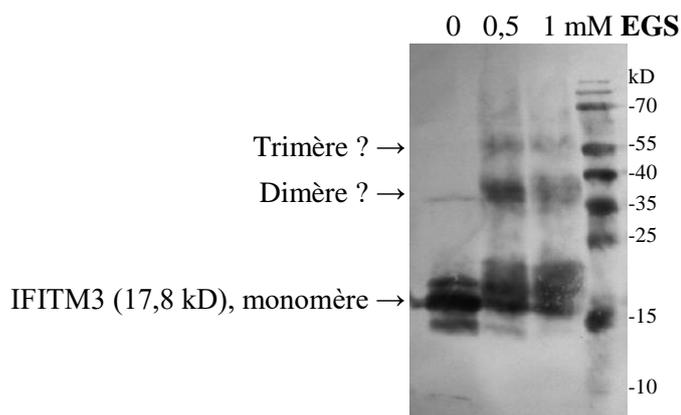


Figure 27 : « Western blot », réalisé avec un anticorps anti-IFITM3, montrant le résultat de l'expérience de pontage chimique menée en présence d'un échantillon de membrane bactériennes contenant IFITM3 et de différentes concentrations (0 ; 0,5 ; 1 mM) d'EGS

5.3. Observation par microscopie électronique à coloration négative de la protéine IFITM3 fortement concentrée en micelles de Fos-choline-12

Un échantillon de protéine IFITM3, solubilisée en micelles de Fos-Choline-12 et identifiée comme s'y trouvant au départ sous une forme monomérique, a été concentré jusqu'à 15 mg/ml puis observé par microscopie électronique à coloration négative avant de faire l'objet de tests de cristallisation. Les images acquises à partir de cet échantillon y ont montré la présence de particules sphériques de taille relativement homogène et largement supérieure à celle d'un monomère ou d'un dimère d'IFITM3 (**figure 28**). Cette observation indique qu'à très haute concentration, les protéines IFITM3 peuvent s'associer entre elles et former de plus grands assemblages.

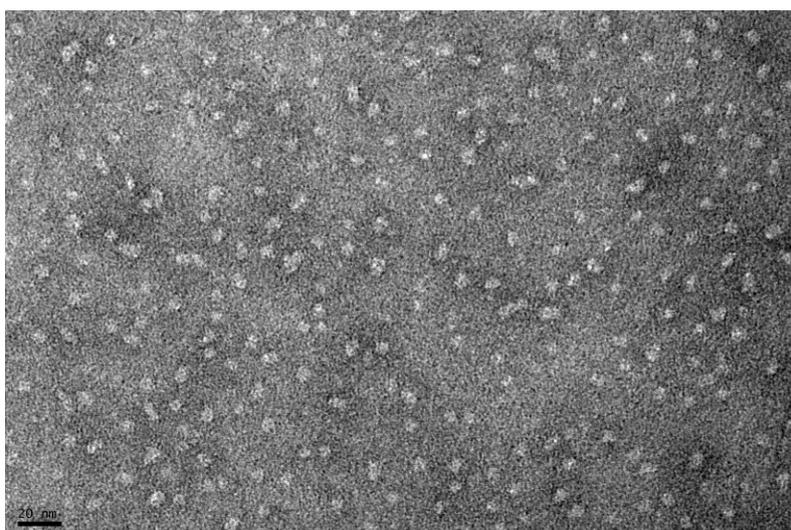


Figure 28 : Image de microscopie électronique à coloration négative d'un échantillon de protéine IFITM3 concentrée à 15 mg/ml en micelles de Fos-Choline-12

5.4. Analyse par dichroïsme circulaire de la structure secondaire adoptée par IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12

Les résultats de l'expérience de dichroïsme circulaire menée avec la protéine IFITM3 à 9 μM (0,16 mg/ml) dans du tampon 20 mM NaP, 150 mM NaF et 3,5 mM Fos-Choline-12 ainsi que d'autres informations (concentration et nombre d'acides aminés de la protéine, épaisseur de la cuvette utilisée) ont été utilisés par le serveur web « Capito – CD Analysis & Plotting Tool » pour établir le spectre de dichroïsme circulaire d'IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12. Ce spectre représente l'évolution de la valeur d'ellipticité moyenne par résidu (θ en $10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) en fonction de la longueur d'onde (en nm) (**figure 29**). Les hélices alpha montrent un spectre de dichroïsme circulaire particulier présentant deux minima soit à 208 et 222 nm alors que les structures en feuillets bêta montrent un seul minimum à 215 nm. Les structures désordonnées (ou pelotes aléatoires) montrent quant à elles un minimum d'absorption à 205 nm. Ici, le spectre obtenu pour IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12 montre un premier minimum d'absorption à 208 nm ainsi qu'un deuxième, moins bien défini, vers 218 nm (**figure 29**). L'analyse de ce spectre par le serveur a indiqué qu'il pourrait correspondre à celui d'une protéine adoptant une structure secondaire constituée à 35 % d'hélices alpha, à 16 % de feuillets bêta et à 46 % de structures désordonnées (pelotes aléatoires).

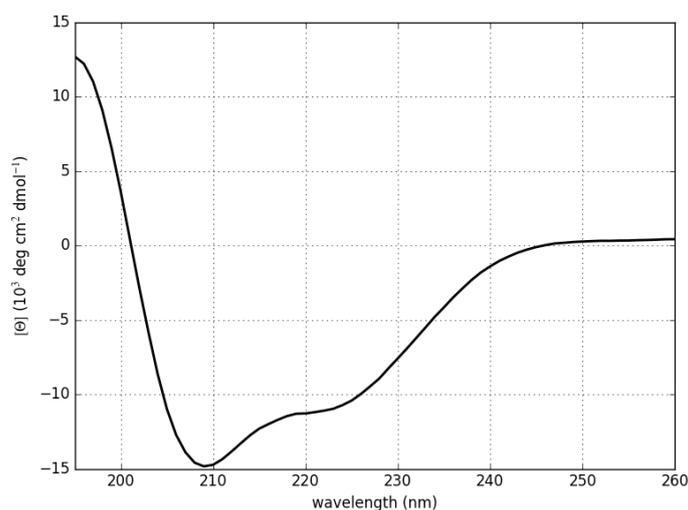


Figure 29 : Spectre de dichroïsme circulaire obtenu pour la protéine IFITM3 (9 μM) dans du tampon 20 mM NaP, 150 mM NaF et 3,5 mM Fos-Choline-12

5.5. Etude de la dénaturation thermique d'IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12

La courbe de dénaturation thermique d'une protéine repliée adopte généralement une allure sigmoïdale et le point d'inflexion de cette courbe correspond à la température à laquelle la protéine perd sa structure secondaire et est dénaturée, appelée température de fusion (T_m , « Melting Temperature »). Le T_m renseigne donc sur la stabilité de la protéine. La courbe de dénaturation thermique de la protéine IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12 a été établie en suivant le ratio de l'intensité de la fluorescence F émise par les deux tryptophanes d'IFITM3 à 350 et à 330 nm (F_{350}/F_{330}) en fonction de l'augmentation de la température. Cependant, la courbe de dénaturation ainsi obtenue n'adopte pas une allure sigmoïdale et aucune transition entre un état replié et dénaturé de la protéine ne peut en être déduite (**figure 30**). Ce résultat peut peut-être s'expliquer par le fait qu'IFITM3 est en majeure partie non structurée, puisque seuls 30 à 35 % de sa séquence adopteraient une conformation hélicoïdale. En outre, la séquence en acides aminés d'IFITM3 ne comporte que deux tryptophanes et il reste à déterminer si ces résidus font partie ou non des régions hélicoïdales de la protéine car si ce n'est pas le cas et qu'ils appartiennent aux régions désordonnées de la protéine, il est évident qu'aucune transition entre un état replié et non replié de la protéine ne peut être détecté en suivant la fluorescence du tryptophane. Ce résultat peut aussi signifier que la protéine est mal repliée ou agrégée mais cette dernière hypothèse concernant une éventuelle agrégation d'IFITM3 ne concorde pas avec les résultats de son analyse par SEC-MALLS, par pontage chimique ainsi que par dichroïsme circulaire. Il est néanmoins probable que la structure d'IFITM3 puisse être affectée par la présence de la Fos-Choline-12.

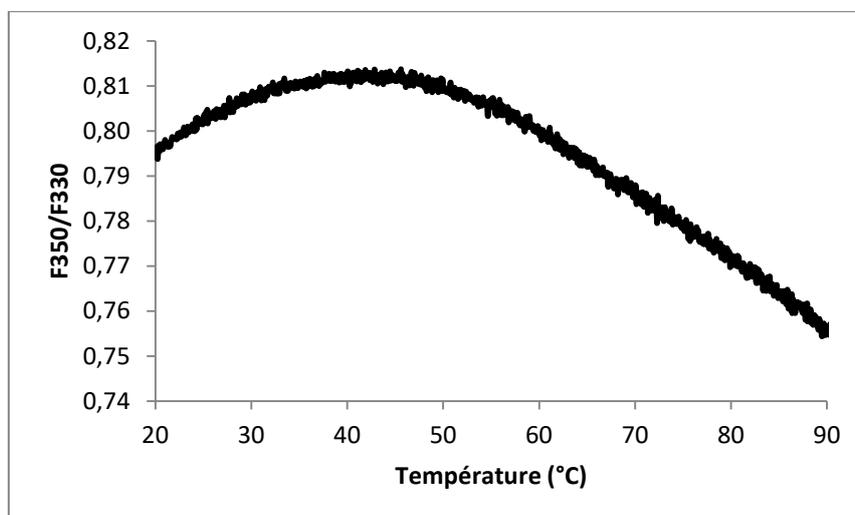


Figure 30 : Courbe de dénaturation thermique d'IFITM3 (1 mg/ml) en micelles de Fos-Choline-12

6. *Essais de cristallisation d'IFITM3 par diffusion de vapeur et en phase cubique de lipides*

La cristallisation de la protéine IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12 concentrée à 13 mg/ml a tout d'abord été testée, par la plateforme HTX de l'EMBL (Grenoble, France), dans 576 conditions de cristallisation dites « standards » réparties en 6 plaques de 96 puits : Classics Suite (Qiagen/Nextal), JCSG+ (Molecular Dimensions), PACT premier (Molecular Dimensions), PEGs-I (Qiagen/Nextal), Salt Grid (Hampton Research – faite par HTX) et Wizard I et II (Rigaku Reagents). Des micro-cristaux ont commencé à se former après 10 jours dans la condition suivante : 50 mM chlorure de césium, 100 mM MES pH 6,5 et 30 % (v/v) de Jeffamine M-600 (plaque JCSG) (**figure 31**). Cependant, la pêche de ces micro-cristaux a entraîné leur destruction et ils n'ont pu être reproduits à la main dans la même condition de cristallisation ainsi que dans des conditions s'en approchant.



Figure 31 : Photographie des micro-cristaux obtenus avec 13 mg/ml de protéine IFITM3 après 35 jours dans la condition suivante : 50 mM chlorure de césium, 100 mM MES pH 6,5 et 30 % (v/v) de Jeffamine M-600

La cristallisation d'IFITM3 en phase cubique de lipides a alors été testée. Pour ce faire, 40 % (poids/poids) de la solution de protéine IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12 concentrée à 20 mg/ml ont été mélangés avec 60 % (poids/poids) de monooléine à l'aide d'une seringue, ceci afin d'insérer IFITM3 dans la phase cubique. 480 conditions de cristallisation réparties en 5 plaques de 96 puits ont ensuite été testées par la plateforme HTX avec la protéine IFITM3 ainsi placée en phase cubique de lipides. Les plaques utilisées sont les suivantes : Cubic phase I et II (Qiagen/Nextal), MemGold, MemMeso et MemStrat & MemSys (Molecular Dimensions). Des micro-cristaux sont apparus après 21 jours dans la

condition suivante : 100 mM chlorure de sodium, 100 mM MES pH 6, 30 % PEG 400 (v/v) et 100 mM de chlorure de magnésium hexahydraté (plaque MemMeso) (**figure 32**). Cependant, ceux-ci n'ont généré aucune diffraction des rayons X caractéristique de cristaux de protéine ou de sel.

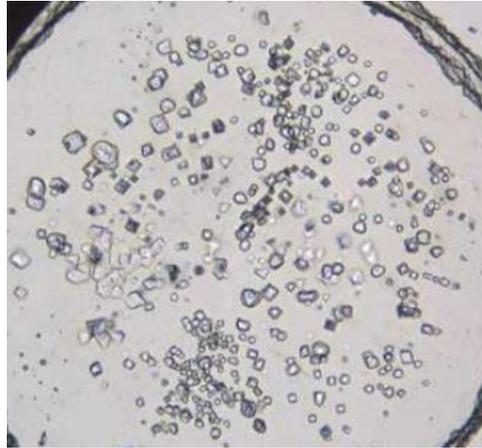


Figure 32 : Photographie des micro-cristaux obtenus avec 20 mg/ml de protéine IFITM3 en phase cubique de lipides après 21 jours dans la condition suivante : 100 mM chlorure de sodium, 100 mM MES pH 6, 30 % PEG 400 (v/v) et 100 mM de chlorure de magnésium hexahydraté

7. *Reconstitution de la protéine IFITM3 en liposomes*

Des liposomes, d'un diamètre de 0,4 μm , composés à 80 % de lipides POPC et à 20 % de lipides POPS ont tout d'abord été formés. Leur taille et leur homogénéité ont ensuite été vérifiées par **DLS** (« **D**ynamic **L**ight **S**cattering ») ainsi que par microscopie électronique à coloration négative.

Afin de déterminer la concentration en Triton X-100 nécessaire pour déstabiliser la membrane de ces liposomes et ainsi y favoriser l'insertion d'IFITM3, une courbe de titration d'un échantillon de ces liposomes (à 1 mg/ml) a été établie en reportant sur un graphique les valeurs d'absorbance de l'échantillon mesurée à 550 nm obtenues au départ puis après chaque nouvel ajout d'1 mM de Triton X-100 et ce, jusqu'à atteindre la valeur de 0 correspondant à la solubilisation complète des liposomes/lipides par le détergent (**figure 33**). La courbe de titration ainsi obtenue montre que la valeur d'absorbance à 550 nm des liposomes commence à diminuer suite à l'ajout d'1 mM de Triton-X100, signifiant que les liposomes sont saturés par le détergent et que leur intégrité commence à être touchée (**figure 34**). Cette concentration

en Triton-X100, à savoir 1 mM pour 1mg/ml de liposomes a, par conséquent, été choisie pour tenter la reconstitution d'IFITM3 dans ces liposomes.

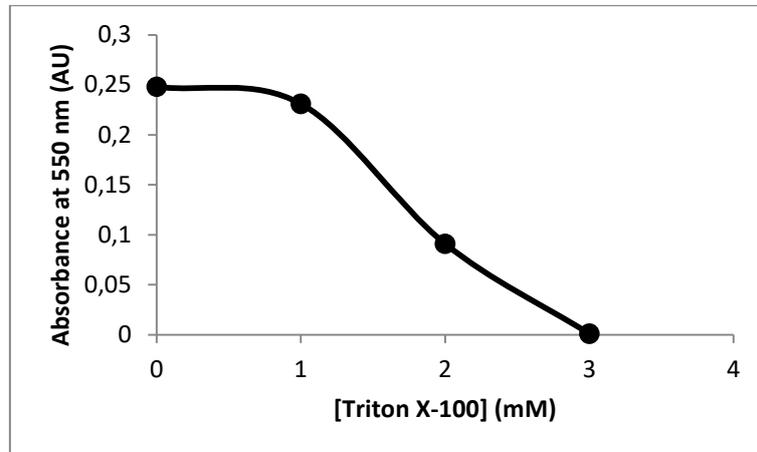


Figure 33 : Courbe de titration d'1 mg/ml de liposomes, composés à 80 % de lipides POPC et à 20 % de lipides POPS, avec différentes concentrations de Triton X-100, obtenue en reportant sur le graphique les valeurs d'absorbance des liposomes mesurées à 550 nm en fonction de la concentration de Triton X-100 qui leur a été ajoutée

Pour ce faire, les liposomes et IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12 ont été mélangés selon différents ratios massiques IFITM3 : liposomes (1 : 10 et 1 : 2) puis la quantité appropriée de Triton-X100 leur a été ajoutée. Les détergents ont ensuite été retirés du mélange suite à plusieurs ajouts de billes de polystyrène adsorbantes (Bio-Beads SM-2) afin qu'IFITM3, démunie de son détergent, puisse trouver refuge dans la membrane des liposomes et que les liposomes puissent retrouver leur intégrité en incorporant IFITM3. L'insertion d'IFITM3 dans la membrane des liposomes, ou tout du moins son association aux liposomes, a ensuite été vérifiée par un test de flottation réalisé avec un gradient de sucrose.

Sur le gel SDS-PAGE des différentes couches du gradient réalisé pour chaque ratio IFITM3 : liposomes testé, la présence d'IFITM3 dans les couches contenant de 10 à 30 % de sucrose indique que la protéine s'est associée aux liposomes, puisqu'en l'absence de liposomes (contrôle négatif), IFITM3 reste au fond du gradient de sucrose, dans la couche contenant 40 % de sucrose et diffuse vers celle en contenant 30 % (**figure 34A et B**). De plus, plus la quantité de protéine ajoutée aux liposomes augmente et plus la position d'IFITM3 dans le gradient décroît, passant de la couche contenant 10 % de sucrose à celles en contenant 20 à 30 % (**figure 34A et B**). Ceci signifie qu'une plus grande quantité de protéine s'associe aux liposomes, augmentant par conséquent leur masse et diminuant leur niveau de flottation.

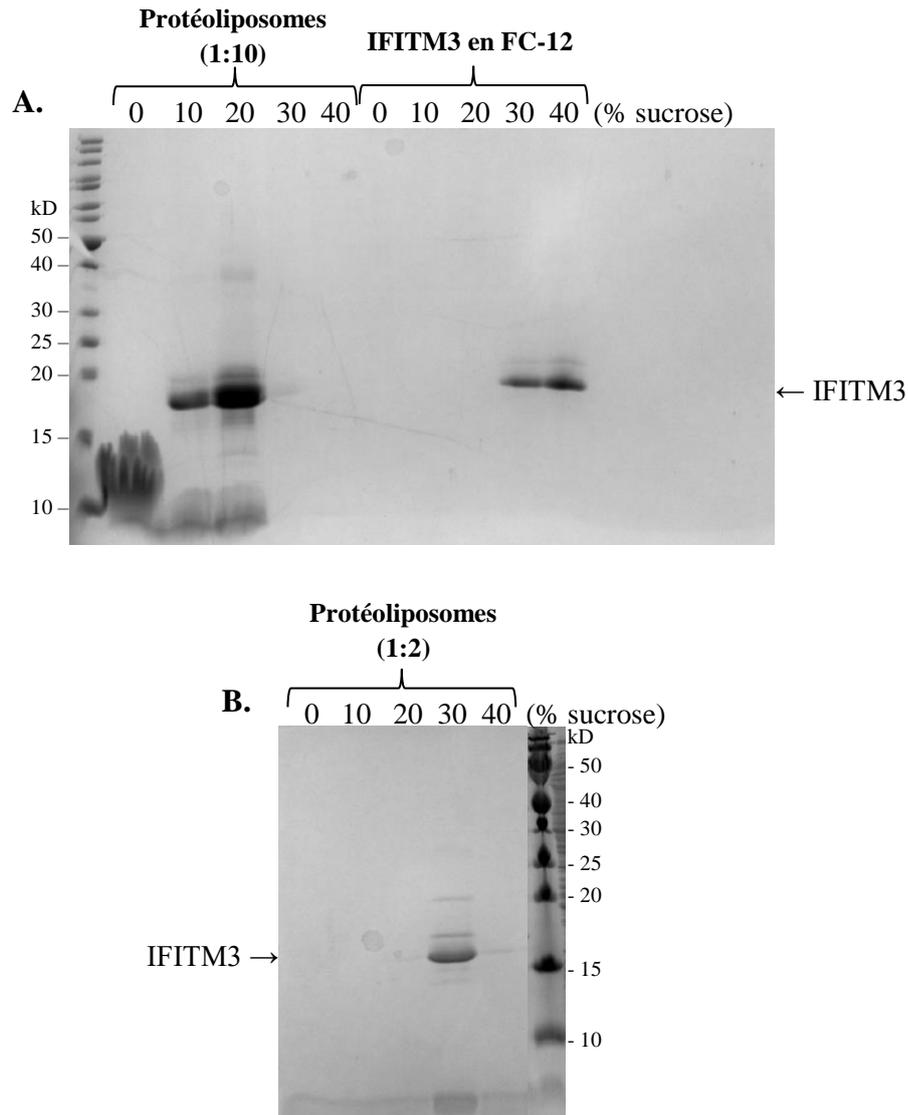


Figure 34 : Gel SDS-PAGE des différentes couches du gradient de sucrose (contenant 0, 10, 20 et 30 % de sucrose) montrant le résultat du test de flottation réalisé avec IFITM3 en Fos-Choline-12 et en protéoliposomes au ratio d'1 IFITM3 : 10 liposomes (A) et d'1 IFITM3 : 2 liposomes (B)

7.1. Protéolyse limitée des protéoliposomes

Cependant, bien que ces arguments soient en faveur de la reconstitution d'IFITM3 dans ces liposomes, ce test de flottation ne permet pas d'exclure la possibilité que la protéine se soit simplement associée à la membrane des liposomes au lieu de s'y insérer tel que souhaité. Afin d'infirmer cette hypothèse, ces protéoliposomes ont été incubés avec de la trypsine (au ratio massique d'1 trypsine : 200 IFITM3) pendant 5, 15 et 60 min afin de mettre en évidence sur gel SDS-PAGE d'éventuels fragments d'IFITM3 protégés de la protéolyse puisqu'insérés dans la membrane des liposomes. Sur le gel SDS-PAGE correspondant, trois bandes correspondant à 3 fragments résultant de la digestion d'IFITM3 apparaissent après 5

min d'incubation puis gagnent de plus en plus en intensité entre 15 et 60 min d'incubation (**figure 35**). La même expérience a été menée avec IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12 (contrôle), cependant deux des trois bandes résistantes à la protéolyse n'y apparaissent pas tandis que l'intensité de la troisième décroît en fonction du temps d'incubation indiquant qu'elle est sensible à la digestion (**figure 35**). Ces résultats vont donc plutôt dans le sens d'une insertion d'IFITM3 au sein de la membrane des liposomes, la protégeant en partie de la protéolyse, plutôt que d'une simple association aux liposomes.

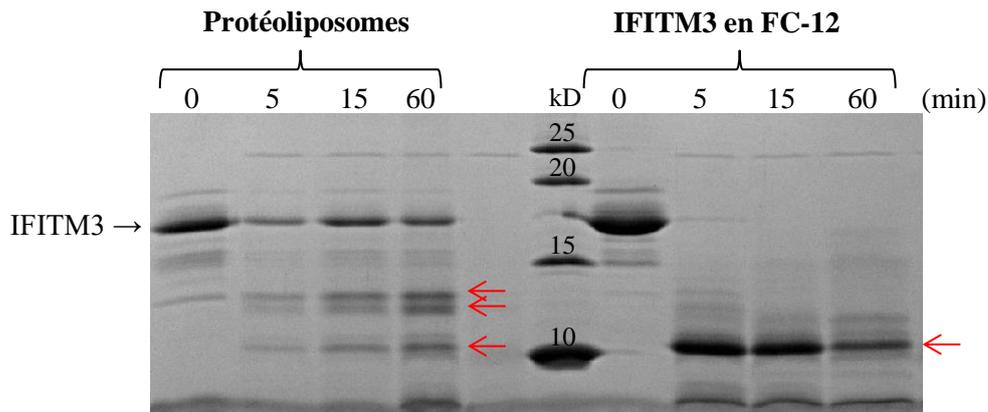


Figure 35 : Gel SDS-PAGE montrant le résultat de la protéolyse limitée d'IFITM3 en protéoliposomes (à gauche) et en micelles de Fos-Choline-12 (à droite) après 5, 15 et 60 min d'incubation avec de la trypsine ajoutée au ratio massique d'1 trypsine : 200 IFITM3

Afin d'identifier à quels fragments d'IFITM3 ces bandes correspondent, les sites de clivage de la trypsine au sein de la séquence d'IFITM3 ont tout d'abord été identifiés puis la taille théorique des fragments générés par chaque site de clivage a ensuite été comparée à celle des bandes apparues sur le gel SDS-PAGE. La trypsine est une protéase à sérine hydrolysant les liaisons peptidiques situées du côté C-terminal d'un résidu lysine (K) ou arginine (R). Le pourcentage de clivage associé à chaque site a été renseigné par le serveur web PeptideCutter (ExPASy) (**figure 36B**). Les bandes numérotées 1 et 2 correspondraient à des fragments d'IFITM3 portant toujours à leur extrémité N-terminale l'étiquette 6 histidines (détectée par « western blot ») (**figure 36A**) et ayant été générés suite au clivage de la protéine au niveau des résidus K110, R112, R114, ou K115, ces sites de clivage produisant des fragments d'une taille théorique de 12,4 ; 12,6 ; 12,9 et 13 kDa respectivement (**figure 36B**). La bande numéro 3 pourrait quant à elle correspondre à un fragment d'IFITM3 dépourvu de son étiquette 6 histidines N-terminale (puisque non détectée par « western blot ») (**figure 36A**) et généré suite au clivage de la protéine au niveau de son résidu K51 (taille théorique du fragment généré : 11,8 kDa) (**figure 36B**). En outre, IFITM3 semble ne pas avoir

été clivée au niveau des résidus R76 et K131, puisqu'aucune bande ne pouvant correspondre à la taille théorique des fragments d'IFITM3 générés par ces clivages, soit 9,2 et 14,6 kDa, n'a été observée sur le gel SDS-PAGE (**figure 36A et B**). Ces deux résidus, R76 et K131, pourraient donc se situer dans des régions d'IFITM3 protégées de la protéolyse soit, parce qu'insérées dans la membrane des liposomes soit, parce que trop proches de la membrane pour être atteintes par la trypsine. Tandis que les résidus K51, K110, R112, R114 et K115 feraient partie des régions extramembranaires d'IFITM3.

A.



B.



Figure 36 : A. Gel SDS-PAGE montrant le résultat de la protéolyse limitée d'IFITM3 reconstituée en liposomes après 60 min d'incubation avec de la trypsine **B.** Identification des sites de clivage de la trypsine au sein de la séquence en acides aminés d'IFITM3. Les résidus surmontés d'un trait vertical rouge correspondraient aux sites de clivage accessibles puisque la taille théorique des fragments générés par ces clivages pourrait correspondre à celle des bandes observées sur le gel SDS-PAGE et numérotées 1 à 3. Tandis que les résidus surmontés d'un trait vert correspondraient aux sites de clivages protégés par la membrane des liposomes puisque la taille théorique des fragments générés par ces clivages ne correspond pas à celle des bandes observées sur le gel SDS-PAGE.

7.2. Détermination de l'état oligomérique d'IFITM3 en protéoliposomes par pontage chimique

L'incubation des protéoliposomes avec 5 et 10 mM d'EGS a également engendré l'apparition, sur le gel SDS-PAGE correspondant, d'une bande affichant un poids moléculaire pouvant correspondre à celui d'un dimère d'IFITM3 (**figure 37**). IFITM3 pourrait donc former un dimère aussi bien en micelles de Fos-Choline-12 qu'en protéoliposomes. En outre, la même expérience, menée cette fois avec 0,5 ; 1 ; 5 et 10 mM de glutaraldehyde ou d'EGS, et dont le résultat a été révélé par « western blot » avec un anticorps dirigé contre IFITM3, a mis en évidence l'apparition de plusieurs formes oligomériques potentielles d'IFITM3 (dimère, trimère, tétramère voire plus) notamment avec des concentrations plus importantes de glutaraldehyde (**figure 38**).

