



HAL
open science

La Sarcolipine, un régulateur de l'ATPase-Ca²⁺ SERCA1a : études in silico

Thomas Barbot

► **To cite this version:**

Thomas Barbot. La Sarcolipine, un régulateur de l'ATPase-Ca²⁺ SERCA1a : études in silico. Biophysique. Université Paris-Saclay, 2018. Français. NNT : 2018SACLS130 . tel-01883821

HAL Id: tel-01883821

<https://theses.hal.science/tel-01883821v1>

Submitted on 28 Sep 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.

La Sarcolipine, un régulateur de l'ATPase- Ca^{2+} SERCA1a Etudes *in silico*

Sarcolipin, a regulator of Ca^{2+} -ATPase SERCA1a *in silico* studies

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à I2BC, CEA-Saclay

École doctorale n°568 BIOSIGNE
Spécialité de doctorat: Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 15 juin, par

Thomas Barbot

Composition du Jury :

Tap Ha-Duong BIOCIS, Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud	Président
Yves-Henri Sanejouand Equipe Conception de protéines in silico, Université de Nantes	Rapporteur
Patrick Fuchs Laboratoire des biomolécules, Paris	Rapporteur
Martin Picard IBPC, Paris	Examineur
Nadège Jamin I2BC, CEA Saclay	Directrice de thèse
Véronica Beswick Université d'Evry, I2BC, CEA Saclay	Co-Encadrante
Liliane Mouawad Institut Curie, Orsay	Invité



Remerciements

Résumé

La Sarcolipine (SLN) est une hélice transmembranaire de 31 résidus dont la fonction est de réguler l'ATPase- Ca^{2+} SERCA1a. Ce régulateur peut subir une modification post-traductionnelle chez certaines espèces. Par exemple, chez le lapin, il est palmitoylé ou oleoylé sur le résidu Cys9. Pour comprendre au niveau moléculaire l'effet de cette modification post-traductionnelle sur la SLN, nous avons réalisé des simulations de dynamique moléculaire de la SLN de lapin insérée dans une bicouche de 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (POPC), non acylée et palmitoylée. L'analyse de ces simulations démontre que la palmitoylation n'affecte pas la structure secondaire, l'orientation (tilt et azimuth), ainsi que l'enfouissement de la SLN dans la membrane. De plus, l'analyse de simulations tout atome de la SLN humaine insérée dans une bicouche de POPC montre que la SLN humaine a la même structure secondaire et orientation que la SLN de lapin mais est plus enfouie dans la membrane que celle de lapin, du fait de sa séquence en acides aminés N-terminale plus hydrophobe.

L'ATPase- Ca^{2+} SERCA1a, une ATPase de type P, est localisée dans la membrane du reticulum sarcoplasmique des cellules du muscle squelettique. Elle est impliquée dans les processus de contraction/relaxation musculaire en transportant rapidement le Ca^{2+} cytosolique dans le lumen du reticulum sarcoplasmique grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. D'importants changements conformationnels de SERCA1a ont lieu durant son cycle catalytique comme le montrent les nombreuses structures cristallines de SERCA1a. En particulier, à l'état E1, la cavité contenant les sites de fixation du Ca^{2+} est ouverte vers le cytoplasme, tandis qu'à l'état E2, cette cavité est ouverte vers le lumen. La transition de l'état E1 à E2 nécessite la phosphorylation du résidu Asp351. Des structures 3D du complexe SERCA1a-SLN ont été déterminées par diffraction aux rayons X avec SERCA1a dans un état E1- Mg^{2+} . Pour comprendre le mécanisme détaillé de la régulation de SERCA1a par la SLN, des simulations de dynamique moléculaire et des analyses des modes normaux (NMA) ont été réalisées en utilisant la structure 3D du complexe SERCA1a-SLN

inséré dans une bicouche de POPC. Les résultats principaux de ces analyses sont les suivants : 1) la SLN régule les transitions $E1.Mg^{2+} \rightarrow E1.2Ca^{2+}$ et $E1.Mg^{2+} \rightarrow E2$; 2) l'interaction de la SLN influe sur la structure et la dynamique de SERCA1a et modifie la position de l'hélice transmembranaire TM1 de sorte à ce que la cavité contenant les sites de fixation du Ca^{2+} soit plus ouverte et que les sites soient plus accessibles ; 3) l'interaction de la SLN avec TM6 affecte deux régions de SERCA1a indispensables à sa fonction : en modifiant la structure et la dynamique de TM6, la SLN perturbe la position et la fluctuation des résidus des sites de fixation du Ca^{2+} , leur conférant une conformation inapte à fixer le Ca^{2+} . De même, l'interaction avec TM6 induit la courbure de TM5, ce qui affecte de façon indirecte le site de phosphorylation (éloigné de plus de 35 Å de la SLN) et conduit à l'inhibition de la phosphorylation du résidu Asp351.

Nos résultats de cette étude *in silico* fournissent de nouveaux éléments concernant le mécanisme par lequel la SLN régule SERCA1a et qui pourrait être complétés par des travaux expérimentaux.

Abstract

Sarcoplipin (SLN), a transmembrane helix of 31 residues, binds to and regulates the Ca^{2+} -ATPase SERCA1a. This regulator is post-translationally modified in some species. For example, in rabbit, it is palmitoylated or oleoylated on its Cys9 residue. To understand at a molecular level, the effect of this post-translational modification on SLN, all-atom molecular dynamics simulations of unacylated and palmitoylated rabbit SLN embedded in a POPC bilayer were performed. Analysis of the simulations demonstrates that palmitoylation does not affect the secondary structure, the orientation (tilt and azimuth) as well as the burying of SLN within the membrane. In addition, the analyses of all-atom simulations of human SLN embedded in a POPC bilayer show that human SLN has the same secondary structure and orientation as rabbit SLN but is more buried within the membrane than rabbit SLN as a result of its more hydrophobic N-terminal amino acids sequence.

The Ca^{2+} pump SERCA1a, a P-type ATPase, is localized in the sarcoplasmic reticulum membrane of striated muscle cells. It is involved in the contraction/relaxation process by fast pumping the cytoplasmic Ca^{2+} from the cytosol to the lumen of the sarcoplasmic reticulum using the energy of ATP hydrolysis. Large conformational changes of SERCA1a occur during its catalytic cycle as evidenced by the various crystal structures of SERCA1a. In particular, in the E1 state, the cavity that contains the Ca^{2+} binding sites is open toward the cytoplasm while in the E2 state, this cavity is open toward the lumen. The transition from the E1 to the E2 state involves the phosphorylation of Asp351 residue. 3D structures of SERCA1a-SLN complex have been determined by X-Ray diffraction, with SERCA1a in a E1- Mg^{2+} state. To understand the detailed mechanisms of SERCA1a regulation by SLN, molecular dynamics (MD) simulations and normal mode analysis (NMA) were performed using the 3D structures of SERCA1a-SLN complex embedded in a POPC bilayer. Main results from these analyses are the followings: 1) SLN regulates the E1- $\text{Mg}^{2+} \rightarrow \text{E1-2Ca}^{2+}$ and E1- $\text{Mg}^{2+} \rightarrow \text{E2}$ state transitions; 2) interaction of SLN with

SERCA1a impact the structure and dynamic of SERCA1a and modifies the position of the transmembrane helix TM1 such that the cavity that contains the Ca^{2+} binding sites is more widely opened and the Ca^{2+} binding sites more accessible; 3) SLN interaction with affects two regions essential to its function. By changing the structure and dynamic of TM6, SLN alters the position and fluctuations of residues involved in the Ca^{2+} binding sites, such that those sites are unable to bind Ca^{2+} . This interaction with TM6 also induces TM5 bending and thus, indirectly modifies the phosphorylation site conformation, leading to the inhibition of Asp351 phosphorylation.

Our results from these *in silico* studies provide new insights into the mechanism by which SLN regulates SERCA1a activity and could be completed by experimental work.

Abréviations

- ADP** adénosine diphosphate
- AMPPCP** Phosphomethylphosphonic Acid Adenylate Ester
- ATP** adénosine triphosphate
- DPC** dodecylphosphocholine
- DOPC** dioleoylphosphatidylcholine
- DOPE** dioleoylphosphatidylethanolamine
- ENM** Elastic Network Model
- GRMS** Gradient Root Mean Square deviation
- NPT** Nombre d'atomes, Pression et Température constants
- PDB** Protein Data Bank
- PLN** Phospholamban
- PME** Particle-Mesh Ewald
- POPC** 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
- RMN** Résonance Magnétique Nucléaire
- RMSD** Root Mean Square Deviation
- RMSF** Root Mean Square Fluctuation
- RTB** Rotation-Translation Blocks
- SDS** Sodium dodecyl sulfate
- SERCA1a** Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) 1a
- SLN** Sarcolipine
- TM** hélice transmembranaire

Table des matières

Remerciements.....	3
Résumé.....	4
Abstract.....	6
Abréviations	8
Table des matières	9
Chapitre I : Introduction	12
I. L'ATPase- Ca^{2+} du reticulum sarcoplasmique SERCA1a	12
1. Les ATPases de transport du Ca^{2+} de type SERCA1	12
2. Le cycle fonctionnel de SERCA1a.....	14
3. Les différents domaines de SERCA1a.....	16
4. Les transitions entre les états E1 et E2.....	36
5. Les interactions de SERCA1a avec la bicouche.....	41
II. Les peptides régulateurs de l'activité de SERCA.....	45
1. Le Phospholamban.....	47
2. La Sarcolipine.....	49
III. Contenu du mémoire de thèse	56
Chapitre II : Matériel et Méthode	58
I. La Dynamique Moléculaire.....	58
1. Le champ de force.....	58
2. L'intégration des équations du mouvement.....	62
3. Les conditions périodiques aux bords	65
4. Le calcul des interactions électrostatiques, la sommation d'Ewald et Particle-Mesh Ewald (PME)	67
5. La simulation de dynamique moléculaire utilisant des modèles gros-grain.....	70
II. L'Analyse des Modes Normaux.....	75
1. La résolution de l'équation de Newton	75
2. Le théorème d'équipartition.....	79
3. La méthode DIMB (Diagonalization In a Mixed Basis)	80
III. Création des systèmes et paramétrisation.....	82

1. Le complexe SERCA1a-SLN inséré dans une membrane de POPC	82
2. Paramétrisation de l'ancre acyle.....	90
3. La SLN isolée insérée dans une membrane de POPC.....	91
IV. Programmes d'analyse des données	95
1. L'épaisseur de la membrane	96
2. Le tilt.....	97
3. Position des atomes dans la membrane.....	97
4. Les paramètres d'ordre Carbone – Deutérium S_{CD}	98
5. Nombre de lipides dans l'anneau lipidique	99
6. Interactions protéine-lipides.....	100
Chapitre III : La Sarcolipine	103
I. Structure secondaire	105
II. L'inclinaison de la SLN dans la membrane.....	107
III. La rotation de la SLN sur son axe	110
IV. Le coefficient de diffusion latéral	112
V. L'enfouissement de la protéine dans la bicouche.....	113
VI. Les paramètres d'ordre des lipides et de l'ancre palmitoyle.....	116
VII. Conclusion et perspectives.....	119
Chapitre IV : Le complexe SERCA1a-SLN.....	121
I. Structure et dynamique de SERCA1a dans les trajectoires des simulations de dynamique moléculaire	121
1. RMSD des carbones α de SERCA1a	121
2. RMSF des carbones α de SERCA1a	125
3. Conservation de la structure secondaire de SERCA1a	127
4. Les interactions de SERCA1a avec la bicouche.....	129
5. Différence entre les structures en présence et absence de SLN.....	132
6. En résumé.....	133
II. Simulations avec le champ de force MARTINI.....	135
1. Structure et dynamique de SERCA1a.....	135
2. La diffusion de SERCA1a dans la bicouche.....	139
3. En résumé.....	141
III. Analyse des Modes Normaux	142

1. Modèle de réseau élastique	142
2. Modèle tout-atome	145
3. Effet de la SLN sur les changements conformationnels de SERCA1a	147
4. La position de l'hélice TM1 dans la bicouche	149
5. Les fluctuations de SERCA1a.....	152
6. Les sites de fixation du Calcium	155
7. Le site de phosphorylation	163
8. En résumé.....	172
IV. Discussion	173
V. Conclusion	180
Perspectives.....	182
Annexes	185
Annexe 1 : Paramètres de la cystéine palmitoylée.....	186
Annexe 2 : Evolution de la structure secondaire de TM2	188
Annexe 3 : Interactions avec les lipides adjacents pour les résidus interagissant avec la membrane à l'état E1-2Ca ²⁺	189
Annexe 4 : Interactions avec les lipides adjacents pour les résidus interagissant avec la membrane à l'état E2.....	197
Annexe 5 : Fluctuation des lipides de la bicouche	205
Références	207

Chapitre I : Introduction

I. L'ATPase- Ca^{2+} du reticulum sarcoplasmique SERCA1a

1. Les ATPases de transport du Ca^{2+} de type SERCA1

Les ATPases à Ca^{2+} de type SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase) sont des protéines membranaires permettant de transporter des ions Ca^{2+} à travers une membrane et ainsi d'établir un gradient de concentration ionique entre deux compartiments, en l'occurrence le cytosol et la lumière du réticulum endoplasmique. Il existe trois gènes responsables de l'expression des ATPases à Ca^{2+} de type SERCA chez l'homme, les gènes ATP2A1, ATP2A2 et ATP2A3, qui, suite à différents épissages, conduisent à l'expression de différentes isoformes qui sont SERCA1a (forme adulte) et 1b (forme néonatale), SERCA2a et 2b et SERCA3a à 3f, respectivement (Bobe et al., 2005; Periasamy and Kalyanasundaram, 2007). Toujours exprimées au niveau du réticulum sarcoplasmique, l'expression des différentes formes de SERCA varie suivant le type cellulaire. SERCA1a est la forme majoritaire dans le muscle squelettique tandis que SERCA2a est majoritaire dans le muscle cardiaque et le muscle lisse. La forme SERCA2b est ubiquitaire, tout comme la forme SERCA3d. Les autres formes de SERCA3 sont exprimées dans les cellules sanguines, le poumon, le rein et le pancréas (Bobe et al., 2005). Parmi cette famille de protéines, SERCA1a a fait l'objet de nombreuses publications et représente un modèle pour comprendre le fonctionnement des pompes à Ca^{2+} de type SERCA.

La maladie de Brody est une pathologie héréditaire associée à SERCA1a, certains patients présentant un gène ATP2A1 déficient. Les symptômes qui caractérisent cette pathologie sont une altération de la relaxation musculaire après la pratique d'un exercice physique, ce qui se traduit par une rigidité corporelle et des crampes (Brody, 1969). Des études réalisées sur différents patients atteints par cette maladie montrent que celle-ci pourrait être liée à l'expression d'une ATPase tronquée (Odermatt et al., 1996, 1997) ou à l'expression d'une ATPase dont le résidu Phe789 aurait

été remplacé par une leucine (Odermatt et al., 2000). Dans les deux cas, la protéine exprimée n'est pas fonctionnelle. Néanmoins, l'origine de cette maladie ne semble pas dépendre uniquement de ces facteurs car certaines familles atteintes par la maladie de Brody ne présentent pas de mutation du gène *ATP2A1* ou de modification du niveau d'expression de l'ATPase à Ca^{2+} .

Dans le cadre de mon projet de thèse, nous nous sommes intéressés à l'isoforme SERCA1a, qui est naturellement localisée dans la membrane du réticulum sarcoplasmique des cellules du muscle squelettique. SERCA1a est impliquée dans le mécanisme de relaxation musculaire. A haute concentration cytosolique en Ca^{2+} (millimolaire), les fibres musculaires se contractent. SERCA1a permet la relaxation musculaire en transportant activement le Ca^{2+} cytosolique vers le lumen du réticulum, faisant ainsi diminuer rapidement la concentration en Ca^{2+} cytosolique qui devient micromolaire. La stimulation des cellules musculaires entrainera l'ouverture des canaux calciques du réticulum, libérant du calcium dans le cytosol et permettant ainsi un nouveau cycle de contraction/relaxation.

2. Le cycle fonctionnel de SERCA1a

En matière de mécanisme, les ATPases de type P sont des protéines transmembranaires permettant la transformation de l'énergie issue de l'autophosphorylation d'un résidu aspartate via un ATP en transport actif de cations contre le gradient de concentration. Dans le cas de SERCA1a, l'hydrolyse d'une molécule d'ATP permet le transport de deux ions Ca^{2+} et le contre-transport de 2 à 3 protons (Cornelius and Møller, 1991; Levy et al., 1990; Yu et al., 1993). La figure 1 décrit une version simplifiée en six étapes des transports de Ca^{2+} et de protons à travers la membrane du réticulum sarcoplasmique par SERCA1a. Durant ces six étapes, SERCA1a alterne entre les formes E1 et E2, qui fixent ou non le calcium. Ce cycle passe par une étape d'autophosphorylation du transporteur qui est une des caractéristiques fonctionnelles principales de la famille des ATPases de type P.

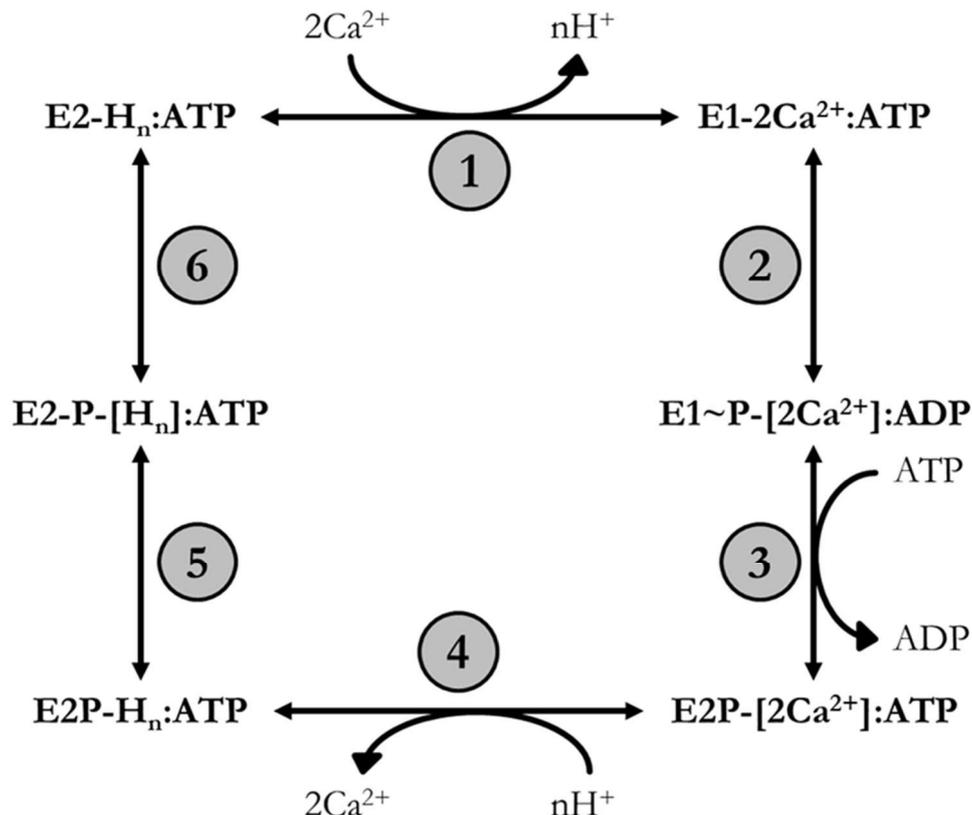


Figure 1 : Représentation simplifiée du cycle fonctionnel de SERCA1a. Le choix de représenter le cycle fonctionnel de SERCA1a sous cette forme est justifié par le fait que, en conditions physiologiques, la concentration en ATP est telle que, même si SERCA1a n'est pas dans un état enzymatiquement actif concernant la phosphorylation/déphosphorylation, la forme prédominante de la pompe est celle présentant un ATP/ADP lié au domaine de fixation du nucléotide (Møller et al., 2010).

A l'étape 1, deux ions Ca^{2+} cytosoliques interagissent avec SERCA1a à l'état E2 non phosphorylé et lié à un ATP pour former le complexe $\text{E1-2Ca}^{2+}:\text{ATP}$. La fixation du Ca^{2+} entraîne la libération de 2 à 3 protons dans le cytosol. La transition de SERCA1a de l'état E2 vers l'état E1 durant l'étape 1, induit par la fixation des deux ions Ca^{2+} , est suivie par l'étape 2 qui est l'autophosphorylation rapide du résidu Asp351 à partir de l'ATP lié. Cette étape 2 aboutit à la formation d'un intermédiaire phosphorylé hautement énergétique, le complexe $\text{E1}\sim\text{P-}[2\text{Ca}^{2+}]:\text{ADP}$, dans lequel les sites de fixation du Ca^{2+} sont occlus. A l'étape 3, l'ADP produit par la phosphorylation est échangé avec une molécule d'ATP pour former le complexe $\text{E2P-}[2\text{Ca}^{2+}]:\text{ATP}$, dans lequel les sites de fixation du Ca^{2+} sont toujours occlus. Ce complexe est un intermédiaire phosphorylé faiblement énergétique (Danko et al., 2009). A l'étape 4, l'énergie apportée par la phosphorylation permet une réouverture des sites de transport côté luminal, exposant les ions Ca^{2+} au lumen et permettant leur libération. La libération des deux ions Ca^{2+} s'accompagne simultanément par la fixation de n protons ($2 \leq n \leq 3$; (Andersson et al., 2008)) et mène à la formation de l'intermédiaire $\text{E2P-H}_n:\text{ATP}$. Les protons fixés par les résidus des sites de fixation du Ca^{2+} permettent de restaurer partiellement l'électroneutralité au sein du domaine transmembranaire. L'étape suivante, i.e. l'étape 5, correspond à la fermeture du domaine transmembranaire du côté luminal et aboutit à la formation de l'intermédiaire $\text{E2P-}[H_n]:\text{ATP}$ où les protons sont occlus. Enfin l'étape 6 correspond à la déphosphorylation de cet intermédiaire et à la formation du complexe $\text{E2-H}_n:\text{ATP}$.

Pour résumer, l'échange $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ réalisé par SERCA1a est basé sur l'existence de deux états, les états E1 et E2, E1 représente l'état où la pompe ATPasique a une haute affinité pour le Ca^{2+} et dont la phosphorylation aboutit à la formation de l'intermédiaire $\text{E1}\sim\text{P-}[2\text{Ca}^{2+}]$ hautement énergétique, et E2 représente l'état où la pompe ATPasique a une meilleure affinité pour les protons H^+ que pour le Ca^{2+} . Notons qu'à pH acide, il est possible de phosphoryler l'ATPase en absence de calcium, à partir de phosphate inorganique (de Meis and Inesi, 1988). Il est important de noter

ici que la version du cycle présentée ici a la particularité de présenter SERCA1a en constante interaction avec un nucléotide, l'ATP ou l'ADP. Dans une version plus classique, l'ATP n'interviendrait qu'à partir de l'étape 6. Le choix de représenter le cycle fonctionnel de SERCA1a sous cette forme est justifié par le fait que, en conditions physiologiques, la concentration en ATP est telle que, même si SERCA1a n'est pas dans un état enzymatiquement actif concernant la phosphorylation/déphosphorylation, la forme prédominante de la pompe est celle présentant un ATP/ADP lié au domaine de fixation du nucléotide (Møller et al., 2010).

3. Les différents domaines de SERCA1a

SERCA1a peut-être subdivisée en 5 sous-domaines. Le domaine de fixation du nucléotide (N), le domaine de phosphorylation (P) et le domaine A constituent les domaines cytoplasmiques de SERCA1a. La protéine possède aussi un unique domaine transmembranaire, au sein duquel se situe les sites de fixation du Ca^{2+} , ainsi qu'un 5^e domaine, aussi appelé cœur central, qui permet de lier le domaine transmembranaire aux domaines cytoplasmiques. La figure 2 représente SERCA1a à l'état E1-2 Ca^{2+} (code PDB : 1vfp (Toyoshima and Mizutani, 2004)) insérée dans une bicouche de POPC, en utilisant les données du serveur OPM (Lomize et al., 2012) pour l'orientation de la protéine dans la bicouche. Les trois domaines cytoplasmiques, ainsi que le domaine transmembranaire ont été représentés sur cette figure (le 5^e domaine possédant des parties communes avec les autres domaines n'est pas représenté sur cette figure, voir partie I.3.e du chapitre Introduction pour une description détaillée de ce domaine). Dans cette partie, nous détaillerons les caractéristiques structurales et fonctionnelles de chacun des domaines de la protéine.