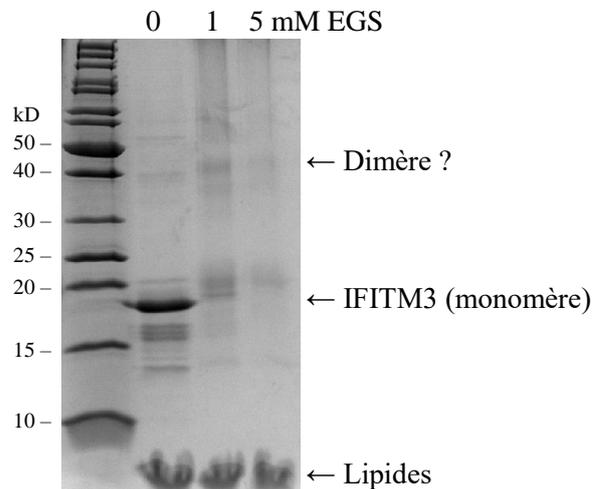


Figure 37 : Gel SDS-PAGE montrant le résultat du pontage chimique obtenu suite à l'incubation d'IFITM3 en protéoliposomes avec différentes concentrations d'EGS (0, 1 et 5 mM)

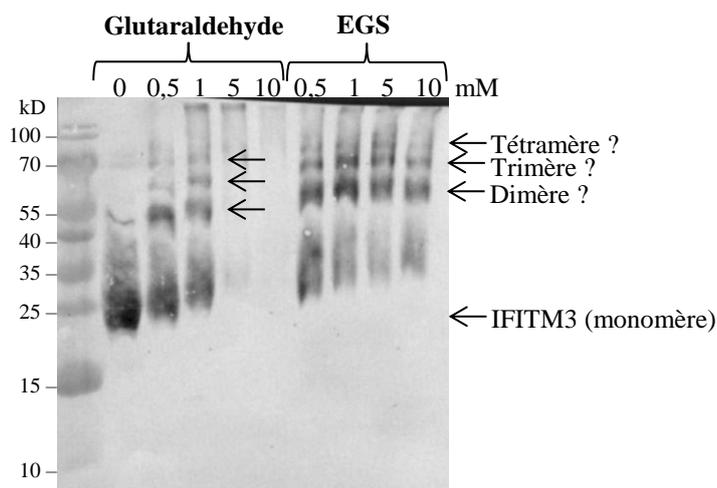


Figure 38 : « Western blot », réalisé avec un anticorps dirigé contre IFITM3, montrant le résultat du pontage chimique d'IFITM3 en protéoliposomes avec différentes concentrations d'EGS ou de glutaraldehyde (0 ; 0,5 ; 1 ; 5 et 10 mM)

7.3. Observation des protéoliposomes par microscopie électronique à coloration négative

Ces protéoliposomes ont également été observés par microscopie électronique à coloration négative afin d'observer un éventuel effet d'IFITM3 sur la membrane des liposomes.

Certaines images ont montré des liposomes adoptant une forme quasiment rectangulaire regroupés autour d'un « matériel » supposé être constitué de protéines IFITM3 (**figures 39 et 40**). Ce « matériel » n'est présent que sur une seule face des liposomes et semble promouvoir leur assemblage. Ce matériel ainsi que des liposomes dont la courbure de la membrane peut aller jusqu'à former un angle droit n'ont pas été visualisés sur les images des liposomes auxquels IFITM3 n'a pas été ajoutée. Néanmoins, même en l'absence d'IFITM3, ces liposomes ont montré une forte tendance à coalescer.

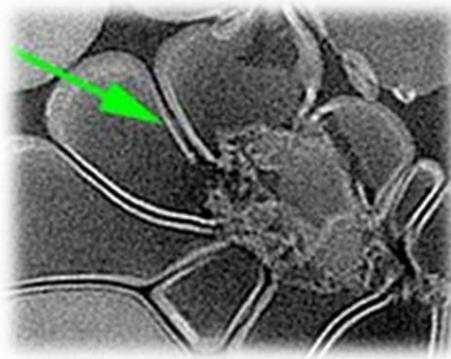
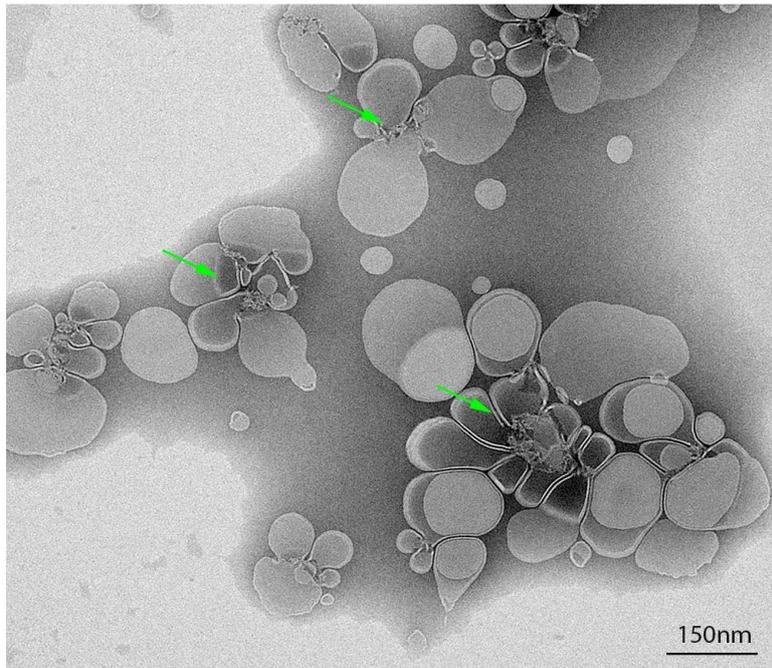


Figure 39 : Image de microscopie électronique à coloration négative de protéoliposomes formés selon le ratio massique suivant, 1 IFITM3 : 10 liposomes. Les flèches vertes montrent le « matériel » supposé être constitué de protéines IFITM3 et semblant promouvoir l'assemblage des liposomes.
(Images prises par Lesley Calder, « The Francis Crick Institute », Royaume-Uni)

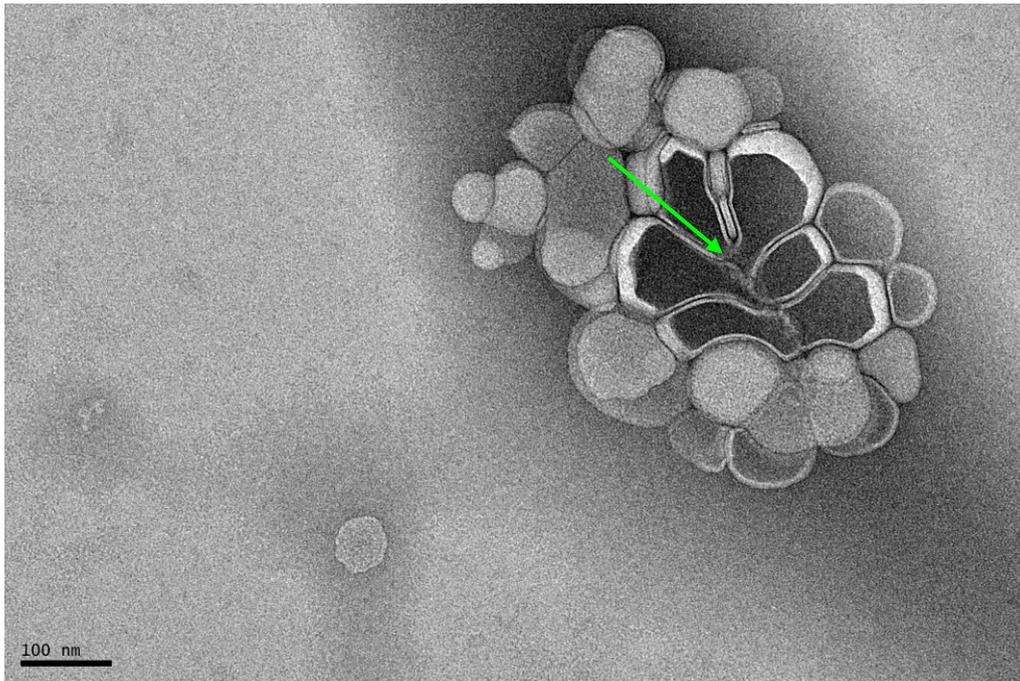


Figure 40 : Image de microscopie électronique à coloration négative de protéoliposomes formés selon le ratio massique suivant, 1 IFITM3 : 10 liposomes (agrandissement : 30 000 x). La flèche verte montre le « matériel » supposé être constitué de protéines IFITM3 et semblant promouvoir l'assemblage des liposomes.

(Images prises par la plateforme de microscopie électronique de l'IBS)

Un test de fusion du virus de la grippe avec des protéoliposomes contenant IFITM3 a également été réalisé en collaboration avec l'Institut Francis Crick de Londres (Royaume-Uni). Ces protéoliposomes ont été formés à partir de la protéine IFITM3 et de liposomes, composés des lipides POPC, POPS, POPE, sphingomyéline et cholestérol (ratio molaire utilisé, 10 : 1,5 : 3 : 3 : 4), mélangés selon le ratio massique suivant 1 IFITM3 : 10 liposomes. Lors de cette expérience, les protéoliposomes ont été mélangés au virus de la grippe puis le pH du mélange a été abaissé à 5 afin de promouvoir le changement de conformation de l'hémagglutinine virale, dépendant du faible pH. Un échantillon de la réaction a ensuite été observé après 5 et 30 min par microscopie électronique à coloration négative. Les images ainsi obtenues ont montré que le virus de la grippe ne s'est associé et n'a fusionné avec les liposomes que dans les zones où ceux-ci ne sont pas liés entre eux par ce matériel granuleux et fibreux supposé correspondre à de la protéine IFITM3. Les zones de liposomes contenant ce matériel semblent avoir échappé à l'invasion par le virus de la grippe (**figure 41**).

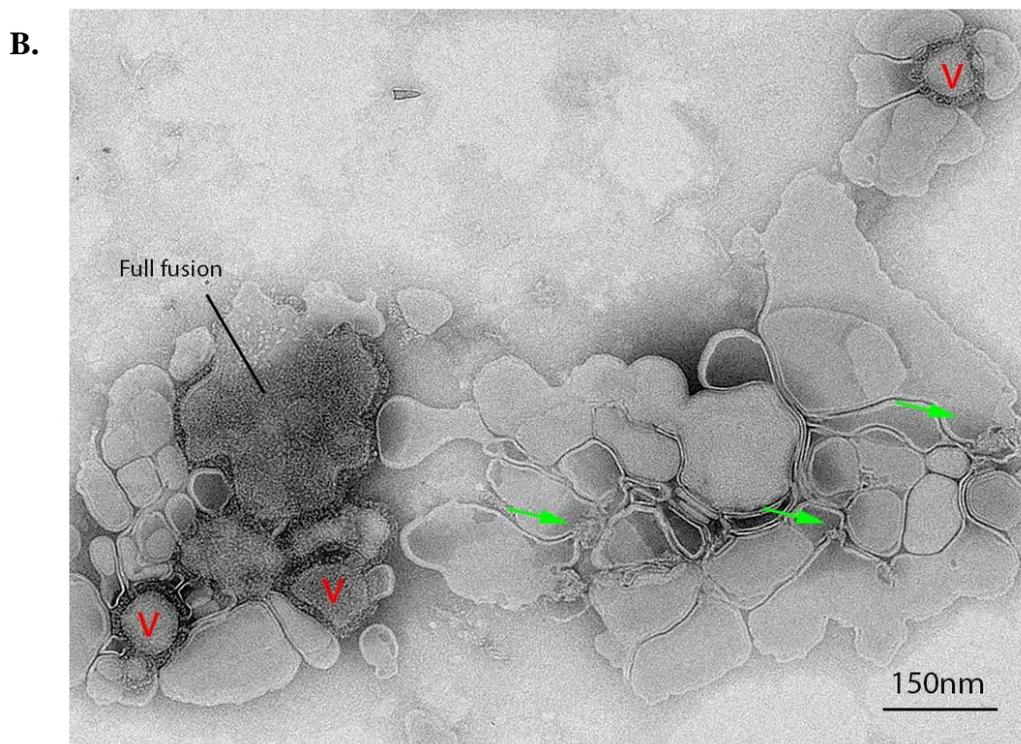
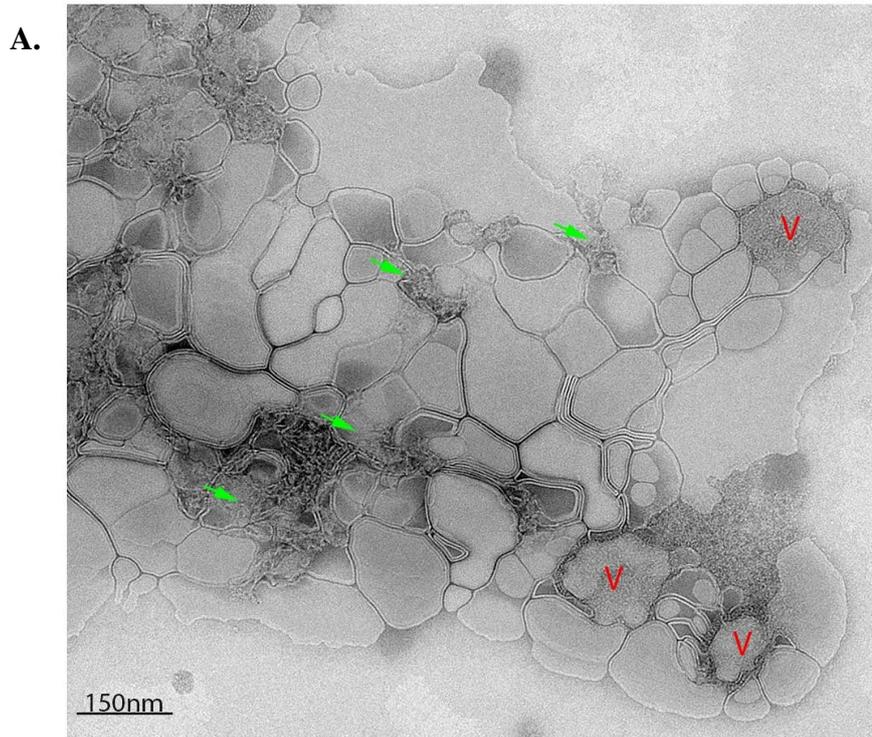


Figure 41 : Images de microscopie électronique à coloration négative de protéoliposomes incubés pendant 5 (A) et 30 min (B) à pH 5 avec le virus de la grippe (désigné par la lettre V rouge). Les flèches vertes montrent le « matériel » supposé être constitué de protéines IFITM3 et semblent promouvoir l’assemblage des liposomes.

(Images prises par Lesley Calder , « The Francis Crick Institute », Royaume-Uni)

7.4. Observation des protéoliposomes par microscopie de fluorescence

Des protéoliposomes fluorescents ont été formés afin de visualiser la présence d'IFITM3 au sein des liposomes et de déterminer si le matériel liant les liposomes entre eux, observé sur les images de microscopie électronique à coloration négative, est bien constitué de protéines IFITM3, tel que supposé. Pour ce faire, les liposomes, composés d'un mélange de lipides appelés « Total Brain extract », ont été rendus fluorescents en les formant en présence du fluorochrome rouge PKH 26. IFITM3 a, quant à elle, été marquée avec un fluorochrome vert, l'Alexa Fluor 488, après une nuit d'incubation à 4 °C à l'abri de la lumière. La conjugaison de l'Alexa Fluor 488 à la protéine a tout d'abord été mise en évidence par la co-élution d'IFITM3, absorbant à 280 nm, et de l'Alexa Fluor 488, absorbant à 494 nm, sur le profil d'élution obtenu après injection de la protéine sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille Superdex S200 10/300 GL (**figure 42**). L'intensité de la fluorescence émise par la protéine marquée à l'Alexa Fluor 488 a ensuite été visualisée en analysant, avec un lecteur UV, le gel SDS-PAGE obtenu après migration des fractions du pic d'élution correspondant à IFITM3 (**figure 43**) et a été jugée satisfaisante. Cependant, le volume d'élution d'IFITM3 (14,9 ml au lieu de 13,5 ml) ainsi que la présence de deux bandes sur le gel SDS-PAGE ont indiqué que la protéine avait été en grande partie dégradée, probablement suite à sa congélation et à sa décongélation. La protéine, bien qu'en partie dégradée, a tout de même été utilisée pour former les protéoliposomes.

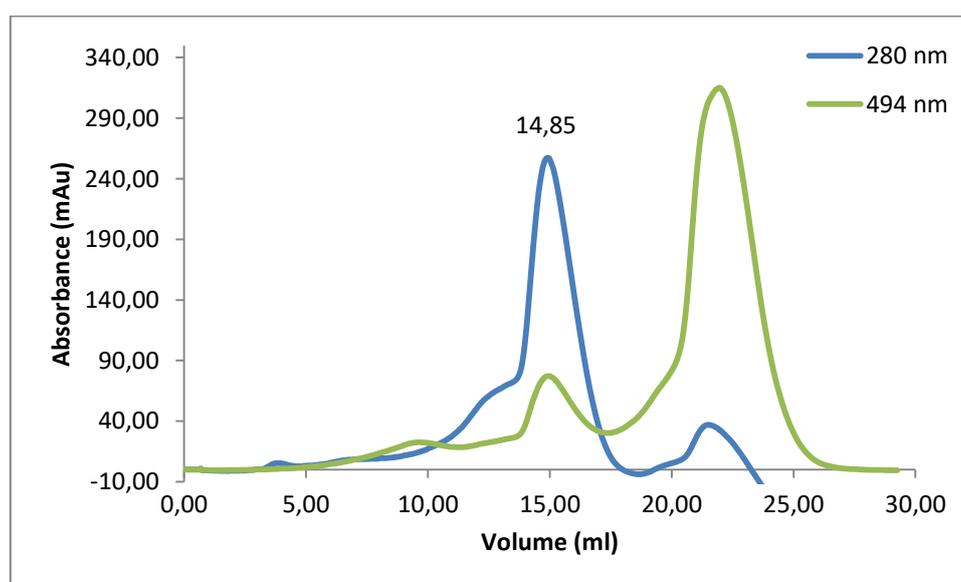


Figure 42 : Chromatogramme obtenu après injection, sur une colonne Superdex 200 10/300 GL, de 100 µl de protéine IFITM3 incubée une nuit à 4 °C avec de l'Alexa Fluor 488, dans du tampon PBS pH 7,4 contenant 1 mM de β-mercaptoéthanol et 3,5 mM de Fos-Choline-12

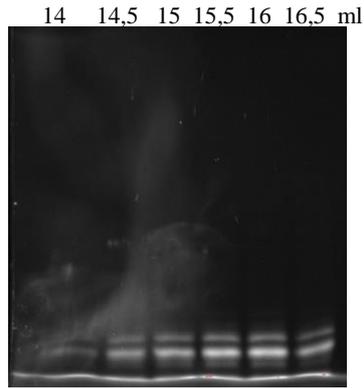


Figure 43 : Visualisation de la fluorescence émise par la protéine IFITM3 conjuguée à l'Alexa Fluor 488 sur un gel SDS-PAGE des fractions correspondant au pic d'éluion d'IFITM3 en filtration sur gel

Les protéoliposomes ont été formés en mélangeant IFITM3 et les liposomes fluorescents selon le ratio massique IFITM3 : liposomes 1:10 ; 1:100 ou 1:1000 en présence de la quantité adéquate de Triton X-100, soit 1 mM pour 1 mg/ml de liposomes (**figure 44**), puis en retirant les détergents à l'aide de billes adsorbantes. Les résultats des tests de flottation, visualisés par « western blot » avec un anticorps anti-histidine, ont ensuite permis de conclure qu'une faible quantité de protéine, apparaissant en haut du gradient, s'était associée aux liposomes lorsque le ratio 1:10 avait été utilisé, la majeure partie de la protéine apparaissant au fond du gradient, dans les couches contenant 30 à 40 % de sucrose. Tandis qu'au ratio 1:100, IFITM3 semblait s'être associée en plus grande quantité aux liposomes, apparaissant majoritairement dans la couche contenant 10 % de sucrose (**figure 45**). En outre, le poids moléculaire de la protéine observée sur la membrane avec un anticorps anti-histidine correspond à celui de la protéine entière.

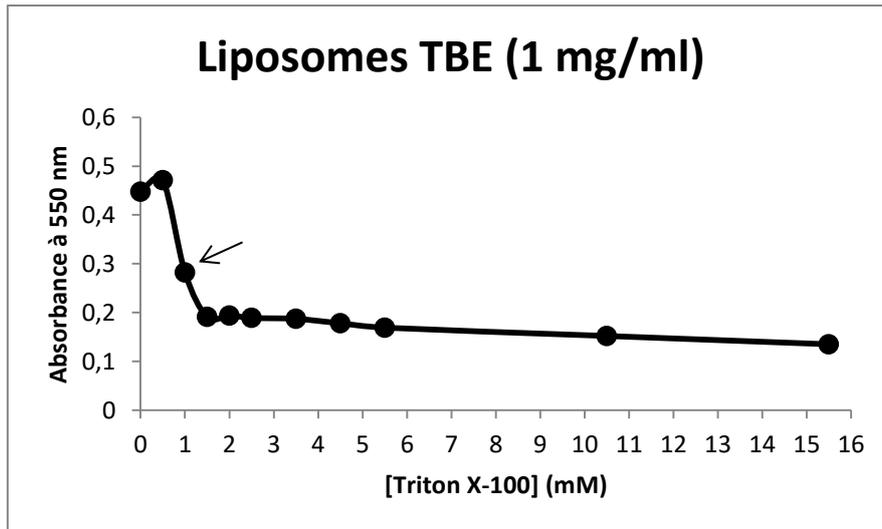


Figure 44 : Courbe de titration d'1 mg/ml de liposomes, composés du mélange de lipides « Total Brain extract », avec différentes concentrations de Triton X-100 obtenue en reportant sur le graphique les valeurs d'absorbance des liposomes mesurées à 550 nm en fonction de la concentration de Triton X-100 qui leur a été ajoutée

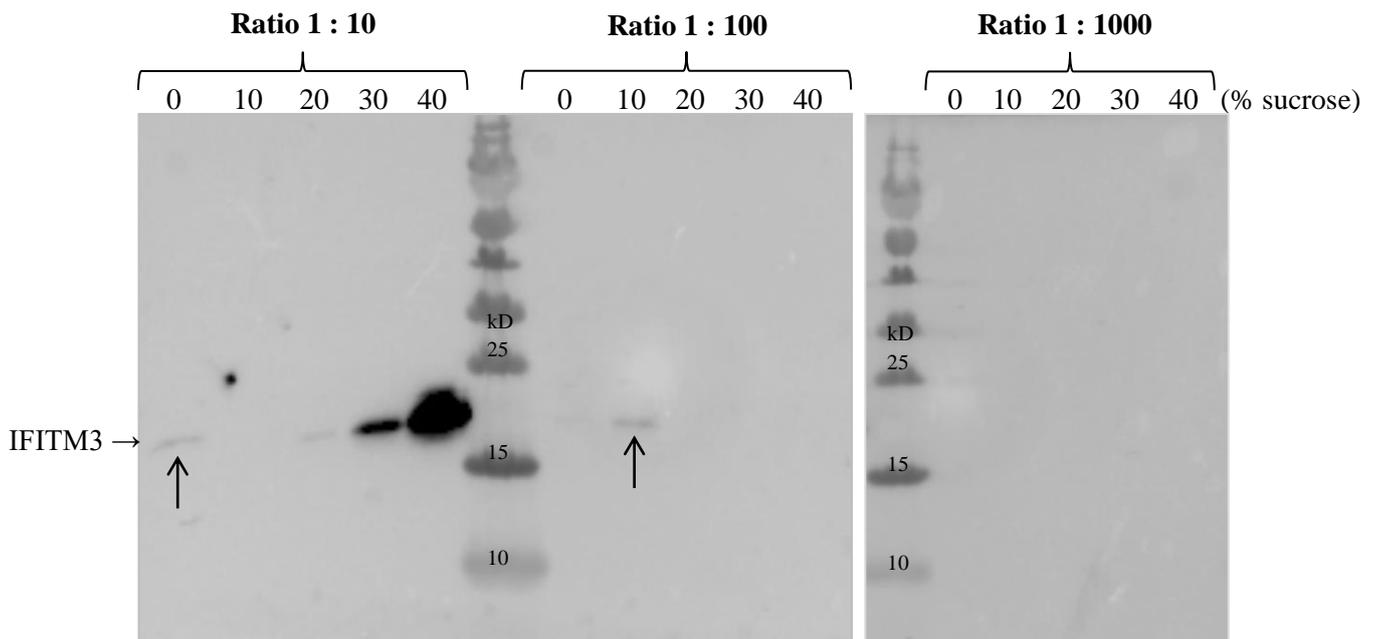


Figure 45 : « Western blot », réalisés avec un anticorps anti-histidine, des différentes couches des gradients de sucrose montrant les résultats des tests de flottation réalisés avec les protéoliposomes formés à partir des ratios massiques IFITM3 : liposomes suivants, 1 :10, 1 : 100 et 1 : 1000

Un échantillon de la couche située en haut gradient obtenue avec le ratio 1 : 10 ainsi qu'un autre provenant de la couche contenant 10 % de sucrose obtenue avec le ratio 1 : 100 ont été observés par microscopie de fluorescence. Des images ont été acquises dans différents

plans de ces échantillons. Les images prises à proximité de la lame de microscope ont montré ce qui peut être interprété comme une étendue de lipides (en rouge) au sein de laquelle IFITM3 est présente, la co-localisation IFITM3-lipides apparaissant en jaune (**figure 46D**). L'intégrité des liposomes semble ici avoir été touchée. Tandis que les images acquises dans le plan central des échantillons, ont montré des liposomes intacts (points rouges), de la protéine IFITM3 non associée aux liposomes (points verts) ainsi que quelques colocalisation IFITM3-liposomes (points jaunes) (**figure 46C**). Enfin, des images prises à la surface des échantillons ont montré des amas de liposomes très mobiles dans le champ du microscope hébergeant tous, en plusieurs endroits, la protéine IFITM3 (**figure 46A**), tel que le montre la reconstruction en 3D de ces images (**figure 46B**). Ces assemblages de liposomes et de protéines IFITM3 pourraient correspondre à ceux observés par microscopie électronique à coloration négative. Dans ce cas, le matériel liant les liposomes serait bien constitué de protéines IFITM3.

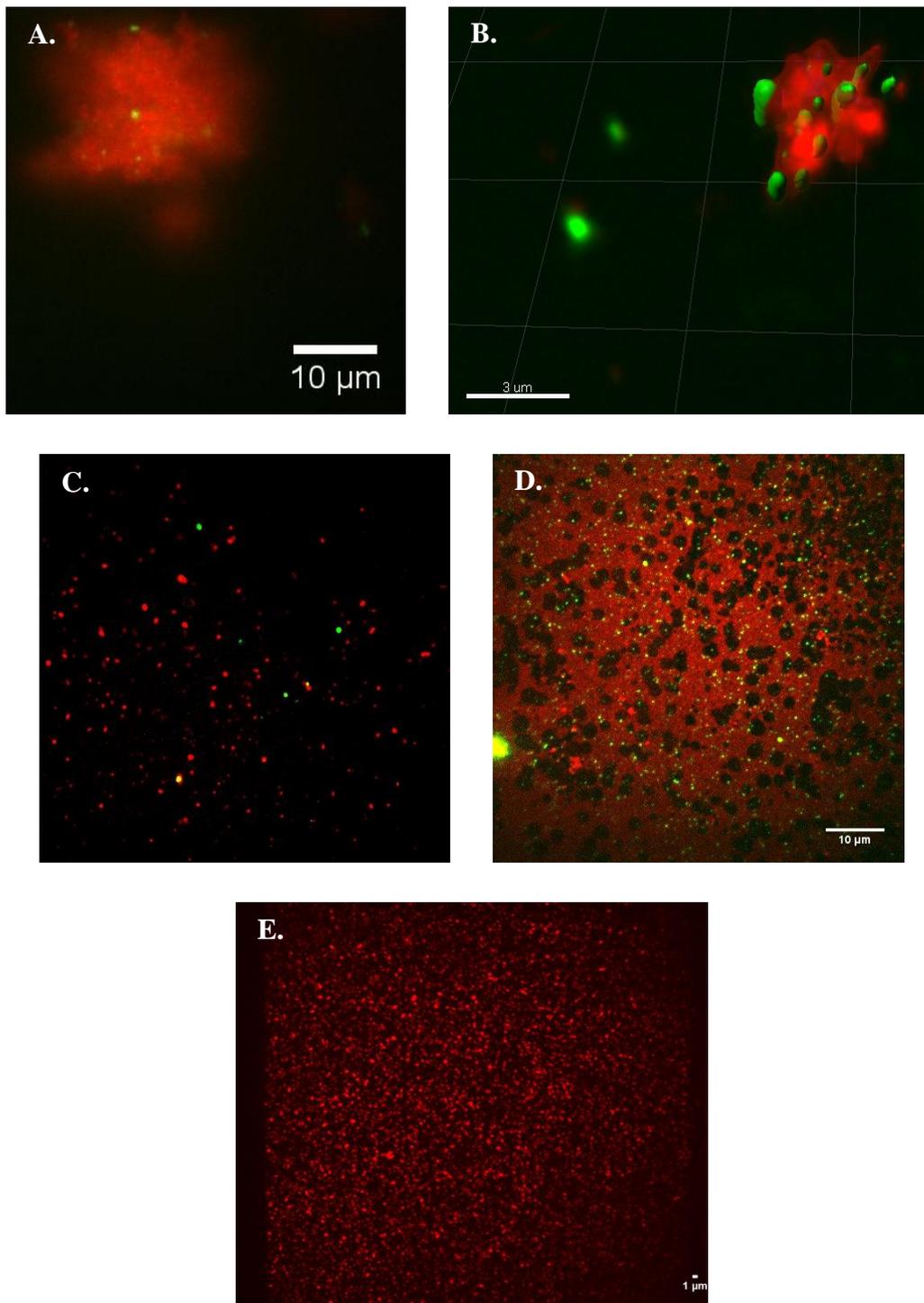


Figure 46 : Images de microscopie à fluorescence prises dans différents plans d'un échantillon de la couche située en haut du gradient de sucrose (couche 0 %, obtenue avec le ratio IFITM3 : liposomes 1 :10) déposé sur une lame de microscope. A. Surface de l'échantillon ; B. Reconstruction en 3D de l'image d'un assemblage formé entre les liposomes et IFITM3 ; C. Centre de l'échantillon ; D. Echantillon en contact avec la lame de microscope ; E. Liposomes seuls, plan central (contrôle)
(Images acquises par Jean-Philippe Kleman, groupe IRPAS, IBS)

8. *Reconstitution de la protéine IFITM3 en nanodisques MSP1E3D1-POPC*

Pour parvenir à reconstituer une protéine membranaire en nanodisque, la protéine d'assemblage MSP, les lipides ainsi que la protéine membranaire d'intérêt doivent être mis en présence selon le bon rapport stœchiométrique. Pour ce faire, le nombre de molécules lipidiques nécessaire à l'assemblage de nanodisques « vides » de taille homogène doit avoir été déterminé au préalable. Ici, des nanodisques ont été assemblés selon différents ratios molaires de la protéine d'assemblage MSP1E3D1 et des lipides POPC soit, 1 : 20 ; 1 : 40 ; 1 : 60 et 1 : 80. L'analyse de leurs profils d'élution, obtenus par chromatographie d'exclusion de taille, a permis de conclure que les nanodisques obtenus en mélangeant 1 MSP1E3D1 pour 80 lipides POPC étaient les plus monodisperses. En effet, la superposition des chromatogrammes des différents nanodisques montre que plus il y a de lipides ajoutés à la protéine MSP1E3D1, plus le volume d'élution des nanodisques engendrés diminue et plus leur pic d'élution gagne en hauteur et en symétrie, signifiant que leur taille augmente et que davantage de MSP et de lipides s'associent pour former des nanodisques de même taille.

Cependant, pour l'assemblage de nanodisques avec la protéine IFITM3, c'est le ratio 1 MSP1E3D1 : 60 POPC qui a été choisi, considérant qu'un certain nombre de phospholipides serait déplacé par la protéine IFITM3 lors de l'assemblage du nanodisque avec cette dernière (**figure 47**).

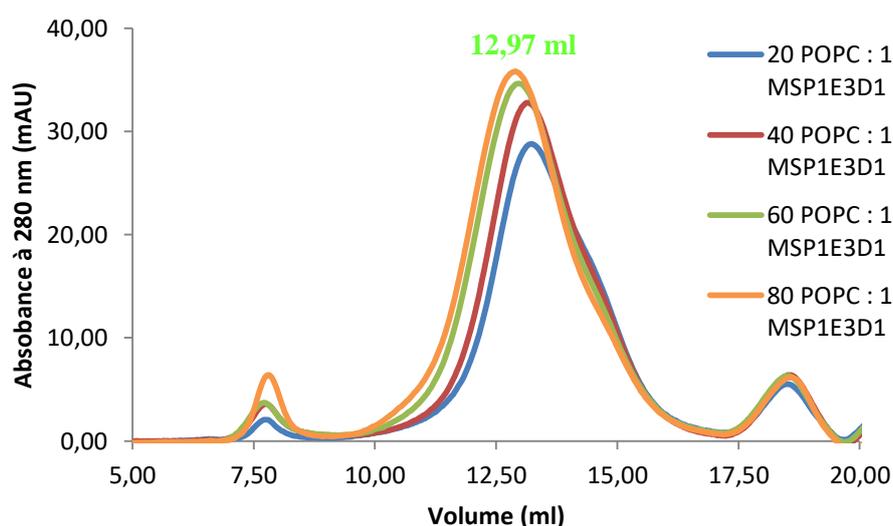


Figure 47 : Superposition des différents chromatogrammes obtenus après injection de 500 μ l de nanodisques, assemblés à partir de différents ratios molaires de la protéine d'assemblage MSP1E3D1 et des lipides POPC (1 : 20 ; 1 : 40 ; 1 : 60 et 1 : 80), sur une colonne S200 10/300 GL dans du tampon PBS pH 7,4

Une première tentative d'incorporation de la protéine IFITM3 en nanodisque a alors été conduite de la manière suivante. La protéine d'assemblage MSP1E3D1, les lipides POPC solubilisés en sodium cholate et la protéine IFITM3 solubilisée en DPC ont été mélangés, sur glace, selon le ratio molaire suivant, 1 MSP1E3D1 : 60 POPC : 0,3 IFITM3. En théorie, ce ratio implique que sur trois nanodisques formés, deux soient vides et un seul contienne la protéine IFITM3 sous forme monomérique. Les détergents (le DPC et le sodium cholate) ont ensuite été retirés du mélange suite à l'ajout de billes de polystyrène les adsorbant, initiant dès lors le processus d'auto-assemblage des nanodisques ayant lieu sous agitation à 4 °C. Enfin, une fois les nanodisques assemblés, ceux-ci ont été séparés des nanodisques agrégés et des autres constituants restants du mélange par chromatographie d'exclusion de taille. Le profil d'élution ainsi obtenu correspond au mélange des nanodisques vides et des nanodisques ayant incorporé la protéine IFITM3. Leur volume d'élution est identique à celui obtenu précédemment pour les nanodisques « vides » assemblés à partir des ratios 1 : 80 et 1 : 60 de la protéine MSP1E3D1 et des lipides POPC. D'autre part, la symétrie du pic d'élution indique que le ratio molaire choisi (1 MSP1E3D1 : 60 POPC : 1 IFITM3) est satisfaisant (**figure 48**). Quant à la co-élution des protéines MSP1E3D1 et IFITM3 visible sur gel SDS-PAGE, elle constitue un argument en faveur de l'incorporation de la protéine IFITM3 au sein de ces nanodisques (**figure 49**).

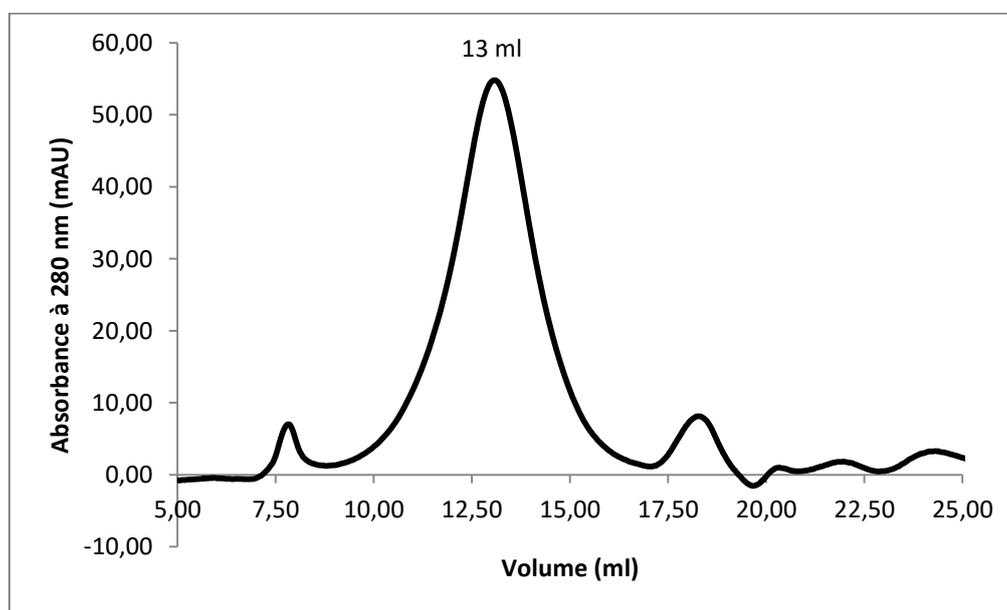


Figure 48 : Chromatogramme obtenu après l'injection de 500 µl de nanodisques, assemblés à partir de la protéine d'assemblage MSP1E3D1, de lipides POPC et de la protéine IFITM3 mélangés selon le ratio molaire suivant 1 : 60 : 0,3, sur une colonne S200 10/300 GL dans du tampon PBS pH 7,4

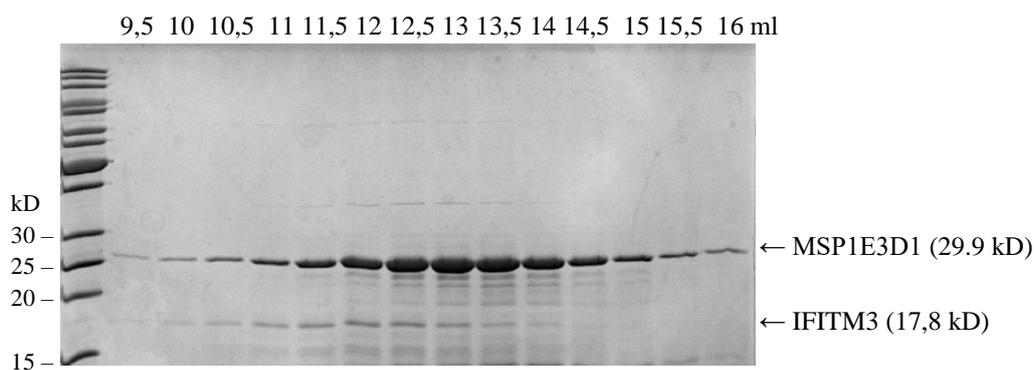


Figure 49 : Gel SDS-PAGE correspondant à la figure 48

Une étape de chromatographie d'affinité sur résine de nickel a ensuite été mise en œuvre afin de séparer les nanodisques vides des nanodisques contenant la protéine IFITM3. La protéine MSP1E3D1 ne portant pas d'étiquette 6 histidines, les nanodisques vides n'ont pas été retenus par la résine de nickel et ont, par conséquent, été récupérés dans le « Flow Through » (FT) et les lavages (L1 et L2) de la résine, comme le montre le gel SDS-PAGE correspondant (**figure 50**). La protéine IFITM3 étant pourvue d'une étiquette 6 histidines, les nanodisques la contenant se sont eux liés à la résine et en ont été élués avec 300 mM d'imidazole, d'où la présence, visible sur le gel SDS-PAGE, des deux protéines, IFITM3 et MSP1E3D1, dans l'éluion (E) de la résine (**figure 50**). La co-élution de ces deux protéines indique une nouvelle fois que la protéine IFITM3 aurait bien été incorporée dans les nanodisques lors de leur assemblage.

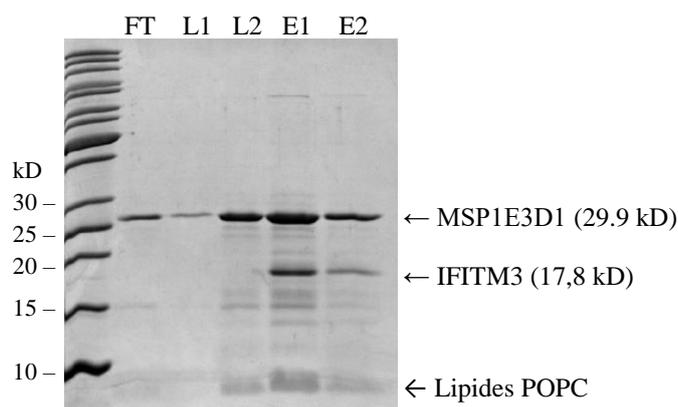


Figure 50 : Gel SDS-PAGE des différentes étapes de la chromatographie d'affinité sur résine de nickel permettant de séparer les nanodisques vides des nanodisques pleins contenant IFITM3 (FT : « Flow Through », nanodisques n'ayant pas été retenus sur la résine ; L1 et L2 : Lavages 1 et 2 ; E1 et E2 : Elutions 1 et 2)

Les nanodisques récoltés lors de la première élution (E1 sur le gel SDS-PAGE, **figure 50**) de la résine de nickel ont été observés par microscopie électronique à coloration négative. Sur les images acquises par la plateforme de microscopie électronique de l'IBS, aucune différence de taille significative n'est constatée entre les nanodisques vides (à gauche) et ceux ayant incorporé la protéine IFITM3 (à droite), et sa présence au sein des nanodisques n'est pas visible, suggérant qu'IFITM3 (17.8 kD) ne s'y est pas reconstituée sous la forme de gros oligomères (**figure 51**).

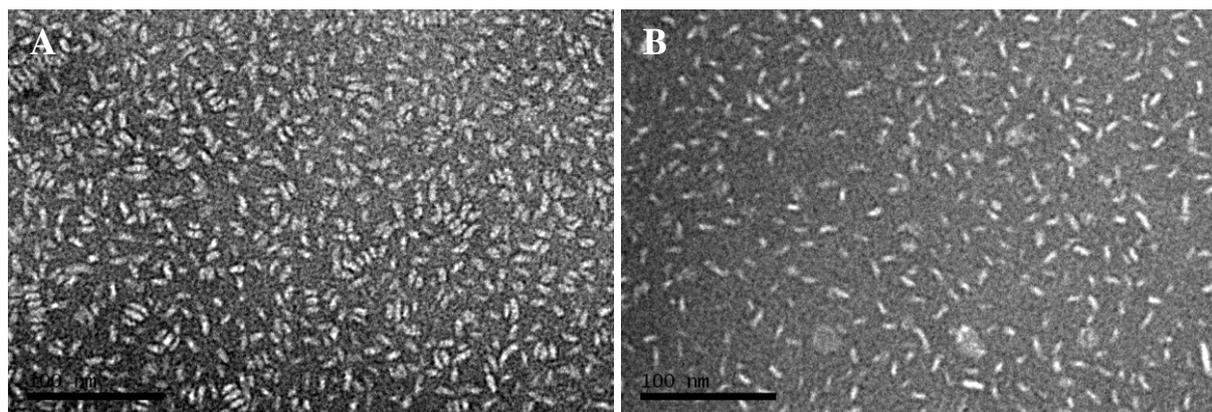


Figure 51 : Images de microscopie électronique à coloration négative (A) de nanodisques vides assemblés selon le ratio molaire suivant, 60 POPC : 1 MSP1E3D1, et (B) de nanodisques pleins assemblés selon le ratio molaire suivant, 60 POPC : 1 MSP1E3D1 : 0,3 IFITM3, et purifiés par chromatographie d'affinité sur résine de nickel (grossissement 30 000 x)
(Images acquises par la plateforme de microscopie électronique de l'IBS)

9. Analyse par RMN de la protéine IFITM3 reconstituée en nanodisques MSP1E3D1-POPC

Une première expérience de RMN, nommée ^1H - ^{15}N HSQC (« Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy »), a été conduite à 20 °C avec la protéine IFITM3 enrichie en isotope ^{15}N reconstituée au sein de nanodisques MSP1E3D1-POPC selon le ratio molaire suivant, 0,3 ^{15}N IFITM3 : 1 MSP1E3D1 : 60 POPC. Pour cette expérience, les nanodisques assemblés en présence de la protéine ^{15}N IFITM3 ont été purifiés par chromatographie d'exclusion de taille et puis concentrés jusqu'au volume souhaité. Contrairement à ce qui a été décrit précédemment, les nanodisques ayant incorporé la protéine ^{15}N IFITM3 n'ont, ici, pas été séparés des nanodisques vides par chromatographie d'affinité sur résine de nickel.

L'objectif principal de cette première expérience était de comparer les spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC acquis pour la protéine ^{15}N IFITM3 reconstituée en nanodisques et pour la

protéine ^{15}N IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12, notamment en terme de nombre de résidus détectés et si possible, en terme de repliement adopté par la protéine. Les premiers spectres s'étant révélés prometteurs en présence des nanodisques, la deuxième étape a été d'optimiser le protocole et le type de nanodisque utilisé afin d'obtenir une attribution des résidus la plus complète possible et de pouvoir obtenir des informations structurales.

Le spectre 2D ^1H - ^{15}N HSQC résultant de cette expérience comporte deux dimensions ou axes, un axe pour le proton (^1H) et un autre pour l'azote (^{15}N). Chaque signal dans ce spectre résulte de la mesure des fréquences (ou résonances) pour une paire d'atomes $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ reliée par une liaison covalente. Chaque signal dans ce spectre est caractérisé par une intensité (hauteur du pic) et deux déplacements chimiques, un pour le noyau ^1H et un autre pour le noyau ^{15}N . Etant donné que dans une protéine, chaque acide aminé ou résidu, à l'exception de la proline, possède un proton attaché à un atome d'azote dans la liaison peptidique, appelé proton amide, chaque résidu devrait donc, en théorie, produire un signal dans le spectre. De plus, certains acides aminés (asparagine, glutamine, tryptophane...), possédant également des groupements N-H au niveau de leur chaîne latérale, peuvent produire plusieurs signaux dans le spectre. Néanmoins, en pratique, tous les signaux générés par les groupements N-H ne sont pas toujours détectables ou correctement résolus et ce, pour diverses raisons. La taille du système moléculaire, son repliement dans l'espace ou ses caractéristiques dynamiques sont autant de facteurs qui peuvent influencer la sensibilité et la résolution des spectres enregistrés. La vitesse d'échange de chacun des protons amides, qui est modulée par le pH, la température et le pKa de chacun des groupements amides, joue un rôle important dans la détection du signal. C'est notamment pour cela que le NH_3 du résidu N-terminal n'est jamais observé à pH 7.

Le spectre 2D ^1H - ^{15}N HSQC enregistré pour la protéine ^{15}N IFITM3 reconstituée en nanodisques MSP1E3D1-POPC (**figure 53**) comporte 18 pics (ou signaux) sur 148 attendus. Ce nombre est bien inférieur aux 58 pics comptés dans le spectre ^1H - ^{15}N HSQC correspondant à la protéine ^{15}N en micelles de DPC (**figure 52**). Ceci peut s'expliquer par le fait que les nanodisques contenant la protéine ^{15}N IFITM3 ont une taille plus importante que celle de la protéine en micelles de DPC. Cette taille importante diminue la diffusion rotationnelle de la molécule en solution engendrant une relaxation (c'est-à-dire une perte du signal) plus rapide. Ceci se traduit sur le spectre par des signaux moins intenses et plus larges, voir même par leur disparition complète, tels qu'observés sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC de la protéine ^{15}N IFITM3 en nanodisques. Quant au repliement adopté par la protéine ^{15}N IFITM3

en nanodisques, la dispersion des signaux au sein du spectre dans la dimension des protons correspond à la signature de résonances appartenant soit, à des régions désordonnées soit, à des régions hélicoïdales (**figure 53**). La même conclusion peut être tirée de l'observation du spectre correspondant à la protéine ^{15}N IFITM3 en micelles de DPC (**figure 52**). Cependant, à ce stade, les informations dispensées par ces spectres sont insuffisantes pour déterminer si la protéine adopte une conformation différente en nanodisques et en micelles de détergent. La bicouche phospholipidique des nanodisques étant l'environnement se rapprochant le plus de l'environnement natif de la protéine, nous avons choisi de poursuivre les expériences de RMN en solution en nanodisques.

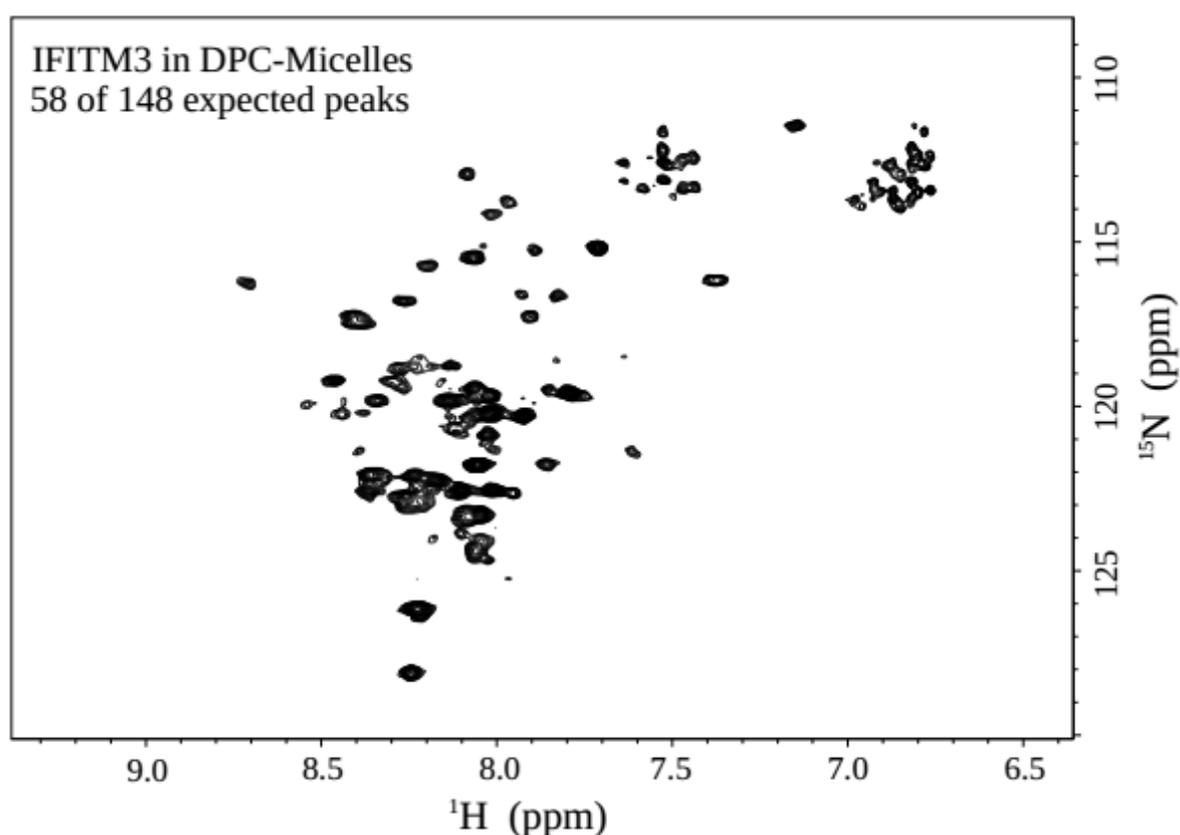


Figure 52 : Spectre 2D ^1H - ^{15}N HSQC de la protéine IFITM3 en micelles de DPC (Fos-Choline-12) enregistré à 20 °C et à pH 7,4 avec un spectromètre de 700 MHz (spectre obtenu par Roberto Maya-Martinez, groupe RMN, IBS)

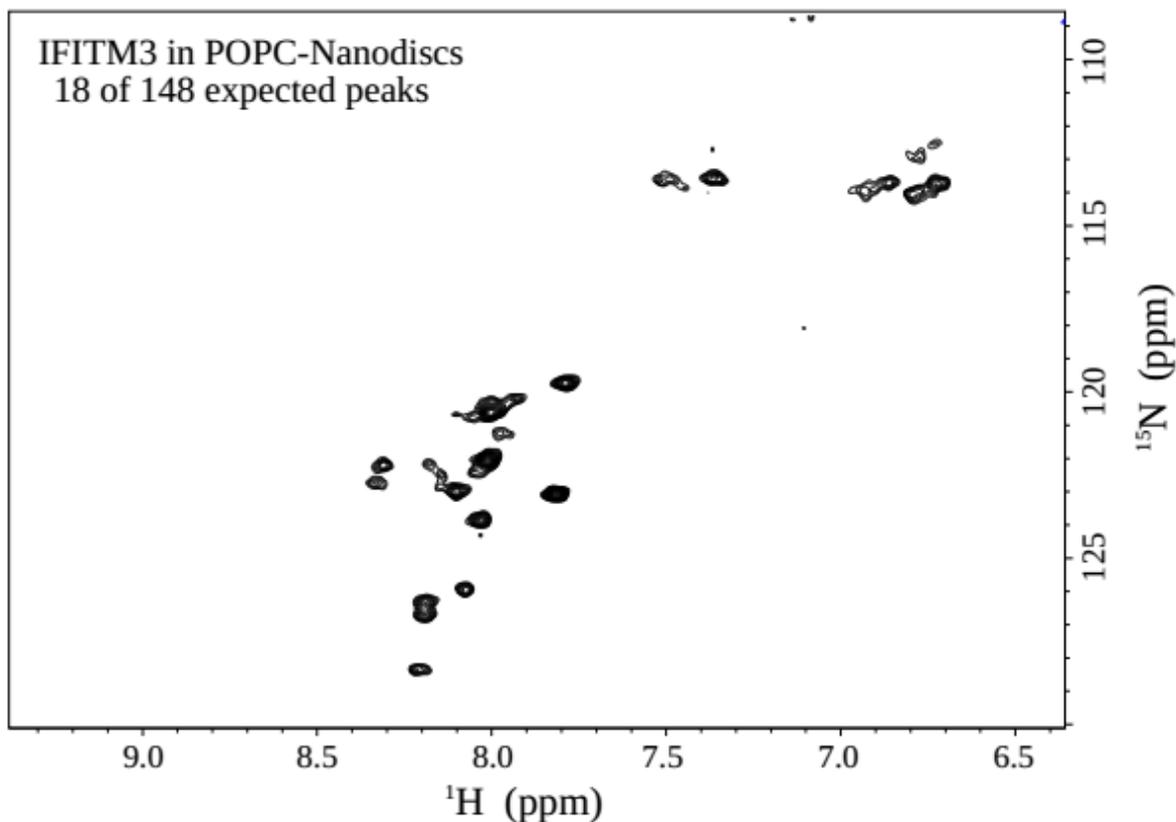


Figure 53 : Spectre 2D ^1H - ^{15}N HSQC de la protéine IFITM3 en nanodisques (ratio molaire 0,3 IFITM3 : 1 MSP1E3D1 : 60 POPC) enregistré à 20 °C et à pH 7,4 avec un spectromètre de 700 MHz (spectre obtenu par Roberto Maya-Martinez, groupe RMN, IBS)

10. Analyse par RMN de la protéine IFITM3 reconstituée en nanodisques MSP1-POPC et MSP1D1ΔH5-POPC

Afin d'améliorer la qualité du spectre obtenu pour la protéine ^{15}N IFITM3 reconstituée en nanodisques de grande taille (MSP1E3D1-POPC), la protéine IFITM3 enrichie en isotope ^{15}N a été reconstituée dans des nanodisques de plus petites tailles générés en utilisant des protéines d'assemblage plus courtes que la MSP1E3D1, telles que les protéines MSP1 et MSP1D1ΔH5. L'idée étant ici de réduire la taille des nanodisques afin de ralentir la relaxation qu'elle engendre et ainsi gagner en signal. La démarche utilisée pour produire ces nanodisques de plus petite taille est la même que celle exposée ci-dessus pour ceux de grande taille. Les nanodisques que nous désignerons ici comme étant de petite taille ont été assemblés à partir de la protéine ^{15}N IFITM3, de lipides POPC et de la MSP1D1ΔH5 selon le ratio molaire suivant, 1 MSP1D1ΔH5 : 25 POPC : 0,5 ^{15}N IFITM3. Le ratio entre IFITM3 et la

protéine d'assemblage MSP1D1ΔH5 (0,5 : 1) a été ici légèrement augmenté de manière à ce qu'en théorie, sur deux nanodisques formés, un seul contienne la protéine IFITM3 et non plus 1 sur 3 comme précédemment défini, de manière à enrichir l'échantillon en nanodisques pleins. Tout comme pour l'analyse des grands nanodisques formés à partir de la protéine d'assemblage MSP1E3D1, les petits nanodisques s'étant assemblés avec ^{15}N IFITM3 n'ont pas été séparés des nanodisques vides. Ils ont seulement fait l'objet d'une purification par chromatographie d'exclusion de taille. Enfin, des nanodisques de taille moyenne ont été formés à partir de la protéine ^{15}N IFITM3, de lipides POPC et de la MSP1 selon le ratio molaire suivant, 1 MSP1 : 35 POPC : 0,1 ^{15}N IFITM3. Le ratio entre IFITM3 et la protéine d'assemblage MSP1 a ici été volontairement réduit de manière à diminuer la probabilité que plus d'une protéine IFITM3 ne trouve refuge au sein d'un nanodisque ce qui pourrait contribuer à accroître encore la taille du nanodisque. Contrairement aux petits et aux grands nanodisques, les nanodisques de taille moyenne ont, eux, tout d'abord été séparés des nanodisques vides par chromatographie d'affinité sur résine de nickel, enrichissant de cette façon l'échantillon en nanodisques pleins, avant d'être purifiés par chromatographie d'exclusion de taille (**figures 54 et 55B**). Leur volume d'élution (11,85 ml) est inférieur à celui des nanodisques vides (13,57 ml) signifiant que leur taille est significativement plus importante (**figure 55A et B**), cependant IFITM3 n'a pas non plus été visualisée au sein de ces nanodisques par microscopie électronique à coloration négative (**figure 58**). En résumé, l'analyse de ces 3 types de nanodisques par RMN en solution a donc permis d'évaluer l'influence de leur taille et de leur préparation (ratio choisi pour la protéine MSP et IFITM3, purification ou non sur résine de nickel) sur la qualité du spectre 2D ^1H - ^{15}N HSQC leur correspondant.