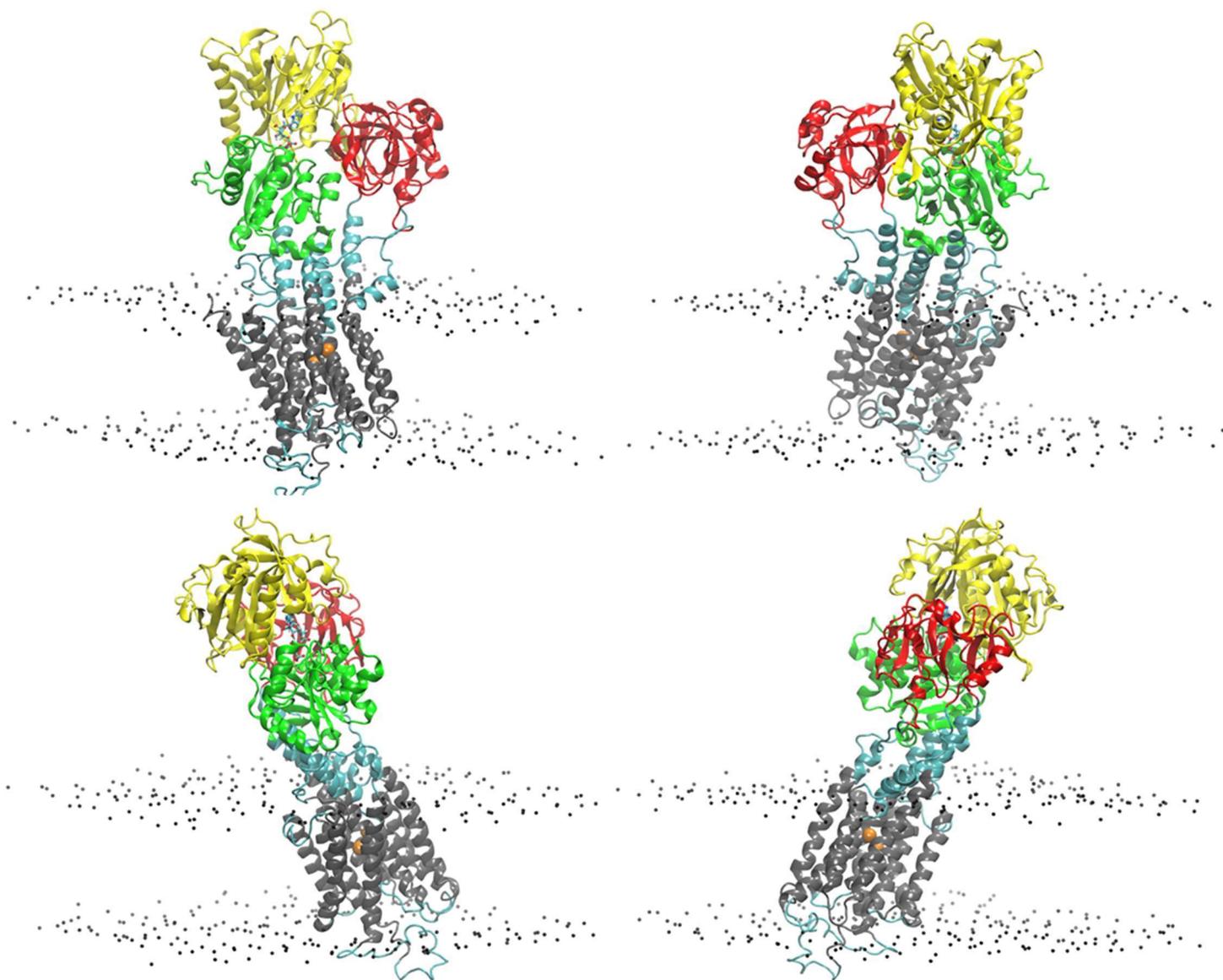


Figure 2 : La structure de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺:ATP [code PDB : 1vfp]. Le squelette peptidique de SERCA1a est représenté en ruban. Les domaines N, P et A sont représentés en jaune, vert et rouge, respectivement. La partie membranaire des hélices du domaine transmembranaire sont représentées en noir et la partie cytoplasmique en cyan. Les atomes de phosphore des lipides de la bicouche sont représentés par des sphères noire. La molécule d'ATP est représentée en boules et bâtons. Les ions Ca²⁺ fixés par SERCA1a sont représentés par des sphères orange. Nous avons utilisé les données du serveur OPM (Lomize et al., 2012) pour l'orientation de SERCA1a dans la bicouche.

a) Le domaine de fixation du nucléotide

Le domaine de fixation du nucléotide (domaine N) est situé sur la partie supérieure du domaine cytoplasmique de SERCA1a. Il est séparé du domaine membranaire par le domaine de phosphorylation (domaine P), avec lequel il est lié *via* deux boucles, l'une formée des résidus 358 à 360 et l'autre par les résidus 600 à 605. La structure du domaine N représente un « pli de Rossmann » (Rao and Rossmann, 1973), formé par 6 hélices α et 13 feuillets β antiparallèles. Le domaine N a la particularité de conserver sa structure (Abu-Abed et al., 2002) et sa capacité à fixer un nucléotide (Champeil et al., 1998; Moutin et al., 1998) après avoir été isolé du reste de SERCA1a par clivage protéolytique.

Les structures de SERCA1a obtenues par diffraction aux rayons X en présence d'AMPPCP lié au domaine N (Sørensen et al., 2004; Toyoshima and Mizutani, 2004) ou en présence d'ATP lié au domaine N (Marchand et al., 2008) montrent que la partie nucléotidique de l'ATP est positionnée dans une cavité localisée à l'extrémité inférieure du domaine N, et le triphosphate est localisé en dehors de cette cavité, à l'interface du domaine N et du domaine P (fig. 3), pointant vers l'aspartate catalytique Asp351. Les hélices α_2 et α_4 et les feuillets β_7 à β_9 sont impliqués dans la fixation de l'ATP, fixation rendue possible par les chaînes latérales des résidus Phe487 et Lys492 et des résidus Lys515, Thr440 et Glu442 qui entourent et interagissent avec le cycle aromatique de l'adénine (fig. 3). Une interaction de type $\pi - \pi$ est observée entre le cycle aromatique du résidu Phe487 et le cycle aromatique de l'ATP. La cavité de fixation de l'ATP à l'état E1-2Ca²⁺ est légèrement plus large en absence de nucléotide. De même, à l'état E2, cette cavité est peu modifiée par la présence de l'ATP. Seuls les rotamères des chaînes latérales sont différents lors de la fixation du nucléotide (principalement Glu439) (Jensen et al., 2006). Ainsi, de faibles réarrangements conformationnels de la cavité de fixation de l'ATP sont nécessaires pour la fixation du nucléotide, quel que soit l'état dans lequel est SERCA1a. L'ensemble des résidus impliqués dans la fixation du

noyau aromatique de l'ATP sont conservés chez les autres protéines composant la famille des ATPases de type P.

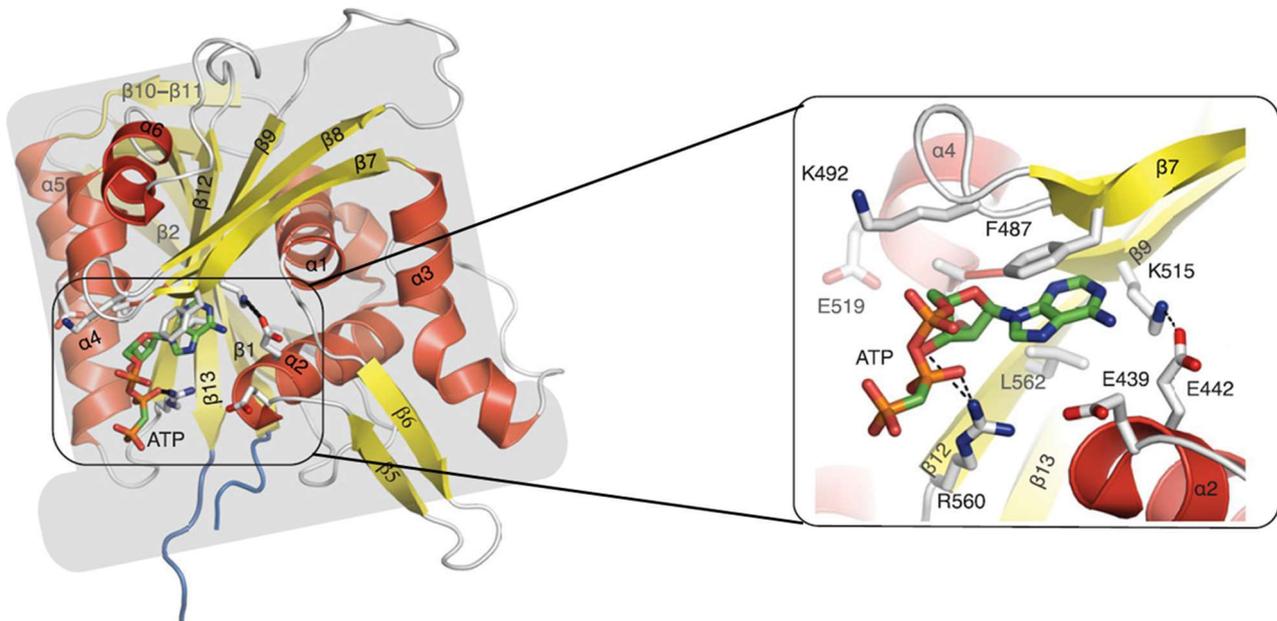


Figure 3 : Le domaine N de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺:ATP. L'état E1-2Ca²⁺:ATP est représenté par la structure de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺:AMPPCP (code PDB : 1t5s (Sorensen et al., 2004)). Le domaine N, représenté en ruban, montre le cœur central composé de 7 brins β entourés de 6 hélices α , ainsi que les brins β périphériques et les boucles liant les différentes structures secondaires. La molécule d'AMPPCP est représentée en bâtons. Les résidus importants du domaine N sont aussi représentés en bâtons. Figure extraite de la revue de Møller *et al.*, 2010.

Le triphosphate de la molécule d'ATP liée, localisé à l'extrémité du domaine N, a une conformation courbée, différente de la conformation allongée observée pour le nucléotide en solution et après minimisation énergétique. Les structures obtenues à partir de cristaux de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺ en présence d'AMPPCP, ainsi que celles obtenues à partir de cristaux de SERCA1a à l'état E2 en présence de thapsigargine et d'AMPPCP suggèrent que cette courbure du triphosphate de l'ATP est due à des interactions électrostatiques entre les chaînes latérales des résidus Arg560 et Arg678 (non représenté sur la figure) et la charge partielle négative de l'oxygène du groupement 2'-OH de l'ATP (Clausen and Andersen, 2003).

b) Le domaine de phosphorylation

i. Structure

Le domaine de phosphorylation (domaine P) est composé de deux parties : une partie N-terminale, comprenant les résidus 330 à 357 et qui succède à la partie cytosolique de l'hélice transmembranaire TM4, et une partie C-terminale, comprenant les résidus 605 à 738. Ces deux parties, bien qu'éloignées dans la séquence, interagissent étroitement entre elles pour former le domaine P. Le motif de phosphorylation ³⁵¹DKTG³⁵⁴ est situé à l'extrémité C_{ter} de la partie N-terminale du domaine P. La partie C-terminale du domaine P forme deux structures de type « pli de Rossmann » (formé par les résidus 605 à 679 et 680 à 738), nommées P-I et P-II et entourant le motif de phosphorylation (fig. 4). Le sous-domaine P-I présente une structure en « pli de Rossmann » $\alpha_3\beta_3$ irrégulière. Le sous-domaine P-II présente une structure en « pli de Rossmann » régulière, composé de trois structures $\alpha\beta$ consécutives positionnées côte-à-côte. Cette partie de la protéine contient un motif qui, comme le motif de phosphorylation, est très conservé au sein de la famille des ATPases de type P et qui comprend la séquence ⁶⁹⁹AM(V)TGVDN ••• GIAMG⁷²¹. Ce motif est important pour la transduction énergétique car le résidu Asp703 (Asp704 pour certaines ATPases de type P) interagit avec le Mg²⁺ lié à l'ATP durant le processus de phosphorylation. De plus, le sous-domaine P-II contient le résidu Lys684 qui, en conjonction avec le Mg²⁺, est requis pour écranter la charge négative du phosphate durant le processus de phosphorylation.

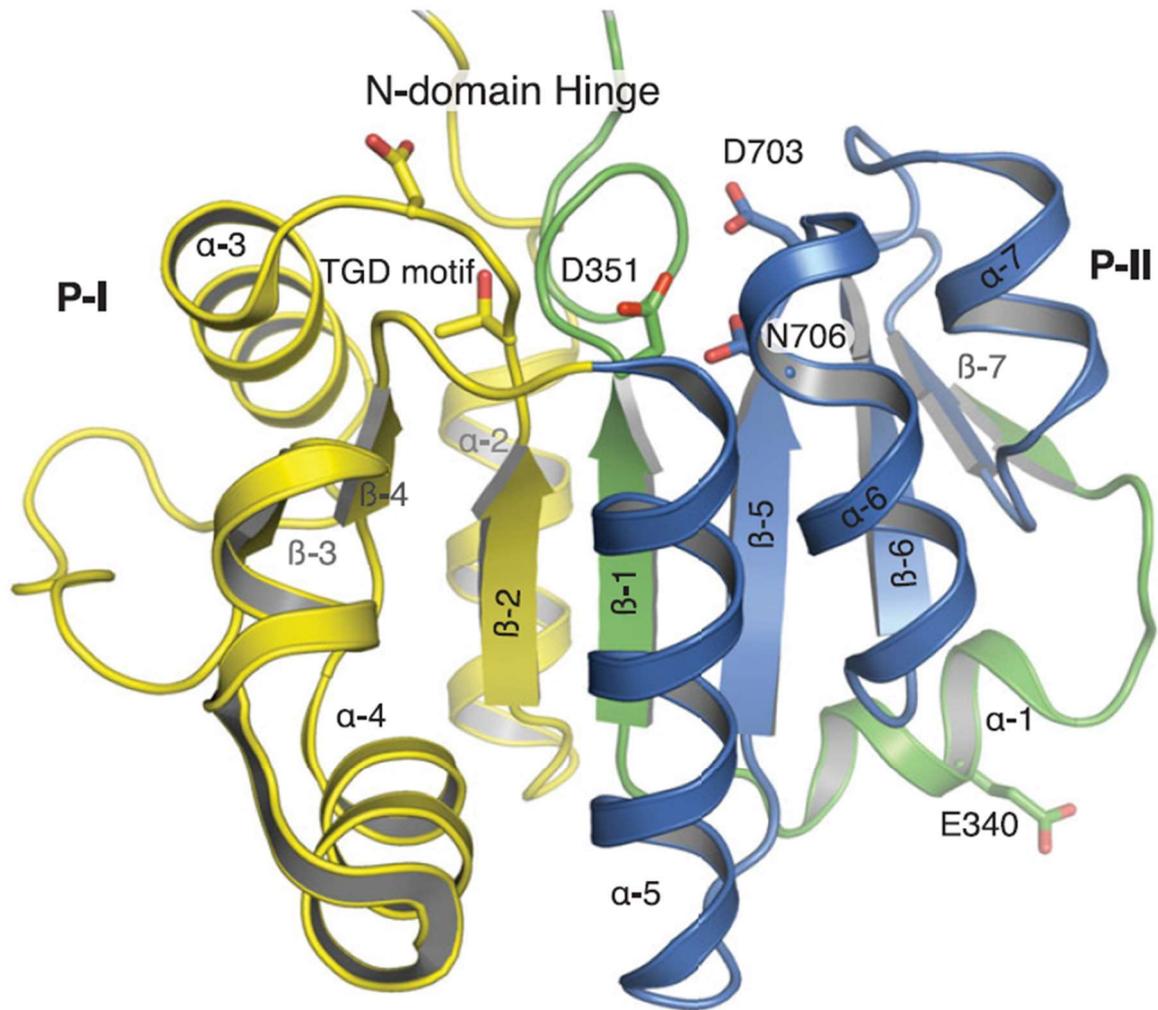


Figure 4 : Le domaine P de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺:ATP. L'état E1-2Ca²⁺:ATP est représenté par la structure de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺:AMPPCP (code PDB : 1t5s). Le domaine P avec son cœur central formé par la partie N-terminale représenté en ruban vert (résidus 330 à 357), la partie C-terminale P-I représenté en ruban jaune (résidus 605 à 679) et la partie C-terminale P-II représenté en ruban bleu (résidus 680 à 738). Les résidus importants du domaine P (i.e. le motif ⁶²⁵TGD et les résidus Glu340, Asp351, Asp703 et Asn706) sont aussi représentés en bâtons. Figure extraite de la revue de Møller *et al.*, 2010.

ii. La phosphorylation du résidu Asp351

De nombreux résultats indiquent que les ATPases de type P appartiennent à la superfamille des déhalogénases haloacides (HAD) (Aravind et al., 1998; Stokes and Green, 2000). La plupart des protéines de cette superfamille sont caractérisées par la formation d'un aspartylphosphate durant leur cycle réactionnel. Malgré un faible degré d'homologie, la comparaison des séquences montre que le site actif est constitué de résidus conservés, situés sur trois zones différentes du polypeptide (Aravind et al., 1998; Ridder and Dijkstra, 1999). Cette conservation des résidus impliqués dans le site actif du domaine P est aussi retrouvée au niveau de la structure du site,

similaire chez la plupart des protéines de cette superfamille dont les structures 3D sont disponibles (Bellolell et al., 1994; Stock et al., 1993). Les trois zones de la protéine comprenant les résidus impliqués dans le site actif du domaine P sont les suivantes : un domaine I comprenant le résidu aspartate phosphorylable par l'ATP (Asp351 dans le cas de SERCA1a) au sein du motif DKTG strictement conservé au sein des ATPases de type P, un domaine II composé d'un résidu serine ou thréonine catalytiquement actif (Thr625 du motif ⁶²⁵TGD du domaine P-I dans le cas de SERCA1a) et un domaine III constitué d'un résidu lysine qui, en collaboration avec un ou deux résidus aspartate de la partie C-terminale du domaine P suivant la protéine, participe aussi à la phosphorylation de la protéine (Lys684 en collaboration avec Asp703 dans le cas de SERCA1a) (Ridder and Dijkstra, 1999; Stock et al., 1993).

La réaction permettant la phosphorylation du résidu aspartate implique un mécanisme d'association nucléophile entre le phosphate γ de l'ATP et le résidu aspartate, une réaction assistée par les résidus des domaines II et III mentionnés précédemment (Ridder and Dijkstra, 1999). La réaction de phosphorylation est constituée de deux étapes : (1) docking du phosphate γ de l'ATP au sein de la cavité formant le site de phosphorylation, entre les sous-domaines P-I et P-II, (2) interaction du phosphate γ avec le résidu Asp351. Cette interaction forme d'abord un intermédiaire représentant un état de phosphorylation transitoire puis, par la formation d'une liaison covalente entre le phosphate γ et le groupement carboxyle du résidu aspartate concomitante au clivage de la liaison entre les phosphates β et γ de l'ATP, aboutit à la phosphorylation du groupement carboxyl de l'aspartate. Quatre types de structures de SERCA1a, disponibles dans la Protein DataBank, décrivent ces étapes (fig. 5): (i) les structures de SERCA1a à l'état E2-AMPPCP (code PDB : 2c88 & 2c8k (Jensen et al., 2006)); (ii) les structures de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺-AMPPCP représentant l'étape où le nucléotide est lié et précédant la phosphorylation activée par la fixation du Ca²⁺ (code PDB : 1t5s (Sørensen et al., 2004)) ; 1vfp); (iii) la structure de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺-ADP-AlF₄⁻ représentant l'état de phosphorylation transitoire (code PDB : 1t5t (Sørensen et al., 2004)); (iv) la structure de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺-P-AMPPN représentant le

phosphoenzyme [2Ca]E1~P avec ATP lié (code PDB : 3ba6 (Olesen et al., 2007)). Dans la figure 5a, l'AMPPCP interagit avec le motif ⁶²⁵TGD et le résidu Arg678. Dans la figure 5b, après le changement conformationnel de SERCA1a de l'état E2 à E1 induit par la fixation du Ca²⁺, le phosphate γ s'est rapproché du groupement carboxyle du résidu Asp351, stabilisé par des liaisons hydrogènes et des interactions électrostatiques avec les chaînes latérales des résidus Thr625 et Lys684. De plus, un ion divalent (Mg²⁺ *in vivo*, Ca²⁺ dans la structure 1t5s, utilisé pour la figure 5b) sert d'intermédiaire entre le groupement carboxyle de l'Asp351 et le phosphate γ de l'ATP. Cet ion divalent est stabilisé par son interaction avec le groupement carbonyle de la chaîne principale du résidu Thr353, le groupement carboxylate du résidu Asp703 et 2 molécules d'eau. Ces interactions sont maintenues dans la structure de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺-ADP-AlF₄⁻ (voir fig. 5c), où l'atome Al³⁺, entouré par les atomes F⁻ positionnés sur un plan, mime le transfert du phosphate dans l'état transitoire. Ainsi, la structure peut être considérée comme représentant un état intermédiaire du transfert du phosphate γ de l'ATP vers le groupement carboxylate du résidu Asp351, en accord avec le mécanisme d'une réaction d'association nucléophile d'ordre 2 (Sørensen et al., 2004). Cette structure révèle comment la répulsion électrostatique entre le phosphate γ chargé négativement et le groupement carboxylate, lui aussi chargé négativement, est annulée par le résidu Lys684 à proximité, ainsi que par l'ion divalent qui interagit avec le groupement carboxylate du résidu Asp351 et avec le phosphate γ . Cette structure confirme aussi le rôle de ces résidus dans la réaction de phosphorylation de SERCA1a, précédemment mis en évidence par des études de mutagenèse (Andersen, 1995a; Clausen et al., 2001; McIntosh et al., 2004). Par ailleurs, le résidu Ly352, bien qu'il ne soit pas directement impliqué dans la phosphorylation de SERCA1a, participe à l'environnement électrostatique favorable pour la réaction de phosphorylation.