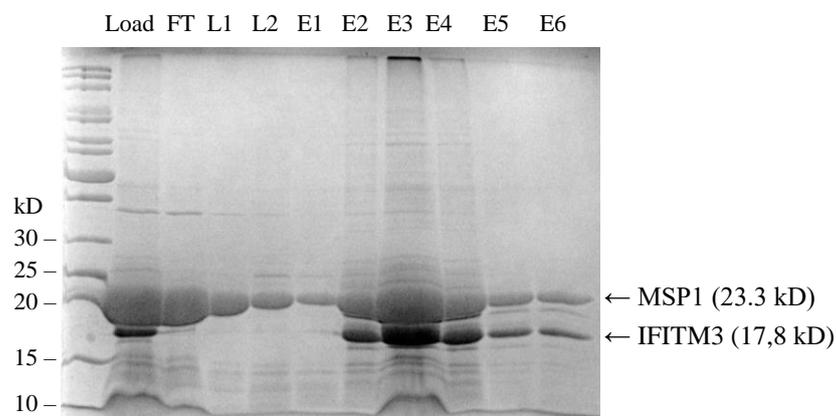


Figure 54 : Gel SDS-PAGE des différentes étapes de la chromatographie d'affinité sur résine de nickel ayant permis de séparer les nanodisques vides des nanodisques pleins contenant IFITM3 (ratio molaire, 1 MSP1 : 35 POPC : 0,1 ^{15}N IFITM3)

(« Load »: ensemble des nanodisques vides et pleins déposés sur la résine, FT : « Flow Through », nanodisques n'ayant pas été retenus sur la résine ; L1 et L2 : Lavages 1 et 2 ; E1 à E6 : Elutions 1 à 6)

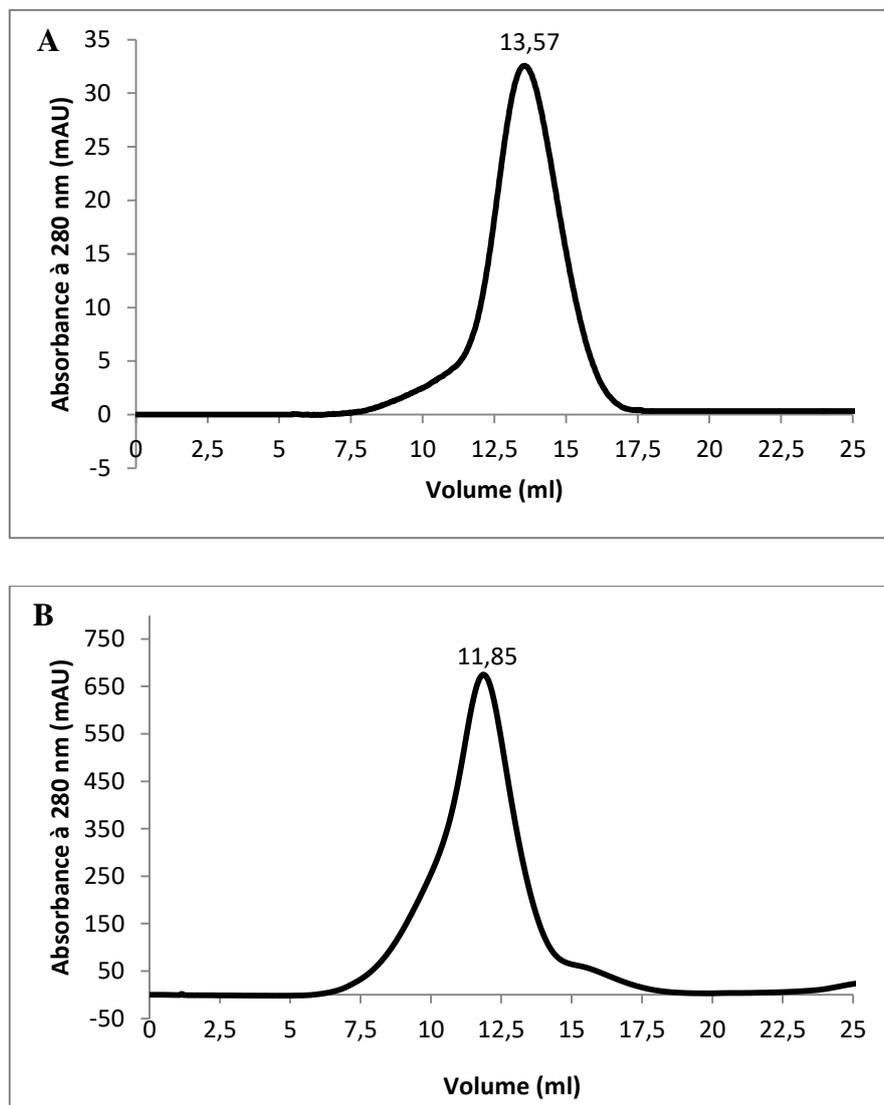


Figure 55 : Chromatogrammes obtenu après l'injection de 500 μ l de nanodisques (A) vides (ratio molaire, 1 MSP1 : 35 POPC) ou (B) pleins (ratio molaire 1 MSP1 : 35 POPC : 0,1 15 N IFITM3), sur une colonne S200 10/300 GL dans du tampon PBS pH 7,4.

Comme attendu, les spectres RMN 2D ^1H - ^{15}N enregistrés à 20 °C pour la protéine ^{15}N IFITM3 en nanodisques de petite, moyenne et grande taille montrent qu'un plus grand nombre de signaux appartenant à la protéine apparaissent lorsque la taille des nanodisques est réduite (**figure 56A, C et E**). Il y a néanmoins peu de différences entre les spectres acquis avec les nanodisques de petite taille et avec les nanodisques de taille moyenne, leur nombre de signaux et leurs déplacements chimiques étant relativement similaires (**figure 56A et C**). Seuls certains signaux retrouvés sur le spectre correspondant aux nanodisques de taille

moyenne n'apparaissent pas sur celui acquis avec les nanodisques de petite taille tandis que d'autres y apparaissent plus larges. En outre, pour les nanodisques de taille moyenne, la diminution de la température de 20 °C à 5 °C, destinée à réduire la vitesse d'échange entre les protons des parties flexibles d'IFITM3 et ceux de l'eau du solvant, a permis de doubler le nombre de signaux enregistrés, aboutissant à l'obtention de 10 signaux supplémentaires par rapport aux nanodisques de petite taille (**figure 56B et D**). C'est pourquoi, en raison de la meilleure qualité des spectres enregistrés avec les nanodisques de taille moyenne, nous avons choisi d'effectuer la suite des expériences avec ces nanodisques, assemblés selon le ratio molaire suivant, 1 MSP1 : 35 POPC : 0,1 ¹⁵N IFITM3 ; et purifiés par une première étape de chromatographie d'affinité sur résine de nickel suivie d'une deuxième étape de chromatographie d'exclusion de taille.

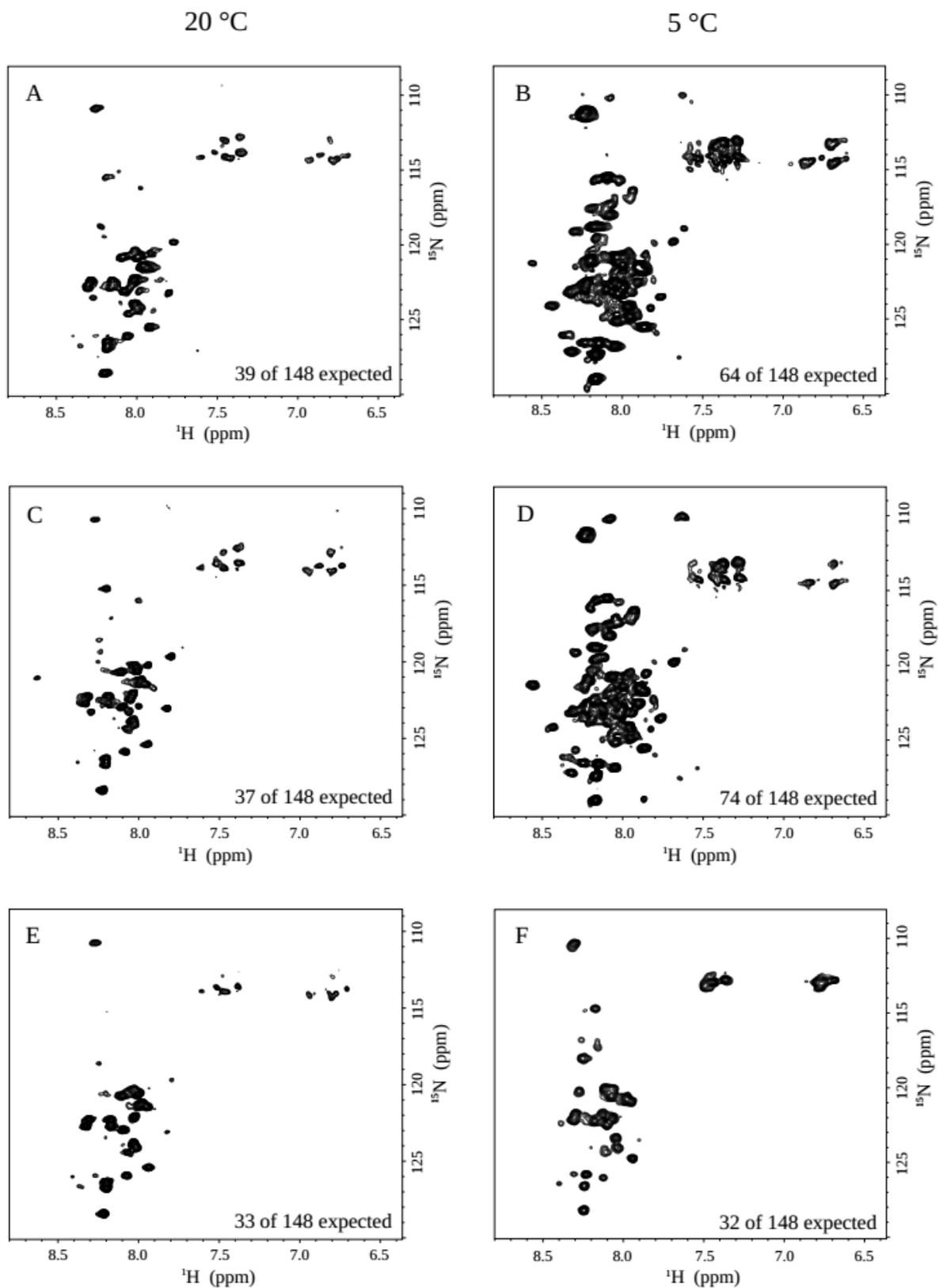


Figure 56 : Spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC de la protéine IFITM3 en nanodisques de petite (A, B), moyenne (C, D) et grande taille (E, F) enregistrés à pH 7,4, à 20 °C et à 5 °C avec un spectromètre de 850 Mhz (Spectres obtenus par Roberto Maya-Martinez, groupe RMN, IBS)

10.1. Optimisation du spectre 2D ^1H - ^{15}N HSQC de la protéine IFITM3 en nanodisques de taille moyenne MSP1-POPC

Les améliorations suivantes, c'est-à-dire la réduction de la taille des nanodisques en utilisant une protéine d'assemblage MSP plus courte et en diminuant le ratio IFITM3 : MSP1, la diminution de la température d'acquisition des spectres RMN ainsi que l'ajout d'une étape de purification des nanodisques pleins supplémentaire, ont permis d'enregistrer un spectre 2D ^1H - ^{15}N HSQC comportant 74 signaux sur 148 attendus, la première expérience RMN n'ayant permis que d'en détecter 18. Cependant, une première tentative d'attribution de ces signaux, à la suite d'expériences RMN menées à 5 °C, a échoué parce qu'à cette température, la vitesse d'échange des protons est plus lente mais la diffusion rotationnelle de la molécule est aussi réduite, engendrant une relaxation plus efficace et une perte de sensibilité lors d'expériences tridimensionnelles. La seule solution à ce problème de relaxation était d'augmenter la température d'acquisition des spectres tout en baissant le pH pour ralentir la vitesse d'échange des protons amides. Par conséquent, afin de parvenir à détecter les résonances manquantes et afin d'être en mesure de les attribuer, l'influence d'un pH plus bas et de températures plus élevées a été testée sur la qualité du spectre ^1H - ^{15}N HSQC de ^{15}N IFITM3 en nanodisques de taille moyenne (**figure 57**).

Si l'on compare les spectres obtenus à 5 °C, à pH 7,4 et à pH 4, une première observation est que, bien que les deux spectres aient permis l'obtention d'un nombre quasiment équivalent de signaux (73 versus 68), ces signaux ou pics sont d'une part, moins larges et mieux définis à pH 4 et d'autre part, présentent des déplacements chimiques différents (**figure 57A, B**). D'autre part, l'augmentation de la température à pH 4 a eu pour conséquence d'augmenter encore le nombre de signaux détectés, passant de 68 signaux à 5 °C à 82 signaux à 30 °C (**figure 57B, D, F**). Ces nouvelles conditions (30 °C à pH 4) nous ont donc permis d'augmenter significativement le nombre de signaux détectés et d'obtenir des spectres mieux résolus.

La meilleure dispersion des signaux obtenue à pH 4 n'est pas surprenante puisqu'IFITM3 est active dans la membrane des endosomes tardifs et des lysosomes, dans lesquels le pH peut atteindre des valeurs très basses comprises entre 4 et 5.

D'autre part, la comparaison, par microscopie électronique à coloration négative, des nanodisques de taille moyenne contenant la protéine IFITM3 ayant été étudiés à pH 7,4 avec ceux ayant été étudiés à pH 4 et ayant été trois fois plus exposés que les autres, a permis de

conclure que le faible pH et la température élevée appliqués à ces nanodisques pendant environ 7 jours ne les avaient pas trop sévèrement affectés. Sur les images de microscopie électronique, l'échantillon de nanodisques analysés par RMN à pH 4 et à 30 °C s'est différencié de celui étudié à pH 7,4 par un nombre d'aggrégats et une hétérogénéité plus importants (**figure 58**). Cependant, ces altérations n'ont pas semblées constituer un obstacle à la poursuite des expériences RMN dans ces conditions de faible pH et de hautes températures, puisque des contrôles qualités de l'échantillon, réalisés après chacune des 3 expériences RMN destinées à attribuer les signaux, n'ont pas mis en évidence l'apparition de nouveaux signaux pouvant laisser penser à une dégradation ou à une agrégation d'IFITM3 ou encore à un désassemblage de ces nanodisques à la suite de ces trois expériences. Ces nanodisques ont donc été jugés comme étant suffisamment stables pour permettre leur étude à pH 4 et à 30 °C pendant au moins une semaine.

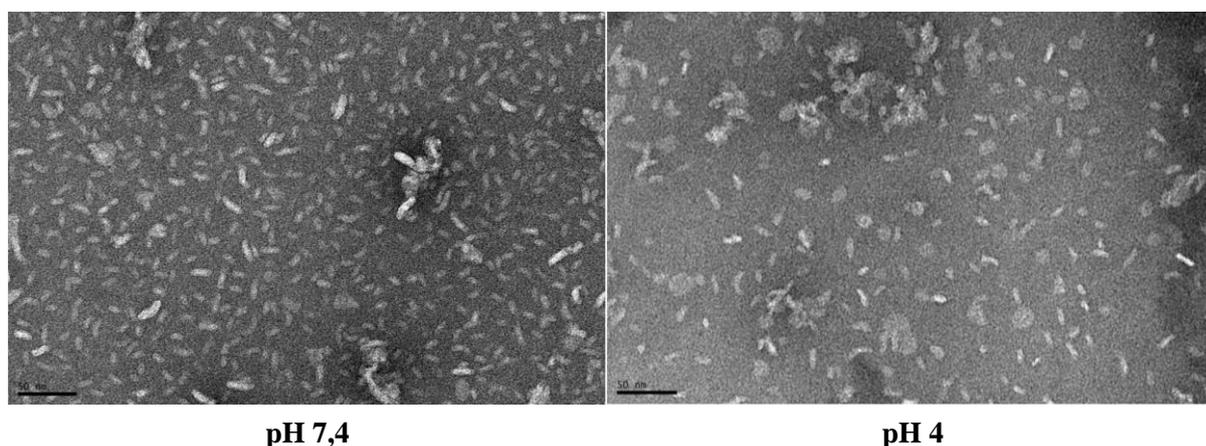


Figure 58 : Images de microscopie électronique à coloration négative de nanodisques (ratio molaire, 1 MSP1 : 35 POPC : 0,1 IFITM3) ayant été analysés par RMN à pH 7,4 (image gauche) ou à pH 4 et à 30 °C (image droite) (Images acquises par la plateforme de microscopie électronique de l'IBS)

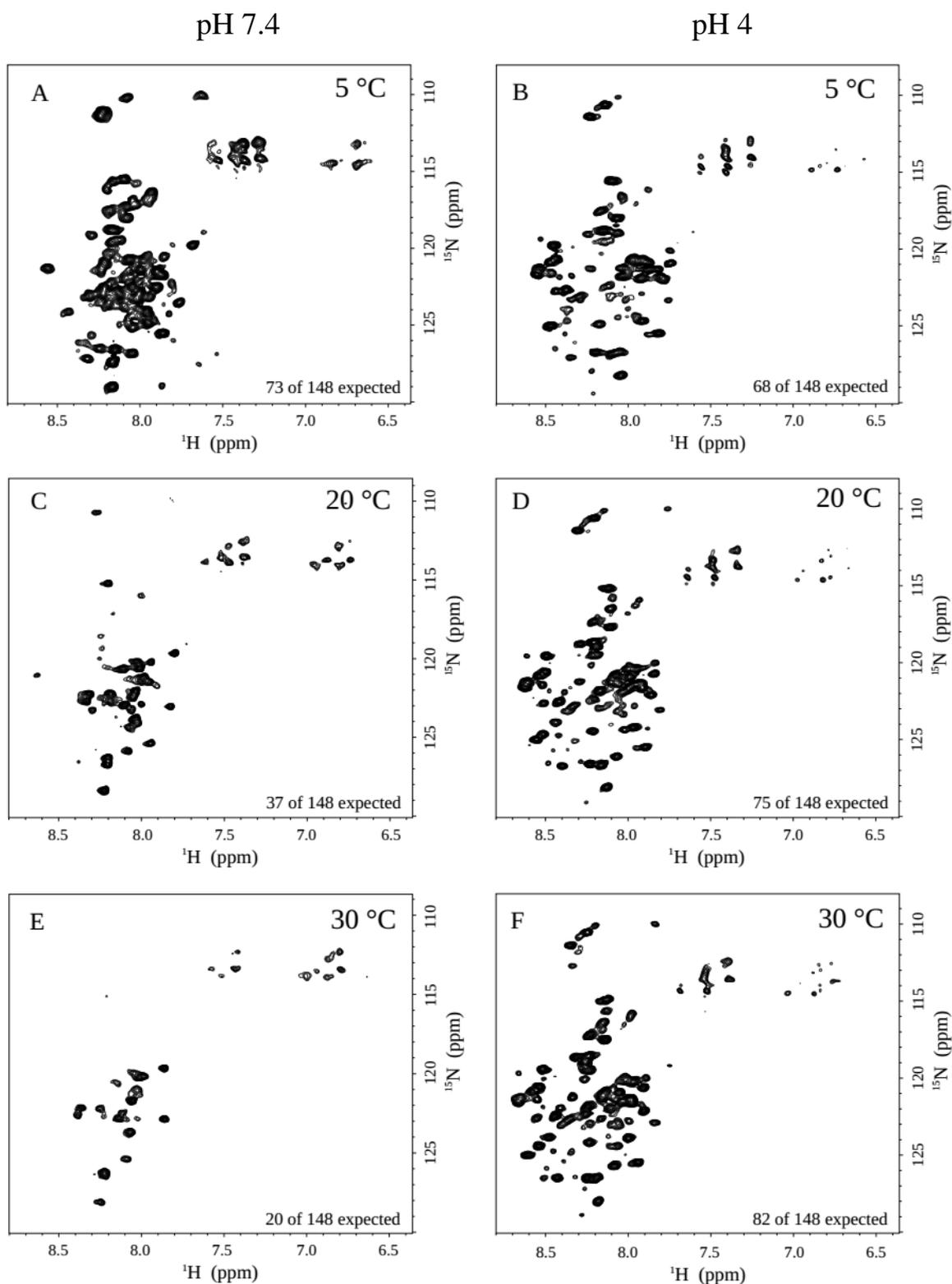


Figure 57 : Spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC de la protéine IFITM3 reconstituée en nanodisques de taille moyenne (ratio molaire, 1 MSP1 : 35 POPC : 0,1 ^{15}N IFITM3) enregistrés à pH 7,4 (A, C et E) et à pH 4 (B, D et F) à 5 °C (A et B), 20 °C (C et D) et 30 °C (E et F) avec un spectromètre de 850 MHz (Spectres obtenus par Roberto Maya-Martinez, groupe RMN, IBS)

10.2. Attribution des résonances obtenues pour la protéine IFITM3 en nanodisques MSP1-POPC à pH 4 et à 30 °C

Afin d'être en mesure d'attribuer, à un résidu de la protéine, chaque déplacement chimique observé dans le spectre 2D ^1H - ^{15}N HSQC enregistré à pH 4 et à 30 °C, plusieurs expériences RMN 3D triple résonance ont été menées avec des nanodisques assemblés avec la protéine IFITM3 enrichie en isotopes ^{15}N , ^{13}C et deutérée. La première expérience, nommée HNCO, détecte les fréquences (ou déplacements chimiques) des 3 noyaux suivants, l'hydrogène (^1H), le carbone (^{13}C) et l'azote (^{15}N) et a pour objectif d'établir une corrélation entre le proton amide (HN), son azote et le carobonyle (CO) de l'acide aminé précédent (i-1), reliant ainsi les acides aminés de la protéine par des couplages scalaires ^1J , reliant successivement les atomes directement liés par une liaison covalente. La deuxième expérience, nommée HN(CA)CO, a elle pour objectif de transférer l'aimantation via des couplages scalaires ^1J ($^1\text{J}_{\text{HN}}$, $^1\text{J}_{\text{NCA}}$, $^1\text{J}_{\text{CACO}}$) du proton amide (HN) vers son azote puis vers le carobonyle (CO) en passant obligatoirement par le Calpha covalement lié à l'azote de ce résidu. Dans cette expérience, seules les fréquences des atomes H, N et CO sont mesurées, le passage à travers le CA, noté entre parenthèse, ne servant que de relais pour atteindre le CO du même résidu. La troisième expérience, nommée HNCACB, est destinée à établir une corrélation entre le proton amide (HN), son azote et les carbones alpha (CA) puis bêta (CB) du même résidu par couplage scalaire ^1J ($^1\text{J}_{\text{HN}}$, $^1\text{J}_{\text{NCA}}$, $^1\text{J}_{\text{CACB}}$) mais aussi ^2J en utilisant un couplage existant entre l'azote du résidu i et le CA du résidu i-1. La quatrième expérience, nommée HN(CO)CACB, est, elle, destinée à établir une corrélation entre le proton amide (HN), son azote et les carbones alpha (CA) puis bêta (CB) de l'acide aminé précédent (i -1) par couplage scalaire ^2J . Cette quatrième expérience permet de discriminer les signaux intra et inter résidus provenant des carbones alpha (CA) et bêta (CB) et de les attribuer au résidu i ou i-1.

Cependant, en raison de problèmes de relaxation du signal, ces quatre premières expériences n'ont permis d'établir des corrélations qu'entre les atomes appartenant à la chaîne principale de la protéine. Celles avec les atomes des chaînes latérales des acides aminés n'ont pu être établies faute d'une bonne efficacité du transfert de magnétisation et d'une faible résolution de la fréquence des CB observés. Trois expériences complémentaires ont alors été menées avec la protéine IFITM3 doublement marquée ^{15}N , ^{13}C (protonée et non deutérée) afin de compléter les corrélations acquises lors des quatre premières expériences avec celles provenant des atomes des chaînes latérales et ainsi parvenir à attribuer 83 résidus.

Lors de ces expériences, le transfert de magnétisation commence à partir de la fin de la chaîne latérale des acides aminés. L'expérience, nommée HCCNH, permet d'établir une corrélation entre le proton du carbone bêta, le carbone bêta, le carbone alpha, l'azote et son proton amide. L'expérience, nommée HCC(CO)NH, permet quant à elle d'établir une corrélation entre le proton du carbone bêta, le carbone bêta, le carbone alpha et l'azote et son proton amide de l'acide aminé précédent permettant dès lors de discriminer les groupements NH détectés et de les attribuer au résidu i ou $i-1$. Enfin, une dernière expérience, nommée HCCH, destinée à détecter soit, tous les carbones soit, tous les protons a été entreprise afin de compléter les corrélations obtenues à l'issue des deux premières expériences.

Les 83 résidus d'IFITM3 apparaissant en vert dans sa séquence en dessous du spectre ont été attribués (**figure 59**). Ces résidus sont pour la plupart situés en dehors de la membrane du nanodisque, dans les parties flexibles de la protéine. En outre, deux déplacements chimiques différents ont été trouvés pour certains acides aminés désignés en rouge sur le spectre. Tous ces acides aminés appartiennent à la partie N-terminale d'IFITM3 tel que montré par les flèches rouges surmontant sa séquence (**figure 59**). L'explication la plus plausible est que ces acides aminés pourraient appartenir à deux protéines IFITM3 distinctes insérées au sein du même nanodisque. La proximité de ces deux protéines IFITM3 au sein du nanodisque contraindrait leur extrémité N-terminale respective à n'explorer que deux conformations possibles. Il pourrait s'agir de deux monomères ou bien d'un dimère. Il reste encore, à ce stade, à trouver une stratégie permettant d'attribuer les 77 résidus restant qui sont probablement enfouis dans la membrane du nanodisque empêchant leur détection jusqu'à présent.