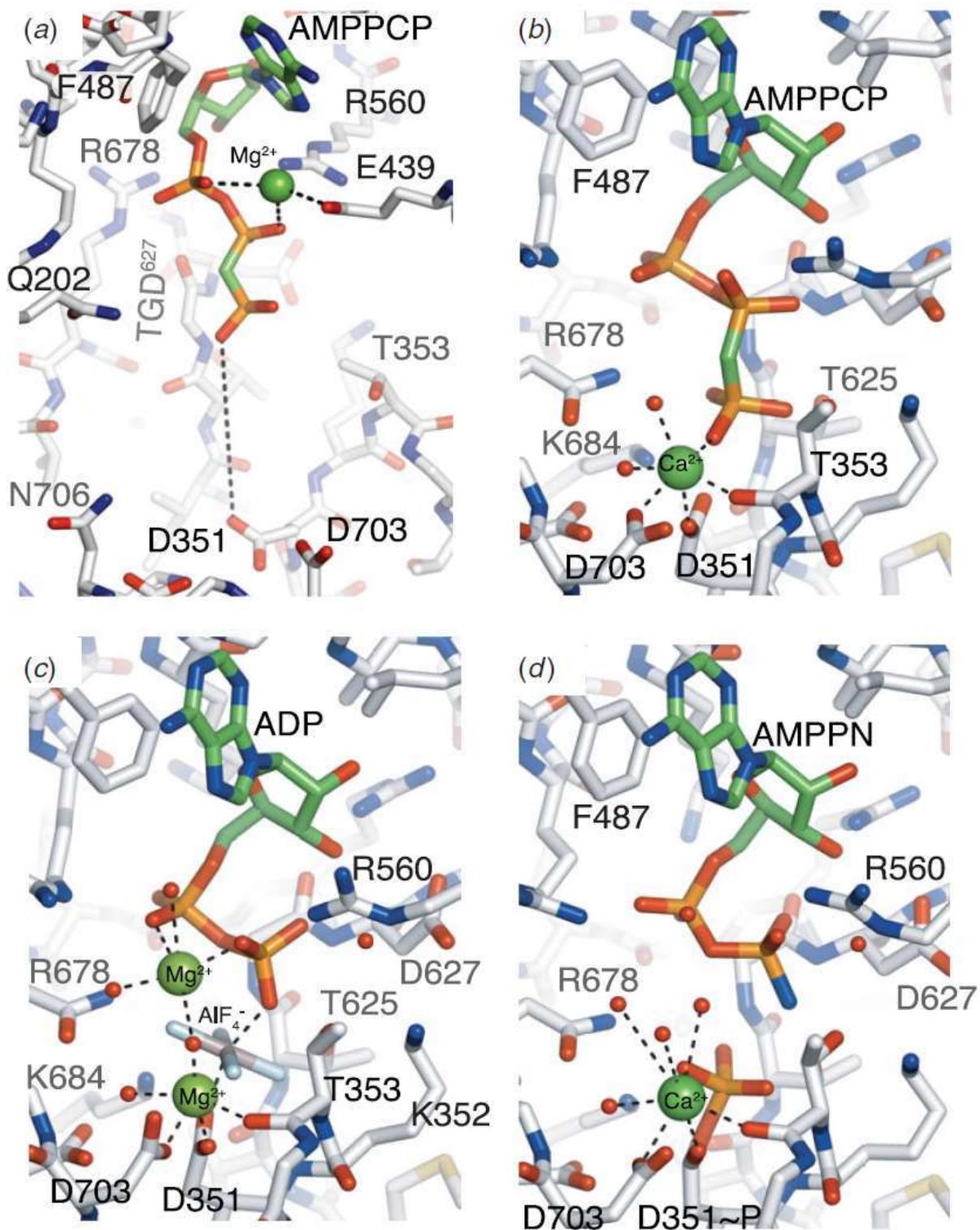


Figure 5 : Les différentes étapes de la réaction de phosphorylation du résidu Asp351. Le site de phosphorylation tel qu'il est représenté (a) dans la structure de SERCA1a à l'état E2:AMPPCP (analogue de l'état E2:ATP, code PDB : 2c88), (b) dans la structure de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺:AMPPCP (analogue de l'état E1-2Ca²⁺:ATP, un Ca²⁺ remplace le Mg²⁺ comme cofacteur de l'AMPPCP, code PDB : 1t5s), (c) dans la structure de SERCA1a à l'état E1-AlF₄-[2Ca²⁺]:ADP (analogue de l'état E1-P-[2Ca²⁺]:ADP, code PDB : 1t5t) et (d) dans la structure E1~P-[2Ca²⁺]:AMPPN (analogue de l'état E1~P-[2Ca²⁺]:ADP, code PDB : 3ba6). Les résidus importants du site de phosphorylation sont représentés en bâtons blancs avec les atomes d'oxygènes et d'azotes représentés en rouge et blanc, respectivement. Le nucléotide est représenté en bâtons. L'eau et les ions sont représentés par des sphères. Figure extraite de la revue de Möller *et al.*, 2010.

Une autre caractéristique de l'état de transition est la formation d'une interaction entre les chaînes latérales des résidus Thr353, Thr625 et le phosphate γ de l'ATP, permettant de stabiliser le phosphate γ pour la phosphorylation du résidu Asp351 (Sørensen et al., 2004; Toyoshima and Mizutani, 2004). Il a aussi été reporté que la formation d'un tour d'hélice à l'extrémité du motif de phosphorylation (DK³⁵³TGTLT), expose le carbonyle de la chaîne principale du résidu Thr353 pour lui permettre d'interagir avec le Mg^{2+} (Jorgensen et al., 2003). Ces interactions entre le phosphate γ et les thréonines 353 et 625, ainsi que le tour d'hélice α permettant l'interaction entre le carbonyle de Thr353 et le Mg^{2+} , sont particulièrement visibles dans la structure cristallographique de SERCA1a à l'état E1.2Ca²⁺, i.e. l'état précédant la phosphorylation (fig. 6).

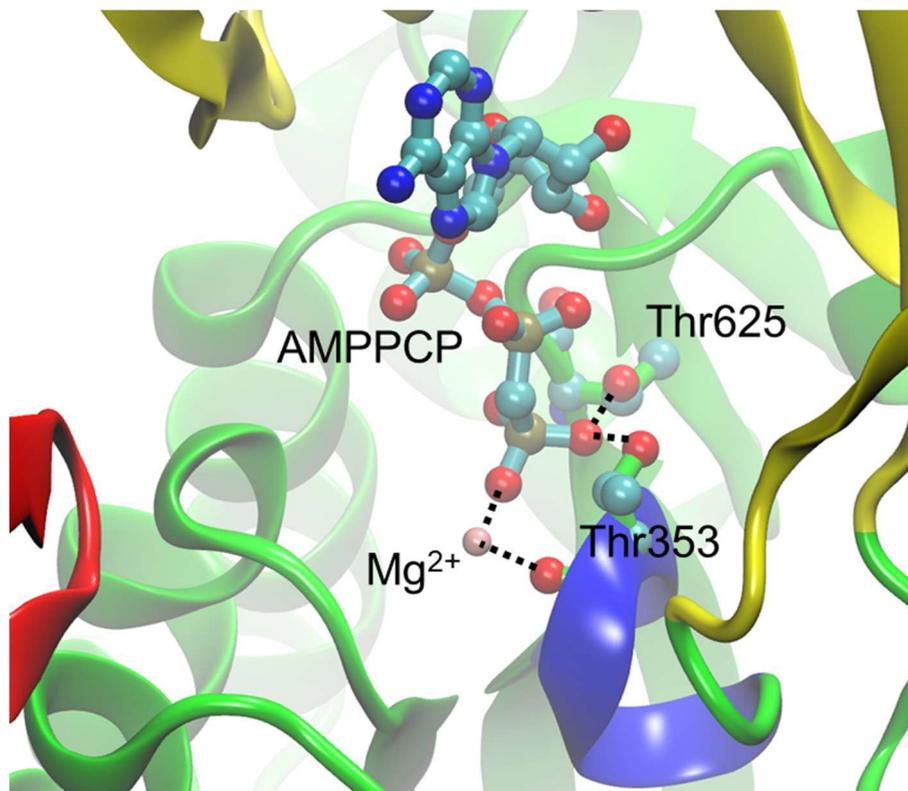


Figure 6 : Interactions entre le phosphate γ de l'ATP et le site de phosphorylation pour SERCA1a à l'état E1.2Ca²⁺. L'état E1-2Ca²⁺:ATP est représenté par la structure de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺:AMPPCP (code PDB : 1vfp). La protéine est représentée en ruban, jaune pour le domaine N, vert pour le domaine P et rouge pour le domaine A. Le tour d'hélice permettant une orientation correcte de la chaîne latérale de Thr353 pour qu'elle interagisse avec le phosphate γ est coloré en bleu. L'ATP et les résidus décrits dans le texte sont représentés en boules et bâtons. L'ion Mg^{2+} est représenté par une sphère rose. Les liaisons et interactions décrites dans le texte sont représentés par des traits noir pointillés.

c) Le domaine A

i. Structure

Le troisième domaine cytoplasmique, le domaine A, est constitué d'une partie centrale comprenant les résidus 122 à 232 et verrouillé par une partie N-terminale comprenant les résidus 1 à 37 (Inesi et al., 2004; Toyoshima et al., 2000). La partie intermédiaire, composée des résidus 38 à 121, comprend les hélices transmembranaires TM1 et TM2 et leurs extensions cytosoliques A-M1 et A-M2. Neuf brins β , principalement antiparallèles, sont uniformément distribués sur l'ensemble de la partie centrale. Cette partie centrale ne contient quasiment aucune structure en hélice, contrairement à la partie N-terminale, constituée de deux hélices liées par des boucles (fig. 7a).

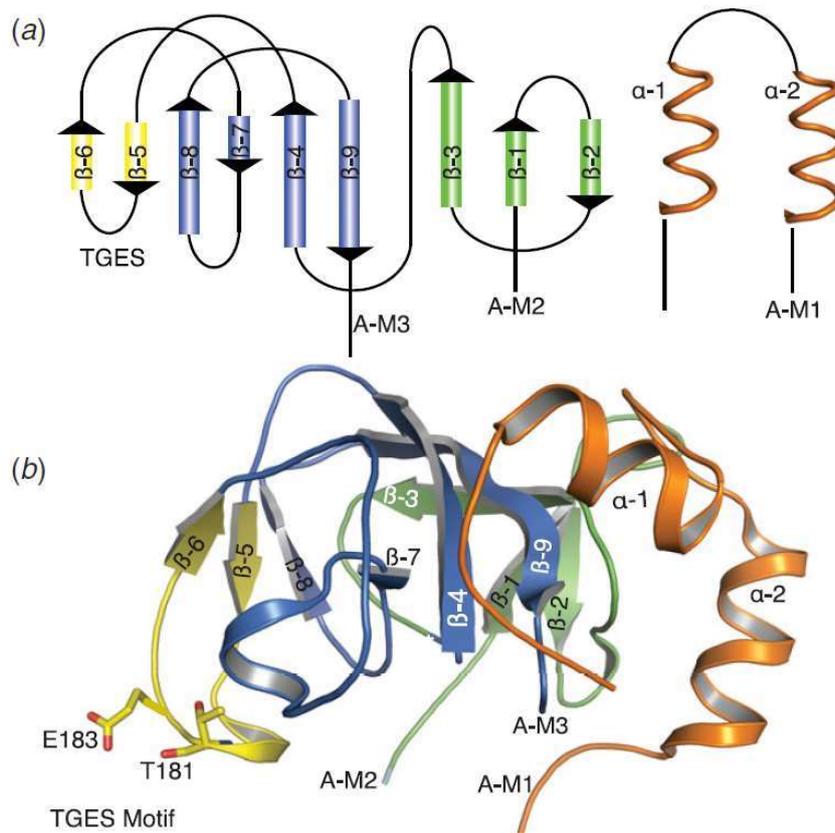


Figure 7 : Le domaine A. (a) Schéma représentant les différents sous-domaines du domaine A, ainsi que les structures secondaires qui le compose. La partie N-terminale est représentée en orange, le sous-domaine externe en vert et le sous-domaine interne en bleu, avec un appendice représenté en jaune et portant le motif de déphosphorylation $^{181}\text{TGES}$. (b) Le domaine A, représenté par la structure de SERCA1a à l'état E2-P (code PDB : 3b9r (Olessen et al., 2007)). Le domaine A est représenté en ruban et le code couleur de la figure 5a a été conservé. Les résidus importants du domaine A sont représentés en bâtons, avec les atomes d'oxygène et d'azote colorés en rouge et bleu, respectivement. Figure extraite de la revue de Møller *et al.*, 2010.

L'abondance de feuillets β forme une structure rigide et stable avec une flexibilité locale permise par les boucles ainsi que les quelques hélices composant le domaine A. Le domaine A comporte deux sous-domaines, un sous-domaine interne commençant par le motif ¹⁶⁰PAD et finissant par le résidu Ile232, et un sous-domaine externe constitué des résidus 122 à 159 ainsi que de la partie N-terminale (fig. 7b). La séparation des sous-domaines internes et externes est démarquée par le dernier feuillet β du domaine (²¹⁹ALGIVAT). Le sous-domaine interne contient le motif ¹⁸¹TGES, essentiel pour la déphosphorylation de SERCA1a à l'état E2P.

ii. Déphosphorylation du résidu Asp351

Une caractéristique des structures de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺ est que le domaine A interagit faiblement avec le domaine P. Cette caractéristique n'est pas retrouvée dans les structures de SERCA1a à des états différents où on observe que le domaine A interagit avec les domaines N et P. Ces interactions entre domaines cytosoliques sont importantes pour la phosphorylation et la déphosphorylation de SERCA1a, ainsi que pour la translocation des ions Ca²⁺. Le profil des interactions entre domaines cytosoliques est dépendant du mouvement rotationnel réalisé par le domaine A durant le cycle fonctionnel de SERCA1a. Cette rotation se fait autour de la normale au plan de la bicouche. Ainsi, durant la transition de SERCA1a de l'état E2 à l'état E1, le domaine A tourne dans le sens antihoraire (Toyoshima and Nomura, 2002) et bloque la phosphorylation du domaine P (Jensen et al., 2006). Cette rotation permet au motif de déphosphorylation ¹⁸¹TGES de se trouver à proximité du site de phosphorylation et d'interagir avec le résidu phosphorylé Asp351. Trois structures permettent d'étudier les détails de la réaction de déphosphorylation. La première structure concerne SERCA1a à l'état E2-BeF₃, qui représente l'état E2P (code PDB : 3b9b (Olesen et al., 2007)). La deuxième structure est celle de SERCA1a à l'état E2-AlF₄⁻ qui représente l'état de transition entre E2P et E2•P_i (fig. 8) (code PDB : 3b9r (Olesen et al., 2007)). Dans cet état, le phosphate (représenté ici par la molécule AlF₄) n'est plus lié covalamment à Asp351, mais reste à proximité du site de phosphorylation. La structure de SERCA1a reproduisant l'état E2P montre

que le domaine $^{181}\text{TGES}$ du domaine A se positionne à proximité du site de phosphorylation (fig. 8). Le résidu Glu183 du motif $^{181}\text{TGES}$ interagit avec le groupe AlF_4^- via une molécule d'eau. La molécule d'eau est correctement positionnée pour réaliser une réaction d'association nucléophile d'ordre 2 et Glu183 agit comme un catalyseur en captant un proton de la molécule d'eau. Ce rôle du résidu Glu183 avait déjà été caractérisé par des travaux de mutagenèse (Clausen et al., 2004). D'autres études de mutagenèse soulignent aussi l'implication des autres résidus du motif $^{181}\text{TGES}$ dans la réaction de déphosphorylation, en particulier les résidus Thr181 et Gly182 (Anthonisen et al., 2006). Enfin, la troisième structure est celle de SERCA1a à l'état $\text{E2}\cdot\text{MgF}_4^{2-}$ qui représente l'état $\text{E2}\cdot\text{P}_i$ (code PDB : 1wpg (Toyoshima et al., 2004)). Elle a été obtenue en présence de MgF_4^{2-} et montre que l'ion Mg^{2+} interagit avec les résidus Asp351 et Glu183 de manière similaire à l' AlF_4^- .

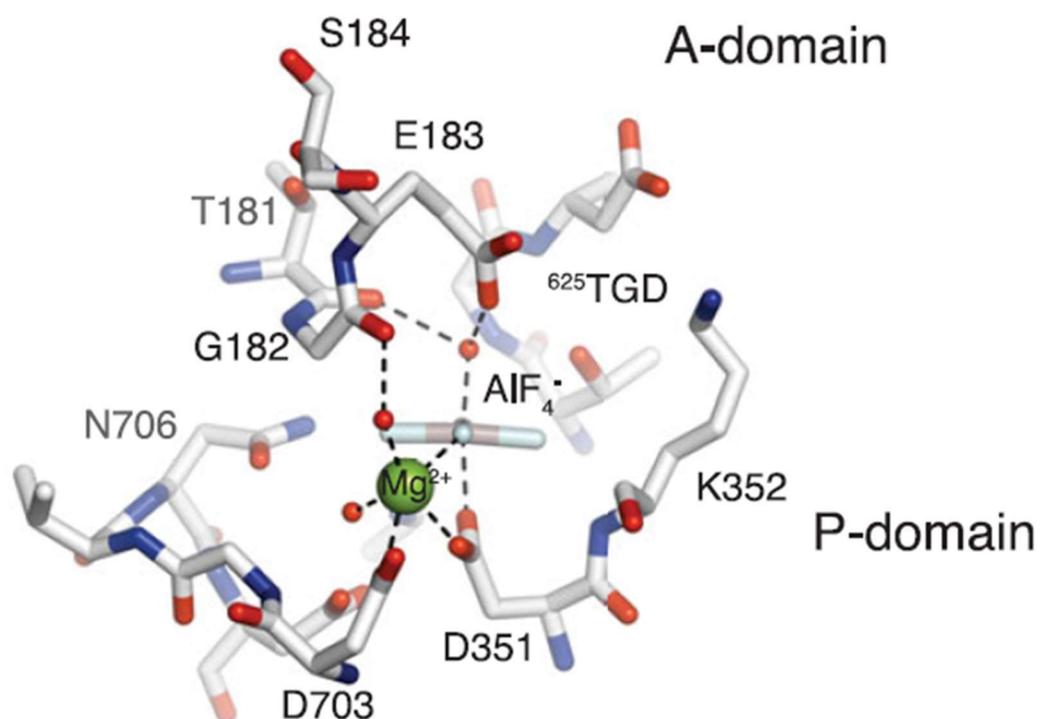


Figure 8 : Représentation de l'interaction entre le motif $^{181}\text{TGES}$ du domaine A et le site de phosphorylation du domaine P issu de la structure de SERCA1a à l'état $\text{E2}\text{-AlF}_4$ (analogue de l'état de transition $\text{E2}\text{-P}$, le groupement AlF_4 mimant le phosphate, code PDB : 3b9r). Les résidus sont représentés en bâtons avec les atomes d'oxygène et d'azote représentés en rouge et bleu, respectivement. Les molécules d'eau et les ions sont représentés par des sphères. Figure extraite de la revue de Møller *et al.*, 2010.

d) Le domaine transmembranaire

i. Structure

Le domaine transmembranaire (domaine TM) est constitué de 10 hélices transmembranaires (TM) qui forment une structure cylindrique ellipsoïdale, d'un diamètre variant de 35 à 40 Å et une hauteur variant de 25 à 30 Å suivant la structure cristalline. Le domaine TM peut être divisé en 3 sous-domaines : deux sous-domaines N-terminaux formés par les paires TM1/TM2 et TM3/TM4, et un sous-domaine C-terminal, composé de TM5 à TM10 et qui forme un faisceau d'hélices compact (fig. 9a). L'étude de la structure de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺ montre que deux ions Ca²⁺ sont fixés à l'ATPase dans deux sites de fixation (appelés site I et site II) situés entre TM4, TM5, TM6 et TM8 (Obara et al., 2005; Toyoshima et al., 2000). La fixation des ions Ca²⁺ implique les chaînes latérales d'acides aminés carboxyliques ainsi que les groupes carbonyles des chaînes principales de certains résidus (fig. 10). Dans le site I, l'ion Ca²⁺ est heptacoordonné, il interagit avec les groupements carboxylates des résidus Glu771 (TM5), Asp800 (TM6) et Glu908 (TM8), ainsi qu'avec les groupements carbonyles des chaînes principales des résidus Asp768 (TM5) et Thr799 (TM6). Deux molécules d'eau interagissent aussi avec l'ion Ca²⁺ situé dans le site I. En ce qui concerne le site II, l'ion Ca²⁺ interagit avec les groupements carboxylates des chaînes latérales des résidus Glu309 (interaction bidentate, TM4) et Asp800 (TM6), ainsi qu'avec les groupements carbonyles des chaînes principales des résidus Val304, Ala305, Ile 307 (tous les 3 situés sur TM4) et Asn796 (TM6). Le résidu Asp800 est le seul résidu commun aux deux sites (Obara et al., 2005; Toyoshima et al., 2000). Dans l'état précédant la translocation ionique, les deux ions Ca²⁺ et les 4 groupements carboxylates auxquels ils sont liés forment une structure électriquement neutre à l'intérieur du domaine transmembranaire.

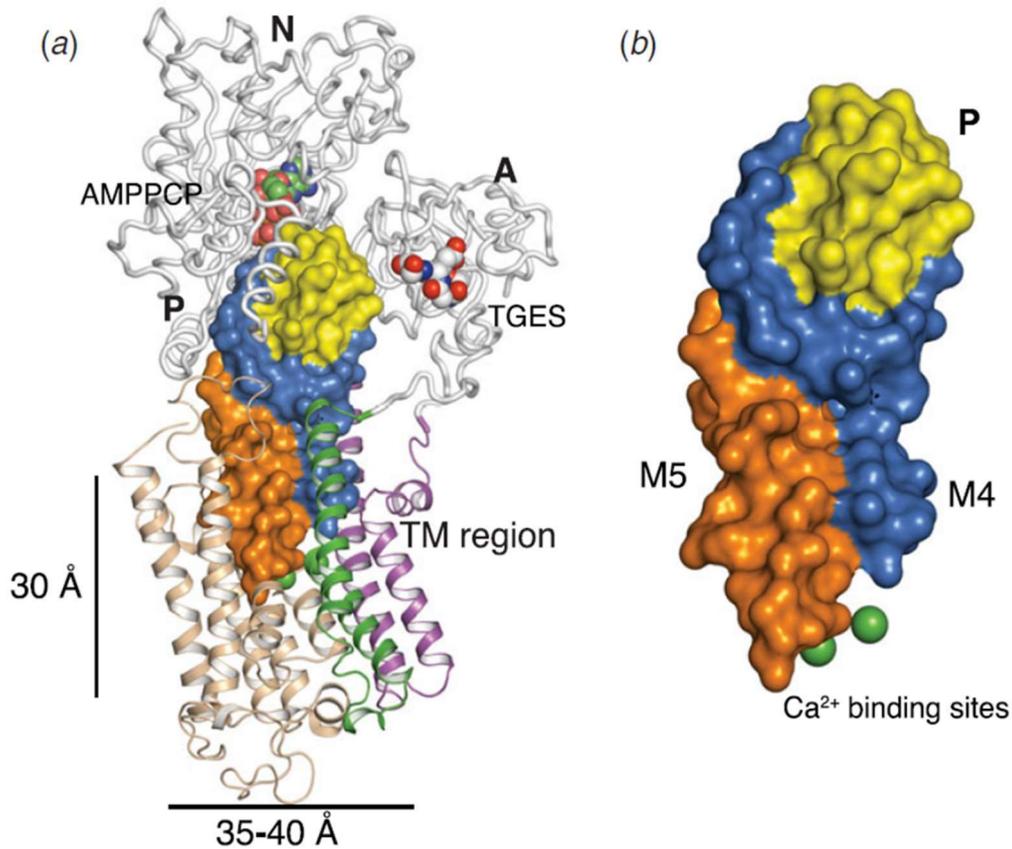


Figure 9 : Le domaine TM et le 5^e domaine de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺:ATP. (a) L'état E1-2Ca²⁺:ATP représenté par la structure de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺:AMPPCP (code PDB : 1t5s). Le domaine transmembranaire est représenté en ruban coloré en violet pour TM1 et TM2, en vert pour TM3 et TM4 et en couleur beige pour TM5 à TM10. Le cœur central est représenté en surface coloré en orange pour la partie de TM5 appartenant au cœur central, en bleu pour la partie de TM4 appartenant au cœur central et en jaune pour la partie du domaine P appartenant au cœur central. Le nucléotide, les ions Ca²⁺ et le motif ¹⁸¹TGES sont représentés en sphères. (b) Le cœur central, représenté en surface en conservant le code couleur de la figure 7a. Figure extraite de la revue de Møller *et al.*, 2010.

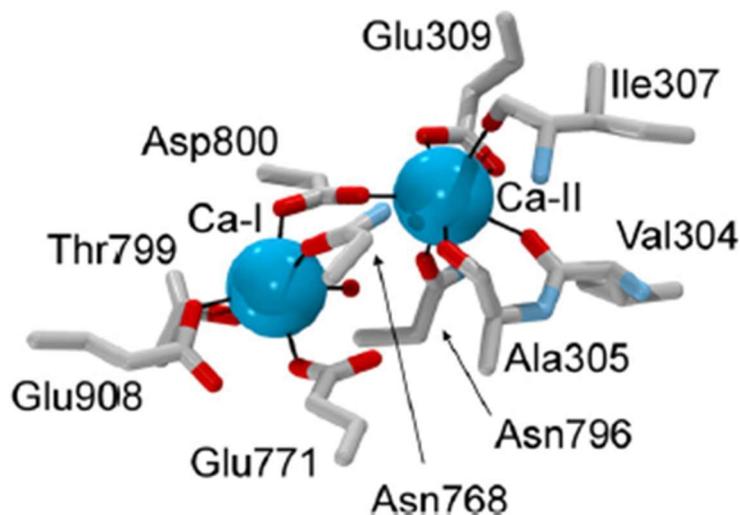


Figure 10 : Les sites de fixation du Ca²⁺ de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺:ATP. L'état E1-2Ca²⁺ ATP est représenté par la structure de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺:AMPPCP (code PDB : 1t5s). Les résidus impliqués dans la fixation des ions Ca²⁺ sont représentés en bâtons avec les atomes d'oxygène et d'azote colorés en rouge et en bleu, respectivement. Les ions Ca²⁺ et les molécules d'eau (une seule visible en utilisant cet angle de vue) sont représentés en sphères de couleur bleu et rouge, respectivement. Figure extraite de l'article de Musgaard *et al.*, 2012.

TM4 (Axelsen and Palmgren, 1998; Møller et al., 1996), TM5 [Nielsen *et al.*, 2003] et TM6 (Soulié et al., 1999) sont des hélices coudées. La présence de ces coudes est due à des motifs structuraux spécifiques, les motifs de Schellman, qui participent à la flexibilité de l'hélice, lui permettant de se courber. A l'issue de l'étude du segment transmembranaire de l'hélice TM6 par RMN, Soulié *et al.* proposent que la flexibilité induite par le motif de Schellman (⁷⁹⁶LVTDGL⁸⁰²) permet d'ajuster la position des résidus impliqués dans la fixation du Ca²⁺ et situés sur ces hélices, optimisant la fixation du Ca²⁺ (Soulié et al., 1999).

ii. Accès aux sites de fixation du Ca²⁺

L'ATPase Ca²⁺, comme la plupart des ATPases de type P et d'autres transporteurs membranaires, fonctionne selon un modèle d'accès alternatif aux sites de transports. Ce modèle est d'ailleurs à l'origine des noms E1 et E2, désignant les états pour lesquels une ATPase a sa cavité de fixation ouverte et apte à fixer un ion et ceux pour lesquels cette cavité est occlue, respectivement (Albers, 1967; Post et al., 1972). En effet, la pompe transportant contre le gradient de concentration, il est nécessaire qu'un état occlu existe pour empêcher le reflux des ions. En ce qui concerne SERCA1a, deux états occlus existent, l'un pour les ions calcium du cytoplasme, l'autre pour les protons du lumen. Dans le cas de l'ATPase Na⁺-K⁺, une autre ATPase de type P, très proche de l'ATPase Ca²⁺, ce sont trois ions Na⁺ qui sont transportés depuis le cytosol vers le milieu extracellulaire, tandis que deux ions K⁺ sont contre-transportés (Yatime et al., 2011).

Le passage emprunté par les ions calcium depuis les sites de transport jusqu'au lumen, a été précisément décrit notamment avec l'obtention des structures de l'ATPase en présence de béryllium fluorure (Olesen et al., 2007; Toyoshima et al., 2007). L'obtention plus récente d'une structure de l'ATPase Na⁺-K⁺ en présence de ouabaine, un inhibiteur spécifique de cette pompe se fixant côté luminal et permettant donc de mimer aussi un état E2P (Yatime et al., 2011), suggère que les deux pompes partagent la même voie de sortie des ions Ca²⁺ pour l'une et Na⁺ pour l'autre. Concernant les voies d'accès des ions Ca²⁺ aux sites membranaires depuis le cytosol, la question a

été longuement débattue. Deux passages sont suggérés (fig. 11), l'un côté N-terminal, passant entre M1 et M2, l'autre côté C-terminal, à proximité de la boucle reliant M6 et M7 (Bublitz et al., 2013).

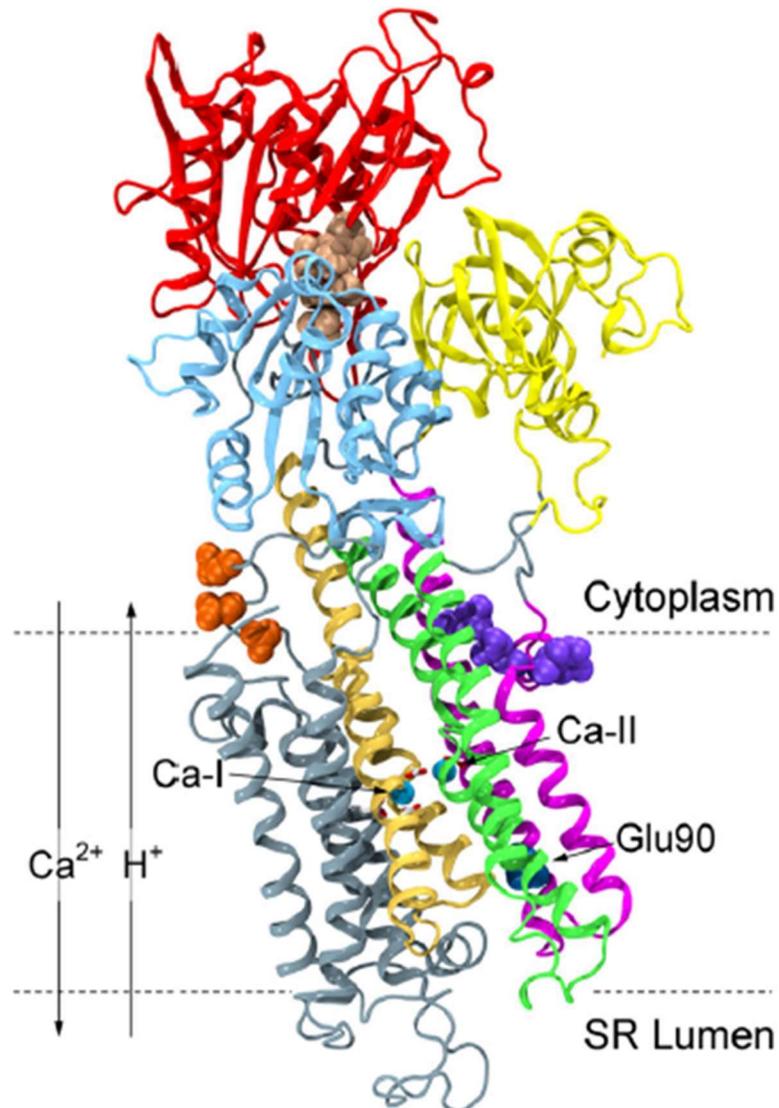


Figure 11 : Les Chemins d'accès aux sites de fixation du Ca^{2+} de SERCA1a à l'état $\text{E1-2Ca}^{2+}:\text{ATP}$. L'état $\text{E1-2Ca}^{2+}:\text{ATP}$ est représenté par la structure de SERCA1a à l'état $\text{E1-2Ca}^{2+}:\text{AMPPCP}$ (code PDB : 1t5s). La protéine est représentée en ruban, avec le domaine N représenté en rouge, le domaine P en bleu, le domaine A en jaune, TM1 et TM2 en magenta, TM3 et TM4 en vert, TM5 et TM6 en ocre et TM7 à TM10 en gris. L'ATP est représentée par des sphères de couleur marron. Les résidus du chemin d'accès N-terminal sont représentés par des sphères violettes, ceux du chemin d'accès C-terminal sont représentés par des sphères orange et le résidu Glu90 est représenté par une sphère bleu sombre. Les ions Ca^{2+} sont représentés par des sphères bleu clair. Figure extraite de l'article de Musgaard et al., 2012.

La première structure de l'ATPase Ca^{2+} obtenue en présence de Ca^{2+} uniquement (Toyoshima et al., 2000) montrait l'existence d'une poche hydrophile à l'aplomb des sites de fixation du calcium, entre les hélices M1, M2, M4 et M6. Dans cette structure, les résidus Glu309 et Asp800 sont directement accessibles depuis le cytosol. Toutefois, cette structure, obtenue en absence de nucléotide et en présence de concentrations très élevées de Ca^{2+} a souvent été critiquée car ne reflétant probablement pas une forme catalytiquement fonctionnelle de l'ATPase (Møller et al., 2010). Toutefois, de nombreux travaux de mutagenèse ainsi que d'autres structures cristallographiques soutiennent cette hypothèse (Inesi et al., 2004; Jensen et al., 2006; Laursen et al., 2009). Des travaux plus anciens d'échanges isotopiques (^{45}Ca) montraient que le Ca^{2+} fixé au site I était bloqué une fois qu'un second calcium est fixé au site II suggérant déjà que les deux ions calcium entraînent « en file indienne » aux sites de transports (Orlowski and Champeil, 1991a, 1991b). En parallèle, de nombreuses études *in silico* ont aussi été réalisées afin d'identifier le chemin d'accès du Ca^{2+} aux sites de fixation. Cependant, les résultats obtenus sont assez divergents selon l'approche choisie (structure de SERCA1a utilisée, positionnement des ions calcium au départ de la simulation, temps de simulation) et montrent une entrée possible des cations soit en N-terminal, soit en C-terminal, soit des deux côtés en même temps (Costa and Carloni, 2003; Fonseca et al., 2007; Huang et al., 2009). Toutefois, une étude plus récente se démarque des autres notamment en utilisant des simulations de dynamique moléculaire plus longues (50 ns contre quelques ns pour les autres) de SERCA1a à partir de l'état E1-2 Ca^{2+} . Cette étude suggère un seul chemin d'accès pour les deux sites de fixation du Ca^{2+} , analogue au chemin d'accès N-terminal décrit plus haut (Musgaard et al., 2012).

Des études de mutagenèse ont toutefois montré que trois résidus aspartates, les résidus Asp813, Asp815 et Asp818 situés sur la boucle cytoplasmique liant TM6 et TM7 avaient un rôle significatif dans la fixation du calcium (Falson et al., 1997; Menguy et al., 1998). De plus, une structure de l'état de transition E2-P obtenue en présence de AlF_4^- à 2.2 Å de résolution (code PDB : 3n5k (Bublitz et al., 2013)) montre la présence de plusieurs molécules d'eau dans une cavité

allongée et étroite, située côté C-terminal, partant du sommet des hélices transmembranaires TM7-TM10 du côté cytosolique et atteignant les résidus impliqués dans la coordination des ions (Asn768, Glu771, Asn796, Asp800 et Glu908). Ce « canal » pourrait faire office de passage pour des ions mais serait trop étroit pour permettre le passage des Ca^{2+} . Plusieurs autres structures ainsi que deux études par dynamique moléculaire ont suggéré l'existence d'un passage C-terminal (Musgaard et al., 2011, 2012; Obara et al., 2005; Toyoshima et al., 2007). A ce stade, il est intéressant d'indiquer que pour la pompe Na^+/K^+ , la plus proche homologue des SERCA, les structures tridimensionnelles ainsi que les expériences de dynamique moléculaire suggèrent aussi l'existence d'un passage C-terminal (Morth et al., 2007; Poulsen et al., 2010; Shinoda et al., 2009) permettant le passage d'un proton nécessaire pour neutraliser le troisième site de fixation du Na^{2+} lors du contre-transport de K^+ .

L'ensemble de ces résultats suggèrent que le passage localisé en C-terminal serait la voie de sortie des protons côté cytosolique. La perte d'affinité pour le calcium observée après mutagenèse dirigée des aspartates de la boucle L6-7 (Asp813, Asp815 et Asp818 ; (Falson et al., 1997; Menguy et al., 1998)) serait la conséquence d'un ralentissement de la sortie des protons, les groupements carboxylate de ces acides pouvant être des sites de fixation intermédiaires, agissant comme des « accélérateurs » de la déprotonation des sites de transports. Des auteurs suggèrent d'ailleurs que l'existence de deux passages côté cytosolique, l'un pour la fixation des calciums et l'autre pour la sortie des protons serait un moyen d'améliorer la coopérativité du système en favorisant le couplage entre transport et contre-transport (Bublitz et al., 2013).

e) Le cœur central

Le cœur central permet au site de fixation du Ca^{2+} et au site de phosphorylation de communiquer, ce domaine contient de nombreux résidus très conservés parmi les ATPases de type P (Møller et al., 1996). Il est formé par l'interaction de différentes parties de SERCA1a (Møller et al., 2010): (i) l'extension cytosolique de TM4, commençant au site de fixation du Ca^{2+} (Glu309) et allant jusqu'au site de phosphorylation (Asp351), (ii) l'extension cytosolique de TM5, commençant aussi au site de fixation du Ca^{2+} (Glu771) et allant jusqu'à la partie C-terminale du domaine P, (iii) la partie C-terminale du domaine P (résidus 699 à 739) (fig. 9). L'ensemble des structures de SERCA1a disponibles montre que, indépendamment des changements conformationnels, les résidus constituant ce domaine forment d'étroits contacts et constituent un ensemble pouvant être structuré différemment suivant l'état du transport ionique. Lorsque les sites I et II de SERCA1a lient le Ca^{2+} , un signal est transmis via le cœur central au site de phosphorylation permettant au résidu Asp351 d'être phosphorylé. À l'inverse, lorsque l'ATPase est phosphorylée, un signal est transmis via le cœur central au domaine TM et permet le transport du Ca^{2+} lié du site de fixation vers le lumen. La nature exacte du signal et la façon dont il est transmis reste inconnue. Scarborough suggère que cette transmission dépend d'un système de relai des charges électriques, opérant principalement via la chaîne principale des résidus liant le site de fixation du Ca^{2+} au site de phosphorylation (Scarborough, 2002). L'importance du cœur central en ce qui concerne la transmission d'un signal entre le site de phosphorylation et le site de fixation du Ca^{2+} , ainsi que dans le transport du Ca^{2+} , est confirmée par des études fonctionnelles de SERCA1a après clivage protéolytique au niveau du cœur central : le clivage entraîne une inactivation et réduit l'affinité de SERCA1a pour le Ca^{2+} du μmol aire au mM olaire (Juil et al., 1995). Cependant, des mutations des résidus composant ce domaine sont généralement tolérées par la protéine et n'entraînent pas de perte de fonction. Ceci est dû à la nature hydrophobe des interactions maintenant le cœur central comme un unique bloc (Garnett et al., 1996; Sorensen and Andersen, 2000), à l'exception des

résidus situés sur l'extension cytosolique de TM4 (Vilsen et al., 1991) et TM5 (Andersen, 1995b), plus précisément ceux situés à l'interface membrane/cytosol.

4. Les transitions entre les états E1 et E2

Au cours de son cycle fonctionnel, des changements conformationnels affectent différentes parties de la protéine. Les changements les plus notables ont lieu lors de deux transitions, la transition de l'état E2 à l'état E1~P, induite par la fixation du Ca^{2+} , et la transition de l'état E1~P à l'état E2P.

a) La transition de l'état E2 à l'état E1~P

La transition de SERCA1a de l'état E2-ATP vers l'état E1~P, permise par l'autophosphorylation de la pompe à partir de l'ATP lié, est activée par la fixation de deux ions Ca^{2+} (Scofano et al., 1979; Stahl and Jencks, 1984; Wakabayashi et al., 1986). Le détail de cette réaction est décrit dans la partie I.3.b du chapitre Introduction traitant du domaine P.

Avant de décrire la transition entre les deux états, il est intéressant de s'arrêter sur les spécificités structurales de SERCA1a à l'état E2. L'analyse de la structure de SERCA1a à l'état E2:AMPPCP représentant l'état E2:ATP (code PDB : 2c88 (Jensen et al., 2006)) montre que le domaine A est tourné en direction du domaine P et interagit avec les domaines N et P (fig. 12a). Cette interaction entre les trois domaines est maintenue grâce à un cœur hydrophobe composé des résidus apolaires entourant le résidu Tyr122 (situé à la base du domaine A), comme le montre des études de mutagenèse dirigée (Wang et al., 2005; Yamasaki et al., 2008). Ces résidus hydrophobes du domaine A entourant Tyr122 interagissent avec les résidus Val705 et Val726 du domaine P. Des interactions sont aussi observées entre des résidus localisés à l'extrémité C_{ter} (188-205) du domaine A et les résidus $^{579}\text{DDSS}$, Glu486 et Arg489 du domaine N. Ces interactions entre les trois domaines cytoplasmiques empêchent le domaine $^{181}\text{TGES}$ d'interagir avec le site de phosphorylation.

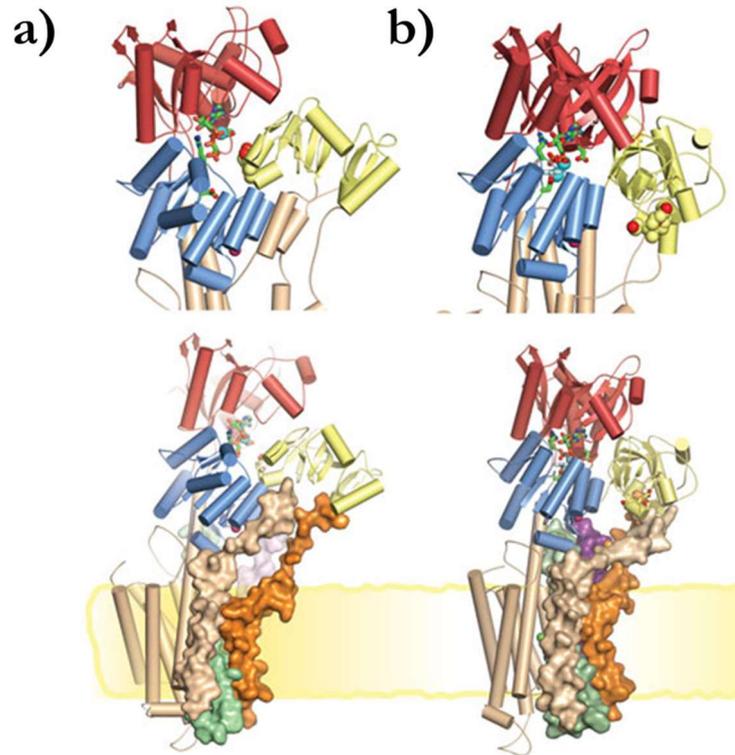


Figure 12 : La transition E2 → E1P. Représentation de la structure de SERCA1a à l'état E2:AMPPCP (représentant l'état E2, code PDB : 2c88) (a) et de SERCA1a à l'état E1~P-[2Ca²⁺] (code PDB : 3ba6) (b). Les domaines N, A et P sont colorés en rouge, jaune et bleu, respectivement. TM1, TM2, TM3-TM4 et TM5-TM6 sont représentés en surface et colorés en orange, magenta, beige et vert, respectivement. Le motif ¹⁸¹TGES est représenté par des sphères de Van der Waals et l'ATP est représenté en bâtons. Figure extraite de la revue de Møller *et al.*, 2010.

Dans la structure de SERCA1a à l'état E2:AMPPCP, l'ATP interagit avec la protéine. Comme expliqué dans la partie I.3.b, le phosphate γ de l'ATP est positionné entre les deux hémisphères du domaine P mais reste toujours éloigné du groupement carboxyle du résidu Asp351 (environ 9-10 Å). Le rapprochement du phosphate γ du résidu Asp351 requiert la fixation des ions Ca²⁺. La fixation des deux ions Ca²⁺ entraîne des mouvements de rotation et de translation des TMs portant des résidus impliqués dans les sites de fixation (i.e. TM4, TM5, TM6 et TM8). Ces mouvements sont transmis aux extensions cytosoliques de TM4 et TM5 composant le cœur central de SERCA1a. Des études de mutagenèse dirigée montrent aussi que des interactions entre la boucle A-M3 (liant l'hélice M3 et le domaine A), la boucle L6-7 (liant TM6 et TM7) et le domaine P permettent aux mouvements dus à la fixation des ions Ca²⁺ d'être transmis à ces régions de la protéine (Clausen and Andersen, 2004; Zhang et al., 2001). En particulier, les mouvements dus à la fixation des ions Ca²⁺ de la région comprenant TM1 à TM4 semblent important car ils consistent

en une translation vers le cytosol ainsi qu'une rotation de cette région qui entraînent un tilt d'environ 20° de l'hélice TM4 (Jensen et al., 2006). Ce réarrangement conformationnel causé par la fixation des ions Ca^{2+} modifie la position du domaine A vis-à-vis des domaines N et P (fig. 12). Ce mouvement du domaine A conduit à un rapprochement de la partie N_{ter} amphipathique de TM1 avec l'extension cytosolique de TM3, clôturant l'accès N-terminal aux sites de fixation du Ca^{2+} (Toyoshima and Nomura, 2002). L'ensemble de ces mouvements permet notamment de rapprocher le phosphate γ de l'ATP du résidu catalytique Asp351 et donc de former l'intermédiaire $\text{E1}\sim\text{P}\text{-}[\text{2Ca}^{2+}]$ (fig. 12b).

b) La transition de l'état E1~P à l'état E2P

La transition de l'état $\text{E1}\sim\text{P}$ à l'état E2P est une étape décisive vis-à-vis du cycle fonctionnel de SERCA1a. Durant cette transition, les ions Ca^{2+} liés au sein des sites de fixation sont transportés à travers la membrane et exposés au lumen du réticulum sarcoplasmique.

Pour comprendre les mouvements accompagnant cette transition, il est nécessaire d'analyser la structure de SERCA1a à l'état $\text{E2}\text{-BeF}_3^-$, obtenue par Olesen et al. (Olesen et al., 2007). L'étude de cette structure mimant l'état $\text{E1}\sim\text{P}\text{-}[\text{2Ca}^{2+}]$ montre que le domaine transmembranaire présente une structure trilobée (fig. 13a). Cette structuration particulière est due à des mouvements latéraux et de rotation des paires TM1/TM2 et TM3/TM4 par rapport au reste du domaine transmembranaire (i.e. TM5 à TM10) qui résultent en un élargissement du canal de transport du Ca^{2+} coté luminal et donc à une exposition des sites de fixation au lumen. Comme le montre la figure 13b, ce changement conformationnel perturbe les sites de fixation du Ca^{2+} . La configuration des résidus interagissant avec le Ca^{2+} à l'état E1 est modifiée, notamment en ce qui concerne le résidu Glu309 qui, à cause des mouvements de rotation et de translation de TM4 vers le lumen, voit sa position changer par rapport aux sites de fixation. La configuration des résidus Asn796, Thr799 et Asp800 est elle aussi modifiée, à cause de la rotation de TM6. Ces trois résidus s'éloignent

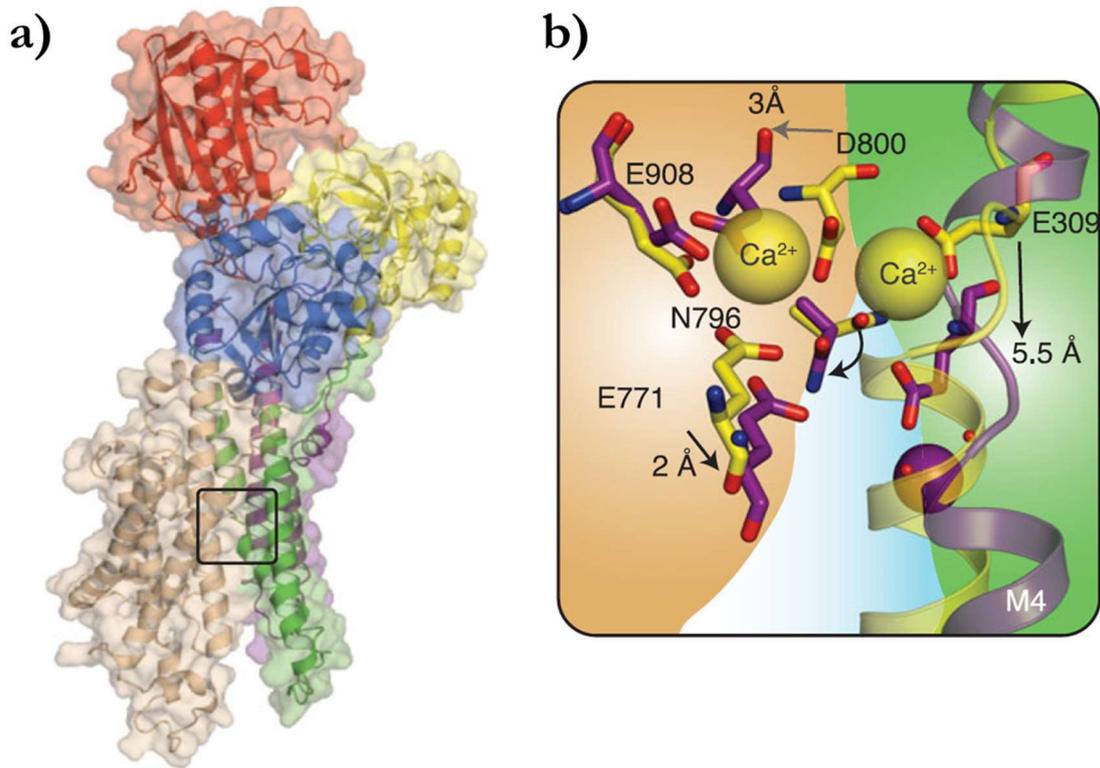


Figure 13 : Ouverture du domaine transmembranaire du coté luminal à l'état E2P. a) Représentation de SERCA1a à l'état E2-BeF₃⁻ (code PDB : 3b9b). La protéine est représentée en surface transparente. Les domaines A, N et P ainsi que TM1/TM2, TM3/TM4 et TM5 à TM10 sont colorés en jaune, rouge, bleu, violet, vert et beige, respectivement. b) Représentation des sites de fixations des Ca²⁺ de SERCA1a à l'état E2-BeF₃⁻ (violet) et à l'état E1~P-AMPPN (code PDB : 3b6a). Les structures ont été superposées sur TM7 à TM10. Figure extraite de la revue de Møller *et al.*, 2010.

des sites de fixation par rapport à la position qu'ils avaient à l'état E1. A l'inverse, la configuration des résidus Asn768, Glu771 et Glu908 n'est pas modifiée durant la transition. Il semble donc que, durant la transition de l'état E1~P vers l'état E2P, le Ca²⁺ lié au site II va suivre Glu309 et rejoindre le Ca²⁺ du site I qui est maintenant lié aux résidus Glu771 et Asn796. Ainsi, la transition est accompagnée par la formation d'un nouveau site de fixation du Ca²⁺ composé des résidus Glu309, Glu771 et Asn796, à partir duquel le Ca²⁺ sera relâché dans le lumen après formation de la structure trilobée. (Andersen, 1995a).