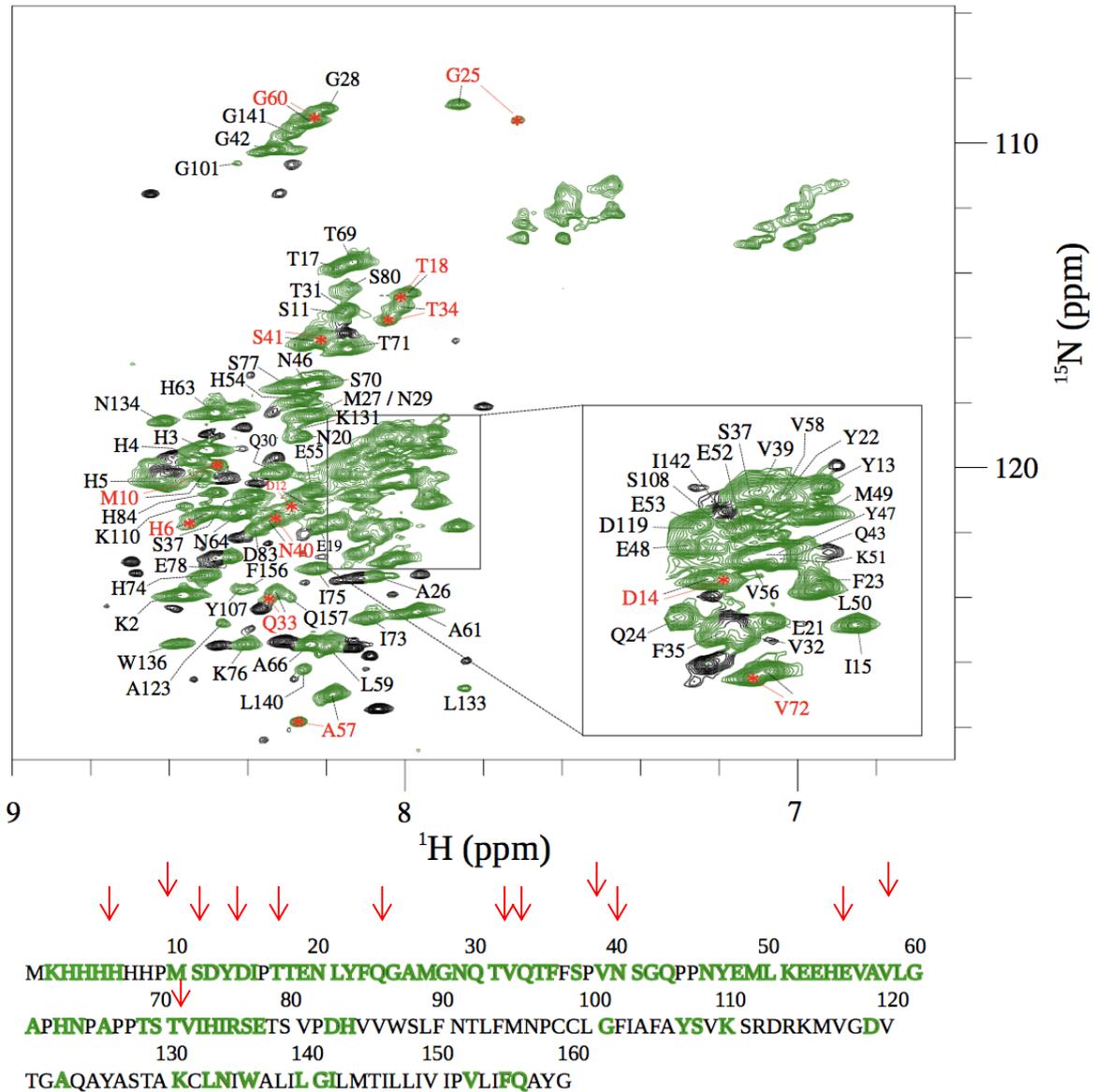


Figure 59 : Résultat de l'attribution des résonances figurant sur le spectre 2D ^1H - ^{15}N HSQC de la protéine ^{15}N , ^{13}C IFITM3, deutérée et reconstituée en nanodisque MSP1-POPC (ratio molaire, 1 MSP1 : 35 POPC : 0,15 IFITM3), enregistré à pH 4 et à 30 °C avec un spectromètre de 850 MHz. Les résidus attribués ont été mis en évidence en vert dans la séquence de la protéine IFITM3 figurant sous le spectre tandis que les résidus présentant deux déplacements chimiques différents ont été marqués par un astérisque rouge dans le spectre et désignés par une flèche rouge dans la séquence d'IFITM3.

(Spectre obtenu par Roberto Maya-Martinez, groupe RMN, IBS)

10.3. Prédiction de la structure secondaire adoptée par les régions attribuées d'IFITM3

Les déplacements chimiques sont dépendants du type de repliement de la protéine. Pour certains atomes, il a été montré que leurs déplacements chimiques peuvent être corrélés à la présence et au type de structure secondaire à laquelle ils appartiennent. Une prédiction de la structure secondaire adoptée par les régions de la protéine qui ont été attribuées a donc été obtenue en utilisant le serveur Talos. La **figure 60A** représente pour chaque résidu de la protéine attribué, sa valeur S^2 (paramètre d'ordre, par comparaison avec les déplacements chimiques de résidus mesurés dans des fragments peptidiques totalement déstructurés) ainsi que sa propension à former une hélice à pH 4, toutes deux calculées par le serveur Talos. Un paramètre d'ordre faible obtenu par Talos correspond à des résidus qui ont un ensemble de déplacements chimiques proches de ceux mesurés dans un peptide flexible. Au contraire, un S^2 proche de 1 révèle un résidu qui a un comportement éloigné de celui d'une zone flexible et peut donc être considéré comme appartenant à une région hautement structurée. Ici, les valeurs S^2 calculées pour les régions attribuées d'IFITM3 sont pour la plupart supérieures à 0,3 et pour environ la moitié d'entre elles supérieures à 0,5, signifiant que ces parties de la protéine ne seraient pas aussi flexibles qu'imaginées et présenteraient, au contraire, un certain degré d'organisation. En outre, la propension à former une hélice a été prédite comme étant particulièrement importante pour les résidus 47 à 52 de même que pour le résidu 79 (**figure 60A**). Cependant, la prédiction réalisée pour le résidu 79 n'est pas significative puisque qu'un seul résidu ne peut être impliqué dans la formation d'une hélice.

Une mesure expérimentale des **NOEs** (« Nuclear Overhauser Effects ») a alors été effectuée afin de confirmer ou d'infirmer la propension des résidus 47 à 52 à former une hélice, telle que prédite par le serveur Talos. L'intensité des corrélations ^1H - ^1HN (« cross-peaks ») représentées dans le spectre NOESY (« Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy ») constitue une mesure indirecte des distances séparant les protons d'une protéine dans l'espace. Les distances ainsi mesurées entre protons peuvent ensuite être utilisées pour déterminer la structure tridimensionnelle adoptée par la protéine. La figure B montre, en pointillés bleus sur le spectre ^{15}N -NOESY d'IFITM3, les connections NOE $i+3$, caractéristiques d'une structure hélicoïdale, établies entre les résidus 48 à 50 et 50 à 52, confirmant dès lors la prédiction faite par Talos (**figure 60B**). Les résidus 48 à 52 d'IFITM3 adopteraient donc bien une conformation hélicoïdale.

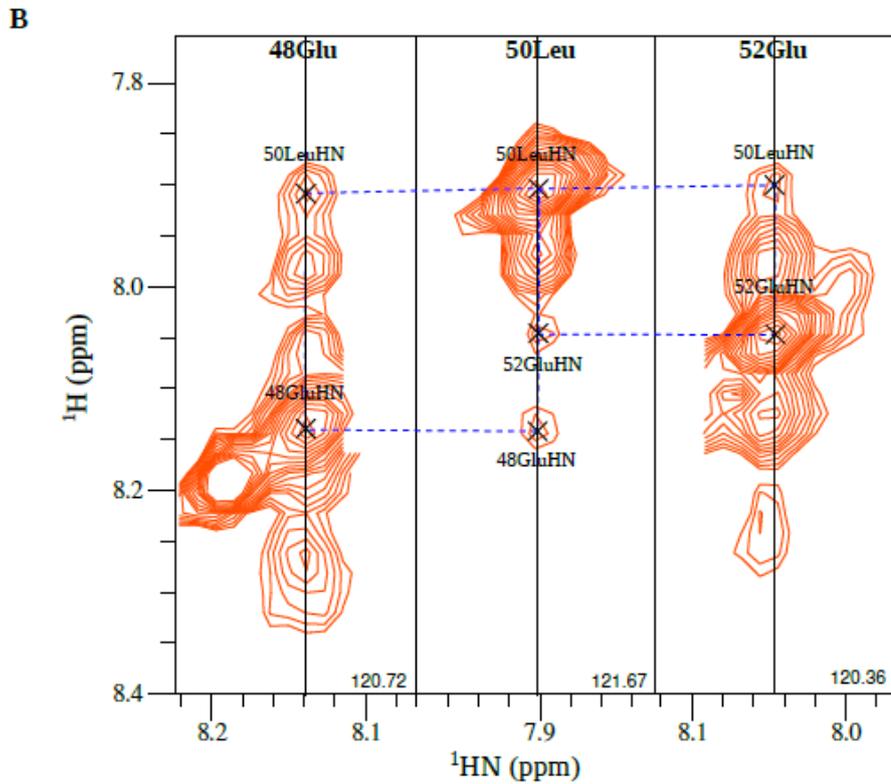
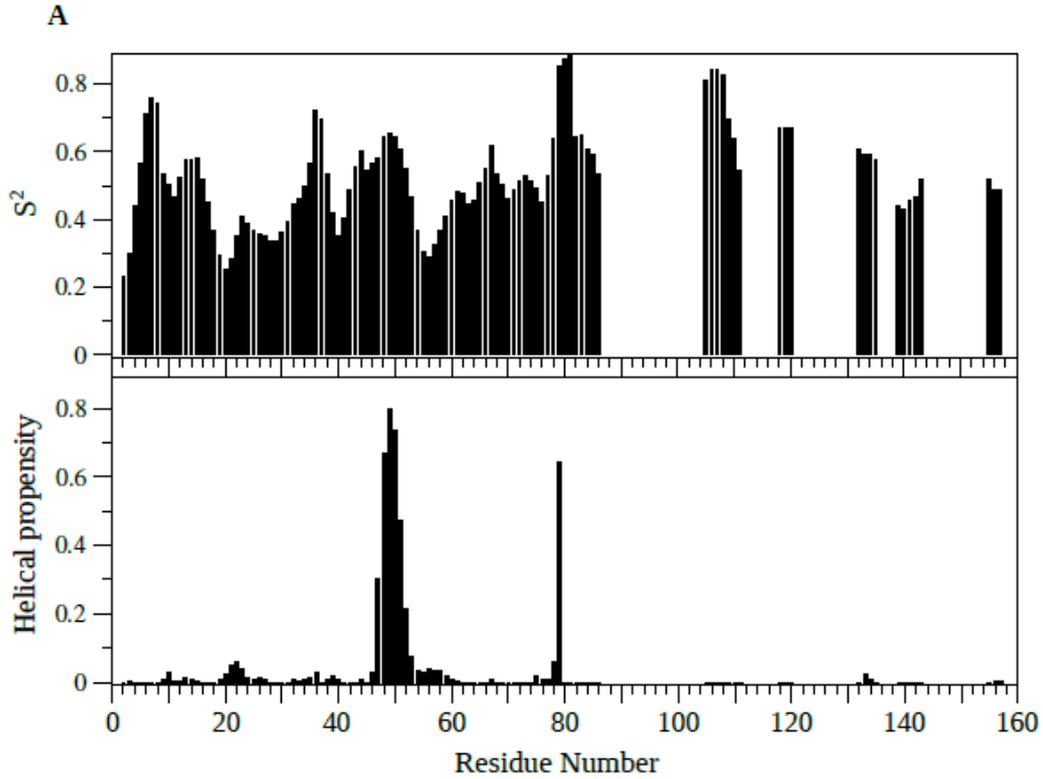


Figure 60 : **A.** Représentation des valeurs du paramètre d'ordre S^2 et de la propension à former une hélice calculées par le serveur Talos pour chaque résidu attribués d'IFITM3. **B.** Spectre ^{15}N -NOESY d'IFITM3 en nanodisques de taille moyenne montrant en pointillés bleus les connections NOEs $i+3$ établies entre les résidus 48 à 50 et 50 à 52.

10.4. Stratégies mises en œuvre pour parvenir à attribuer les résidus d'IFITM3 interagissant avec la membrane du nanodisque

77 résidus d'IFITM3 n'ont à ce stade pas encore pu être attribués. S'agissant certainement des résidus interagissant avec la membrane du nanodisque, l'explication la plus plausible est que les parties membranaires deutérées de la protéine protégées tout d'abord par la membrane bactérienne puis par le détergent et enfin par la membrane du nanodisque ne soient pas assez longtemps exposées au solvant entre chaque étape pour permettre l'échange de tous les ions deutériums mobiles (N-D) avec les protons du solvant. La plupart des ions deutérium n'étant alors pas remplacés par des protons, les signaux provenant de ces derniers ne peuvent être détectés et les résidus leur correspondant ne peuvent par conséquent pas être attribués.

Afin d'augmenter la vitesse d'échange entre les ions deutérium (ND) de la protéine et les protons de l'eau (H₂O) du solvant et ainsi favoriser la reprotonation des groupements amides dans le cas de la protéine produite en D₂O, la première stratégie entreprise a été de lyser les cellules ayant exprimé IFITM3 à pH 10, puis de poursuivre toutes les autres étapes de solubilisation et de purification de la protéine à ce même pH, puisque le taux d'échange chimique ND/H₂O est minimal à pH 2-3 puis augmente d'un facteur 10 par unité de pH (Englander, 2006). L'idée étant qu'à chaque fois que les régions membranaires de la protéine sont, un tant soit peu exposées au solvant, suite aux mouvements des lipides ayant lieu lors de la lyse ou encore lors de l'extraction d'IFITM3 par le détergent par exemple, l'échange avec les protons du solvant soit suffisamment rapide pour qu'IFITM3 puisse être reprotonée. La protéine ainsi purifiée à pH 10 a ensuite été reconstituée en nanodisque à pH 7,4 puis analysée par RMN à pH 4 et à 30 °C. Néanmoins, bien que l'intensité de certains signaux ait été augmentée et que de nouveaux signaux moins intenses et pouvant correspondre à des résidus des régions membranaires d'IFITM3 soient apparus (designés par des flèches bleues sur le spectre ¹⁵N-HSQC) (**figure 61**), cette approche fût un échec puisqu'elle n'a pas permis d'attribuer de résidus appartenant aux régions membranaires d'IFITM3.

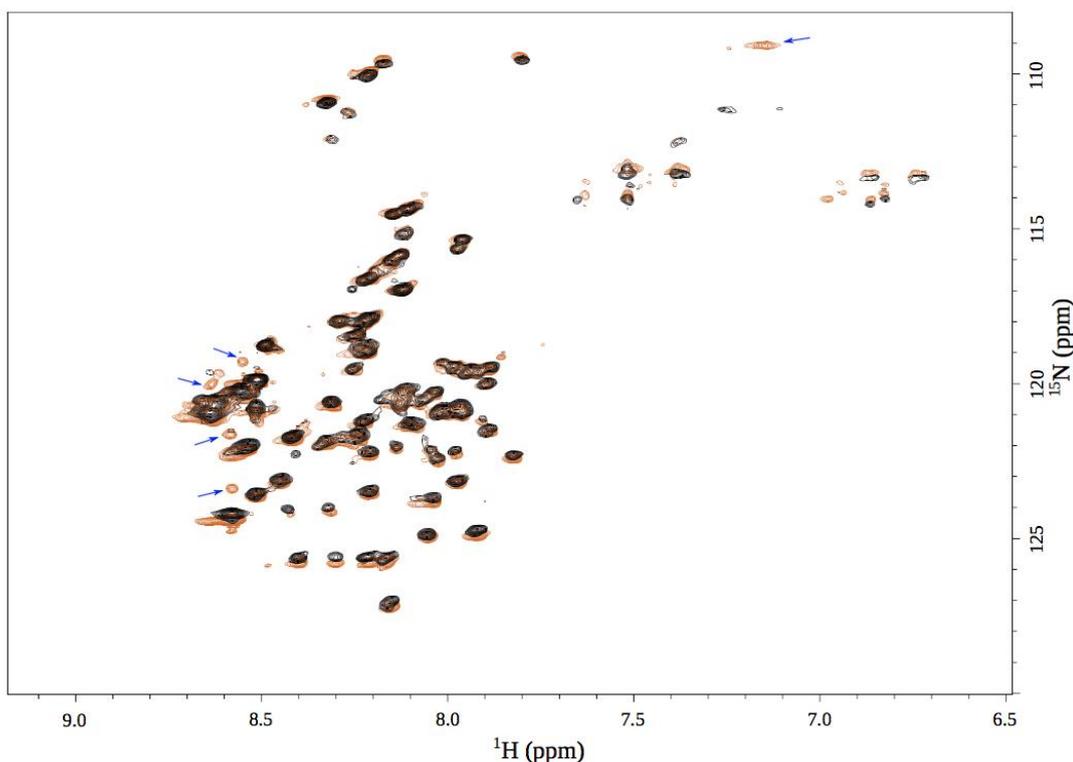


Figure 61 : Comparaison des spectres HN HSQC obtenus à pH 4 et à 30 °C pour les nanodisques (MSP1 : POPC : IFITM3) assemblés à partir de la protéine IFITM3 marquée ^{15}N ^{13}C et deutérée purifiée à pH 7,4 (spectre noir) et à pH 10 (spectre orange). Les flèches bleues indiquent dans le spectre les signaux additionnels apparus suite à la préparation d'IFITM3 à pH 10.

(Spectre obtenu par Roberto Maya-Martinez, groupe RMN, IBS)

Une deuxième stratégie a alors été testée, il s'agit d'une tentative de dépliement/repliement (« defolding/refolding ») d'IFITM3. Le principe étant ici de dénaturer complètement la protéine dans de l'urée en l'absence de détergent de façon à ce que toutes les régions de la protéine soient exposées au solvant et soient ainsi reprotonées. IFITM3 serait ensuite renaturée en présence de son détergent, la Fos-Choline-12, suite au retrait progressif de l'urée. En cas de bon repliement de la protéine, IFITM3 reprotonée pourrait alors être reconstituée et étudiée par RMN en nanodisques. Un échantillon de protéine ^{15}N IFITM3 ayant fait l'objet d'une tentative de « defolding/refolding » (**figure 62**), décrite dans le matériel et méthodes, a alors été analysé par RMN et comparé à celui de la protéine ayant été extraite des membranes et purifiée en Fos-Choline-12. Les spectres HN HSQC ainsi obtenus à pH 7,4 et à 30 °C montrent tout d'abord, que cette première tentative de « defolding/refolding » a fonctionné puisque les deux spectres se superposent et d'autre part, que 15 nouveaux signaux, indiqués sur le spectre par des flèches bleues, ont été détectés à

partir de l'échantillon de protéine IFITM3 renaturée (**figure 63**). Cependant, il est peu probable que ces signaux proviennent des régions membranaires d'IFITM3. D'autre part, le rendement de protéine repliée ainsi obtenu est relativement faible et deviendrait catastrophique si la protéine était deutérée, la deutération ayant tendance à diminuer la solubilité des protéines et à les faire précipiter. Or, pouvoir reconstituer en grande quantité IFITM3 marquée ^{15}N , ^{13}C et deutérée en nanodisques est un pré-requis indispensable pour espérer attribuer les résidus de la chaîne principale d'IFITM3.

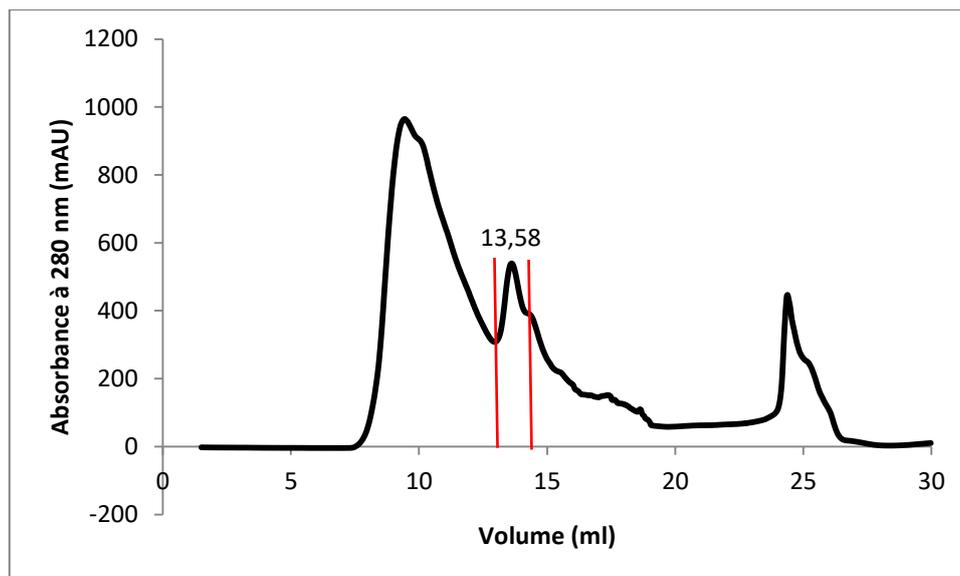


Figure 62 : Chromatogramme obtenu après injection, sur une colonne Superdex 200 10/300 GL Increase, de 500 μl de protéine ^{15}N IFITM3 ayant fait l'objet d'une tentative de dépliement/repliement, dans du tampon PBS pH 7,4 contenant 1 mM de β -mercaptoéthanol et 3,5 mM de Fos-Choline-12. Le pic de protéine éluant à 13,5 ml, délimité par deux traits rouges sur le chromatogramme, a été sélectionné et concentré jusqu'à 160 μl (soit le volume du tube capillaire devant contenir l'échantillon) avant son analyse par RMN.

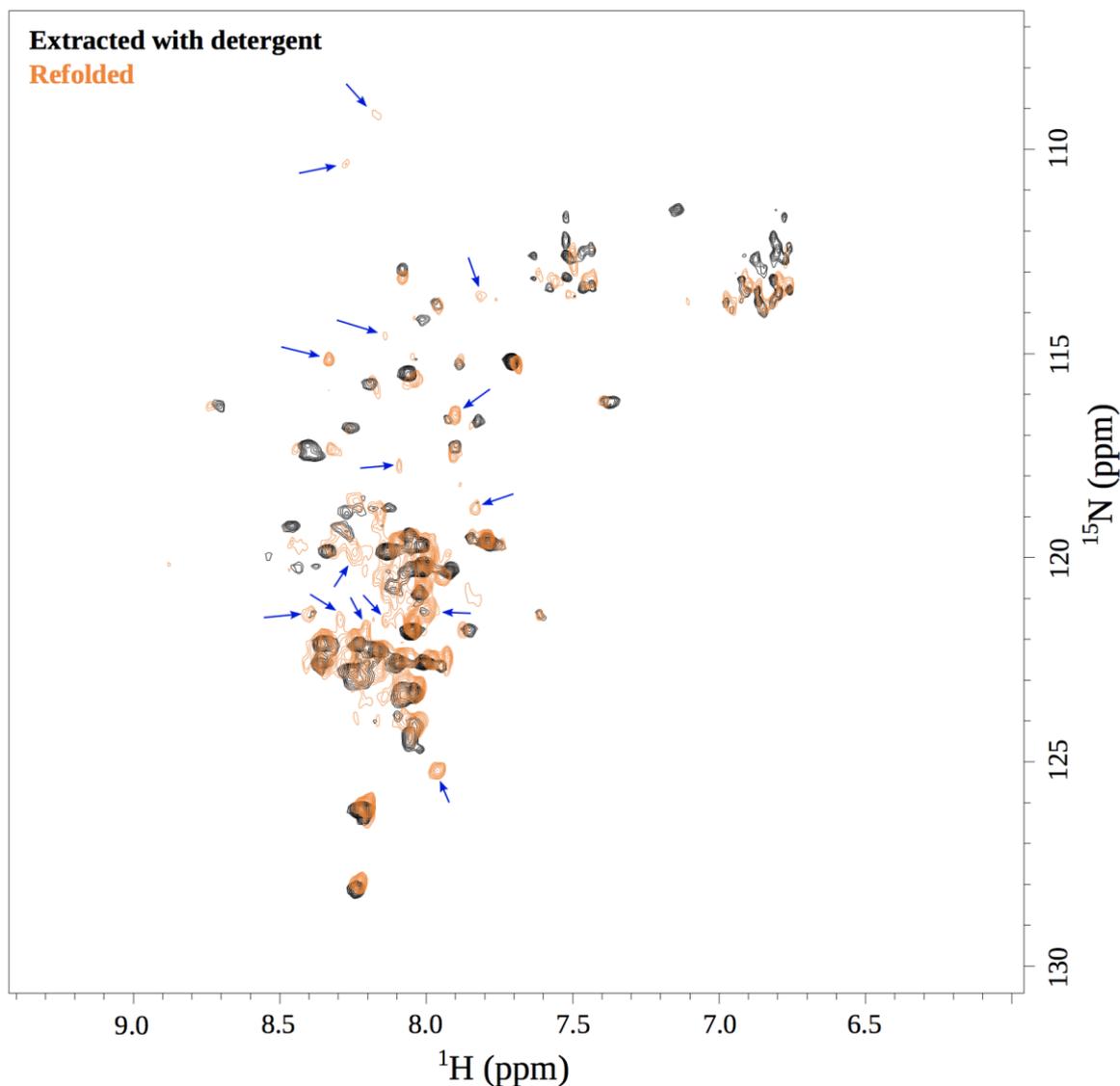


Figure 63 : Comparaison des spectres HN HSQC obtenus à pH 7,4 et à 30 °C pour la protéine ^{15}N IFITM3 soit, extraite et purifiée en micelles de Fos-Choline-12 (spectre noir) soit, ayant fait l'objet d'un dépliement en urée puis d'un repliement en micelles Fos-Choline-12 (spectre orange). Les flèches bleues indiquent les nouveaux signaux apparus suite au dépliement/repliement d'IFITM3.
(Spectre obtenu par Roberto Maya-Martinez, groupe RMN, IBS)

Une dernière stratégie, non encore explorée, consisterait à solubiliser et à purifier ^{15}N , ^{13}C IFITM3 deutérée à pH 10 de manière à favoriser sa reprotonation (ND \rightarrow NH) puis de la reconstituer au sein de nanodisques assemblés à partir de lipides POPC deutérés. Les signaux provenant des groupements NH de la protéine ne seraient alors plus perdus suite à leur interaction avec les groupements CH, devenus CD, des lipides résolvant ainsi les problèmes de relaxation du signal rencontrés jusqu'à présent. Cette approche pourrait alors permettre de détecter les signaux provenant des résidus membranaires d'IFITM3 et de les attribuer suite à

plusieurs expériences de RMN, certaines nécessitant de produire le même échantillon préparé cette fois à partir de la protéine ^{15}N ^{13}C IFITM3 deutérée à différents pourcentages. Cette approche est pour l'instant à l'étude notamment en raison du coût exorbitant de ces lipides POPC deutérés.

11. Expérience de protéolyse limitée d'IFITM3 en nanodisques MSP1-POPC

Sur le gel SDS-PAGE montrant le résultat de la digestion à la trypsine d'IFITM3 (1 trypsine : 200 IFITM3) reconstituée en nanodisques apparaissent les trois mêmes bandes de dégradation que celles obtenues lors de la protéolyse d'IFITM3 en protéoliposomes (**figures 64 et 35**). Ce profil de digestion de la protéine identique en nanodisque et en liposomes tend à démontrer qu'IFITM3 adopterait la même topologie au sein de la membrane des liposomes et des nanodisques et qu'elle y serait bien insérée dans les deux cas.

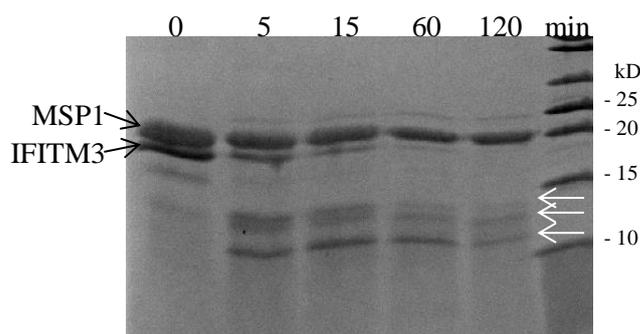


Figure 64 : Gel SDS-PAGE montrant le résultat de la protéolyse limitée d'IFITM3 en nanodisques POPC : MSP1 après 5, 15, 60 et 120 min d'incubation avec de la trypsine ajoutée au ratio massique d'1 trypsine : 200 IFITM3

12. Détermination de l'état oligomérique d'IFITM3 en nanodisques MSP1E3D1-POPC et MSP1-POPC par pontage chimique

Le résultat du pontage chimique d'IFITM3 en nanodisques de moyenne et de grande taille avec différentes concentrations d'EGS et de glutaraldehyde (1 et 5 mM) a ici été visualisé par « western blot » avec un anticorps anti-histidine afin de ne pas détecter la présence de la protéine MSP formant les nanodisques. Une bande pouvant correspondre au poids moléculaire d'un dimère d'IFITM3 est apparue en l'absence et en présence d'EGS avec les nanodisques formés à partir de la protéine d'assemblage MSP1E3D1 (**figure 65**). Cet éventuel dimère d'IFITM3 n'a par conséquent pas été affecté par le prétraitement dénaturant (action combinée du SDS, du 2-mercaptoéthanol et de la chaleur) qu'il a subi avant son analyse par SDS-PAGE, probablement parce que protégé par la bicouche lipidique du nanodisque. Une autre bande pouvant correspondre au poids moléculaire d'un trimère d'IFITM3 n'est quant à elle apparue qu'en présence d'EGS (**figure 65**). La même expérience réalisée avec IFITM3 en nanodisques de plus petite taille, formés à partir de la protéine d'assemblage MSP1, a également révélé la présence d'un potentiel dimère d'IFITM3 aussi bien en présence qu'en l'absence d'agent de pontage chimique, glutaraldehyde ou EGS (**figure 66**), démontrant une fois encore la résistance de ce potentiel dimère à la dénaturation. La présence de l'agent de pontage chimique n'a eu pour conséquence que d'accentuer l'intensité de la bande déjà présente. Cependant, il convient d'être prudent quant à l'interprétation de ces résultats puisqu'ils ne permettent pas d'exclure toute implication de la MSP dans la formation de ces dimères ou trimères avec la protéine IFITM3.