Nous sommes donc confrontés à deux modèles différents permettant d'expliquer la translocation du Ca²⁺ par SERCA1a : le modèle d'Olesen *et al.* basé sur une ouverture du domaine transmembranaire du coté luminal dû à un changement conformationnel du domaine aboutissant à une structure trilobée et le modèle de Toyoshima *et al.* qui est basé sur une ouverture plus

restreinte du domaine transmembranaire dû à un écartement de TM4 et TM6 et aboutissant à la formation d'un canal. Si les modèles divergent, ceci est dû aux différences entre les structures de SERCA1a à l'état E2-BeF₃⁻ obtenues par les deux équipes. Dans la structure de SERCA1a à l'état E2-BeF₃⁻ obtenue par Olesen *et al.*, le domaine A a réalisé une rotation de 120° par rapport à la structure à l'état E1-ADP-AlF₄⁻[2Ca²⁺] (représentant l'état E1~P). Cette différence de position du domaine A a pour conséquence, dans la structure obtenue par Olesen *et al.*, d'entraîner l'écartement des paires TM1/TM2 et TM3/TM4, via les boucles liant le domaine A aux TM1, TM2 et TM3, et permet la formation d'une structure trilobée du domaine membranaire de SERCA1a. (Møller et al., 2010).

Néanmoins, des expériences de mutagenèse dirigée, ainsi que des études fonctionnelles de SERCA1a après clivage protéolytique montrent l'importance des boucles liant le domaine A au domaine transmembranaire concernant la transition E1~P → E2P et semblent confirmer le modèle de Olesen *et al.* (Daiho et al., 2003, 2007). Ces résultats montrent qu'une longueur appropriée de la boucle liant le domaine A à TM1 est nécessaire pour que le motif de déphosphorylation de ce domaine soit proche du site de phosphorylation situé entre les domaines N et P et permette le mouvement des hélices transmembranaires N-terminales (i.e. les paires TM1/TM2 et TM3/TM4). L'effet inhibiteur du clivage protéolytique de la boucle liant le domaine A à TM3 (Møller et al., 2002) et de celle liant le domaine A à TM2 (Lenoir et al., 2004) vis-à-vis de la formation de SERCA1a à l'état E2P, ainsi que l'effet inhibiteur de l'insertion de résidus dans la boucle liant le domaine A à TM3 vis-à-vis de la déphosphorylation de SERCA1a à l'état E2P montrent que ces boucles jouent un rôle primordial dans la translocation du Ca²⁺ et dans le processus de déphosphorylation de SERCA1a à l'état E2P.

5. Les interactions de SERCA1a avec la bicouche

SERCA1a est une protéine transmembranaire enfouie dans la membrane du réticulum sarcoplasmique. L'analyse de structures cristallines de SERCA1a à différents états et en présence de phospholipides avec des chaînes acyles de différentes longueurs et insaturations a mis en évidence la présence de 3 sites d'interaction spécifiques pour les têtes polaires indépendamment des chaînes acyles (Drachmann et al., 2014). Un quatrième site a été identifié également dans d'autres structures cristallines dans le sillon occupé par la thapsigargine (Drachmann et al., 2014). Plus récemment, Norimatsu *et al.* (2017) ont réalisé une étude détaillée du profil d'interaction de SERCA1a avec les lipides en analysant des structures cristallines de SERCA1a à différents états fonctionnels et obtenues à partir de cristaux de SERCA1a solubilisée dans un mélange lipide/détergent. Ces auteurs ont démontré que les interactions avec les lipides diffèrent suivant l'état de SERCA1a (Norimatsu et al., 2017).

Comme mentionné ci-dessus, 4 sites d'interactions ont été décrits à partir de l'étude de la position de lipides (fragments de lipides ou lipides entiers) observés dans différentes structures cristallines de SERCA1a obtenues par diffraction aux rayons X, nommés A, B, C et D (Drachmann et al., 2014). Ces sites que nous allons vous décrire sont aussi représentés sur la figure 14.

Le site A

Le site A est localisé dans une cavité située entre les hélices TM2 et TM4 et faisant face au cytosol. Le site de fixation est composé des résidus Gln108 (situé sur TM2), Ile315, Thr316, Leu319 et Pro337 (tous les quatre situés sur TM4/S4). Les résidus Gln108 et Thr316 fixent le phosphate du lipide via leur chaîne latérale. Les chaînes latérales des résidus Ile315, Leu319 et Pro337 forment une cavité hydrophobe dans laquelle vient se positionner la tête choline du lipide. L'ensemble des structures de SERCA1a où un lipide a été observé dans ce site a été obtenu pour SERCA1a à l'état E2.

Le site B

Le site B est composé des résidus Arg924 (situé sur TM9), Arg989 et Asn990 (tous deux situés sur TM10). Les résidus Arg989 et Asn990 fixent le phosphate du lipide via leur chaîne latérale, tandis que la tête choline du lipide fait face au résidu Arg924. En ce qui concerne la position de la tête choline vis-à-vis d'Arg924, les structures montrent un positionnement de la tête choline proche de la partie hydrophobe de la chaîne latérale de l'arginine. Des lipides ont été observés dans ce site de fixation pour des structures de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺, SLN.E1.Mg²⁺ et à l'état E2.

Le site C

Le site C est localisé dans la cavité formée par TM2, TM6 et TM9, cavité dans laquelle se fixent deux peptides régulateurs de la SERCA1a, le phospholamban (PLN) (Akin et al., 2013) et la Sarcopline (SLN) (Toyoshima et al., 2013; Winther et al., 2013)) (voir partie II du chapitre Introduction pour plus de précision sur ces régulateurs). Ce site est décrit dans certaines structures de SERCA1a à l'état E1 (à l'état E1-2Ca²⁺ et à l'état E1-P), obtenues en absence de SLN. Les résidus Gln108 (aussi présent dans le site A) et Arg324 interagissent avec des lipides dans le site C en fixant le phosphate du lipide via leur chaîne latérale. Le résidu Trp932, situé sur l'extrémité cytoplasmique de TM9, participe aussi à la fixation du lipide tout comme il participe à la fixation des peptides régulateurs.

Le site D

Enfin, le site D est localisé dans une cavité formée par TM3, TM5 et TM7 et dans laquelle interagit la thapsigargine. Le résidu responsable de la fixation d'un lipide dans ce site de fixation est

le résidu Gln259, qui interagit avec le phosphate du lipide via sa chaîne latérale. Des lipides ont été observés dans ce site de fixation pour des structures de SERCA1a à l'état E1-P et à l'état E2.

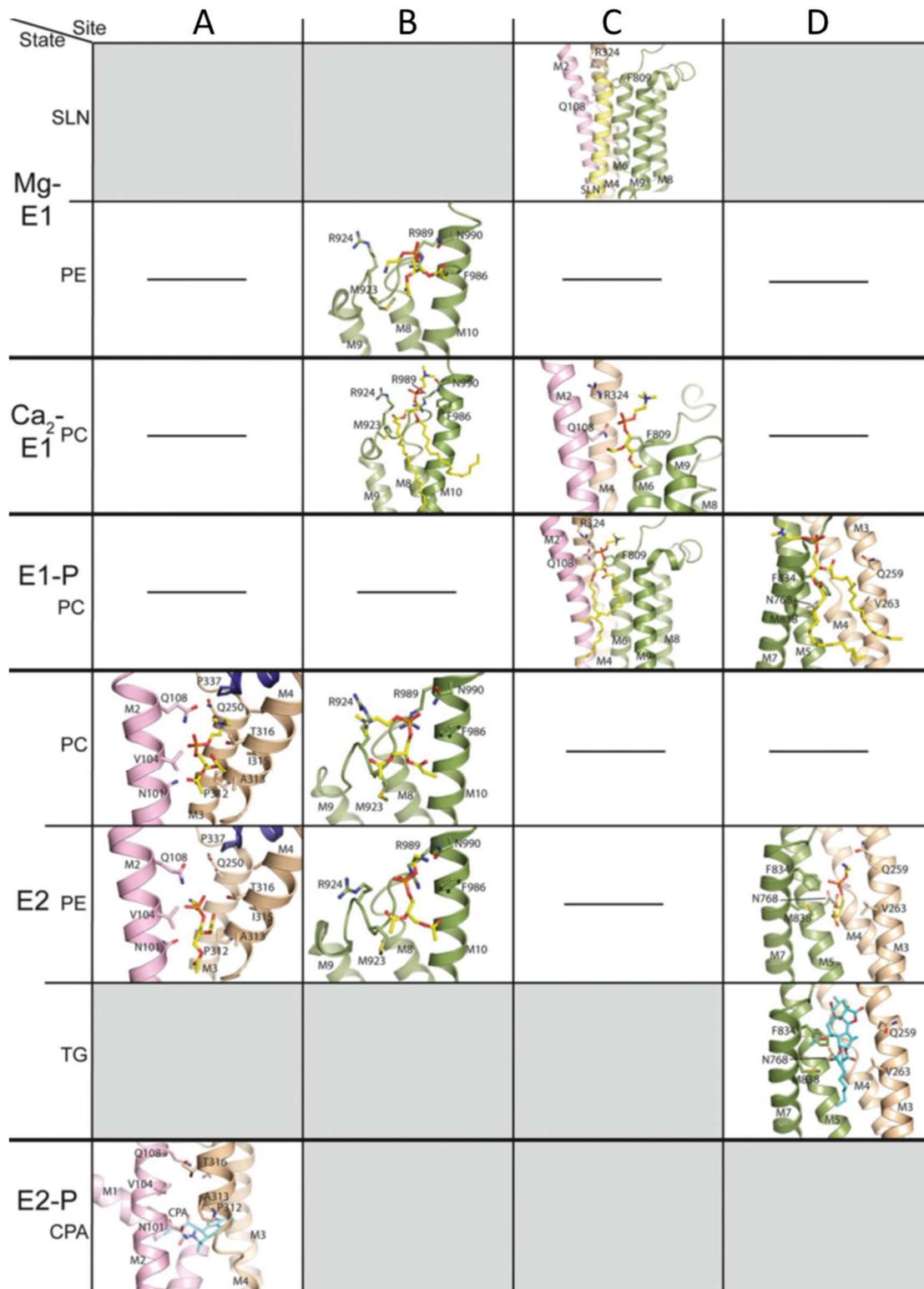


Figure 14 : Sites de fixation des lipides pour les différents états conformationnels de SERCA1a. Données issues de structure cristallographique de SERCA1a. La protéine est représentée en ruban et les molécules et résidus d'intérêt sont représentés en bâtons. Figure extraite de l'article de Drachmann *et al.* (2014).

D'autres interactions entre SERCA1a et la bicouche ont été observées à partir des structures obtenues par diffraction aux rayons X de SERCA1a à différents états, les cristaux ayant été obtenus à partir d'un mélange lipides/détergent/protéine (Norimatsu et al., 2017). Ces structures présentent un nombre important de lipides entourant le domaine transmembranaire de SERCA1a et permettent de déterminer un profil d'interaction protéine-lipide. Or, on observe que ces structures présentent des profils d'interaction différents suivant l'état fonctionnel de SERCA1a et que l'orientation de SERCA1a au sein de la bicouche varie au cours du cycle fonctionnel.

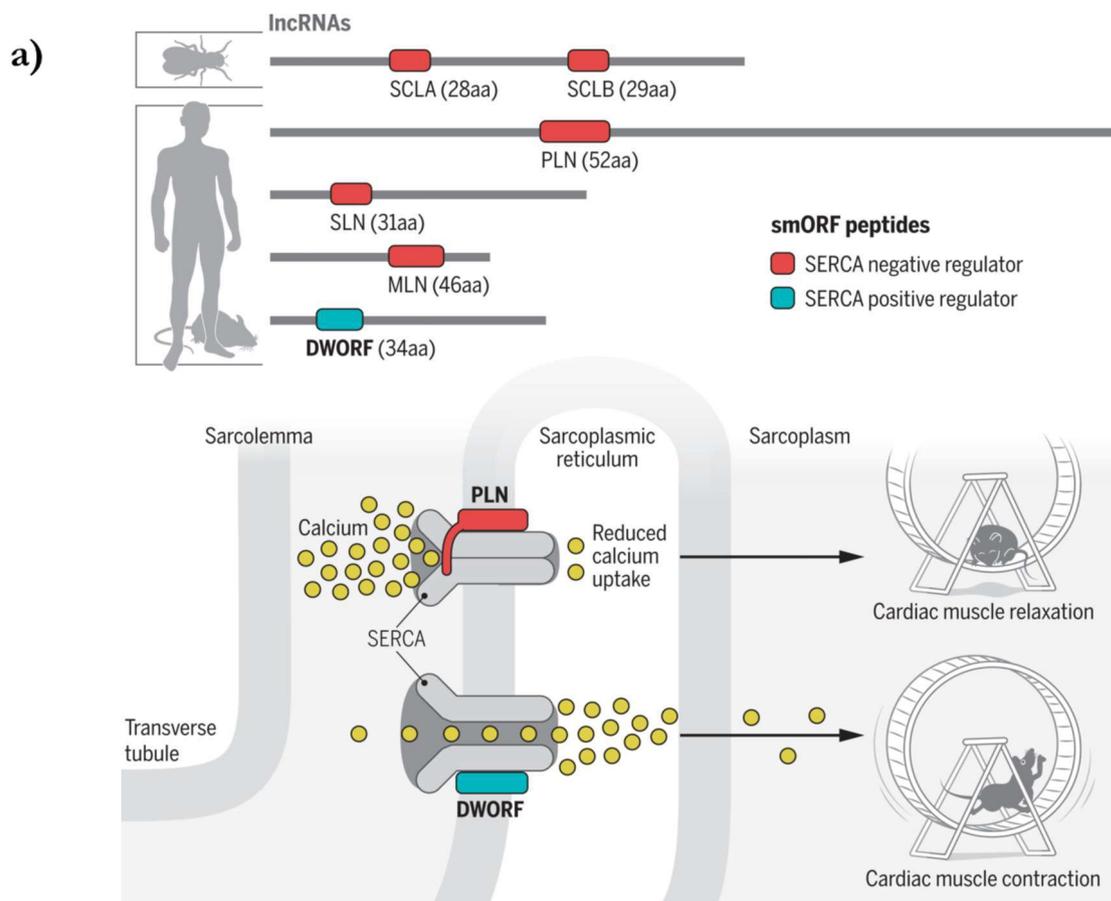
Parmi les résidus décrits comme interagissant avec les lipides de la bicouche, les auteurs distinguent deux familles : les résidus aromatiques, notamment les résidus tryptophane localisés dans les régions exposées aux lipides des TMs. Ces résidus participent à la minimisation énergétique en modifiant l'orientation de leur chaîne latérale, « couchée » sur la bicouche lorsque le résidu est situé à l'interface membrane/solvant et le long de la protéine ou inséré entre deux chaînes aliphatiques lorsqu'ils sont enfouis. Cette flexibilité concernant les chaînes latérales de ces résidus permet à SERCA1a de réduire un éventuel mismatch hydrophobe dû à d'importants mouvements des hélices TM entre elles lors d'une transition conformationnelle de l'ATPase. La deuxième famille de résidus dont l'interaction avec la bicouche est importante pour le fonctionnement de SERCA1a est la famille des résidus basiques arginine et lysine dont les longues chaînes latérales permettent à la protéine d'utiliser les lipides comme point d'ancrage pour modifier son orientation membranaire.

Récemment, Norimatsu et al. (2017) ont obtenu des structures de SERCA1a dans différents états fonctionnels avec un nombre important de lipides en interaction avec la protéine. Les auteurs ont observé 3 des 4 sites d'interaction décrits par Drachmann *et al.* (2014). L'interaction avec le site C n'est pas retrouvée par Norimatsu *et al.* pour SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺, contrairement aux observations de Drachmann *et al.*. Ce site est situé dans la cavité de fixation de la SLN et est notamment composé du résidu Arg324, décrit par Norimatsu *et al.* comme primordial pour accompagner certaines transitions d'états de SERCA1a. Il faut néanmoins garder à l'esprit que,

dans les structures de Norimatsu et al., l'anneau lipidique autour de la protéine n'est pas complet, et l'absence d'interaction dans ces cristaux concernant un résidu ne signifie pas forcément que celle-ci n'est pas possible *in-vivo*. De plus, les cristaux ont été obtenus en présence de DOPC uniquement. Or, la composition en lipides (nature et longueurs de chaînes) est très variable dans le réticulum endoplasmique (Berman et al., 1974; Bick et al., 1998).

II. Les peptides régulateurs de l'activité de SERCA

De nombreux peptides ont été identifiés comme des régulateurs de l'activité de SERCA1a. Le premier peptide régulateur de l'activité de SERCA1a à avoir été identifié est le Phospholamban (PLN) (Kirchberber et al., 1975), suivi de la Sarcolipine (SLN) (Odermatt et al., 1997, 1998a). Plus récemment, l'analyse d'ARNs exprimés chez les mammifères, à l'origine identifiés comme des lncRNA (long non-coding RNAs, des ARNs non codants), ont montré que leur traduction aboutissent à des peptides potentiels régulateurs de l'activité de SERCA1a, tel la Myoreguline (MLN) (Anderson et al., 2015), ou encore DWORF qui agit comme un régulateur positif de l'activité de SERCA (Nelson et al., 2016). Notons aussi le Sarcolamban (SCL) (Magny et al., 2013) qui a été observé chez la mouche *Drosophila Melanogaster* chez laquelle SLN et PLN sont absents (fig. 15a).



b)

Myoregulin	MTGKNWILISTTTPKS-L-EDEIVGRLLKILFVIFVD---LISIIYVVITS-----	46
Phospholamban	MEKVQYLTRSAIRRASTIEMPQQARQKLQNLFINFCLILICLLLCIIVMLL----	52
Sarcolipin	-----MGINTRELFNFTIVLITVILMWLLVRSYQY--	31
Sarcolamban A	-----MSEARNLFTTFGILAILL---FFLYLIYAVL-	28
Sarcolamban B	-----MNEAKSLFTTFLILAFLL---FLLYAFYEAAF	29
	: **: * : : :	

Figure 15 : Peptides régulateurs de l'activité de SERCA. (a) De longs ARN, à l'origine identifiés comme non codants, produisent une famille de petits peptides transmembranaires régulant l'activité de SERCA. Le peptide DWORF prévient la fixation de la SLN, du PLN et de la MLN à SERCA, résultant en une augmentation de la concentration en Ca^{2+} dans le lumen du réticulum sarcoplasmique. Figure extraite de l'article de Payre & Desplan, 2016 (les peptides ELN et ALN, identifiés après la publication de l'article d'où provient cette figure, ne sont donc pas présents sur celle-ci). (b) Alignement des séquences de différents peptides régulateurs de SERCA1a. Les organismes d'où proviennent ces séquences sont Homo Sapiens pour la Myoréguline, le Phospholamban et la Sarcolipine, et Drosophila Melanogaster pour le Sarcolamban. Une étoile * signifie que le résidu est conservé chez toutes les espèces. Un double point : signifie que les résidus ont des fortes similarités. Un simple point . signifie que les résidus ont de faibles similarités. La région hydrophobe partagé par les 5 peptides est représenté en gris. Alignement réalisé avec le serveur Web Clustal ω

Ces peptides transmembranaires présentent tous des similarités dans leur structure et séquence. Une séquence hydrophobe notamment est conservée entre SLN, PLN, MLN et SCL (Anderson et al., 2015; Magny et al., 2013) (fig 15b). Néanmoins, en ce qui concerne les peptides

les plus récemment découverts (i.e. MLN, SCL et DWORF), leurs mécanismes d'action restent à élucider. Dans cette partie II du chapitre Introduction, nous allons donc nous concentrer sur les deux peptides pour lesquels nous avons le plus d'information, i.e. PLN et SLN.

1. Le Phospholamban

Dans les cellules du muscle cardiaque ainsi que dans celles des muscles lisses, SERCA est régulé par le Phospholamban (PLN), un peptide membranaire de 52 résidus. Ce peptide possède une partie N_{ter} cytosolique de 30 résidus et une partie C_{ter} transmembranaire de 22 résidus au sein de laquelle sont retrouvés des motifs hydrophobes communs à d'autres peptides régulateurs de SERCA (notamment avec la SLN, voir figure 15b). PLN, en interagissant avec SERCA, réduit l'affinité de la pompe ATPasique pour le Ca²⁺ mais n'a que peu ou pas d'influence sur la vitesse maximum (V_{max}) de SERCA (MacLennan and Kranias, 2003). L'interaction de PLN avec SERCA1a pourrait être régulée par la concentration cytosolique en Ca²⁺, par l'état de phosphorylation de PLN ainsi que par son état d'oligomérisation. En effet, PLN est en équilibre dynamique entre sa forme monomérique et sa forme oligomérique, la forme pentamérique étant la forme dominante (Jones et al., 1985; Li et al., 1998). La mutation de certains résidus leucine et isoleucine dans PLN déstabilise la structure pentamérique et favorise la forme monomérique. Ces mutations entraînent aussi une augmentation de l'inhibition de SERCA par PLN, suggérant que la forme monomérique est la forme active (Cornea et al., 1997, 2000; Kimura et al., 1997) et que la forme pentamérique serait la forme de stockage (Becucci et al., 2009; MacLennan and Kranias, 2003). Néanmoins, une interaction directe entre le pentamère et SERCA a été proposée (Colyer, 1993; Oxenoid and Chou, 2005; Stokes et al., 2006).