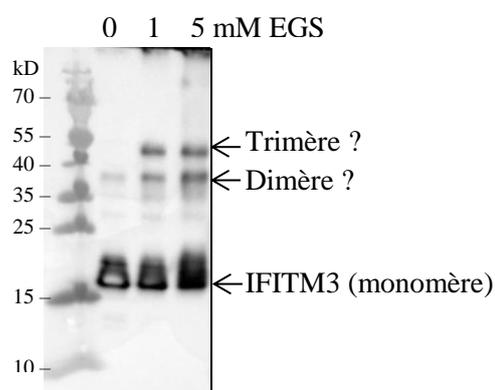


Figure 65 : « Western blot » réalisé avec un anticorps anti-histidine montrant le résultat du pontage chimique d'IFITM3 en nanodisques de grande taille (MSP1E3D1 : POPC) avec 0, 1 et 5 mM d'EGS

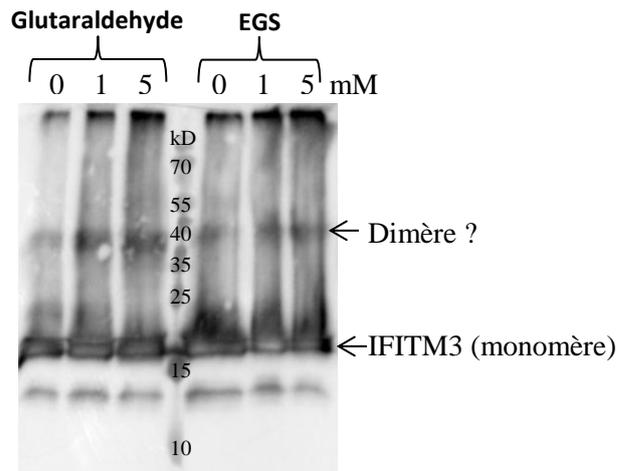


Figure 66 : « Western blot » réalisé avec un anticorps anti-histidine montrant le résultat du pontage chimique d'IFITM3 en nanodisques de taille moyenne (MSP1 : POPC) avec 0, 1 et 5 mM de glutaraldehyde ou d'EGS

Deux autres expériences visant à déterminer l'état oligomérique d'IFITM3 en nanodisques (MSP1 : POPC) ont également été mises en œuvre. La première a été l'analyse de ces nanodisques par spectrométrie de masse en condition native. Cependant, cette approche fût en échec, IFITM3 s'ionisant trop faiblement. La deuxième a été de marquer IFITM3 avec des billes d'or se liant à son étiquette six histidines et d'observer les nanodisques par microscopie électronique afin d'essayer de compter le nombre de billes d'or et donc de protéines IFITM3 présentes par nanodisque. Cependant, cette approche fût également un échec, les billes d'or semblant désagréger les nanodisques.

13. Mise en évidence, par la méthode d'électrophysiologie TEVC, de la formation de pores membranaires par la protéine IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12

L'hypothèse selon laquelle la protéine IFITM3 pourrait exercer son activité antivirale en formant des pores ou canaux ioniques au sein de la membrane des endosomes et des lysosomes a ici été investiguée par la méthode **TEVC** (« **T**wo-**E**lectrode **V**oltage **C**lamp ») employée sur des ovocytes de Xénope. Il s'agit d'une méthode d'électrophysiologie utilisant deux microélectrodes, l'une mesurant le potentiel membranaire et l'autre injectant un courant afin de maintenir le potentiel imposé (Voltage-Clamp). Cette méthode de double électrode permet d'uniformiser le potentiel de membrane sur des cellules de grande taille, tels que les ovocytes de Xénope (~1 mm de diamètre) qui sont utilisés dans cette étude. Le potentiel membranaire est la différence de potentiel électrique existant entre les compartiments intra et extracellulaires. Cette différence de potentiel est due à une asymétrie de charge entre les deux compartiments séparés par la membrane. Le potentiel de membrane au repos des cellules est maintenu par les gradients ioniques (principalement potassiques) et l'ouverture de canaux ioniques sélectifs qui créent un flux de charge constant. Le gradient ionique est également maintenu en permanence par l'activité des pompes ATPases sodium/potassium (Na/K) consommatrices d'énergie. Dans cette expérience, la valeur du potentiel membranaire est imposée (-50mV) et est maintenue constante en appliquant à l'ovocyte un courant égal et opposé en charge au courant traversant la membrane. Tout changement du potentiel membranaire, induit par exemple par la formation de pores, génère un flux ionique et donc un courant qui est enregistré en temps réel. La configuration TEVC reflète l'ensemble des courants ioniques traversant la membrane plasmique de l'ovocyte de Xénope. Durant l'enregistrement effectué par un automate (HiClamp, MultiChannel Systems), l'ovocyte est incubé dans différents puits contenant les tampons et échantillons testés.

Afin de déterminer si la protéine IFITM3 avait une quelconque activité de formation de pores ou de canaux ioniques au sein de la membrane d'ovocytes de Xénope, une première expérience TEVC a été réalisée en présence de 5 μ M de protéine IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12. Pour ce faire, deux contrôles ont été réalisés au préalable en incubant l'ovocyte avec, tout d'abord, le tampon ND-96 (5 mM HEPES pH 7,4 ; 91 mM NaCl, 2 mM KCl ; 1,8 mM CaCl₂, 1mM MgCl₂) puis avec le tampon d'IFITM3 (PBS pH 7,4 ; 3,5 mM Fos-Choline-12) pendant 4 min afin de s'assurer qu'aucun de ces tampons, et en particulier le détergent

Fos-Choline-12, n'avait d'effet sur le potentiel membranaire de l'ovocyte, puisque la création de fuite ionique dans la membrane par le détergent engendrerait un signal identique à la formation de pore. La valeur du courant enregistré avec ces tampons est toujours égale à zéro, indiquant qu'aucune fuite ionique n'est produite par ces tampons et que ces conditions sont propices à la mesure de formation de pore (**figure 67**). L'ovocyte a ensuite été incubé pendant 4 min avec 5 μM de protéine IFITM3 dans son tampon. La présence de la protéine IFITM3 (avec détergent) dans le milieu extracellulaire de l'ovocyte de Xénope a cette fois généré un courant de grande amplitude ($> 90 \mu\text{A}$) tel que montré par l'enregistrement de la **figure 67**. Ce courant est dû à une fuite ionique importante suggérant la formation de pores au sein de la membrane des ovocytes. A titre de comparaison, les canaux potassiques ayant la plus forte expression et activité dans les mêmes conditions génèrent une amplitude de courant plus proche de $20 \mu\text{A}$, signifiant que la fuite massive d'ions engendrée par IFITM3 serait très probablement non sélective et qu'elle résulterait de la formation de pores membranaires par IFITM3.

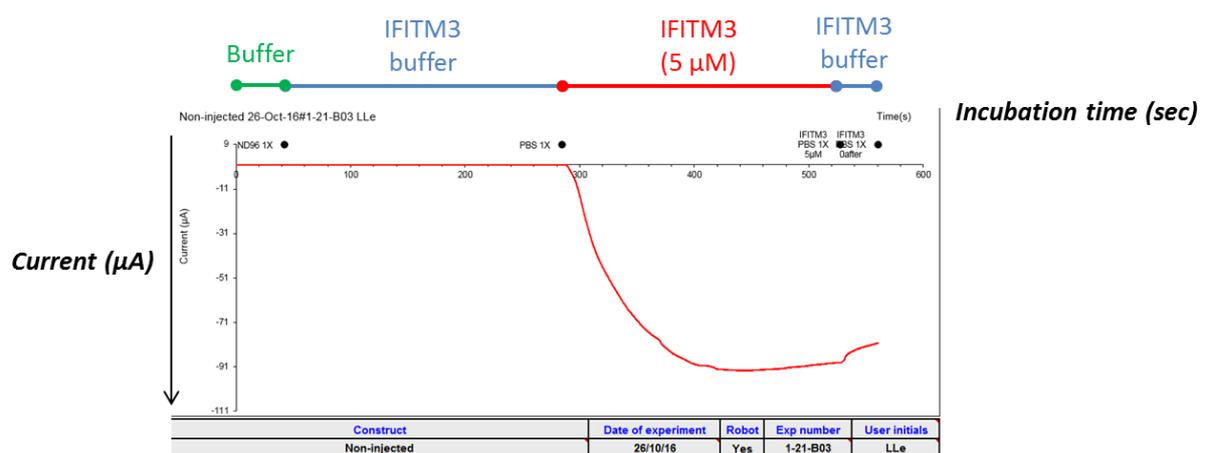


Figure 67 : Mesure électrophysiologique de la formation de pores par IFITM3. Enregistrement TEVC montrant l'évolution de la valeur du courant en fonction du temps suite à l'incubation de l'ovocyte avec le tampon "physiologique" (ND-96) puis avec le tampon de la protéine IFITM3 (PBS pH 7,4 ; 3,5 mM Fos-Choline-12) et enfin avec la protéine IFITM3 à 5 μM dans son tampon (données recueillies par Laura Lemel, goupe canaux de l'IBS)

Ensuite, afin de pouvoir attribuer cet effet uniquement à l'action de la protéine IFITM3 et non à une éventuelle action combinée de la protéine et du détergent ou encore à la formation d'agrégats, cette même expérience a été répétée en incluant un contrôle supplémentaire, à savoir une autre protéine, gp-41, qui est solubilisée dans le même détergent, la Fos-Choline-12, et non connue pour former des pores. L'incubation de l'ovocyte avec le

tampon de gp-41 (50 mM Hepes pH 7,1 ; 80 mM KCl, 1 mM Fos-Choline-12) puis avec 5 μM de gp-41 dans son tampon n'ont pas engendré de courant, contrairement à la protéine IFITM3 ajoutée ensuite (**figure 68**) suggérant que la formation de pore est spécifiquement liée à la présence d'IFITM3. Bien que les concentrations en détergent ayant été testées pour gp-41 et IFITM3 ne soient pas identiques (1 mM versus 3,5 mM), ces résultats confortent l'idée selon laquelle la formation de pores ne résulterait que de l'action d'IFITM3 et ne serait pas liée à la présence de son détergent.

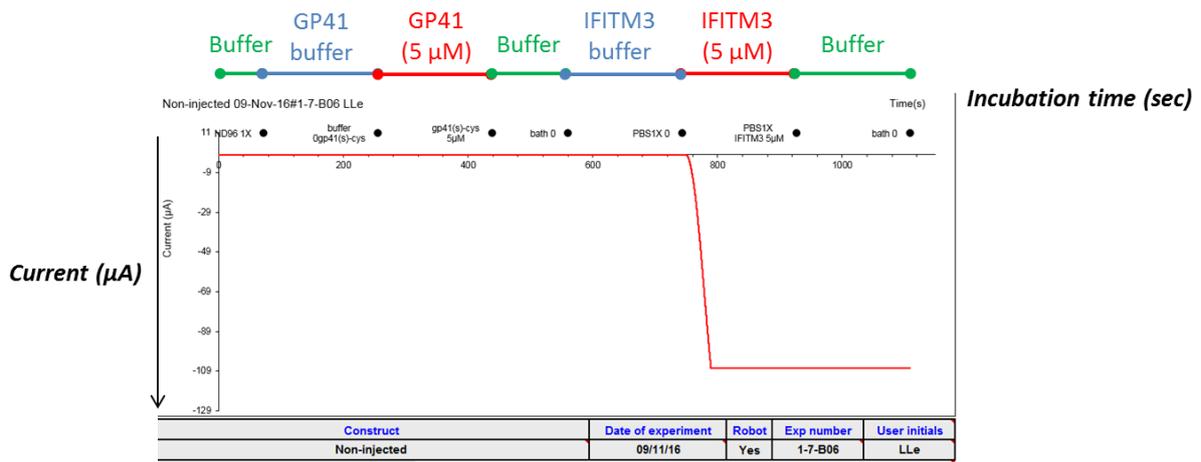


Figure 68 : Contrôle négatif avec la protéine GP41 solubilisée en Fos-Choline-12. Enregistrement TEVC montrant l'évolution de la valeur du courant en fonction du temps suite à l'incubation de l'ovocyte avec, successivement, son tampon (ND-96), le tampon de la protéine gp-41 (50 mM Hepes pH 7,1 ; 80 mM KCl, 1 mM Fos-Choline-12), la protéine gp-41 à 5 μM dans son tampon, à nouveau le tampon de l'ovocyte, le tampon d'IFITM3 (PBS pH 7,4 ; 3,5 mM Fos-Choline-12) et la protéine IFITM3 dans son tampon
(données recueillies par Laura Lemel, goupe canaux de l'IBS)

En outre, certains enregistrements TEVC ont montré que 5 μM de protéine IFITM3 généraient parfois un signal saturant l'amplificateur (courant > 107 μA) (**figure 68**) et conduisaient à la mort des ovocytes. Afin de vérifier si l'amplitude du signal est corrélée avec la concentration en IFITM3, une autre expérience TEVC a alors été menée avec une concentration en protéine IFITM3 réduite de moitié (2,5 μM) de manière à constater un éventuel effet dose-dépendant de la protéine et à établir une cinétique de formation des pores. Les enregistrements ont montré que réduire la concentration en protéine induisait également une baisse de l'amplitude du courant ainsi qu'un ralentissement de la cinétique de formation des pores comme espéré (**figure 69**).

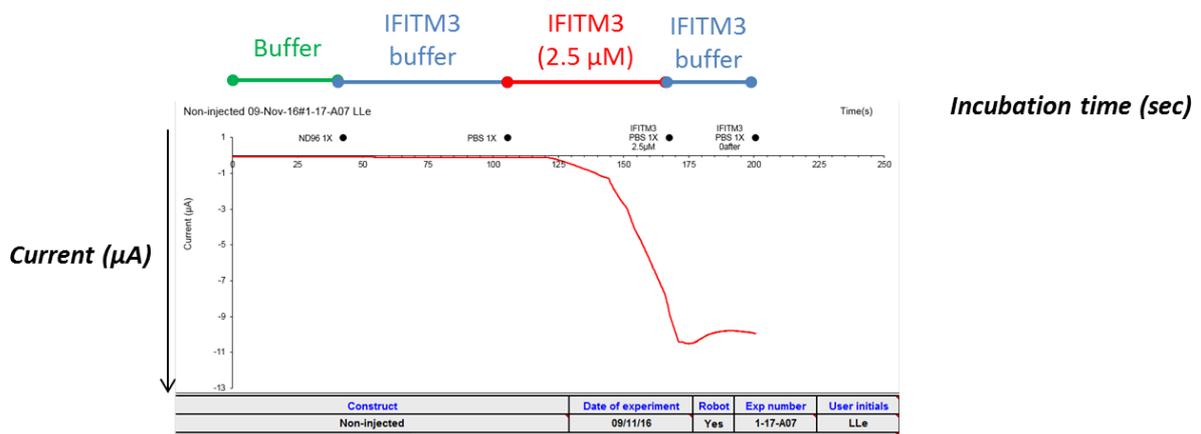


Figure 69 : L'amplitude et la cinétique du signal sont corrélées avec la concentration d'IFITM3.

Enregistrement TEVC montrant l'évolution de la valeur du courant en fonction du temps suite à l'incubation de l'ovocyte avec le tampon "physiologique" (ND-96) puis avec le tampon de la protéine IFITM3 (PBS pH 7,4 ; 3,5 mM Fos-Choline-12) et enfin avec la protéine IFITM3 à 2,5 µM dans son tampon

(données recueillies par Laura Lemel, goupe canaux de l'IBS)

Afin de s'affranchir d'artéfacts éventuels liés aux étapes de purification et de solubilisation d'IFITM3, une autre façon d'investiguer la formation de pores par la protéine IFITM3 au sein de la membrane d'ovocytes a été d'injecter l'ARNm codant pour la protéine dans ces ovocytes, de façon à ce qu'ils expriment la protéine *in situ*, et l'adressent à la membrane plasmique si celle-ci forme des pores dans ces conditions. La détection des pores a été réalisée par la méthode TEVC 24 à 48h après l'injection de l'ARNm. Cependant, aucune formation de pore n'a été mise en évidence dans les ovocytes micro-injectés avec l'ARNm codant pour IFITM3. Ce résultat négatif ne signifie pas pour autant qu'IFITM3 ne forme pas de pores au sein de la membrane plasmique des ovocytes, la première cause possible étant la trop faible expression de la protéine. En effet les résultats obtenus avec l'incubation d'IFITM3 solubilisée à 2,5 µM suggèrent qu'une réduction de la concentration de la protéine d'un facteur 2 (5 µM -> 2.5 µM) génère un signal d'une amplitude réduite d'un facteur ~10 (~90 µA -> ~9µA). D'autres causes pourraient également empêcher la protéine d'exercer son activité de formation de pores, telles que la présence d'autres domaines lipidiques intracellulaires pouvant "piéger" IFITM3 tels que les membranes internes ou les nombreux granules lipidiques présents dans le cytoplasme de l'ovocyte de Xénope. Dans ces cas, la méthode TEVC ne peut détecter les fuites ioniques, seules celles se produisant à la membrane plasmique peuvent être enregistrées.

Discussion

1. *Influence de la Fos-Choline-12 sur le repliement adopté par IFITM3*

Sur la base de résultats acquis par RMN en solution et par RPE, Ling *et al.* ont récemment proposé un modèle de structure et de topologie membranaire adopté par la protéine IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12, à savoir deux courtes hélices alpha intramembranaires N-terminales connectées via une petite boucle flexible à une longue hélice alpha transmembranaire C-terminale (**figure 7**) (Ling *et al.*, 2016). Bien que ce modèle supporte la théorie selon laquelle IFITM3 est une protéine transmembranaire de type 2 (Bailey *et al.*, 2013) et qu'il dépeint une conformation de la protéine accessible aux modifications post-traductionnelles qui lui ont été associées (Yount *et al.*, 2012), nous avons des raisons de croire que ce modèle pourrait ne pas correspondre à celui de la protéine IFITM3 dans son état fonctionnel. Nous pensons que la structure d'IFITM3 pourrait avoir été affectée en tout ou en partie par l'usage des détergents (SDS et Fos-Choline-12) ayant servi à sa solubilisation et à sa purification. La protéine IFITM3 exprimée à la membrane de cellules BL21-GOLD en a, en effet, été extraite à l'aide de 1 % de SDS, un détergent anionique dénaturant, avant d'être ensuite purifiée dans des micelles de Fos-Choline-12.

La Fos-Choline-12 que nous avons également utilisée ici pour solubiliser et purifier IFITM3 est un détergent zwitterionique constitué d'une seule chaîne aliphatique (queue hydrophobe) liée à un groupement phosphocholine (tête polaire) (**figure 12**), sa structure est donc proche de celle d'un phospholipide lui valant l'appellation de détergent « lipid-like ». Comparé à d'autres détergents zwitterioniques tels que le CHAPS, CHAPSO ou encore le LDAO connus pour être relativement agressifs, la Fos-Choline-12 était, il y a encore quelques années, considérée comme un détergent plus doux, utilisé lors d'études nécessitant que l'activité de la protéine soit préservée. En outre, sa petite taille de micelle en a fait un détergent de choix pour les études de RMN. Cependant, ces dernières années, de nouvelles études ont démontré que la Fos-Choline-12 pouvait se révéler être un détergent particulièrement agressif et dénaturant pour certaines protéines et en particulier les transporteurs mitochondriaux (Maffeo et Aksimentiev, 2009 ; Zhou et Cross, 2013 ; Zoonens *et al.*, 2013 ; Crichton *et al.*, 2015 ; Holzmann *et al.*, 2016 ; Dehez *et al.*, 2017). Un exemple frappant est celui du transporteur mitochondrial UCP2 (« UnCoupling Protein 2 »). Des expériences de dénaturation thermique (TSA, « Thermostability Shift Assay ») ont montré que lorsqu'UCP2 était extraite des membranes et solubilisée en Fos-Choline-12, aucune transition entre un état replié et dénaturé de la protéine n'était observé tandis que

lorsqu'UCP2 était extraite des membranes et solubilisée dans un détergent plus doux tel que le DDM (n-Dodecyl β -D-Maltoside), une courbe de dénaturation thermique typique d'une protéine repliée était alors obtenue (Crichton *et al.*, 2015). Ces constatations suggèrent que la Fos-Choline-12 a partiellement dénaturé UCP2 ou, tout du moins, a fortement affecté la stabilité de sa structure tertiaire. De surcroix, la reconstitution en liposomes d'UCP2, préalablement purifiée en Fos-Choline-12 (Berardi *et al.*, 2011), n'a pas permis à la protéine de recouvrer son état de repliement fonctionnel (Zoonens *et al.*, 2013). La Fos-Choline-12 a donc probablement affecté la structure d'UCP2 de manière irréversible.

L'expérience de dénaturation thermique d'IFITM3 en micelles de Fos-choline-12 n'a pas non plus permis de mettre en évidence de transition entre un état replié et un état dénaturé de la protéine (**figure 30**), renforçant les doutes déjà présents quant à un éventuel effet délétère de la Fos-Choline-12 sur la structure d'IFITM3. En outre, la Fos-Choline-12 est le seul détergent testé à avoir permis d'isoler IFITM3 sous sa forme monomérique en une seule étape, reflétant son action plus agressive. Cependant, l'étude, par dichroïsme circulaire, d'IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12 (**figure 29**) a tout de même mis en évidence l'existence de structures secondaires au sein de la protéine et notamment d'hélices alpha dont le pourcentage correspond à celui prédit (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q01628>). De même, les expériences de RMN que nous avons menées avec IFITM3 en Fos-Choline-12 ont également confirmé la présence de régions ordonnées et désordonnées au sein de la protéine (**figure 52**). IFITM3 ne serait donc pas entièrement dénaturée par la Fos-Choline-12, seule sa structure tertiaire pourrait être affectée. Ces présomptions quant au mauvais repliement adopté par IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12 m'ont encouragé à tenter de reconstituer IFITM3, préalablement purifiée en Fos-Choline-12, en liposomes et en nanodisques en espérant que la protéine recouvre sa structure native au sein de ces environnements lipidiques plus proches de ses conditions physiologiques. Ne disposant d'aucun test permettant de déterminer directement si IFITM3 est fonctionnelle ou non, j'ai alors investigué son repliement en soumettant IFITM3 reconstituée en liposomes à des expériences de dichroïsme circulaire et de dénaturation thermique, cependant, pour des raisons indéterminées, ces expériences n'ont pas permis de tirer de conclusion quant à l'état de repliement adopté par IFITM3 au sein de la membrane de ces liposomes (données non montrées). La formation de pores ou tout du moins la génération de fuites ioniques au travers de la membrane des ovocytes de xénope observée suite à l'ajout dans leur environnement extracellulaire de protéine IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12 (**figure 67**) tend, elle, à démontrer qu'une fois débarrassée de son détergent et

insérée dans une membrane, IFITM3 pourrait être fonctionnelle, si toutefois il s'agit bien d'une de ses fonctions. Un autre indice, bien que moins convaincant, est l'absence de fusion du virus de la grippe avec les liposomes liés entre eux par la protéine IFITM3 (**figure 41**). Bien que l'explication pourrait être tout autre, on ne peut totalement exclure que cette inhibition résulte de l'activité exercée par IFITM3 dans ces liposomes. Enfin, les expériences de RMN ont montré, qu'à faible pH, IFITM3 reconstituée en nanodisque devenait plus ordonnée (**figure 57**), probablement par l'établissement de nouvelles liaisons hydrogènes à l'origine d'un gain de structure secondaire et tertiaire. La structure d'IFITM3 au sein de membranes artificielles ne serait donc pas figée et serait sensible à son environnement.

2. Etats oligomériques adoptés par IFITM3 dans différents environnements

Les différentes expériences de pontage chimique menées avec IFITM3 en micelles de Fos-Choline-12, en liposomes, en nanodisques ou encore exprimée au sein de la membrane bactérienne native (**figures 26, 27, 37, 38, 65 et 66**) ont toutes abouti à la même conclusion, IFITM3 semble au minimum pouvoir s'assembler en un dimère dans ces trois conditions. En plus de la formation de dimères, celle de trimères d'IFITM3 a également été observée suite à son expression au sein de la membrane bactérienne ainsi que suite à sa reconstitution en nanodisques de grande taille (**figures 27 et 65**). Des dimères, des trimères et des tétramères d'IFITM3 voire de plus grandes espèces oligomériques encore sont quant à elles apparues suite à la reconstitution d'IFITM3 en liposomes (**figure 38**). Les résultats de l'attribution par RMN des acides aminés d'IFITM3 reconstituée en nanodisque (**figure 59**) vont également dans le sens de la dimérisation de la protéine puisque deux conformations différentes ont été observées pour certains acides aminés signifiant qu'ils appartiennent probablement à deux formes de la protéine IFITM3, une monomérique et une dimérique. Par ailleurs, si la formation de pores par IFITM3 est avérée, celle-ci ne peut résulter que de l'insertion d'IFITM3 au sein de la membrane de l'ovocyte au minimum sous la forme d'un dimère (si sa structure comporte 2 hélices transmembranaires) ou d'un tétramère (si sa structure n'en comporte qu'une seule) puisque 4 hélices transmembranaires constituent le nombre minimal d'hélices théoriquement requis pour former un pore membranaire. D'autre part, l'observation par microscopie électronique à coloration négative d'un échantillon fortement concentré en protéine IFITM3 solubilisée en micelles de Fos-Choline-12 a révélé la présence dans

l'échantillon de particules sphériques dont la taille, relativement homogène, serait supérieure à celle d'un dimère de la protéine (**figure 28**). Nous pensons par conséquent que la formation de ces gros assemblages serait dépendante d'une forte concentration en protéine et qu'il pourrait également s'agir de l'association de plusieurs dimères d'IFITM3 entre eux. Ces observations indiquent, par ailleurs, que la capacité d'IFITM3 à oligomériser n'a pas été affectée par sa solubilisation en Fos-Choline-12.

Enfin, l'hypothèse selon laquelle IFITM3 pourrait agir sous la forme d'un dimère a déjà été formulée précédemment, tout d'abord par John *et al.*, ayant identifiés les résidus phénylalanine 75 et 78 comme étant impliqués dans la dimérisation d'IFITM3 (John *et al.*, 2013) puis par Chesarino *et al.* selon lesquels deux protéines IFITM3 pourraient interagir et combiner leur action de manière à renforcer encore le mécanisme d'inhibition de la fusion virale (Chesarino *et al.*, 2017). Perreira *et al.* ont quant à eux postulé que dans la membrane plusieurs protéines IFITM3 pourraient s'associer via leur premier domaine intramembranaire IM1 pour former un pentamère et que la répétition symétrique de ces pentamères pourrait former un maillage altérant la fluidité et la courbure membranaire (Perreira *et al.*, 2013).

3. Hypothèses concernant la topologie membranaire adoptée par IFITM3 en liposomes et en nanodisques

Suite à la digestion à la trypsine d'IFITM3 reconstituée en liposomes, trois bandes principales sont apparues sur le gel SDS-PAGE, entre les marqueurs de poids moléculaire 10 et 15 kDa (**figure 35**). Ces mêmes bandes sont également apparues suite à la digestion à la trypsine d'IFITM3 reconstituée en nanodisques (**figure 64**). La comparaison de la taille des bandes apparues sur le gel SDS-PAGE avec la taille théorique des fragments générés par chaque site de clivage a permis de conclure qu'IFITM3 aurait été clivée au niveau des résidus K51, K110, R112, R114, ou K115 mais n'aurait, en revanche, pas été clivée au niveau des résidus R76 et K131 (**figure 36**). Ces deux résidus, R76 et K131, pourraient donc se situer dans des régions d'IFITM3 protégées de la protéolyse soit, parce qu'insérées dans la membrane des liposomes ou dans celle des nanodisques soit, parce que trop proches de la membrane pour être atteintes par la trypsine. Tandis que les résidus K51, K110, R112, R114 et K115 feraient partie des régions extramembranaires d'IFITM3.