Sous forme monomérique, PLN interagit avec SERCA à l'état E2. L'analyse d'une structure du complexe obtenue par Akin *et al.* (Akin et al., 2013) montre que PLN se lie à SERCA au sein d'une cavité formée par les hélices TM2, TM6 et TM9 de la Ca²⁺-ATPase et la partie N_{ter} de PLN est en contact avec la partie cytoplasmique de l'hélice TM4. Les sites de fixation des ions Ca²⁺ sont

tous les deux modifiés par l'interaction de SERCA avec PLN. L'hélice TM4 montre une perte de sa structure en hélice α au niveau du coude séparant la partie transmembranaire et la partie cytoplasmique de l'hélice TM4. La chaîne latérale du résidu Glu309, situé dans cette région de TM4 et participant au site II de fixation du Ca^{2+} , est éloignée du site I. De plus, les 3 groupements carbonyles de la chaîne principale de cette hélice qui participent normalement au site II de fixation sont eux aussi trop éloignés, rendant le site II inopérant. En ce qui concerne le site I, celui-ci est aussi fortement perturbé par l'interaction de SERCA1a avec PLN. Le contact du peptide avec les hélices TM4 et TM6 de SERCA occlut le site I à tout ion (Mg^{2+} ou Ca^{2+}) car les chaînes latérales des résidus Asn768, Glu771, Asn796 et Asp800 sont trop proches les unes des autres pour permettre la fixation d'un ion. Le résidu Asn34 de PLN joue un rôle déterminant dans la perturbation. La chaîne latérale de ce résidu forme des contacts avec l'oxygène peptidique de Gly801 (TM6) et avec les chaînes latérales des résidus Thr805 (TM6) et Gln108 (TM2). Le résidu Gln108 étant en contact avec la chaîne latérale du résidu Thr317, ceci influe sur le positionnement de la chaîne latérale du résidu Glu309 et participe à la perturbation du site II. De plus, l'interaction du résidu Asn34 avec le résidu Thr805 (M6) initie un repositionnement des résidus 795 à 804 de TM6, perturbant ainsi le site I. Des expériences de mutagenèse dirigée pour lesquelles Asn34 est muté en alanine montrent une perte de la fonction inhibitrice de PLN (Kimura et al., 1997), confirmant le rôle critique de ce résidu dans la fonction de PLN. La perturbation des deux sites de fixation du Ca^{2+} par l'interaction de SERCA avec PLN explique par quels moyens le peptide inhibiteur affecte l'affinité de SERCA pour le Ca^{2+} .

L'inhibition de SERCA par PLN peut être levée par une augmentation de la concentration cytosolique en Ca^{2+} , mais aussi par la phosphorylation de PLN. En effet, PLN peut être phosphorylé sur le résidu Ser16 par la protéine kinase cAMP-dépendante (PKA), ainsi que sur le résidu Thr17 par la protéine kinase II calcium/calmoduline-dépendante (Wegener et al., 1989) ou la protéine Ak (Catalucci et al., 2009). La phosphorylation de PLN a aussi pour effet de déstabiliser

l'équilibre forme monomérique/forme pentamérique en faveur de la forme pentamérique (Cornea et al., 1997).

2. La Sarcolipine

La SLN est le deuxième peptide régulateur de SERCA identifié. Présent dans la membrane du réticulum sarcoplasmique des cellules des muscles squelettiques, SLN est un petit peptide transmembranaire de 31 résidus (voir fig. 15b) inhibant l'activité de SERCA. Ce peptide interagit avec SERCA en se fixant dans la même cavité que PLN, et des similitudes sont observées au niveau du domaine transmembranaire lorsqu'on compare les séquences primaires des deux peptides entre elles (voir fig. 15b). Cependant, les similitudes avec PLN s'arrêtent ici. *In vivo*, SLN interagit préférentiellement avec SERCA1a, isoforme prédominant dans les cellules des muscles squelettiques alors que PLN interagit plutôt avec la SERCA2a majoritaire dans les cellules cardiaques. De plus, à l'heure actuelle, les données disponibles dans la littérature semblent montrer que l'interaction SERCA1a-SLN n'est probablement possible que pour SERCA1a à l'état E1 (Toyoshima et al., 2013; Winther et al., 2013) alors que PLN interagirait préférentiellement avec l'état E2 (Akin et al., 2010; Chen et al., 2006; Toyoshima et al., 2003). Enfin, s'il est clair que PLN inhibe SERCA en diminuant son affinité pour le Ca^{2+} , l'effet régulateur de SLN sur SERCA reste mal compris à l'heure actuelle. Les premières analyses de l'effet de SLN sur la fonction de SERCA1a varient suivant les auteurs mais montrent dans l'ensemble que l'interaction avec SLN diminue modérément l'affinité de SERCA1a pour le Ca^{2+} ainsi que sa V_{\max} (Asahi et al., 2002, 2003; Douglas et al., 2005; Gorski et al., 2013; Hughes and Middleton, 2003; Hughes et al., 2007; MacLennan et al., 2003). Cependant, d'autres résultats montrent que l'interaction de SLN avec SERCA1a n'aurait aucun effet sur l'affinité de l'ATPase pour le Ca^{2+} mais diminuerait sa V_{\max} et entrainerait le découplage de l'activité d'hydrolyse de l'ATP de celle du transport des ions Ca^{2+} (Mall et al., 2006; Sahoo et al., 2015; Smith et al., 2002).

La structure primaire de la SLN varie suivant les espèces (fig. 16). Dans certains cas, le résidu en position neuf est une phénylalanine, chez l'humain notamment (Lanfranchi et al., 1996; Odermatt et al., 1997). Mais pour d'autres organismes, comme le lapin, le résidu neuf est une cystéine (Ohnoki and Martonosi, 1980; Wawrzynow et al., 1992). Il a été montré récemment au laboratoire que cette cystéine peut être acylée avec une chaîne palmitoylé ou oleoylé (Montigny et al., 2014). La S-palmitoylation est une modification post-traductionnelle des protéines qui consiste en l'attachement d'une chaîne de 16 carbones saturés à une cystéine via la formation d'une liaison thioester. Contrairement aux autres acylations, la S-palmitoylation est réversible (Blaskovic et al., 2013; Duncan and Gilman, 1998; Rusch et al., 2011; Siegel et al., 2009; Tian et al., 2012; Tomatis et al., 2010; Zeidman et al., 2009). Le rôle de la palmitoylation des protéines membranaires fait l'objet de nombreux débats. La palmitoylation semble par exemple affecter la capacité d'interaction avec d'autres protéines. Dans certains cas, la palmitoylation est requise pour l'interaction (Lakkaraju et al., 2012), dans d'autre cas, elle empêche cette interaction (Kulahin et al., 2011). De plus, de nombreuses études s'intéressent au rôle de la palmitoylation sur l'association des protéines avec des domaines membranaires spécifiques tels que des domaines enrichis en cholestérol et sphingolipides (Levental et al., 2010) ou même avec des compartiments cellulaires spécifiques (Charollais and Van Der Goot, 2009). Dans ces cas, la palmitoylation participerait à l'adressage des protéines palmitoylées et à leur ségrégation afin de favoriser leur interaction et/ou leur activité. D'un point de vue chimique, la palmitoylation augmente le caractère hydrophobe des protéines ce qui peut

Homo Sapiens	MGINTREL F LNFTIVLITVILMWLLVRSYQY	31
Mus Musculus	MERSTQEL F INFTVVLITVLLMWLLVRSYQY	31
Rattus Norvegicus	MERSTQEL F INFTVVLITVLLMWLLVRSYQY	31
Oryctolagus Cuniculus	MERSTREL C LNFTVVLITVILIWLLVRSYQY	31
Sus Scrofa	MERSTREL C LNFTVVLITVILIWLLVRSYQY	31
Bos Taurus	MERSTREL C LNFTVVLITVILIWLLVRSYQY	31
	* . * : ** : *** : ***** : * : *****	

Figure 16 : Alignement des séquences de la SLN chez différentes espèces. Une étoile * signifie que le résidu est conservé chez toutes les espèces. Un double point : signifie que les résidus ont des fortes similarités. Un simple point . signifie que les résidus ont de faibles similarités. Alignement réalisé avec le serveur Web Clustal ω

impacter leurs interactions au sein des membranes cellulaires avec des partenaires (protéines et/ou lipides) ou avec elle-même. De plus, la palmitoylation des protéines membranaires dans la région proche de leur domaine membranaire pourrait avoir des conséquences structurales importantes telles qu'un basculement de leur domaine membranaire par rapport à la membrane (Abrami et al., 2008; Joseph and Nagaraj, 1995).

Lors des premiers mois de mon doctorat, notre équipe a écrit une revue concernant la Sarcolipine (Barbot et al., 2016) (ci-dessous). Néanmoins, celle-ci ayant été rédigée en 2015 et publiée en 2016, j'ai complété les informations présentées dans la revue avec les résultats concernant la SLN publiés à une date ultérieure à celle de la revue.

a) Revue sur la SLN

Review: Functional and Structural Insights into Sarcolipin, a Regulator of the Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPases.

Chapter 10

Functional and Structural Insights into Sarcolipin, a Regulator of the Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPases

Thomas Barbot, Cédric Montigny, Paulette Decottignies, Marc le Maire, Christine Jaxel, Nadège Jamin, and Veronica Beswick

Abstract Sarcolipin (SLN), a transmembrane peptide from sarcoplasmic reticulum, is one of the major proteins involved in the muscle contraction/relaxation process. A number of enzymological studies have underlined its regulatory role in connection with the SERCA1a activity. Indeed, SLN folds as a unique transmembrane helix and binds to SERCA1a in a groove close to transmembrane helices M2, M6, and M9, as proposed initially by cross-linking experiments and recently detailed in the 3D structures of the SLN–Ca²⁺-ATPase complex. In addition, association of SLN with SERCAs may depend on its phosphorylation. SLN possesses a peculiar C-terminus (RSYQY) critical for the regulation of the ATPases. This luminal tail appears to be essential for addressing SLN to the ER membrane. Moreover, we recently demonstrated that some SLN isoforms are acylated on cysteine 9, a feature which remained unnoticed so far even in the recent crystal structures of the SLN–SERCA1a complex. The removal of the fatty acid chain was shown to increase the activity of the membrane-embedded Ca²⁺-ATPase by about 20 %. The exact functional and structural

T. Barbot • C. Montigny • M. le Maire • C. Jaxel • N. Jamin
Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Commissariat à l’Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Paris-Sud, iBiTec-S/SB2SM/Laboratoire des Protéines et Systèmes Membranaires, CEA-Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette CEDEX, France

P. Decottignies
Pharmacologie et biochimie de la synapse, Neuro PSI, UMR9197, CNRS, Université Paris-Sud, 91405 Orsay CEDEX, France

V. Beswick (✉)
Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Commissariat à l’Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Paris-Sud, iBiTec-S/SB2SM/Laboratoire des Protéines et Systèmes Membranaires, CEA-Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette CEDEX, France

Physics Department, Université d’Evry-Val-d’Essonne, 91025 Evry CEDEX, France
e-mail: veronica.beswick@cea.fr

© Springer International Publishing Switzerland 2016
S. Chakraborti, N.S. Dhalla (eds.), *Regulation of Ca²⁺-ATPases, V-ATPases and F-ATPases*, Advances in Biochemistry in Health and Disease 14,
DOI 10.1007/978-3-319-24780-9_10

153

role of this post-translational modification is presently unknown. Recent data are in favor of a key regulator role of SLN in muscle-based thermogenesis in mammals. The possible link of SLN to heat production could occur through an uncoupling of the SERCA1a-mediated ATP hydrolysis from calcium transport. Considering those particular features and the fact that SLN is not expressed at the same level in different tissues, the role of SLN and its exact mechanism of regulation remain sources of interrogation.

Keywords Sarcolipin • Calcium ATPase • NMR • X-Ray crystallography • Molecular dynamics • Phosphorylation • Protein acylation • Oligomerization • Regulatory peptides • Membrane protein

Abbreviations

SRER	Sarco-endoplasmic reticulum	Endoplasmic reticulum
ER	Endoplasmic reticulum	
SERCA 1a or 2a	Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ -ATPase isoform 1a or 2a	
SLN	Sarcolipin	
hSLN	Human isoform of SLN	
rSLN	Rabbit isoform of SLN	
mSLN	Mouse isoform of SLN	
PLN	Phospholamban	
DDM	<i>n</i> -Dodecyl-β-D-maltopyranoside	
C ₁₂ E ₈	Octaethylene glycol monododecyl ether	
DOC	Deoxycholate	
SDS	Sodium dodecyl sulfate	
DPC	<i>n</i> -Dodecylphosphocholine or Fos-choline-12	
SEC	Size exclusion chromatography	
MS	Mass spectrometry	
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption ionization—time of flight	
NMR	Nuclear magnetic resonance	
ssNMR	Solid state nuclear magnetic resonance	
MD	Molecular dynamics	
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	
DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	
EYPC	Egg yolk phosphatidylcholine	
EYPA	Egg yolk phosphatic acid	
RyR	Ryanodine Receptor	
FCCP	Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone	

1 Introduction

Sarcolipin is a transmembrane peptide (SLN, 31 amino acids) [1] which was first isolated from rabbit fast-twitch skeletal muscle during the extraction of sarco-endoplasmic reticulum (SR) membranes [2]. Purification and solubility analysis of SLN revealed strong interactions with lipids and the presence of fatty acids. Therefore, considering its amino acid sequence similarity with phospholamban (PLN), a Ca^{2+} -ATPase regulatory peptide, it was suggested that SLN interacts both with lipids and the sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA1a) [3, 4].

The main role of SERCAs is to control cytosolic calcium by maintaining SR/ER calcium stores in cells. Calcium is the primary regulator of the contractile machinery and a second messenger in the signal transduction pathways that control, e.g. muscle growth, metabolism, and pathological remodeling. Upon muscle stimulation, Ca^{2+} release by the ryanodine receptor (RyR) localized at the SR membrane transiently increases Ca^{2+} level in the cytosol, triggering actomyosin cross-bridge formation within the sarcomere to generate contractile force. Re-uptake of Ca^{2+} into the SR by SERCAs is necessary for muscle relaxation and restores the Ca^{2+} level for subsequent contraction–relaxation cycles. Several SERCA isoforms have been described with different expression profiles depending on the species, tissues, and even the developmental stage. SERCA1a and SERCA2a isoforms are predominant, and are mainly expressed in the fast-twitch muscle and in the slow-twitch muscle, respectively [5] (Table 10.1 and references herein).

The main steps of the calcium transport cycle are well understood (Fig. 10.1). However, its regulation and especially, the exact role of sarcolipin are still a matter of debate as reviewed below. As a matter of fact, SLN is one of known regulators of SERCA activity in vertebrates as well as phospholamban (PLN, 52 amino acids; [6]) and most probably myoregulin (MLN, 46 amino acids; [7]) (Fig. 10.2). Contrary to SLN and MLN, PLN has been extensively characterized during the last two decades. In invertebrate, an ortholog of these proteins has also been discovered recently and is named sarcolamban (SCL, 28 amino acids; [7, 8]).

In order to contribute to a better understanding of the specific regulator role of SLN upon SERCA activities, we propose, in this review, some critical readings of the published data as well as some additional data. First, SLN gene characterization, its localization in species and tissues and its differential expression during muscle development are presented. Secondly, SLN implications in diseases and thermogenesis are discussed. Then, structural and functional data, including the role of particular amino acid sequence features (phosphorylation, luminal tail, acylation) are reviewed to give a general and new outlook on the topic. Finally, the hypothesis of SLN oligomer formation and SLN interaction with PLN are considered.

Table 10.1 Expression of SLN, PLN, MLN, SERCA1a and SERCA2a in various species and tissues
Levels of expression (mRNA and proteins) of peptides and SERCA

Species	Tissues	SLN						PLN			MLN			SERCA1a			SERCA2a			
		mRNA	Proteins																	
Mouse	Atria	+++ ^a	+++ ^c	+++ ^b																
	Ventricle	- ^a	- ^e	- ^b	- ^d	+++ ^a	+++ ^e	+++ ^a	+++ ^e	- ^a	- ^e	- ^a	- ^e	+++ ^a	+++ ^e	+++ ^a	+++ ^e	+++ ^a	+++ ^e	+++ ^b
	Slow-twitch muscle	+	+	+/- ^b	+/- ^d	+/- ^a	- ^e	+++ ^a	+++ ^e	+++ ^a	+++ ^e	+++ ^a	+++ ^e	+++ ^a	+++ ^e	+++ ^a	+++ ^e	+++ ^a	+++ ^e	+++ ^b
	Fast-twitch muscle	- ^a	+	++ ^b	++ ^d	+/- ^a	- ^e	+++ ^a	+++ ^e	+++ ^a	+++ ^e	+++ ^a	+++ ^e	+++ ^a	+++ ^e	+++ ^a	+++ ^e	+++ ^a	+++ ^e	+
Rat	Atria	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^b																
	Ventricle	- ^a	- ^b	- ^b	- ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^b
	Slow-twitch muscle	+/- ^a	+/- ^b	+	+	- ^a	- ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^b
	Fast-twitch muscle	- ^a	+++ ^b	+++ ^b	+++ ^b	- ^a	- ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^b
Rabbit	Atria	+++ ^a	+/- ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^b														
	Ventricle	- ^a	- ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^b
	Slow-twitch muscle	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^b																
	Fast-twitch muscle	+++ ^a	+++ ^b	+++ ^b																
Pig	Atria	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Ventricle	+/- ^a	+/- ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Slow-twitch muscle	+++ ^a																		
	Fast-twitch muscle	+++ ^a																		

Dog	Atria									+++ ^b
	Ventricle									+++ ^b
	Slow-twitch muscle		- ^b							+ ^b
	Fast-twitch muscle		+++ ^b							+ ^b
Human	Atria		+++ ^c							+++ ^c
	Ventricle									
	Slow-twitch muscle		+ ^d						+ ^d	+++ ^d
	Fast-twitch muscle		+++ ^d						+++ ^d	- ^d

Relative evaluations were performed by measuring the mRNA levels (RT PCR) and the proteins levels (western-blot). Selected references are [12]^a, [13]^b, [16]^c, [14]^d and [7]^e

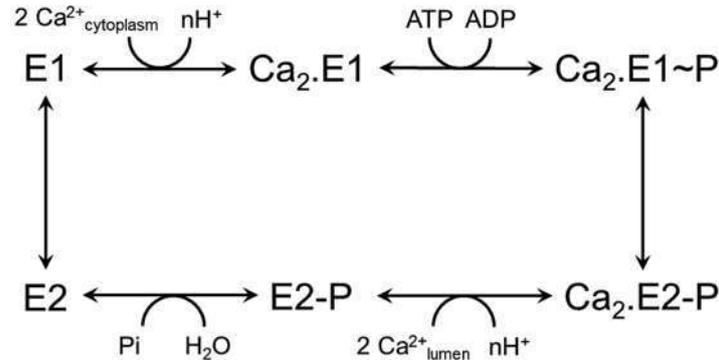


Fig. 10.1 Ca^{2+} -ATPase catalytic cycle. Sarcoplasmic reticulum calcium ATPases catalyze calcium transport from the cytosol to the lumen, coupled with ATP hydrolysis. The main steps of the catalytic cycle are shown here. At physiological pH, two cytoplasmic calcium ions bind to the “E1” high-affinity states. Binding of one Mg.ATP triggers calcium occlusion and it results in autophosphorylation of the ATPase (“ $\text{Ca}_2\text{.E1}\sim\text{P}$ ” occluded state). Then, large conformational changes occur, leading to the calcium deocclusion, the release of the calcium into the lumen, and protonation of the transport sites. The Ca^{2+} -free “E2-P” state is finally hydrolyzed to the “E2” ground state

```

hSLN                               MGINTRELFNFTIVLITVILMWLLVRSYQY
hPLN  MEKVQYLTRSAIRRASTIEMPQQARQKLQNLFINFCILICLLLCIIVMLL
hMLN   MTGKNWILISTTTPKSLEDEIVGRLLKILFVIFVDLISIIYVVITS
dSCL                               MSEARNLFTTFGILAILLFFLYLIYAVL
                                     * * * * *

```

Fig. 10.2 Transmembrane peptides that putatively interact with SERCAs. Alignment of human sarcolipin (hSLN), human phospholamban (hPLN), human myoregulin (hMLN), and their invertebrate ortholog *Drosophila melanogaster* sarcolamban (dSCL). Sequences were aligned with the SEAVIEW program [100]. *Boxed* residues are expected to match with the hydrophobic part of the lipid bilayer. Identical residues are indicated by a *star* and similar residues are *dotted*

2 Sarcolipin Gene Characterization

In human, SLN gene is mapped to chromosome 11q22-q23 [4]. SLN gene (5.6 kb) has two small exons, with the entire coding sequence lying in exon 2 and a large intron (3.9 kb) separating the two segments. Several box elements upstream of the transcription initiation site may correspond to DNA binding sites for transcriptional activators such as (a) the binding site for the myocyte enhancer factor MEF2 in combination with MEF3-like element involved in muscle-specific induction of the aldolase A gene, and (b) the E box-paired sites for MyoD bound in the muscle creatine kinase enhancer [9] and in the acetylcholine receptor α -subunit enhancer [10]. Thus, these DNA binding elements might be responsible for the muscle-specific expression of the SLN gene. The 3' end of the gene contains multiple polyadenylation signals and two transcripts may be produced, one being preferential.

Comparison of human, rabbit, and mouse SLN cDNAs revealed 84 % nucleotide sequence identity between human and rabbit, 44 % nucleotide sequence identity between human and mouse, and 41 % sequence identity between mouse and rabbit SLN cDNAs. The higher level of nucleotide sequence identity between human and rabbit SLN cDNAs is reflected in their identical length and in their use of the same polyadenylation signal sequence for the major transcript. This polyadenylation site is lacking in the mouse SLN gene, which contains another consensus polyadenylation signal sequence downstream. Thus, the mouse cDNA is longer. In terms of translation, nucleotides including the translation initiation signal sequence [11] are not well conserved among the three species [4].

The two other membrane peptides, PLN and MLN, have a similar gene organization. As a matter of fact, the human PLN gene, as the SLN gene, contains two exons and one large intron (6 kb), the entire coding sequence being located in exon 2. The 3' end of the PLN gene also contains multiple polyadenylation signals. Recent genome-wide studies have suggested that hundreds of functional peptides may be also encoded in vertebrate long noncoding RNAs (lncRNAs) notably in humans and mice. While analyzing the evolutionary conservation of lncRNA, Anderson et al. recently identified an annotated skeletal muscle-specific lncRNA and a short 138 nucleotides ORF with the potential to encode a highly conserved 46 amino acid peptide, myoregulin (MLN) [7]. The human and mouse MLN genes consist of three exons that span 16.5 kb and 15 kb, respectively, with the ORF located in exon 3. MLN, the skeletal muscle-specific isoforms of SERCA and the Ryanodine receptor (RyR) are co-regulated by MyoD, suggesting that they comprise a core genetic module important for Ca²⁺ handling in skeletal muscle. Analysis of the 5' flanking region of the MLN gene revealed highly conserved binding sites for the myogenic transcription factors MyoD (E-box) and MEF2. Thus, the MLN gene is a direct target of the transcription factors that activate skeletal myogenesis as the SLN gene [7, 9].

3 Expression of Sarcolipin in Species and Tissues

3.1 Expression of mRNA Encoding Sarcolipin

In order to describe SLN expression at the mRNA level, Odermatt et al. have performed Northern blots analyses by using a human probe against the 3' untranslated region of the cDNA [4]. Using this method, no expression of SLN was found in various human tissues such as brain, placenta, lung, liver, kidney, uterus, colon, small intestine, bladder, and stomach. Only trace amounts were detected in prostate and pancreas. Yet, the SLN transcript was highly expressed in skeletal muscle at least 50-fold more abundant than in heart muscle. By using a similar rabbit probe, a ninefold higher level of the SLN transcript was found in rabbit fast-twitch skeletal muscle (*psaos*) than in slow-twitch skeletal muscle (*soleus*).

SLN expression at the mRNA level and in various species was more recently determined by RT-PCR experiments. Vangheluwe et al. have shown a difference of

SLN mRNA level in small mammals (mouse and rat) as compared to large mammals (rabbit and pig) [12]. Indeed, SLN mRNA was found in *atria* for rodents, while it was detected in *atria*, *soleus* and *extensor digitorum longus* (EDL) for rabbit, and at very high level in *soleus* and EDL for pig. By comparison, PLN mRNA was detected at very high level in ventricles for rodents and rabbit (at lower level for pig), in *atria* for all the species and also in *soleus* for rabbit. In terms of SERCA1a and SERCA2a mRNA, SERCA2a is the only isoform found in heart (ventricle and *atria*) for all studied species, SERCA2a is more expressed than SERCA1a in *soleus* for all the species, and SERCA1a is largely the major form in EDL for all the species except for pig (where SERCA2a is more abundant than SERCA1a) (see Table 10.1).

The SLN expression was also studied at the protein level. To perform such studies, the authors have generated an antibody targeted to a peptide corresponding to the N-terminal sequence (12 residues) of mouse SLN [12]. This antibody reacts to mouse SLN as expected but the authors noticed that this antibody could also cross-react with PLN and, has a very low affinity for rabbit and pig SLN, probably due to sequence diversity at the N-terminus of SLN between small and larger mammals. Consequently, the use of this antibody was restricted to rodents (see Fig. 10.3a for sequences). Western blot analyses of SLN abundance confirmed the expression of SLN in *atria* for rodents. Using a highly specific antibody, targeting the C-terminal sequence (6 residues) of SLN which is conserved among most of the species (see below), Babu et al. have shown that SLN is more abundant in rodent *atria* (mouse, rat) than in *atria* of larger mammals (rabbit, dog) [13]. In rodents' *atria* and ventricles, the high levels of expression of SLN and SERCA2a are correlated, whereas in rabbit and dog, SLN is predominantly expressed in muscle tissues although SERCA2a expression is moderate (see Table 10.1). Recently, SLN was found in human *vastus lateralis* skeletal muscle only in the presence of SERCA1a and, in fast-twitch muscle fibers while PLN is expressed in fast-twitch and slow-twitch fibers, with a preference for slow-twitch fibers, where SERCA2a is predominant [14] (see Table 10.1).

3.2 *Differential Expression of Sarcolipin during Muscle Development*

Babu et al. have studied whether SLN expression may be developmentally regulated [13]. The authors analyzed the temporal pattern of SLN expression in rat *atria*, ventricle, quadriceps, and tongue during embryonic and neonatal development. SLN was detected in the *atria* and its expression level increases throughout development, whereas in the ventricle, its expression level was below detection. At the same development stage, PLN was detected only in heart tissues and the expression level was higher in the ventricles. During embryonic development, the fast-twitch muscle undergoes several transitions from slow- to fast-twitch fibers. Thus, in rat fast-twitch skeletal muscles as the quadriceps muscles, SLN and SERCA2a are expressed at

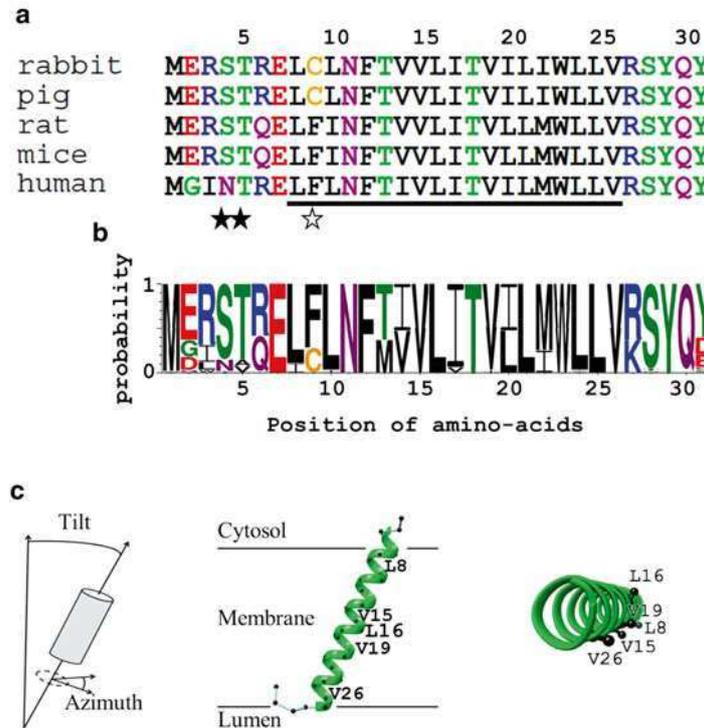


Fig. 10.3 Sarcolipin. (a) The alignment of selected sequences was obtained with the SEAVIEW program [100]. Serine 4 and Threonine 5 were identified as putative phosphorylation sites for Ca^{2+} -calmodulin-dependent kinases or STK16 kinases (*black stars*, [32, 33]). In rabbit and pig, cysteine 9 is constitutively acylated (*white star*, [31]). The region of SLN predicted to match with the hydrophobic part of the lipid bilayer is *underlined*. (b) A sequence logo [101, 102] was obtained from the alignment of 110 sarcolipin sequences (for detailed procedure, see [31]). Color code for panels a and b is the following: acidic residues in red, basic residues in blue, cysteine in yellow, Q and N in pink, other polar residues and glycine in green, and black for hydrophobic residues. The height of the letters corresponds to the relative frequency of each amino acid at a given position. (c) *left*, definition of the tilt and azimuthal angles; *middle*, hSLN helical structure and its orientation within the bilayer, with the N-terminus pointing in the cytosol and the C-terminus pointing in the lumen; *right*, hSLN helix viewed from the luminal side of the membrane [39]. Only the residues of the helix side oriented toward the lumen are depicted. For the sake of clarity, only α and β carbons are represented by small black spheres on right panel

high levels throughout embryonic development. After birth, SLN and SERCA2a protein levels decline and disappear after 21 days. In contrast, SERCA1a expression increases and SERCA1a becomes the predominant SERCA isoform in the adult. In parallel, during mouse embryogenesis, MLN might be expressed in the precursors of skeletal muscle as estimated from the mRNA levels (using northern-blot analysis with a probe specific to the full-length MLN transcript). During foetal and adult stages, MLN mRNA is found in all skeletal muscles, similarly to the expression pattern of SERCA1a, and is not detected in cardiac or smooth muscles [7].

4 Sarcoplipin in Health and Diseases

As human SLN is highly expressed in *atria* and mediates β -adrenergic responses, its involvement in various heart diseases has been investigated. Both at mRNA and protein levels, SLN expression has been shown to be altered in the atrial myocardium disease [15] so SLN is proposed to be a key regulator of cardiac SERCAs. SLN mRNA levels are decreased in *atria* of patients with chronic atrial fibrillation (AF). SLN protein expression level is also significantly decreased both in patients with atrial fibrillation (AF) and in those with heart failure (HF). Although PLN protein level is not altered, PLN phosphorylation is significantly decreased in the atrial tissues of patients with AF and HF compared to control patients. The Ca^{2+} sensitivity as well as the V_{\max} of SR Ca^{2+} uptake is significantly increased in human *atria* from AF patients [16]. In children with congenital heart defects (tetralogy of Fallot), at the mRNA level, SLN and PLN expressions were decreased relatively to SERCA2a and RyR2 expressions [17].

In large mammals and human, SLN is also highly expressed in fast-twitch muscle fibers associated with SERCA1a. Thus, diseases related to muscle dysfunctions have been studied. The Brody disease is an inherited disorder of skeletal muscle function characterized by exercise-induced impairment of muscle relaxation. Studies of the sarcoplasmic reticulum from Brody patients have shown a decrease of the Ca^{2+} uptake and the Ca^{2+} -dependent ATP hydrolysis. As a matter of fact, SERCA1a activity was reduced by 50 % even if the SERCA1a content was reported to be normal in all patients. Mutations in the *ATP2A1* gene encoding SERCA1a have been associated with the Brody disease in some families (called Brody disease with *ATP2A1* mutations), but not in other families (called Brody syndrome without *ATP2A1* mutations) [18]. As SLN interacts with SERCA1a, it was proposed that SLN gene could be altered in Brody disease, because a mutation of SLN could increase inhibition of SERCA1a function. However, no alteration in coding, splice junctions or promoter sequences was found in the SLN gene [4].

The SERCAs and more recently SLN have been proposed to play a key role in non-shivering thermogenesis (reviewed in [19, 20]). Animals lacking brown adipose tissues produce heat from ATP hydrolysis to maintain their body temperature [19, 21]. Moreover, regulation of thermogenesis is critical for cold acclimation [19]. There are functional similarities in the use of the skeletal muscle for thermogenesis across several animals, like fishes, birds, and mammals [19]. De Meis et al. suggested that part of the energy released from the hydrolysis of ATP at the SR, i.e. by the Ca^{2+} -ATPase, could be dissipated as heat, while the other part of the energy would be used to drive the transport of calcium ions through the membrane [22]. As suggested by de Meis et al. this process could involve the release of calcium from the $\text{Ca}_2\text{E}_2\text{-P}$ state in the cytosol instead of in the lumen, yielding a futile hydrolysis of ATP since all the energy would be dissipated as heat. This phenomenon was named slippage or uncoupling [23–25]. Interestingly, the rate of slippage is affected by the presence of sarcoplipin. SLN when co-reconstituted with SERCA1a, increases the rate of uncoupling, resulting in an increase of the heat production whereas the

accumulation of calcium decreases [20]. Using isothermal calorimetry, it was shown that the amount of heat production is maximal at a SLN:SERCA1a 15:1 mol:mol ratio [26]. As reported in Table 10.1, the SLN content of SR depends on the muscle type. Therefore, SLN expression level could vary with the involvement of a given muscle in thermogenesis. This hypothesis gave rise to several studies in order to demonstrate the specific *in vivo* role of SLN in thermogenesis [27]. Recently, SLN was shown to have a protective role against hypothermia and obesity induced by high fat diet using a knock-out mouse model [28, 29]. As a matter of fact, it is suggested that this protective role results from an increase in the uncoupling of the SERCA1a, but also that the ryanodine receptor 1 Ca²⁺ channel may play a role in thermogenesis [28, 30].

5 Structure of Sarcolipin

5.1 Primary Structure

Sarcolipin possesses 31 residues and is composed of three regions (Fig. 10.3a). For most of the species, the N-terminus (1–7) is rich in polar and charged residues as illustrated by Fig. 10.3b. For some species ([31], see also Fig. 10.3b), several charged residues are replaced by neutral or hydrophobic residues, for example ¹MERST for rabbit is replaced by ¹MGINT for human. The N-terminus, oriented toward the cytosol [3], contains potential phosphorylation sites (Ser4 and Thr5) [32, 33]. On the contrary to the N-terminus, the C-terminus amino acid sequence, ²⁷RSYQY, is highly conserved. The central region, from Leu8 to Val26, is mainly composed of hydrophobic residues and possesses, in some species, a cysteine at position 9 that was recently shown to be acylated ([31], see below).

5.2 3D Structure of Isolated Human Sarcolipin

Human sarcolipin structure, at atomic resolution, has been extensively studied by solution and solid-state NMR spectroscopies. Solution NMR spectroscopy is performed on membrane proteins solubilized in detergent micelles. This technique is limited to small membrane proteins due to the large size of protein-detergent complexes and to the internal dynamics of membrane protein within the complex. NMR data yield spatial information, such as range of distances between atoms, which is then applied as experimental constraint during molecular modeling. A set of 3D structures compatible with the NMR data is finally obtained. Solid-state NMR (ssNMR) allows the study of membrane proteins in lipid environments such as lipid vesicles or oriented bilayer systems. ssNMR provides information on the secondary structure adopted by the protein and on the orientation of the helices inside the

bilayer (tilt angle of the helix relative to the direction of the magnetic field and the rotation angle around the helix axis, i.e. azimuthal angle, Fig. 10.3c). It can also give high-resolution information on the side-chain conformations [34, 35].

The solution and ssNMR experiments performed on hSLN solubilized in SDS [36] or DPC [37, 38] micelles as well as embedded in DOPC/DOPE bilayers [39] have revealed that hSLN folds as a unique transmembrane helix. The protein adopts a helical structure from residue Glu7 to Arg27 when solubilized in DPC micelles but extends up to residue Ile3 when embedded in a lipid bilayer. This later result is in agreement with results from molecular dynamics (MD) simulations performed on hSLN inserted in a pure DOPC bilayer [40]. It is noteworthy that the sole structure of human SLN found in the PDB (PDB ID: 1jdm) comes from the oldest data obtained by solution NMR experiments performed on hSLN solubilized in the presence of SDS and are consistent with a shorter α -helix structure defined from residue Phe9 to residue Arg27 [36]. The somewhat shorter helical structure observed in the presence of SDS demonstrates the influence of the nature of the detergent head-group, used to solubilize the protein, on the structure of the N-terminus of hSLN. The transmembrane domain of hSLN solubilized in the presence of DPC encompasses a flexible helix up to residue Ile14 and a more rigid ideal alpha-helix from residue Val15 to residue Arg27 [37, 38]. MD simulation of hSLN in DOPC bilayer confirms the presence of these two different helical flexible regions, responsible for a curved structure [40]. However, Veglia and co-workers have recently proposed that hSLN adopts a helical conformation closer to an ideal helix for the whole sequence from Ile3 to Arg27 when applying solid-state NMR experimental restrained in their simulations [41]. Besides, ssNMR showed that hSLN helix is tilted with respect to the membrane normal. In DOPC/DOPE lipid mixture, the tilt angle is $23 \pm 2^\circ$ [39, 42] in good agreement with the value derived from MD simulations of hSLN in DOPC bilayers which is $28 \pm 6^\circ$ [40] and also with the value obtained by solid-state NMR of hSLN in pure DOPC bilayer [43]. Moreover, experiments and MD simulations have revealed that the residues Leu8, Val15, Leu16, Val19, and Val26 located on the same side of the tilted helix point toward the lumen [39, 40] (Fig. 10.3c). This tilt and this azimuthal position of the helix are driven by the N- and C-terminal residues which undergo specific interactions with the lipid membrane at the water/lipid interfaces. As a matter of fact, MD simulation showed that the N-terminal residues Met1 and Ile3 are located outside the cytosolic interface, the polar residue Thr5, a putative phosphorylation site of SLN [32, 33], interacts with the lipid headgroups as well as Arg6 which forms a salt bridge with the lipid headgroups. On the luminal interface, both C-terminal residues Tyr 29 and Tyr31 interact with lipids via cation- π interactions between the aromatic rings and the lipid choline groups. Arg27 also forms a salt bridge with the lipid headgroups. Moreover, as expected, hydrophobic amino acids are located within the hydrophobic core of the membrane bilayer. The two hydrophilic residues, Thr13 and Thr18, distributed in the center of the lipid bilayer, have their polar hydroxyl groups hydrogen bonded with the backbone carbonyl groups of Phe9 and Ile14, respectively [40].

6 SLN Affects Moderately the Affinity for Ca^{2+} and the V_{\max} of SERCA

The possible role of sarcolipin on SERCA isoforms turnover was investigated in various experimental models. One widespread model since the discovery of sarcolipin involves the heterologous expression of SLN and SERCA isoforms in HEK-293 cells [3]. Cells are simultaneously transfected with several genes coding regulatory peptides like SLN or PLN and a SERCA isoform (SERCA1a or 2a). These cell lines, derived from Human Embryonic Kidney cells (HEK cells) [44] do not appear to express endogenously SLN, PLN, SERCA1a and SERCA2a, and are thus good models to assess the role of SLN on SERCA isoforms. Nevertheless, the presence of partners playing a regulatory role is unknown (e.g. RyR, kinases). The coding sequences were inserted in a pMT2 expression vector, under the control of a SV40 strong constitutive promoter, one obvious drawback is the uncontrolled expression level of the different proteins. This lack of control of the protein expression levels of each partner could explain some discrepancies within the published results. MacLennan et al. first showed that co-expression of rabbit SLN with rabbit SERCA1a in HEK-293 cells results in a moderate decrease in the affinity for calcium ($\text{Ca}_{1/2}$ rises from 0.3 to 0.5 μM in absence or in presence of sarcolipin, respectively) combined with a huge increase in the V_{\max} of about 40 % at micromolar, i.e. saturating, concentrations of calcium [3]. Surprisingly, the same group showed some years later that co-expression in HEK-293 cells of SERCA1a or SERCA2a in presence of SLN resulted in a slight decrease of about 5–10 % of the V_{\max} which is far from the initial results [45–47]. However, the authors confirmed that the presence of SLN induces a moderate but reliable decrease in $\text{Ca}_{1/2}$ for the two isoforms (0.20 and 0.33 μM for SERCA1a, and 0.13 and 0.37 μM for SERCA2a, in the absence and in the presence of SLN, respectively) [45–47]. As mentioned, the stoichiometry is not tightly controlled during co-expression and this could explain the discrepancies of the results obtained for such heterologous expression systems.

Interestingly, Hughes et al. studied the stoichiometry of the interaction between sarcolipin and SERCA isoforms using rabbit SERCA1a prepared from native sarco-endoplasmic reticulum membranes and a synthetic rabbit SLN co-reconstituted in DOPC bilayers [43, 48]. The authors demonstrated that a 10:1 (SLN:SERCA1a) molar ratio is necessary to observe a moderate decrease in calcium affinity and in V_{\max} ($\text{Ca}_{1/2}$ rises from 0.2 to 0.5 μM and V_{\max} decreases from 1.5 to 1.2 $\mu\text{mol hydrolyzed ATP}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, in absence or in presence of SLN respectively). A 3:1 molar ratio has no effect on SERCA1a turnover. This observation was confirmed in similar studies using a value of the SLN:SERCA1a molar ratio after co-reconstitution in EYPC/EYPA bilayers of about 1:1 to 4.5:1 [49, 50]. At low molar ratio, no effect on V_{\max} was found whereas V_{\max} decreased by 20 % at the highest molar ratio. A moderate decrease in calcium affinity ($\text{Ca}_{1/2}$ rises from 0.4, in absence of SLN, to 0.8 μM , in presence of SLN) was found. Moreover, the presence of endogenous SLN (or PLN) in the samples must be considered as it could affect the stoichiometry. As a matter of fact, native sarco-endoplasmic reticulum membranes prepared from rabbit

fast-twitch skeletal muscle already contains endogenous sarcolipin that could reach about 1:1 SLN:SERCA1a mol:mol [3]. We recently demonstrated that most of the sarcolipin remains associated with SERCA1a even after treating the membranes with deoxycholate (*DOC-extracted SR*) and also even after membrane solubilization by mild detergent [31]. Size exclusion chromatography purification of the DDM-solubilized SR shows that the SLN is mainly co-eluted with SERCA1a at about a 1:1 mol:mol ratio. Some SLN is also detected in the mixed micelles peak suggesting that in the SR membrane, the SLN to SERCA1a ratio is higher than 1:1 mol:mol [31]. Therefore, it is suggested that the results presented above based on co-reconstitution experiments were obtained in presence of misestimated amount of SLN [49, 50, 43, 48, 31]. For example, the lack of effect observed at low molar ratio (proposed to be 1:1 SLN:SERCA1a) is not surprising as it is probably related to a molar ratio higher than 2:1 considering the endogenous SLN content. This point appears to be critical for the interpretation of mutagenesis experiments as both wild-type and mutated SLN are present [50]. In addition, as reported in Table 10.2, some experiments were performed with SERCA and SLN isoforms from different species and sometimes within the same experiment. But, as mentioned previously, the amino acid sequences of SLN differ among species especially the N-terminus (Fig. 10.3a, b) [14, 3, 12]. For example, human SLN reconstituted in presence of rabbit SERCA1a has a lower inhibitory effect than rabbit SLN [38, 49, 50]. In the case of rabbit SLN overexpressed in presence of rat SERCA1a or SERCA2a in rat

Table 10.2 $Ca_{1/2}$ and V_{max} estimates in several selected references

SLN ^a	SERCA ^a	Systems used ^b and SLN:SERCA molar ratio ^c	$Ca_{1/2}$ (μ M) ^d		V_{max} ^e (% of SERCA alone)	References
			No SLN	+ SLN		
rSLN	rSERCA1a	HEK-293 cells	0.3	0.5	143	[3]
rSLN	rSERCA1a	HEK-293 cells	0.2	0.33	95	[45, 47]
rSLN	rSERCA2a	HEK-293 cells	0.13	0.37	90	[45, 47]
rSLN	rSERCA1a	DOPC bilayers (10:1)	0.2	0.5	80	[43, 48]
hSLN	DOC-extracted rSERCA1a	EYPC-EYPA bilayers (4.5:1)	0.4	0.6	80	[49]
rSLN	DOC-extracted rSERCA1a	EYPC-EYPA bilayers (4.5:1)	0.4	0.8	70	[50]
hSLN	rSERCA1a	DPC micelles	0.25	0.5	100	[38]
rSLN	rat SERCA1a	Slow-twitch myocytes	0.4	0.4	70	[51]

^a“r” referred to rabbit isoforms, “h” to human isoform

^bHEK-293 cells and myocytes were used for co-expression and possible microsomes preparation. DOPC or EYPC-EYPA bilayers were obtained from co-reconstitution of SR from native sources with recombinant or synthetic SLN

^cMolar ratio does not take into account the possible presence of endogenous SLN

^d $Ca_{1/2}$ corresponds to the amount of calcium necessary to attain half-maximal activity (calcium uptake or turn-over depending on the system used)

^eUnfortunately, values of V_{max} in μ mol.mg⁻¹.min⁻¹ were not available

myocytes (which are deprived in endogenous SLN) no effect on affinity was detected but a significant decrease of about 30 % in calcium uptake and a reduced contractility were observed [51].

To put it in a nutshell, stoichiometry appears to be one of the critical points to assess diligently the effect of SLN on the SERCA1a catalysis. Neither heterologous expression nor co-reconstitution experiments described here gave an accurate estimate of the SLN:SERCA ratio while yet they all agreed that this ratio is important. Nonetheless, it is widely accepted that sarcolipin is an inhibitor of SERCAs but the detailed mechanism of this inhibition remains unknown at the molecular level.

7 Structural Insights into the SLN–SERCA1a Complex from NMR and X-Ray Diffraction Experiments

7.1 *NMR Studies of the Interaction between hSLN and SERCA1a*

Studies of the hSLN–SERCA1a interactions were performed using solution NMR spectroscopy of hSLN upon addition of SERCA1a in the presence of DPC. Analysis of both chemical shifts and peak intensities of SLN signals indicate the existence of three different SLN states: the free, the bound, and the intermediate states at the NMR time scale. The effects of the binding were inferred by analyzing the changes occurring in the intermediate form as the bound state of SLN cannot be detected due to the large size of the SLN/SERCA1a/DPC complex.

Changes in ¹H chemical shifts were used as reporters for structural changes occurring in hSLN upon interaction with SERCA1a. As a matter of fact, these changes are correlated with variations in hydrogen bond interactions or secondary structures upon interaction [52]. The different flexible regions of isolated hSLN previously identified have distinct properties in the presence of SERCA1a. Concerning the N-terminus, residues Met1 through Arg6, except Asn4, do not exhibit significant chemical shift changes indicating that this region remains highly dynamic in the presence of SERCA1a. In contrast, signals from the helical region spanning residues Glu7 through Val26, which contains two dynamical domains, show large chemical shift changes. Signals from Glu7 to Thr18 (except Thr13) display downfield shifts, whereas signals from the C-terminal portion of the transmembrane helix exhibit an increasing upfield shift for all the residues up to Val26. Buffy et al. have suggested that these chemical shift changes could indicate the formation of tighter hydrogen bonds in the region from Glu7 to Val14 and a slight unwinding of the helix from residues Val15 through Arg27, a mechanism analogous to that proposed for the transmembrane domain of PLN [38]. Concerning the unstructured C-terminal tail, all signals, except those of Arg27, are shifted upfield which could reveal a structural change of this amino acid sequence suggesting an interaction of the tail with either the luminal part of the ATPase or the lipids.

7.2 X-Ray Diffraction of the rSLN–SERCA1a Complex

Two recent crystallographic structures of rabbit SLN in complex with rabbit SERCA1a (PDB ID: 3W5A at a resolution of 3.0 Å [53] and PDB ID: 4H1W at a resolution of 3.1 Å [54]) revealed a previously undescribed conformation of SERCA1a in the presence of SLN. This SERCA1a–rSLN complex was obtained in the presence of high concentration of magnesium (40–75 mM) that appears to be essential to stabilize a Ca²⁺-deprived form of the enzyme. Considering the relative position of the ATPase sub-domains and the conditions of crystallization, authors from the two groups suggested that this complex corresponds to a genuine E1 intermediate, i.e. between the protonated E2 form and the Ca₂E1P occluded state (Fig. 10.1). This complex could allow cytoplasmic ion exchange between protons and calcium ions: as a matter of fact, both structures display a large open groove, followed by a deep, funnel-shaped and negatively charged path that leads to the transmembrane Ca²⁺ binding sites, suggesting that this form is prefiguring the Ca²⁺ fixation.

However, the physiological significance of this E1-Mg state is also worth discussion. In both studies mentioned above [53, 54], the structures were solved with the Ca²⁺-free enzyme solubilized in C₁₂E₈, a condition known to cause irreversible enzyme inactivation [55–58]. Besides, the functional role of the E1-Mg state is unclear. On the one hand, Toyoshima et al. concluded that this state is an obligate intermediate in the catalytic cycle of SERCA1a and that Mg²⁺ binding accelerates Ca²⁺ binding by reducing the energy required for formation of a calcium-bound E1 form. On the other hand, Winther et al. concluded differently, that Mg²⁺ binding to the “low-affinity Mg²⁺ sites” actually delays SERCA1a activation by Ca²⁺. Moreover, Akin et al. [59] concluded that the E1-Mg state obtained at 40–75 mM MgSO₄ by Toyoshima et al. and Winther et al. does not exist at a physiological Mg²⁺ concentration (i.e. about 3 mM).