Selon les derniers modèles de structure et de topologie membranaires proposés pour IFITM3 (Ling *et al.*, 2016 ; Chesarino *et al.*, 2017), la lysine (K) 131 serait située au sein d'une hélice transmembranaire (**figure 70A et B**). Elle serait donc bien protégée par la membrane de la protéolyse par la trypsine. L'arginine (R) 76 serait quant à elle située en dehors de la membrane (**figure 70A et B**), ce qui est probablement la raison pour laquelle elle a pu être attribuée par RMN (**figure 71**). Il est donc surprenant qu'elle n'ait pas été affectée par l'activité protéolytique de la trypsine. Néanmoins, étant située moins d'une dizaine de résidus avant la première hélice identifiée comme étant amphipathique (**figure 70B**), sa proximité avec la membrane l'a peut-être rendue difficile d'accès pour la trypsine (26,6 kDa). Le résidu K51 ainsi qu'un ou plusieurs des résidus suivants K110, R112, R114 et K115 se seraient eux montrés sensibles à la digestion par la trypsine. La lysine (K) 51, faisant partie de la longue région N-terminale extramembranaire d'IFITM3 (**figure 70A et B**), il était attendu qu'IFITM3 soit clivée à cet endroit. Concernant les résidus K110, R112, R114 et K115, le modèle A désignent la moitié d'entre eux comme faisant partie d'une hélice intramembranaire (**figure 70A**) tandis que le modèle B les désignent comme faisant partie d'une hélice extramembranaire (**figure 70B**). Si ces résidus ont bel et bien été clivés par la trypsine, il est peu probable qu'il soient situés au sein ou à proximité d'une hélice intramembranaire qui les protégerait ou les rendrait difficilement accessibles. Leur appartenance à une hélice extramembranaire décrite par le modèle B (**figure 70B**) est donc plus en faveur des résultats obtenus par protéolyse limitée. Cependant, si une telle hélice se trouvait en dehors de la membrane et si elle était suffisamment flexible, la plupart des résidus la constituant auraient probablement pu être détectés et attribués par RMN, ce qui ne fût pas le cas (**figure 71**). Il est donc plus probable que ces résidus fassent partie d'une courte boucle intracytoplasmique séparant les deux domaines membranaires d'IFITM3 et permettant l'accès de la trypsine à ces résidus.

En conclusion, la topologie adoptée par IFITM3 au sein de la membrane des nanodisques et des liposomes pourrait donc être différente de celle décrite, sur la base de données de RMN, pour la protéine en micelles de détergent (**figure 70A**).

A.

10 20 30 40 50 60
MKHHHHHHPM SDYDIPTTEN LYFQGAMGNQ TVQTFSPVN SGQPPNYEML **K**EEHEVAVLG
70 80 90 100 110 120
APHNPAPPTS TVIH**R**SETS VPDHV**V**W**S**LF NTLFMN**P**CC**L** GF**I**A**F**A**Y**S**V****K** **S****R****D****R****K**MVGDV
130 140 150 160
TGAQAYASTA **K**CLNIWALIL GILMTILLIV IPVLIFQAYG

B.

10 20 30 40 50 60
MKHHHHHHPM SDYDIPTTEN LYFQGAMGNQ TVQTFSPVN SGQPPNYEML **K**EEHEVAVLG
70 80 90 100 110 120
APHNPAPPTS TVIH**R**SETS VPDHV**V**W**S**LF NTLFMN**P**CC**L** GF**I**A**F**A**Y**S**V****K** **S****R****D****R****K**MVGD**V**
130 140 150 160
TGAQAYASTA **K**CLNIWALIL GILMTILLIV IPVLIFQAYG

X Hélices alpha intramembranaires

X Hélice alpha amphipathique

X Hélice alpha extramembranaire

X Hélice alpha transmembranaire

Figure 70 : Modèles de structure et de topologie membranaire proposés pour IFITM3 par **A.** Ling *et al.* et **B.** Chesarino *et al.*

10 20 30 40 50 60
MKHHHHHHPM SDYDIPTTEN LYFQGAMGNQ TVQTFSPVN SGQPPNYEML KEEHEVAVLG
70 80 90 100 110 120
APHNPAPPTS TVIH**R**SETS VPDHV**V**W**S**LF NTLFMN**P**CC**L** GF**I**A**F**A**Y**S**V****K** **S****R****D****R****K**MVGD**V**
130 140 150 160
TGAQAYASTA **K**CLNIWALIL GILMTILLIV IPVLIFQAYG

Figure 71 : Résultat de l'attribution des résidus d'IFITM3 par RMN. Les résidus attribués apparaissent en vert dans la séquence en acides aminés d'IFITM3. Les résidus non attribués appartiennent probablement aux régions membranaires d'IFITM3

4. *Nouvelle information structurale apportée par l'analyse RMN d'IFITM3 reconstituée en nanodisques*

La mesure expérimentale des NOEs ainsi que l'analyse des déplacements chimiques (**figure 60B**) ont révélé que l'extrémité N-terminale d'IFITM3, située en dehors de la membrane, contient une courte séquence 48-EMLK-52 adoptant une structure hélicoïdale. Cette structure hélicoïdale n'a encore jamais été identifiée auparavant. Il s'agit d'une partie de la séquence protéique 20-YEML-23 (ici, 47-YEML-51, la séquence d'IFITM3 étant précédée d'une étiquette 6 histidines et d'un site de clivage à la protéase TEV) décrite comme jouant le rôle de motif d'internalisation d'IFITM3, de la membrane plasmique vers les compartiments intracellulaires endolysosomaux. Ce motif interagirait avec la sous-unité $\mu 2$ du complexe AP2 impliqué dans le processus d'internalisation par endocytose clathrine-dépendante. En outre, il a été proposé que la phosphorylation de la tyrosine Y20 (ici, Y47) régulerait l'activité de ce motif en empêchant son interaction avec la sous-unité $\mu 2$ (Jia *et al.*, 2012). La découverte de la formation d'une hélice par une partie de ce motif conforte l'idée selon laquelle celui-ci pourrait bien servir de site d'interaction avec une autre protéine.

Les parties membranaires d'IFITM3 n'ayant pas été attribuées, aucune information extraite à partir des NOEs ou des déplacements chimiques n'a pu être obtenue pour ces régions. Ces mesures auraient pu servir à définir précisément la position des structures hélicoïdales au sein de ces régions.

Néanmoins, ces premières tentatives de résolution de la structure d'IFITM3 reconstituée en nanodisques constituent une bonne base pour prévoir d'autres expériences de RMN en solution qui, elles, pourraient aboutir à l'obtention de cette structure et le cas échéant, à la mise en place d'études fonctionnelles basées sur cette structure. De nouvelles expériences réalisées cette fois avec des lipides POPC deutérés sont d'ailleurs actuellement en cours au laboratoire afin d'obtenir les informations structurales manquantes.

5. *Hypothèses concernant la ou les fonctions présumées d'IFITM3*

La possibilité qu'IFITM3 puisse agir en formant des pores au sein de la membrane, telle que démontré dans ce manuscrit par des expériences TEVC réalisées sur des ovocytes de xénope (**figure 67**), n'a jusqu'à présent jamais été évoquée. Cependant, celle-ci corrobore l'hypothèse selon laquelle IFITM3 pourrait agir en empêchant l'acidification des compartiments endolysosomaux (Anafu *et al.*, 2013). En effet, la formation de pores par IFITM3 au sein de la membrane endolysosomale engendrerait un changement de la composition ionique de la lumière des endolysosomes (Bischofberger *et al.*, 2012) compromettant ainsi son acidification. Or, cette acidification est indispensable pour permettre aux virus enveloppés de fusionner avec la membrane des compartiments endolysosomaux et ainsi pénétrer dans le cytosol de la cellule cible. Ce mécanisme d'action expliquerait également pourquoi IFITM3 est active contre un large éventail de virus puisqu'elle cible un mécanisme d'entrée dans la cellule qui est commun à un grand nombre d'entre eux. Cependant, ce mode d'action potentiel ne permet pas d'expliquer l'inhibition exercée par IFITM3 contre le VIH-1 puisque ce virus fusionne à la membrane plasmique et que cette fusion est non dépendante d'un faible pH. IFITM3 pourrait alors resreindre le VIH-1 selon un autre mécanisme.

En outre, la mise en évidence de l'oligomérisation d'IFITM3 appuie la théorie selon laquelle IFITM3 pourrait former des pores membranaires puisqu'en théorie un minimum de 3 à 4 hélices transmembranaires serait requis pour former un pore. Les actinoporines (AP), par exemple, sont de petites protéines d'une taille équivalente à celle d'IFITM3 (20 kD) pouvant former un pore membranaire suite à l'insertion dans la membrane de 3 à 4 hélices alpha appartenant chacune à un monomère d'AP (Rojko *et al.*, 2016) (**figure 72**).

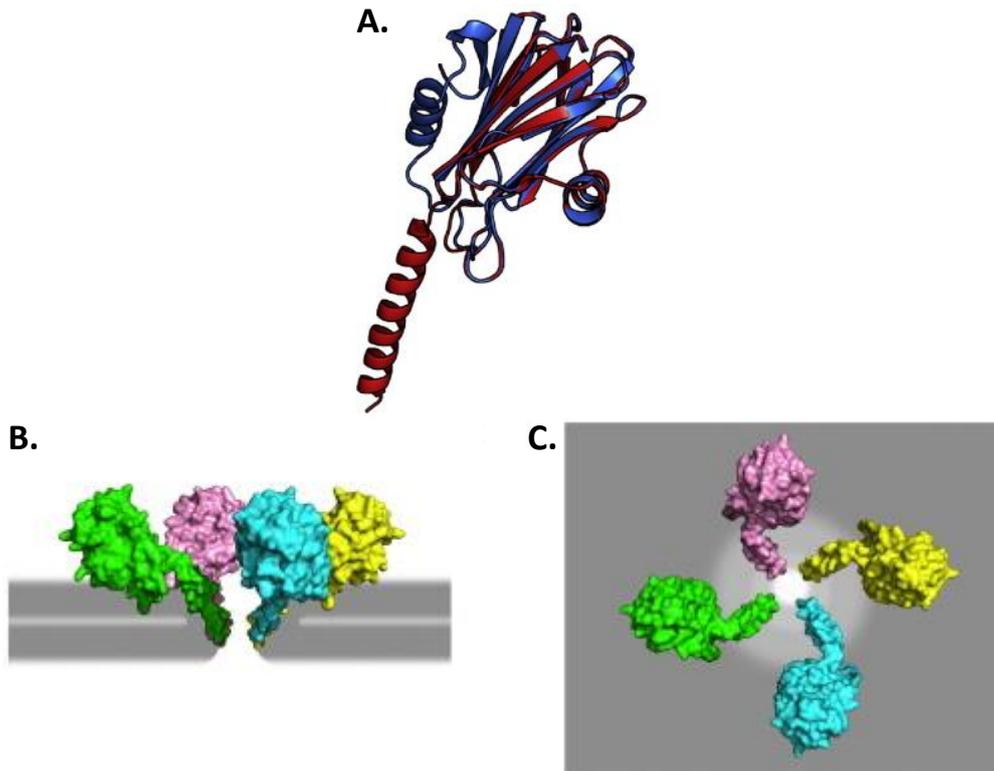


Figure 72 : **A.** Structure 3D de l'actinoporine « fragaceatoxin C » (FracC) sous forme monomérique
B et C. Modèle de pore toroïdal formé par 4 monomères d'actinoporine vu de profil (B) et de haut (C)
 (Rojko *et al.*, 2016)

Cependant, une telle formation de pores au sein de la membrane cellulaire pourrait avoir pour conséquence d'aboutir à la mort de la cellule par nécrose ou apoptose (Kennedy *et al.*, 2009 ; Knapp *et al.*, 2010 et Lin *et al.* ; 2010) or une telle issue suite à la surexpression d'IFITM3 dans la cellule n'a encore jamais été décrite jusqu'à présent dans la littérature. En conséquence, si IFITM3 forme des pores au sein de la membrane cellulaire, elle ne peut le faire qu'à une faible concentration n'entraînant pas la mort de la cellule et de façon à ce que celle-ci puisse mettre en œuvre les moyens lui permettant de restaurer l'intégrité de sa membrane. Il est particulièrement intéressant de noter qu'un de ces moyens est le retrait de ces pores de la membrane plasmique par endocytose afin de les détruire à l'issue de la voie endolysosomale, tel que proposé pour les pores formés par les cytolysines dépendantes du cholestérol (Idone *et al.*, 2008 ; Corrotte *et al.*, 2012 ; Tam *et al.*, 2010). Nous pouvons dès lors imaginer que l'activité d'IFITM3 pourrait être régulée de manière à ce qu'elle ne puisse former des pores qu'une fois internalisée dans les compartiments endolysosomaux.

La S-palmitoylation des cystéines d'IFITM3 (Yount *et al.*, 2010) pourrait quant à elle permettre la reconnaissance et la liaison de la protéine à un certain type de lipide ou de

récepteur de la membrane, IFITM3 étant en effet décrite comme étant principalement localisée au niveau des radeaux lipidiques particulièrement riches en cholestérol et en sphingomyéline ainsi qu'en récepteurs. Ces palmitoylations ne seraient par contre pas nécessaires pour permettre à la protéine de former des pores puisque la formation de ceux-ci a été mise en évidence à partir d'une protéine n'ayant pas été palmitoylée puisqu'exprimée en bactérie. Elles ne pourraient intervenir alors que dans la localisation membranaire d'IFITM3. L'hélice transmembranaire d'IFITM3 participerait elle à la formation du pore résultant de l'oligomérisation de la protéine. Par ailleurs, en formant des pores, IFITM3 pourrait également être à l'origine des mêmes effets sur la membrane que ceux qui lui ont été attribués tels que l'altération de sa fluidité et la modification de sa courbure (Ros et Garcia-Saez, 2015).

Cependant, ce modèle impliquerait que la deuxième hélice transmembranaire d'IFITM3 soit amphipathique. Or, seule son premier domaine membranaire a été décrit comme pouvant contenir une hélice amphipathique (Chesarino *et al.*, 2017). Il convient également de garder à l'esprit que, bien que les résultats des expériences TEVC plaident en faveur d'une véritable formation de pores par IFITM3 au sein de la membrane d'ovocytes de xénope, on ne peut totalement exclure l'hypothèse selon laquelle cette fuite massive d'ions au travers de la membrane puisse également résulter d'une déstabilisation importante de celle-ci par IFITM3 et/ou son détergent sans formation de pores au travers de la membrane.

En outre, aucune formation de pores par IFITM3 au travers de la membrane des liposomes n'a été observée par microscopie électronique à coloration négative. Il se peut que la taille des pores formés par IFITM3 soit trop petite pour être visualisée ou bien que la présence d'un certain type de lipide ou d'un récepteur au sein de la membrane conditionne la formation de ces pores. Le diamètre du pore formé par 4 hélices alpha d'AP n'est en effet que de 2 nm et la formation de ce pore nécessite la reconnaissance préalable par l'AP de la sphingomyéline, agissant comme récepteur dans la membrane cellulaire (Rojko *et al.*, 2016).

Seuls de potentiels effets d'IFITM3 sur la courbure de la membrane des liposomes ont été observés par microscopie électronique à coloration négative de même qu'une accumulation de protéine à l'interface de plusieurs liposomes semblant les lier entre eux (**figures 39 et 40**). La présence d'IFITM3 au sein de ces amas de liposomes a été confirmée par l'observation de protéoliposomes par microscopie de fluorescence (**figure 46A et B**). Quant à un éventuel effet d'IFITM3 sur la membrane des liposomes, les liposomes ainsi liés

entre eux par la protéine ont montré adopter une forme plus angulaire, voire rectangulaire pour certains, et non une forme sphérique normalement adoptée par les liposomes. L'accumulation de protéine pourrait, elle, correspondre à un excès de protéine IFITM3 n'ayant pas pu s'insérer dans la membrane des liposomes déjà saturée et ayant trouvé refuge à la confluence de plusieurs liposomes sous la forme d'agrégats. Un ratio massique d'une protéine IFITM3 pour 10 lipides POPC ou POPS a en effet été utilisé pour former ces protéoliposomes, il n'est donc pas étonnant que toute la protéine n'ait pu s'y insérer. De plus, l'observation en microscopie de fluorescence de dépôts de lipides associés à de la protéine IFITM3 sur la lame du microscope (**figure 46D**) pourrait résulter de la destruction des liposomes suite à une insertion trop importante de protéine au sein de leur membrane. Cette accumulation de protéine à la confluence de plusieurs liposomes pourrait également résulter d'une mauvaise insertion de la protéine au sein de la membrane liposomale. Il est important de rappeler que la protéine IFITM3 utilisée pour ces expériences a été exprimée en bactérie, organisme au sein duquel la plupart des modifications post-traductionnelles ne peuvent avoir lieu. IFITM3 n'a donc pas ici fait l'objet des palmitoylations avancées comme pouvant servir d'ancrage de la protéine à la membrane. De plus, les lipides choisis pour sa reconstitution en liposomes ne lui ont peut-être pas permis de recouvrer sa structure native. Il est par conséquent probable que le premier domaine membranaire d'IFITM3 ne se soit pas inséré comme il se doit au sein de la membrane liposomale et se soit alors associé à celui d'une autre protéine IFITM3 située à proximité ou présente dans la membrane d'un liposome adjacent formant dès lors ces gros assemblages à la confluence de plusieurs liposomes. Une autre explication possible est que parmi les deux régions membranaires d'IFITM3, l'une se soit insérée au sein de la membrane d'un liposome et l'autre se soit insérée au sein de la membrane d'un autre liposome adjacent, formant dès lors un pontage entre ces deux liposomes.

Néanmoins, les expériences de protéolyse limitée menées avec ces protéoliposomes (**figure 35**) ont démontré que certaines parties de la protéine sont protégées de la protéolyse et que ces parties pourraient correspondre aux régions de la protéine prédites comme étant membranaires. Une proportion importante de protéine IFITM3 pourrait donc s'être bien insérée au sein de la membrane des liposomes. En outre, la formation de différentes formes oligomériques d'IFITM3 au sein de ces protéoliposomes a été mise en évidence par des expériences de pontage chimique (**figure 38**) signifiant que toute la protéine ne peut pas y être présente que sous une forme agrégée. Enfin, l'absence de fusion du virus de la grippe avec les

liposomes regroupés autour d'amas de protéine IFITM3 (**figure 41**) suggère que la présence d'IFITM3 au sein de la membrane de ces liposomes, correctement reconstituée ou non, pourrait être défavorable à la fusion du virus de la grippe avec ces liposomes. En effet, en oligomérisant au sein de la membrane liposomale, IFITM3 pourrait l'avoir destabilisée et pourrait avoir modifié sa courbure, tel qu'observé sur les images de microscopie électronique à coloration négative de protéoliposomes adoptant une forme quasiment rectangulaire, inhibant dès lors le processus de fusion entre les membranes virale et liposomale. Nos observations sont donc plutôt en faveur de l'hypothèse selon laquelle IFITM3 exercerait une action antivirale de type mécanique, dépendante de son oligomérisation, et influant sur la fluidité et la courbure membranaire, rendant ainsi le processus de fusion virale énergétiquement défavorable (John *et al.*, 2013). Les fuites ioniques engendrées par IFITM3 au travers de la membrane d'ovocytes de xénope pourraient également résulter d'une destabilisation membranaire ou encore refléter l'existence d'un autre mode d'action d'IFITM3, celui de former des pores au sein des membranes des compartiments endolysosomiaux afin de modifier leur composition ionique et ainsi rendre ces compartiments hostiles à la fusion virale. On peut alors imaginer que le mécanisme d'action exercé par IFITM3 pourrait différer en fonction du type cellulaire dans lequel elle se trouve, de sa localisation au sein de la cellule et du type de virus ciblé.

Références

- 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis, G.R., Auton, A., Brooks, L.D., DePristo, M.A., Durbin, R.M., Handsaker, R.E., Kang, H.M., Marth, G.T., and McVean, G.A. (2012). An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 491, 56–65.
- Alber, D., and Staeheli, P. (1996). Partial inhibition of vesicular stomatitis virus by the interferon-induced human 9-27 protein. *J. Interferon Cytokine Res.* 16, 375–380.
- Amini-Bavil-Olyaei, S., Choi, Y.J., Lee, J.H., Shi, M., Huang, I.-C., Farzan, M., and Jung, J.U. (2013). The antiviral effector IFITM3 disrupts intracellular cholesterol homeostasis to block viral entry. *Cell Host Microbe* 13, 452–464.
- Anafu, A.A., Bowen, C.H., Chin, C.R., Brass, A.L., and Holm, G.H. (2013). Interferon-inducible Transmembrane Protein 3 (IFITM3) Restricts Reovirus Cell Entry. *J Biol Chem* 288, 17261–17271.
- Andrejeva, J., Childs, K.S., Young, D.F., Carlos, T.S., Stock, N., Goodbourn, S., and Randall, R.E. (2004). The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 17264–17269.
- Arikawa, J., Takashima, I., and Hashimoto, N. (1985). Cell fusion by haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) viruses and its application for titration of virus infectivity and neutralizing antibody. *Arch. Virol.* 86, 303–313.
- Bailey, C.C., Huang, I.-C., Kam, C., and Farzan, M. (2012). Ifitm3 Limits the Severity of Acute Influenza in Mice. *PLoS Pathog* 8.
- Bailey, C.C., Kondur, H.R., Huang, I.-C., and Farzan, M. (2013). Interferon-induced Transmembrane Protein 3 Is a Type II Transmembrane Protein. *J Biol Chem* 288, 32184–32193.
- Bailey, C.C., Zhong, G., Huang, I.-C., and Farzan, M. (2014). IFITM-Family Proteins: The Cell's First Line of Antiviral Defense. *Annu Rev Virol* 1, 261–283.
- Bayburt, T.H., and Sligar, S.G. (2010). Membrane protein assembly into Nanodiscs. *FEBS Lett.* 584, 1721–1727.

- Berardi, M.J., Shih, W.M., Harrison, S.C., and Chou, J.J. (2011). Mitochondrial uncoupling protein 2 structure determined by NMR molecular fragment searching. *Nature* 476, 109–113.
- Bertrand, P., Côté, M., Zheng, Y.-M., Albritton, L.M., and Liu, S.-L. (2008). Jaagsiekte Sheep Retrovirus Utilizes a pH-Dependent Endocytosis Pathway for Entry. *J Virol* 82, 2555–2559.
- Beutler, B. (2004). Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430, 257–263.
- Bischofberger, M., Iacovache, I., and van der Goot, F.G. (2012). Pathogenic pore-forming proteins: function and host response. *Cell Host Microbe* 12, 266–275.
- Bossert, B., and Conzelmann, K.-K. (2002). Respiratory syncytial virus (RSV) nonstructural (NS) proteins as host range determinants: a chimeric bovine RSV with NS genes from human RSV is attenuated in interferon-competent bovine cells. *J. Virol.* 76, 4287–4293.
- Bowie, A.G., and Haga, I.R. (2005). The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Molecular Immunology* 42, 859–867.
- Bradbury, L.E., Kansas, G.S., Levy, S., Evans, R.L., and Tedder, T.F. (1992). The CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules. *J. Immunol.* 149, 2841–2850.
- Brass, A.L., Huang, I.-C., Benita, Y., John, S.P., Krishnan, M.N., Feeley, E.M., Ryan, B., Weyer, J.L., van der Weyden, L., Fikrig, E., et al. (2009). IFITM Proteins Mediate the Innate Immune Response to Influenza A H1N1 Virus, West Nile Virus and Dengue Virus. *Cell* 139, 1243–1254.
- Carette, J.E., Raaben, M., Wong, A.C., Herbert, A.S., Obernosterer, G., Mulherkar, N., Kuehne, A.I., Kranzusch, P.J., Griffin, A.M., Ruthel, G., et al. (2011). Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature* 477, 340–343.
- de Chaldée, M., Brochier, C., Van de Vel, A., Caudy, N., Luthi-Carter, R., Gaillard, M.C., and Elalouf, J.M. (2006). Capucin: a novel striatal marker down-regulated in rodent models of Huntington disease. *Genomics* 87, 200–207.
- Chan, Y.K., Huang, I.-C., and Farzan, M. (2012). IFITM Proteins Restrict Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection. *PLoS One* 7.

- Chandran, K., and Nibert, M.L. (1998). Protease Cleavage of Reovirus Capsid Protein $\mu 1/\mu 1C$ Is Blocked by Alkyl Sulfate Detergents, Yielding a New Type of Infectious Subvirion Particle. *J Virol* 72, 467–475.
- Chandran, K., Farsetta, D.L., and Nibert, M.L. (2002). Strategy for Nonenveloped Virus Entry: a Hydrophobic Conformer of the Reovirus Membrane Penetration Protein $\mu 1$ Mediates Membrane Disruption. *J Virol* 76, 9920–9933.
- Chandran, K., Sullivan, N.J., Felbor, U., Whelan, S.P., and Cunningham, J.M. (2005). Endosomal Proteolysis of the Ebola Virus Glycoprotein Is Necessary for Infection. *Science* 308, 1643–1645.
- Chen, W.J., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1990). NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 265, 3116–3123.
- Chen, Y.-C., Wang, S.-Y., and King, C.-C. (1999). Bacterial Lipopolysaccharide Inhibits Dengue Virus Infection of Primary Human Monocytes/Macrophages by Blockade of Virus Entry via a CD14-Dependent Mechanism. *J Virol* 73, 2650–2657.
- Chen, Y.X., Welte, K., Gebhard, D.H., and Evans, R.L. (1984). Induction of T cell aggregation by antibody to a 16kd human leukocyte surface antigen. *J. Immunol.* 133, 2496–2501.
- Chesarino, N.M., Compton, A.A., McMichael, T.M., Kenney, A.D., Zhang, L., Soewarna, V., Davis, M., Schwartz, O., and Yount, J.S. (2017). IFITM3 requires an amphipathic helix for antiviral activity. *EMBO Rep.* 18, 1740–1751.
- Cho, T.-J., Lee, K.-E., Lee, S.-K., Song, S.J., Kim, K.J., Jeon, D., Lee, G., Kim, H.-N., Lee, H.R., Eom, H.-H., et al. (2012). A Single Recurrent Mutation in the 5'-UTR of IFITM5 Causes Osteogenesis Imperfecta Type V. *Am J Hum Genet* 91, 343–348.
- Compton, A.A., Bruel, T., Porrot, F., Mallet, A., Sachse, M., Euvrard, M., Liang, C., Casartelli, N., and Schwartz, O. (2014). IFITM proteins incorporated into HIV-1 virions impair viral fusion and spread. *Cell Host Microbe* 16, 736–747.

- Compton, A.A., Roy, N., Porrot, F., Billet, A., Casartelli, N., Yount, J.S., Liang, C., and Schwartz, O. (2016). Natural mutations in IFITM3 modulate post-translational regulation and toggle antiviral specificity. *EMBO Rep.* *17*, 1657–1671.
- Corrotte, M., Fernandes, M.C., Tam, C., and Andrews, N.W. (2012). Toxin pores endocytosed during plasma membrane repair traffic into the lumen of MVBs for degradation. *Traffic* *13*, 483–494.
- Côté, M., Zheng, Y.-M., and Liu, S.-L. (2009). Receptor Binding and Low pH Coactivate Oncogenic Retrovirus Envelope-Mediated Fusion. *J Virol* *83*, 11447–11455.
- Côté, M., Misasi, J., Ren, T., Bruchez, A., Lee, K., Filone, C.M., Hensley, L., Li, Q., Ory, D., Chandran, K., et al. (2011). Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for ebolavirus infection. *Nature* *477*, 344–348.
- Crichton, P.G., Lee, Y., Ruprecht, J.J., Cerson, E., Thangaratnarajah, C., King, M.S., and Kunji, E.R.S. (2015). Trends in thermostability provide information on the nature of substrate, inhibitor, and lipid interactions with mitochondrial carriers. *J. Biol. Chem.* *290*, 8206–8217.
- Danthi, P., Holm, G.H., Stehle, T., and Dermody, T.S. (2013). REOVIRUS RECEPTORS, CELL ENTRY, AND PROAPOPTOTIC SIGNALING. *Adv Exp Med Biol* *790*, 42–71.
- Deblandre, G.A., Marinx, O.P., Evans, S.S., Majjaj, S., Leo, O., Caput, D., Huez, G.A., and Wathelet, M.G. (1995). Expression cloning of an interferon-inducible 17-kDa membrane protein implicated in the control of cell growth. *J. Biol. Chem.* *270*, 23860–23866.
- Dehez, F., Schanda, P., King, M.S., Kunji, E.R.S., and Chipot, C. (2017). Mitochondrial ADP/ATP Carrier in Dodecylphosphocholine Binds Cardiolipins with Non-native Affinity. *Biophys. J.*
- Denisov, I.G., Grinkova, Y.V., Lazarides, A.A., and Sligar, S.G. (2004). Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer Nanodiscs with controlled size. *J. Am. Chem. Soc.* *126*, 3477–3487.
- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R., and Silverman, R.H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 15623–15628.

Ebert, D.H., Deussing, J., Peters, C., and Dermody, T.S. (2002). Cathepsin L and cathepsin B mediate reovirus disassembly in murine fibroblast cells. *J. Biol. Chem.* *277*, 24609–24617.

Englander, S.W. (2006). Hydrogen exchange and mass spectrometry: A historical perspective. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* *17*, 1481–1489.

Evans, S.S., Lee, D.B., Han, T., Tomasi, T.B., and Evans, R.L. (1990). Monoclonal antibody to the interferon-inducible protein Leu-13 triggers aggregation and inhibits proliferation of leukemic B cells. *Blood* *76*, 2583–2593.

Everitt, A.R., Clare, S., Pertel, T., John, S.P., Wash, R.S., Smith, S.E., Chin, C.R., Feeley, E.M., Sims, J.S., Adams, D.J., et al. (2012). IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza. *Nature* *484*, 519–523.

Feeley, E.M., Sims, J.S., John, S.P., Chin, C.R., Pertel, T., Chen, L.-M., Gaiha, G.D., Ryan, B.J., Donis, R.O., Elledge, S.J., et al. (2011). IFITM3 Inhibits Influenza A Virus Infection by Preventing Cytosolic Entry. *PLoS Pathog* *7*.

Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S., and Rubinstein, M. (2013). LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 7306–7311.

Gaio, V., Nunes, B., Pechirra, P., Conde, P., Guiomar, R., Dias, C.M., and Barreto, M. (2016). Hospitalization Risk Due to Respiratory Illness Associated with Genetic Variation at IFITM3 in Patients with Influenza A(H1N1)pdm09 Infection: A Case-Control Study. *PLoS One* *11*.

Geertsma, E.R., Nik Mahmood, N. a. B., Schuurman-Wolters, G.K., and Poolman, B. (2008). Membrane reconstitution of ABC transporters and assays of translocator function. *Nat Protoc* *3*, 256–266.

Hach, J.C., McMichael, T., Chesarino, N.M., and Yount, J.S. (2013). Palmitoylation on Conserved and Nonconserved Cysteines of Murine IFITM1 Regulates Its Stability and Anti-Influenza A Virus Activity. *J Virol* *87*, 9923–9927.

Hagn, F., Etzkorn, M., Raschle, T., and Wagner, G. (2013). Optimized phospholipid bilayer nanodiscs facilitate high-resolution structure determination of membrane proteins. *J. Am. Chem. Soc.* *135*, 1919–1925.

- Haller, O., Kochs, G., and Weber, F. (2006). The interferon response circuit: Induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* 344, 119–130.
- Hanagata, N., Li, X., Morita, H., Takemura, T., Li, J., and Minowa, T. (2011). Characterization of the osteoblast-specific transmembrane protein IFITM5 and analysis of IFITM5-deficient mice. *J. Bone Miner. Metab.* 29, 279–290.
- Harmon, B., Schudel, B.R., Maar, D., Kozina, C., Ikegami, T., Tseng, C.-T.K., and Negrete, O.A. (2012). Rift Valley Fever Virus Strain MP-12 Enters Mammalian Host Cells via Caveola-Mediated Endocytosis. *J Virol* 86, 12954–12970.
- Hickford, D., Frankenberg, S., Shaw, G., and Renfree, M.B. (2012). Evolution of vertebrate interferon inducible transmembrane proteins. *BMC Genomics* 13, 155.
- Hollidge, B.S., Nedelsky, N.B., Salzano, M.-V., Fraser, J.W., González-Scarano, F., and Soldan, S.S. (2012). Orthobunyavirus Entry into Neurons and Other Mammalian Cells Occurs via Clathrin-Mediated Endocytosis and Requires Trafficking into Early Endosomes. *J Virol* 86, 7988–8001.
- Holzmann, N., Chipot, C., Penin, F., and Dehez, F. (2016). Assessing the physiological relevance of alternate architectures of the p7 protein of hepatitis C virus in different environments. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 24, 4920–4927.
- Huang, I.-C., Bosch, B.J., Li, F., Li, W., Lee, K.H., Ghiran, S., Vasilieva, N., Dermody, T.S., Harrison, S.C., Dormitzer, P.R., et al. (2006). SARS coronavirus, but not human coronavirus NL63, utilizes cathepsin L to infect ACE2-expressing cells. *J. Biol. Chem.* 281, 3198–3203.
- Huang, I.-C., Bailey, C.C., Weyer, J.L., Radoshitzky, S.R., Becker, M.M., Chiang, J.J., Brass, A.L., Ahmed, A.A., Chi, X., Dong, L., et al. (2011). Distinct Patterns of IFITM-Mediated Restriction of Filoviruses, SARS Coronavirus, and Influenza A Virus. *PLoS Pathog* 7.
- Hunt, C.L., Lennemann, N.J., and Maury, W. (2012). Filovirus Entry: A Novelty in the Viral Fusion World. *Viruses* 4, 258–275.
- Idone, V., Tam, C., Goss, J.W., Toomre, D., Pypaert, M., and Andrews, N.W. (2008). Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺-dependent endocytosis. *J. Cell Biol.* 180, 905–914.

- Inoki, Y., Hakamata, Y., Hamamoto, T., Kinouchi, T., Yamazaki, S., Kagawa, Y., and Endo, H. (2000). Proteoliposomes colocalized with endogenous mitochondria in mouse fertilized egg. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 183–191.
- Inoue, Y., Tanaka, N., Tanaka, Y., Inoue, S., Morita, K., Zhuang, M., Hattori, T., and Sugamura, K. (2007). Clathrin-Dependent Entry of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus into Target Cells Expressing ACE2 with the Cytoplasmic Tail Deleted. *J Virol* 81, 8722–8729.
- Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5, 987–995.
- Jia, R., Pan, Q., Ding, S., Rong, L., Liu, S.-L., Geng, Y., Qiao, W., and Liang, C. (2012). The N-Terminal Region of IFITM3 Modulates Its Antiviral Activity by Regulating IFITM3 Cellular Localization. *J Virol* 86, 13697–13707.
- Jiang, D., Weidner, J.M., Qing, M., Pan, X.-B., Guo, H., Xu, C., Zhang, X., Birk, A., Chang, J., Shi, P.-Y., et al. (2010). Identification of Five Interferon-Induced Cellular Proteins That Inhibit West Nile Virus and Dengue Virus Infections. *J Virol* 84, 8332–8341.
- Jin, M., Park, J., Lee, S., Park, B., Shin, J., Song, K.-J., Ahn, T.-I., Hwang, S.-Y., Ahn, B.-Y., and Ahn, K. (2002). Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Virology* 294, 60–69.
- John, S.P., Chin, C.R., Perreira, J.M., Feeley, E.M., Aker, A.M., Savidis, G., Smith, S.E., Elia, A.E.H., Everitt, A.R., Vora, M., et al. (2013). The CD225 Domain of IFITM3 Is Required for both IFITM Protein Association and Inhibition of Influenza A Virus and Dengue Virus Replication. *J Virol* 87, 7837–7852.
- Kennedy, C.L., Smith, D.J., Lyras, D., Chakravorty, A., and Rood, J.I. (2009). Programmed cellular necrosis mediated by the pore-forming alpha-toxin from *Clostridium septicum*. *PLoS Pathog.* 5, e1000516.
- Knapp, O., Maier, E., Mkaddem, S.B., Benz, R., Bens, M., Chenal, A., Geny, B., Vandewalle, A., and Popoff, M.R. (2010). *Clostridium septicum* alpha-toxin forms pores and induces rapid cell necrosis. *Toxicon* 55, 61–72.

- Krug, R.M., Yuan, W., Noah, D.L., and Latham, A.G. (2003). Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. *Virology* 309, 181–189.
- Lange, U.C., Adams, D.J., Lee, C., Barton, S., Schneider, R., Bradley, A., and Surani, M.A. (2008). Normal Germ Line Establishment in Mice Carrying a Deletion of the Ifitm/Fragilis Gene Family Cluster. *Mol Cell Biol* 28, 4688–4696.
- Lee, H.-Y., Huang, Y., Bruneau, N., Roll, P., Roberson, E.D.O., Hermann, M., Quinn, E., Maas, J., Edwards, R., Ashizawa, T., et al. (2012). Mutations in the gene PRRT2 cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia with infantile convulsions. *Cell Rep* 1, 2–12.
- Leung, H.S.Y., Li, O.T.W., Chan, R.W.Y., Chan, M.C.W., Nicholls, J.M., and Poon, L.L.M. (2012). Entry of Influenza A Virus with a α 2,6-Linked Sialic Acid Binding Preference Requires Host Fibronectin. *J Virol* 86, 10704–10713.
- Lewin, A.R., Reid, L.E., McMahon, M., Stark, G.R., and Kerr, I.M. (1991). Molecular analysis of a human interferon-inducible gene family. *Eur. J. Biochem.* 199, 417–423.
- Li, K., Markosyan, R.M., Zheng, Y.-M., Golfetto, O., Bungart, B., Li, M., Ding, S., He, Y., Liang, C., Lee, J.C., et al. (2013). IFITM Proteins Restrict Viral Membrane Hemifusion. *PLoS Pathog* 9.
- Li, W., Moore, M.J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S.K., Berne, M.A., Somasundaran, M., Sullivan, J.L., Luzuriaga, K., Greenough, T.C., et al. (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426, 450–454.
- Lin, C.-F., Chen, C.-L., Huang, W.-C., Cheng, Y.-L., Hsieh, C.-Y., Wang, C.-Y., and Hong, M.-Y. (2010). Different types of cell death induced by enterotoxins. *Toxins (Basel)* 2, 2158–2176.
- Lin, T.-Y., Chin, C.R., Everitt, A.R., Clare, S., Perreira, J.M., Savidis, G., Aker, A.M., John, S.P., Sarlah, D., Carreira, E.M., et al. (2013). Amphotericin B Increases Influenza A Virus Infection by Preventing IFITM3-Mediated Restriction. *Cell Rep* 5, 895–908.
- Ling, S., Zhang, C., Wang, W., Cai, X., Yu, L., Wu, F., Zhang, L., and Tian, C. (2016). Combined approaches of EPR and NMR illustrate only one transmembrane helix in the human IFITM3. *Scientific Reports* 6, srep24029.

López-Rodríguez, M., Herrera-Ramos, E., Solé-Violán, J., Ruíz-Hernández, J.J., Borderías, L., Horcajada, J.P., Lerma-Chippirraz, E., Rajas, O., Briones, M., Pérez-González, M.C., et al. (2016). IFITM3 and severe influenza virus infection. No evidence of genetic association. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *35*, 1811–1817.

Lu, J., Pan, Q., Rong, L., Liu, S.-L., and Liang, C. (2011). The IFITM Proteins Inhibit HIV-1 Infection. *J Virol* *85*, 2126–2137.

Lu, Y., Qian, X.Y., and Krug, R.M. (1994). The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing. *Genes Dev.* *8*, 1817–1828.

de la Luna, S., Fortes, P., Beloso, A., and Ortín, J. (1995). Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J. Virol.* *69*, 2427–2433.

Maffeo, C., and Aksimentiev, A. (2009). Structure, Dynamics, and Ion Conductance of the Phospholamban Pentamer. *Biophysical Journal* *96*, 4853–4865.

Matsumoto, A.K., Martin, D.R., Carter, R.H., Klickstein, L.B., Ahearn, J.M., and Fearon, D.T. (1993a). Functional dissection of the CD21/CD19/TAPA-1/Leu-13 complex of B lymphocytes. *J. Exp. Med.* *178*, 1407–1417.

Matsumoto, A.K., Martin, D.R., Carter, R.H., Klickstein, L.B., Ahearn, J.M., and Fearon, D.T. (1993b). Functional dissection of the CD21/CD19/TAPA-1/Leu-13 complex of B lymphocytes. *J. Exp. Med.* *178*, 1407–1417.

McCaughey, C., Shi, X., Elliot, R.M., Wyatt, D.E., O’Neill, H.J., and Coyle, P.V. (1999). Low pH-induced cytopathic effect--a survey of seven hantavirus strains. *J. Virol. Methods* *81*, 193–197.

McNulty, S., Flint, M., Nichol, S.T., and Spiropoulou, C.F. (2013). Host mTORC1 Signaling Regulates Andes Virus Replication. *J Virol* *87*, 912–922.

Meertens, L., Labeau, A., Dejarnac, O., Cipriani, S., Sinigaglia, L., Bonnet-Madin, L., Le Charpentier, T., Hafirassou, M.L., Zamborlini, A., Cao-Lormeau, V.-M., et al. (2017). Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep* *18*, 324–333.

- Mills, T.C., Rautanen, A., Elliott, K.S., Parks, T., Naranbhai, V., Ieven, M.M., Butler, C.C., Little, P., Verheij, T., Garrard, C.S., et al. (2014). IFITM3 and Susceptibility to Respiratory Viral Infections in the Community. *J Infect Dis* 209, 1028–1031.
- Moffatt, P., Gaumond, M.-H., Salois, P., Sellin, K., Bessette, M.-C., Godin, E., de Oliveira, P.T., Atkins, G.J., Nanci, A., and Thomas, G. (2008). Bril: a novel bone-specific modulator of mineralization. *J. Bone Miner. Res.* 23, 1497–1508.
- Monel, B., Compton, A.A., Bruel, T., Amraoui, S., Burlaud-Gaillard, J., Roy, N., Guivel-Benhassine, F., Porrot, F., Génin, P., Meertens, L., et al. (2017). Zika virus induces massive cytoplasmic vacuolization and paraptosis-like death in infected cells. *EMBO J.* 36, 1653–1668.
- Mudhasani, R., Tran, J.P., Retterer, C., Radoshitzky, S.R., Kota, K.P., Altamura, L.A., Smith, J.M., Packard, B.Z., Kuhn, J.H., Costantino, J., et al. (2013). IFITM-2 and IFITM-3 but Not IFITM-1 Restrict Rift Valley Fever Virus. *J Virol* 87, 8451–8464.
- Munier, S., Moisy, D., Marc, D., and Naffakh, N. (2010). Transmission inter-espèces, adaptation à l’homme et pathogénicité des virus influenza d’origine animale. </data/revues/03698114/v58i2/S0369811410000337/>.
- Narayana, S.K., Helbig, K.J., McCartney, E.M., Eyre, N.S., Bull, R.A., Eltahla, A., Lloyd, A.R., and Beard, M.R. (2015). The Interferon-induced Transmembrane Proteins, IFITM1, IFITM2, and IFITM3 Inhibit Hepatitis C Virus Entry. *J. Biol. Chem.* 290, 25946–25959.
- Pan, Y., Yang, P., Dong, T., Zhang, Y., Shi, W., Peng, X., Cui, S., Zhang, D., Lu, G., Liu, Y., et al. (2017). IFITM3 Rs12252-C Variant Increases Potential Risk for Severe Influenza Virus Infection in Chinese Population. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 294.
- Parisien, J.-P., Lau, J.F., and Horvath, C.M. (2002). STAT2 acts as a host range determinant for species-specific paramyxovirus interferon antagonism and simian virus 5 replication. *J. Virol.* 76, 6435–6441.
- Park, Y.W., and Katze, M.G. (1995). Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation. *J. Biol. Chem.* 270, 28433–28439.

Pasqual, G., Rojek, J.M., Masin, M., Chatton, J.-Y., and Kunz, S. (2011). Old World Arenaviruses Enter the Host Cell via the Multivesicular Body and Depend on the Endosomal Sorting Complex Required for Transport. *PLoS Pathog* 7.

Perreira, J.M., Chin, C.R., Feeley, E.M., and Brass, A.L. (2013). IFITMs restrict the replication of multiple pathogenic viruses. *J. Mol. Biol.* 425, 4937–4955.

Rojko, N., Dalla Serra, M., Maček, P., and Anderluh, G. (2016). Pore formation by actinoporins, cytolysins from sea anemones. *Biochim. Biophys. Acta* 1858, 446–456.

Ros, U., and García-Sáez, A.J. (2015). More Than a Pore: The Interplay of Pore-Forming Proteins and Lipid Membranes. *J. Membr. Biol.* 248, 545–561.

Sällman Almén, M., Bringeland, N., Fredriksson, R., and Schiöth, H.B. (2012). The dispanins: a novel gene family of ancient origin that contains 14 human members. *PLoS ONE* 7, e31961.

Samuel, C.E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 778–809, table of contents.

Savidis, G., Perreira, J.M., Portmann, J.M., Meraner, P., Guo, Z., Green, S., and Brass, A.L. (2016). The IFITMs Inhibit Zika Virus Replication. *Cell Rep* 15, 2323–2330.

Schoggins, J.W., and Rice, C.M. (2011). Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Current Opinion in Virology* 1, 519.

Schoggins, J.W., Wilson, S.J., Panis, M., Murphy, M.Y., Jones, C.T., Bieniasz, P., and Rice, C.M. (2011). A diverse array of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 472, 481–485.

Semler, O., Garbes, L., Keupp, K., Swan, D., Zimmermann, K., Becker, J., Iden, S., Wirth, B., Eysel, P., Koerber, F., et al. (2012). A Mutation in the 5'-UTR of IFITM5 Creates an In-Frame Start Codon and Causes Autosomal-Dominant Osteogenesis Imperfecta Type V with Hyperplastic Callus. *Am J Hum Genet* 91, 349–357.

Shan, Z., Han, Q., Nie, J., Cao, X., Chen, Z., Yin, S., Gao, Y., Lin, F., Zhou, X., Xu, K., et al. (2013). Negative Regulation of Interferon-induced Transmembrane Protein 3 by SET7-mediated Lysine Monomethylation. *J Biol Chem* 288, 35093–35103.

- Shi, G., Schwartz, O., and Compton, A.A. (2017). More than meets the I: the diverse antiviral and cellular functions of interferon-induced transmembrane proteins. *Retrovirology* 14, 53.
- Siegrist, F., Ebeling, M., and Certa, U. (2009). Phylogenetic analysis of interferon inducible transmembrane gene family and functional aspects of IFITM3. *Cytokine* 1–2, 87.
- Slotboom, D.J., Duurkens, R.H., Olieman, K., and Erkens, G.B. (2008). Static light scattering to characterize membrane proteins in detergent solution. *Methods* 46, 73–82.
- Smit, J.M., Moesker, B., Rodenhuis-Zybert, I., and Wilschut, J. (2011). Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. *Viruses* 3, 160–171.
- Smith, R.A., Young, J., Weis, J.J., and Weis, J.H. (2006). Expression of the mouse fragilis gene products in immune cells and association with receptor signaling complexes. *Genes Immun.* 7, 113–121.
- Smith, S., Weston, S., Kellam, P., and Marsh, M. (2014). IFITM proteins—cellular inhibitors of viral entry. *Current Opinion in Virology* 4, 71–77.
- Smith, S.E., Gibson, M.S., Wash, R.S., Ferrara, F., Wright, E., Temperton, N., Kellam, P., and Fife, M. (2013). Chicken interferon-inducible transmembrane protein 3 restricts influenza viruses and lyssaviruses in vitro. *J. Virol.* 87, 12957–12966.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H., and Schreiber, R.D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 227–264.
- Tam, C., Idone, V., Devlin, C., Fernandes, M.C., Flannery, A., He, X., Schuchman, E., Tabas, I., and Andrews, N.W. (2010). Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *J. Cell Biol.* 189, 1027–1038.
- Tanaka, S.S., Yamaguchi, Y.L., Tsoi, B., Lickert, H., and Tam, P.P.L. (2005). IFITM/Mil/Fragilis Family Proteins IFITM1 and IFITM3 Play Distinct Roles in Mouse Primordial Germ Cell Homing and Repulsion. *Developmental Cell* 9, 745–756.
- Tartour, K., and Cimorelli, A. (2015). [IFITM, a common barrier to many viruses]. *Med Sci (Paris)* 31, 377–382.

Tartour, K., Appourchaux, R., Gaillard, J., Nguyen, X.-N., Durand, S., Turpin, J., Beaumont, E., Roch, E., Berger, G., Mahieux, R., et al. (2014). IFITM proteins are incorporated onto HIV-1 virion particles and negatively imprint their infectivity. *Retrovirology* *11*, 103.

de Veer, M.J., Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, S., Paranjape, J.M., Silverman, R.H., and Williams, B.R. (2001). Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J. Leukoc. Biol.* *69*, 912–920.

Wakim, L.M., Woodward-Davis, A., Liu, R., Hu, Y., Villadangos, J., Smyth, G., and Bevan, M.J. (2012). The molecular signature of tissue resident memory CD8 T cells isolated from the brain. *J. Immunol.* *189*, 3462–3471.

Wang, X., Li, M., Zheng, H., Muster, T., Palese, P., Beg, A.A., and García-Sastre, A. (2000). Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. *J. Virol.* *74*, 11566–11573.

Weidner, J.M., Jiang, D., Pan, X.-B., Chang, J., Block, T.M., and Guo, J.-T. (2010). Interferon-Induced Cell Membrane Proteins, IFITM3 and Tetherin, Inhibit Vesicular Stomatitis Virus Infection via Distinct Mechanisms. *J Virol* *84*, 12646–12657.

Weston, S., Czieso, S., White, I.J., Smith, S.E., Wash, R.S., Diaz-Soria, C., Kellam, P., and Marsh, M. (2016). Alphavirus Restriction by IFITM Proteins. *Traffic* *17*, 997–1013.

Wiedemann, C., Bellstedt, P., and Görlach, M. (2013). CAPITO--a web server-based analysis and plotting tool for circular dichroism data. *Bioinformatics* *29*, 1750–1757.

Wilkins, C., Woodward, J., Lau, D.T.-Y., Barnes, A., Joyce, M., McFarlane, N., McKeating, J.A., Tyrrell, D.L., and Gale, M. (2013). IFITM1 is a tight junction protein that inhibits hepatitis C virus entry. *Hepatology* *57*, 461–469.

Wyles, J.P., McMaster, C.R., and Ridgway, N.D. (2002). Vesicle-associated membrane protein-associated protein-A (VAP-A) interacts with the oxysterol-binding protein to modify export from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *277*, 29908–29918.

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* *5*, 730–737.

- Yount, J.S., Moltedo, B., Yang, Y.-Y., Charron, G., Moran, T.M., López, C.B., and Hang, H.C. (2010). Palmitoylome profiling reveals S-palmitoylation-dependent antiviral activity of IFITM3. *Nat. Chem. Biol.* *6*, 610–614.
- Yount, J.S., Karssemeijer, R.A., and Hang, H.C. (2012). S-Palmitoylation and Ubiquitination Differentially Regulate Interferon-induced Transmembrane Protein 3 (IFITM3)-mediated Resistance to Influenza Virus. *J Biol Chem* *287*, 19631–19641.
- Yu, J., Li, M., Wilkins, J., Ding, S., Swartz, T.H., Esposito, A.M., Zheng, Y.-M., Freed, E.O., Liang, C., Chen, B.K., et al. (2015). IFITM Proteins Restrict HIV-1 Infection by Antagonizing the Envelope Glycoprotein. *Cell Rep* *13*, 145–156.
- Zaitseva, E., Yang, S.-T., Melikov, K., Pourmal, S., and Chernomordik, L.V. (2010). Dengue Virus Ensures Its Fusion in Late Endosomes Using Compartment-Specific Lipids. *PLoS Pathog* *6*.
- Zhang, L., Peeples, M.E., Boucher, R.C., Collins, P.L., and Pickles, R.J. (2002). Respiratory Syncytial Virus Infection of Human Airway Epithelial Cells Is Polarized, Specific to Ciliated Cells, and without Obvious Cytopathology. *J Virol* *76*, 5654–5666.
- Zhang, Y.-H., Zhao, Y., Li, N., Peng, Y.-C., Giannoulatou, E., Jin, R.-H., Yan, H.-P., Wu, H., Liu, J.-H., Liu, N., et al. (2013). Interferon-induced transmembrane protein-3 genetic variant rs12252-C is associated with severe influenza in Chinese individuals. *Nat Commun* *4*, 1418.
- Zhou, H.-X., and Cross, T.A. (2013). Influences of Membrane Mimetic Environments on Membrane Protein Structures. *Annu. Rev. Biophys.* *42*, 361–392.
- Zhu, H., and Liu, C. (2003). Interleukin-1 Inhibits Hepatitis C Virus Subgenomic RNA Replication by Activation of Extracellular Regulated Kinase Pathway. *J Virol* *77*, 5493–5498.
- Zoonens, M., Comer, J., Masscheleyn, S., Pebay-Peyroula, E., Chipot, C., Miroux, B., and Dehez, F. (2013). Dangerous liaisons between detergents and membrane proteins. The case of mitochondrial uncoupling protein 2. *J. Am. Chem. Soc.* *135*, 15174–15182.

Abstract

The host cell first line of defence against viral infections induces the production of interferons. These interferons are then released in the surrounding medium where they bind to target cells and induce the expression of hundreds of genes so called interferon-stimulated genes (ISGs). The interferon inducible transmembrane proteins IFITM are part of the products of these ISGs. IFITM1, 2 and 3 are antiviral factors able to restrict the replication of a broad variety of enveloped viruses, such as influenza virus, HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus) and Hepatitis C virus. These viruses enter in the host cell either by direct fusion with the cell membrane or by endocytosis. IFITM proteins contain two membrane regions for insertion or interaction with plasma and endolysosomal membranes where they block the fusion of virus particles with cellular membranes by a mechanism which is still undefined. In addition, their incorporation into new HIV virions, in virus producing cells, has been correlated with decreased infectivity.

Among the IFITM protein family members, IFITM3 is the one showing the most recurrent antiviral effect in the different studies. Therefore it represents a good model to study the whole IFITM family.

The determination of its structure and membrane topology is crucial to be able to clarify, through structure-based functional studies, the mechanism(s) by which IFITM3 interfere with the viral cycle.

Here we characterized and we studied IFITM3 structure and membrane topology in a lipidic environment close to its native environment such as liposomes and nanodiscs. We demonstrated that IFITM3 can self-associate to form at least a dimer. Some higher order associations of IFITM3 have been observed after its reconstitution into liposomes and big size nanodiscs. We discovered by NMR in solution that the N-terminal region of IFITM3 contains a small helical region, never described until now, which could correspond to an internalization motif. We also observed by negative staining electron microscopy some liposomal membrane curvature changes that could be assigned to the presence of IFITM3 in these liposomes. And we discovered through TEVC experiments that IFITM3 addition in the extracellular environment of xenopus oocytes produces ion leaks through the oocyte membrane which could result either from membrane destabilization or from a pore formation.

Les protéines IFITM (« InterFeron Inducible TransMembrane proteins »), et en particulier les membres 1, 2 et 3, sont des facteurs de restriction antiviraux dont l'expression est induite par le système immunitaire inné en réponse à une infection virale. Elles inhibent la réplication de nombreux virus pathogènes pour l'homme parmi lesquels figurent le virus de la grippe A, le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) de type 1 ou encore le virus de l'hépatite C. Ces virus entrent dans la cellule hôte, soit par fusion directe avec la membrane plasmique, soit par la voie de l'endocytose. Il est à présent communément admis que les protéines IFITM, localisées au sein des membranes plasmiques et endolysosomales, agissent en inhibant la fusion des membranes virales et cellulaires, empêchant par conséquent l'entrée du virus dans la cellule et donc sa réplication. D'autre part, dans le cas du VIH, leur incorporation dans les particules virales produites par la cellule hôte diminuerait la capacité de ces particules à infecter de nouvelles cellules cibles. Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels les protéines IFITM interfèrent avec le cycle viral ne sont pas encore clairement définis.

Parmi les membres de la famille IFITM, IFITM3 est celui qui présente l'effet antiviral le plus systématique selon les différentes études. Il constitue donc un modèle de référence pour étudier la famille IFITM.

Déterminer la structure ainsi que la topologie membranaire d'IFITM3 sous sa forme active rendrait alors possible la réalisation d'études fonctionnelles, dont les résultats contribueraient sans nul doute à élucider le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) IFITM3 exerce son activité antivirale.

C'est pourquoi, nous nous sommes tout d'abord attelés à reconstituer IFITM3 au sein de membranes artificielles (liposomes, nanodisques), car contrairement aux micelles de détergent, ces membranes artificielles peuvent mimer l'environnement natif des protéines membranaires et par conséquent, offrir de plus grandes chances de les y étudier sous leur forme active. Nous avons ensuite procédé à la caractérisation biochimique et biophysique d'IFITM3 et avons mis en évidence la formation de dimère de la protéine ainsi que de plus grandes espèces oligomériques. L'analyse structurale d'IFITM3 reconstituée en nanodisques par RMN nous a quant à elle permis d'identifier une courte région hélicoïdale dans la région N-terminale extramembranaire d'IFITM3 encore jamais décrite auparavant et pouvant correspondre à un motif d'internalisation. Nous avons en outre observé, par microscopie électronique à coloration négative, de potentiels effets d'IFITM3 sur la courbure de la membrane de liposomes qui pourraient être à l'origine de son action inhibitrice sur la fusion virale. Et enfin, nous avons montré au travers d'expériences TEVC que lorsqu'IFITM3 est présente dans l'environnement extracellulaire d'ovocytes de xénope, celle-ci est capable d'engendrer des fuites ioniques au travers de la membrane des ovocytes qui pourraient résulter soit, d'une déstabilisation de la membrane par IFITM3 soit, d'une formation de pores membranaires par la protéine.