Analyses of both structures [53, 54] reveal that in the complex, rSLN forms a slightly bended membrane-spanning helix, and is associated with SERCA1a within a groove between M2, M6, and M9 transmembrane helices (Fig. 10.4a). Most of the residues located at the interface between rSLN and SERCA1a are hydrophobic amino acids. Those residues form a large hydrophobic cluster (Fig. 10.4b) as represented by the important network of distances less than 4.7 Å between rSLN and SERCA1a hydrophobic side-chains (orange and blue dotted lines). Moreover, rSLN and SERCA1a also show proximities between polar residues. For example, rSLN Asn11 side-chain and SERCA1a Gly801 backbone form a hydrogen bond (Fig. 10.4c), as well as rSLN Glu7 side-chain and SERCA1a Asn111 side-chain (Fig. 10.4d). N-terminal and C-terminal residues of SLN are poorly defined. The local disorder of the electron density maps suggests that no stable interaction involves rSLN C-terminus and SERCA1a in the conditions used for crystallization [54]. These structures are also in agreement with several site-directed mutagenesis experiments: as a matter of fact, MacLennan et al. observed a moderate but significant loss of inhibition after substitution by alanine of SLN Asn11, Val14 and

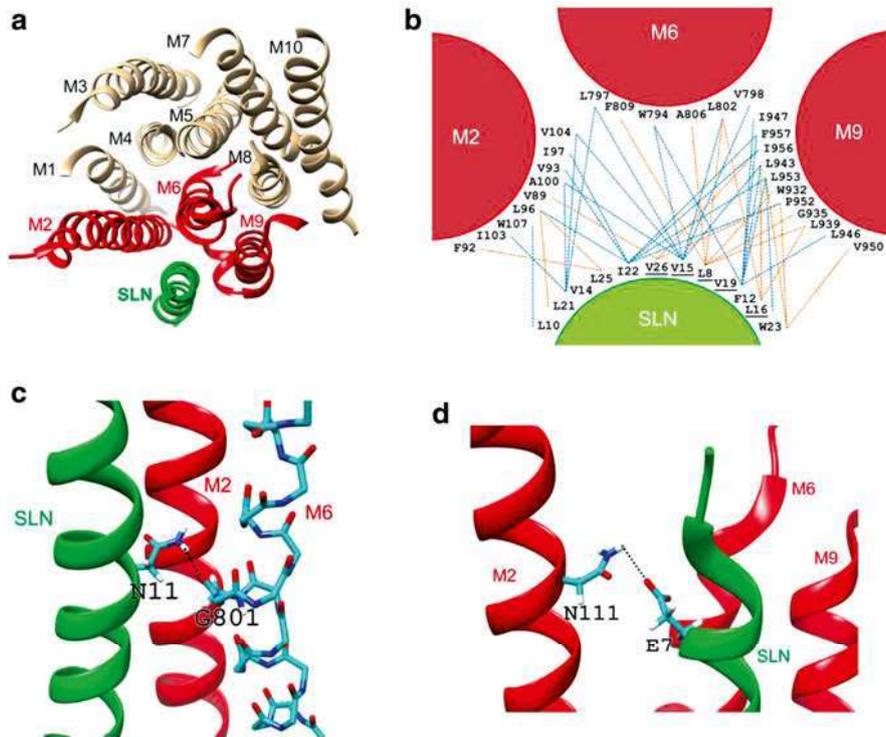


Fig. 10.4 rSLN in interaction with SERCA1a transmembrane domain. (PDB: 4H1W, [54]). (a) rSLN is in interaction with SERCA1a within a groove between M2, M6, and M9 transmembrane helices (viewed from the cytosol). Sarcolipin is depicted as a *green ribbon*. SERCA1a transmembrane helices M2, M6, and M9 are depicted as *red ribbons* and the other transmembrane helices are in *grey*. (b) Scheme of the hydrophobic interaction network taking place at rSLN/SERCA1a interface (viewed from the cytosol). Only the hydrophobic amino acids involved in the interaction network are displayed. SLN residues previously pinpointed in Fig. 10.3c are underlined. A distance of 4.7 Å or less between side-chains is represented by *blue* or *orange dotted lines* for a sake of clarity. (c) rSLN Asn11 side-chain and SERCA1a Gly801 backbone form a hydrogen bond [54]. (d) rSLN Glu7 side-chain and SERCA1a Asn111 side-chain form a hydrogen bond [53]. Residues backbone and side-chains are represented as *sticks*. Carbon atoms are in *cyan*, oxygen in *red*, nitrogen in *blue*, and hydrogen in *white*. Hydrogen bond is represented as a *dotted black line*

Val19 [3]. These authors also showed that substitution by alanine of SERCA1a Leu321 (M4) and Leu802 (M6) trigger SLN dissociation [46]. Additional cross-linking experiments confirmed that the binding sites of SLN and PLN overlap as expected, due to similarities between the SLN transmembrane domain (from Leu8 to Val26) and the membrane-spanning C-terminal segment of PLN [53] (see Fig. 10.2 for sequence similarities).

Because the contacts between rSLN and SERCA1a observed in the E1-Mg structures were similar to PLN-SERCA1a interactions inferred previously from cross-linking experiments [60–64], Toyoshima et al. and Winther et al. postulated

that the E1-Mg state is similar to the state that binds PLN [53, 54]. However, notable structural differences of their respective transmembrane domains indicate that PLN stabilizes a distinct conformation of SERCA1a. The Ca^{2+} binding sites in the E1-Mg structures are partially formed and have a distinctly E1-like appearance. On the other hand, in the metal-free E2 state that binds PLN, the SERCA transmembrane structure is closest to E2 state more than E1 state, leading to the collapse of the Ca^{2+} binding sites [59], suggesting that PLN and rSLN are interacting with different ATPase conformers.

Toyoshima et al. and Winther et al. made hypothesis concerning the binding or not of rSLN to different SERCA1a conformers during the catalytic cycle [53, 54]. Toyoshima et al. proposed that the E1.Mg²⁺ state is the preferred state for binding of rSLN as suggested previously for PLN [65, 46, 60, 64]. These authors suggested that rSLN cannot interact with the Ca₂.E1 and E2 states because, in these states, the position of the helices M2, M4, M6, and M9 leads to a very narrow and a very wide groove, respectively, that will prevent rSLN to bind firmly. Instead, Winther et al. suggested that the E2 state of SERCA1a is compatible with a SERCA1a-rSLN complex as the E2 structure offers a wider binding groove to rSLN [54]. In contrast, in the occluded Ca₂.E1P conformation, the position of the M1, M2, M3, and M4 helices leads to a narrowing of rSLN-binding site thus implicating rSLN dislodgement or a positional rearrangement. Recent cross-linking experiments suggest that rSLN remains in contact with the pump throughout the enzymatic cycle and, are thus in favor of a positional rearrangement of rSLN in interaction with SERCA1a [53]. Bidwell et al. demonstrate that a PLN-SERCA1a interaction remains even in presence of millimolar concentration of calcium or in presence of thapsigargin which may trigger the ATPase in a Ca₂.E1 or E2-like conformation, respectively [66].

8 Focus on Some Particular Features of Sarcolipin

8.1 Phosphorylation

Sequence analysis and site-directed mutagenesis experiments of Ser4 and Thr5 suggested that human, rat, and mouse SLN could be phosphorylated on Thr5 whereas rabbit, cow, and pig could be phosphorylated on Ser4 or Thr5 [33]. In this work, the effect of SLN overexpression and its ability to get phosphorylated were investigated in two different models. Using overexpression of the rabbit SERCA1a isoform in HEK-293 cells, in presence of wild-type (WT), S4A or T5A rabbit SLN, the authors demonstrated that both Ser4 and Thr5 are involved in the ATPase inhibition, Thr5 having probably a more preponderant role than Ser4. It is also shown that phosphorylation could be achieved by the Serine/Threonine-protein Kinase 16 (STK16, [67–70]). The overexpression of mouse SLN in mouse cardiac myocytes obtained from PLN null transgenic mice results in an inhibition of the cardiac function. Treatment with isoproterenol, a β -adrenoreceptor agonist and an activator of the cardiac muscle, resulted in complete restoration of the calcium dynamics in SLN

overexpressing tissues whereas no effect was found in absence of SLN. Therefore, a mechanism for which isoproterenol would act through cAMP signaling to regulate SLN interaction with SERCA isoforms is proposed. Bhupathy et al. demonstrated that a T5A point mutation exerts an inhibitory effect on rat myocyte contractility and calcium transients similar to that of WT SLN, whereas a phosphorylation mimetic mutation, T5E, abolishes the inhibition [32]. The WT and mutated SLN co-localized with SERCA2a in the rat ventricular myocytes sarcoplasmic reticulum. Interestingly, the overexpression of SLN has no effect on SERCA2a and PLN expression levels suggesting that the functional changes observed were really due to SLN. Similar results were obtained previously with PLN null transgenic mice [33], suggesting that SLN may act against SERCA2a independently of PLN (see below). Bhupathy et al. also proposed that SLN phosphorylation depends on the calcium/calmoduline-dependent protein Kinase II (CaMKII) rather on the STK16. The role of STK16 remains unclear whereas the role of CaMKII in heart is better known, especially CaMKII phosphorylates PLN at Thr17 during β -adrenergic-mediated stimulation and could be important for heart function [71–74]. However, no study investigates the possible role of Ser4.

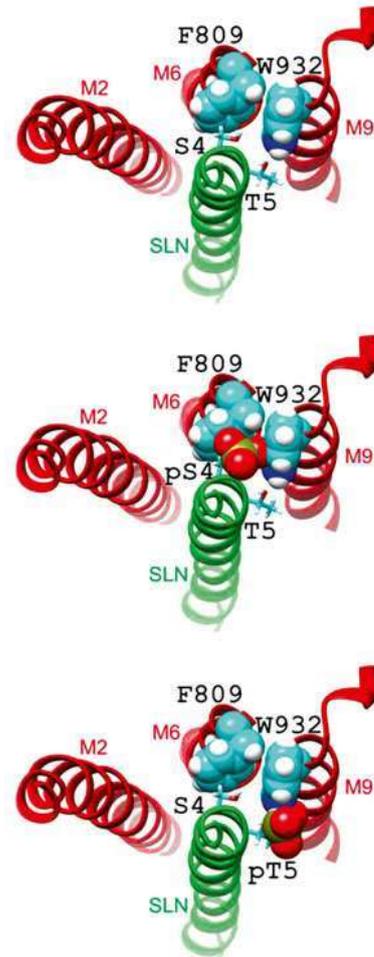
Both Ser4 and Thr5 of SLN are close to SERCA1a Trp932 in the two recent structures of the SLN–SERCA1a complex [53, 54] and, molecular modeling of the phosphorylation of these two residues (Fig. 10.5) shows that in both cases, phosphorylation may induce steric clashes with Trp932 leading most probably to SLN and/or SERCA1a conformational changes. As a consequence, these conformational changes could induce dissociation of the complex as suggested by Toyoshima et al. [53].

Among 67 unique SLN sequences, most of them include a Ser and a Thr residue at positions 4 and 5, respectively, except for the rhinoceros which contains two successive threonines [31]. All the primates (9 species), including human, contain only Thr5, Ser4 being replaced by an asparagine (S4N). Note that Trp932 of SERCA isoforms 1a and 2a are fully conserved among mammals suggesting that some local rearrangement of the ATPase and/or the SLN N-terminus could take place when either Ser4 or Thr5 are substituted. Interestingly, most of the sequences from fishes (7 species among 8) contain only a serine at position 4, the threonine being replaced by an alanine (T5A) or a valine (T5V). Assuming that the regulatory mechanism of SERCA isoforms (and of muscle contraction) is conserved among species, i.e. dissociation of SLN from SERCA1a induced by phosphorylation, Ser4 will be a candidate for phosphorylation in fishes. Indeed, kinases like CaMKII are poorly specific [75] and thus, both Ser4 and Thr5 can be phosphorylation targets.

8.2 *The RSYQY Luminal Tail*

The C-terminus amino acid sequence of SLN, Arg²⁷-Ser-Tyr-Gln-Tyr (RSYQY tail), appears critical for its proper localization at the endoplasmic reticulum membrane, as it acts as an ER retention signal. Progressive amino acid deletion revealed that removal of the Arg27-Tyr31 sequence results in a misrouting of SLN. Interestingly, when the deleted form of SLN is co-expressed with SERCA2a,

Fig. 10.5 Phosphorylation of rSLN Ser4 and Thr5. View from the cytosol of rSLN surrounded by the transmembrane helices M2, M6, and M9 of SERCA1a (PDB: 4H1W, [54]). *Top*: native rSLN; *middle*: model with rSLN Ser4 phosphorylated (*pS4*); *bottom*: model with rSLN Thr5 phosphorylated (*pT5*). Sarcolipin is depicted as a *green ribbon*. SERCA1a transmembrane helices M2, M6, and M9 are depicted as *red ribbons*. rSLN Ser4 and Thr5 side-chains are depicted as *sticks*. SERCA1a Phe809 and Trp932 side-chains are depicted as Van der Waal's spheres. Phosphorylated side-chains were modeled using UCSF Chimera software [103] and are depicted as Van der Waal's spheres. Carbon atoms are in cyan, oxygen in *red*, nitrogen in *blue*, phosphorus in *bronze*, and hydrogen in *white*



misrouting is abolished and this shortened form is stably expressed and properly co-localized with SERCA2a at the ER. It suggests that in presence of sufficient amount of a SERCA isoform, SLN can be addressed to the ER independently of its tail. However, it has been reported that in absence of SERCA, SLN may accumulate in the ER via interactions of its luminal tail with another partner [76].

A key role of this C-terminal tail for catalysis was pointed out early by MacLennan et al. [3] who showed that a C-terminally FLAG tagged version of SLN does not affect SERCA1a activities as WT or N-terminally tagged (NF) SLN isoforms. As a matter of fact, human, rat or rabbit SLN (hSLN, rat SLN, and NF-SLN respectively) induce a moderate decrease of $Ca_{1/2}$ (shifted from 0.35 μ M in absence of SLN to 0.5 μ M when SLN is co-expressed with SERCA1a in HEK-293 cells) and a significant increase of the Ca^{2+} uptake activity up to about 140 %. On the

other hand, co-expression of a C-terminally FLAG tagged rabbit SLN (SLN-FC) and SERCA1a resulted in a significant decrease of both $Ca_{1/2}$ (shifted from 0.35 μ M to 1.1 μ M) and V_{max} (only 62 % of the SERCA1a alone). To investigate the role of the tail in the regulation of SERCA1a, alanine mutants of the tail were co-reconstituted with native SERCA1a within proteoliposomes (SERCA1a:SLN:lipids 1:4.5:120 m:m:m, i.e. molar ratio close to those of native SR, [49, 50]). This study showed that, compared to the WT SLN, all the alanine mutants induced a lower inhibition of the SERCA1a, i.e. a moderate decrease of the affinity for calcium and a slight decrease of the V_{max} , except the Y31A mutant which induced an increase of the V_{max} despite a poor effect on the $Ca_{1/2}$ [50]. Note that these results are not in agreement with those previously published by MacLennan et al. [3]. Later, this group demonstrated that modifications of the tail sequence could trigger a misrouting of SLN as described above [76] suggesting that in HEK-293 cells, improper trafficking of mutated SLN was not taken into account in previous experiments. As a consequence, the co-reconstitution model seems to be a better model to investigate the effect of a complete amino acid deletion of the tail. Co-reconstitution of a Δ R27SLN with SERCA1a led to a smaller inhibition of the SERCA1a than for entire SLN ($Ca_{1/2}$ and V_{max} are closer to the SERCA1a alone values) [50]. However, in that model, the SERCA1a is from native rabbit SR membrane which already contains endogenous rabbit SLN. As mentioned above, SLN remains associated with the SERCA1a even after deoxycholate extraction or solubilization with mild detergent and subsequent purification [31]. Therefore, results from Gorski et al. were probably obtained in the presence of both endogenous WT SLN and recombinant—WT or mutated—SLN. However, considering the fact that a significant molar excess of SLN was used, those results suggest that SLN luminal tail is essential for the inhibition of the SERCA1a by SLN. The high degree of amino acid conservation of the Arg²⁷-Tyr-Gln residues also suggests a critical functional role of this sequence of SLN, a role that has survived evolutionary divergence [76, 31] (Fig. 10.3b). While SLN inhibition properties may reside in its luminal tail, most of the inhibition properties of PLN depend on its transmembrane region. As a matter of fact, the amino acid C-terminus sequences of SLN and PLN are rather different: Arg²⁷-Ser-Tyr-Gln-Tyr (RSYQY tail) for SLN and Met⁵⁰-Leu-Leu (MLL tail) for PLN in mammals. Furthermore, myoregulin is deprived of such a tail (Fig. 10.2), suggesting a mechanism of inhibition proper to each regulatory peptide. Recently, a very different amino acid sequence of the luminal tail was reported [77] for a zebrafish isoform of PLN (zfPLN) that comprises additional residues, Leu⁵⁰-Leu-Ile-Ser-Phe-His-Gly-Met (⁵⁰LLISPHGM). This luminal tail has different functional properties than those of SLN and other PLN isoforms and can only regulate SERCA1a in the context of the full primary sequence of zfPLN. Deletion of this tail resulted in a loss of inhibition by zfPLN and, a zfPLN-SLN_{tail} chimera restored the inhibition. A chimera composed of the human PLN and the luminal tail of zfPLN shares the same functional properties as human PLN suggesting that this tail is efficient only in a zebrafish context [77]. C-terminal residues are poorly defined in the two published crystal structures of the SLN-SERCA1a complexes due to missing electron density which probably reflects a high flexibility of this region [53, 54].

Thus, the hypothesis concerning the interaction between the luminal tail of SLN and the SERCA1a derived from experimental data [46, 50] could not be confirmed from these structures. However, solid state NMR studies showed that the peptide encompassing the five C-terminal residues (R²⁷SYQY) interacts with SERCA1a. Moreover, this peptide inhibits the ATPase activity, yet it has no effect on the Ca_{1/2}. Using various peptides differing by their length and amino acid composition, the authors proposed that the positively charged residue Arg27 may be important in stabilizing the interaction of the luminal tail with the SERCA1a, possibly through salt bridge formation, and that Tyr29 and Tyr31 could participate in π - π or π -cation interactions with residues from the luminal face of SERCA1a [43]. These interactions could not be confirmed by the crystal structures of the SLN-SERCA1a complexes due to the poorly defined structure of the C-terminal residues of SLN and of the luminal loop between M1 and M2.

8.3 *S*-Palmitoylation and *S*-Oleoylation of Cysteine 9

Recently, our group showed that native rabbit SLN is modified by a fatty acid anchor on its unique cysteine residue (Cys9) with a palmitic acid or, surprisingly, an oleic acid in a ratio of 60 % and 40 %, respectively [31]. Treatment with hydroxylamine removes the fatty acids from a majority of the SLN pool and apparently without any modification on the SERCA1a. Mass spectrometry analysis of SEC-purified samples after several hours of incubation confirmed that SLN is satisfactorily deacylated and that it remains associated with the SERCA1a even after solubilization by mild detergent like *n*-dodecyl- β -D-maltopyranoside (DDM) or octaethylene glycol monododecyl ether (C₁₂E₈) and successive purification of the complex by size exclusion chromatography [31]. This treatment does not modify the affinity of SERCA1a for Ca²⁺ but it results in an increase of the Ca²⁺-dependent ATPase activity of native SR membranes indicating that the S-acylation is required for full inhibitory effect of rabbit SLN on rabbit SERCA1a (Fig. 10.6). Deacylation does not affect the stability of the Ca²⁺ATPase over time, neither in a native membranous context nor after solubilization by mild detergent (*unpublished results*).

Sarcolipin is most probably acylated in the crystals [53, 54] as we found SLN acylated when it was purified in conditions very similar to the crystallization procedure [31]. Although no electron density exists to describe the position of the acyl chain (probably a consequence of a local disorder in the crystals), we propose a model of SLN palmitoylated on Cys9 in complex with SERCA1a and embedded in a POPC bilayer (Fig. 10.7). The acyl chain was grafted on the SLN Cys9 within the crystal structure of the complex [54]. As shown in Fig. 10.7, the acyl chain is inserted in the upper leaflet of the membrane and faces the lipids as Cys9 is located on the opposite side of the helix interaction side. It suggests that the acyl chain is probably not directly in contact with the Ca²⁺-ATPase.

Alignment of 67 SLN amino acid sequences from different species shows that 19 of them contain a cysteine and the remaining sequences a phenylalanine at position 9. As an example, we demonstrated that pig SLN, obtained from *extensor digitorum*

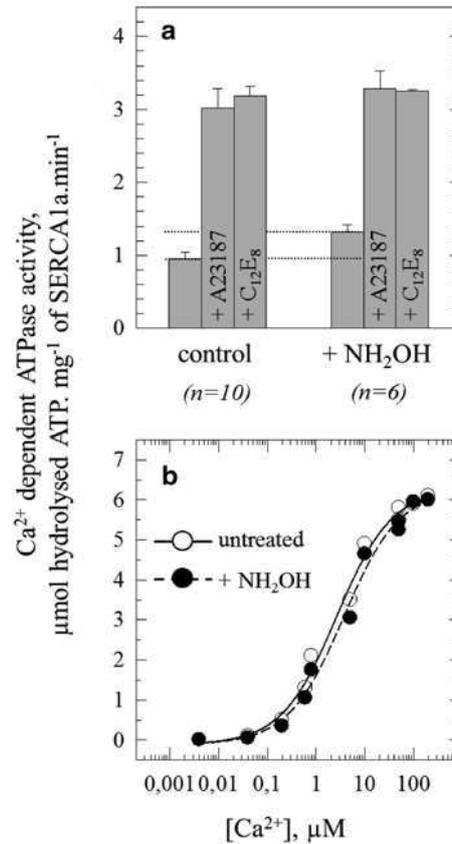


Fig. 10.6 Hydroxylamine treatment of SR membranes results in an increase of calcium ATPase activity but has a moderate effect on the apparent affinity for calcium. **(a)** Effect of hydroxylamine on ATPase activity. Rabbit SR membranes were initially suspended at 4 mg mL⁻¹ in the assay buffer and stored on ice. When employed, an equal volume of a freshly prepared 2 M hydroxylamine solution (NH₂OH, pH adjusted at 7.5 with saturated Tris) was added prior to incubation at 20 °C for 1 h. As a control, an equal volume of buffer was added before incubation at 20 °C for 1 h. ATPase activity was estimated by an enzyme coupled assay as described previously [57] at pH 7.5 in presence of 50 µM free calcium (see [31] for further details). **(b)** Ca²⁺ dependency of the ATPase activity. ATPase activity was again measured by a coupled enzyme assay as described previously. The medium was first supplemented with 50 µM Ca²⁺ and subsequently with final Ca²⁺ concentrations of 100 or 200 µM, and then, various concentrations of EGTA were added sequentially, to explore the effect of lower free Ca²⁺ concentrations ([Ca²⁺]_{free} was estimated according to [104]). The medium also contained 0.1 mg/mL SR vesicles which have been formerly treated with 1 M hydroxylamine for 3 h at 20 °C (black symbols and dashed line) or not (3 h at 20 °C in absence of hydroxylamine; empty symbols and continuous line). Final concentration of hydroxylamine in the cuvette was 5 mM and has no effect on the enzyme coupled assay. These experiments have been done twice, each data point being the mean, and these data were fitted to Hill equations. *Error bars* were not indicated as they were smaller than the size of the symbols. The estimated Ca_{1/2} for untreated and NH₂OH-treated SR are 2.3±0.3 µM (pCa=5.64) and 3.2±0.5 µM (pCa=5.49), respectively. Note that our values are higher than those indicated by MacLennan et al. who did the measurements at pH 7 [46], in conditions where the E2 to E1 equilibrium is pulled toward E2 resulting in slightly lower Ca_{1/2} values

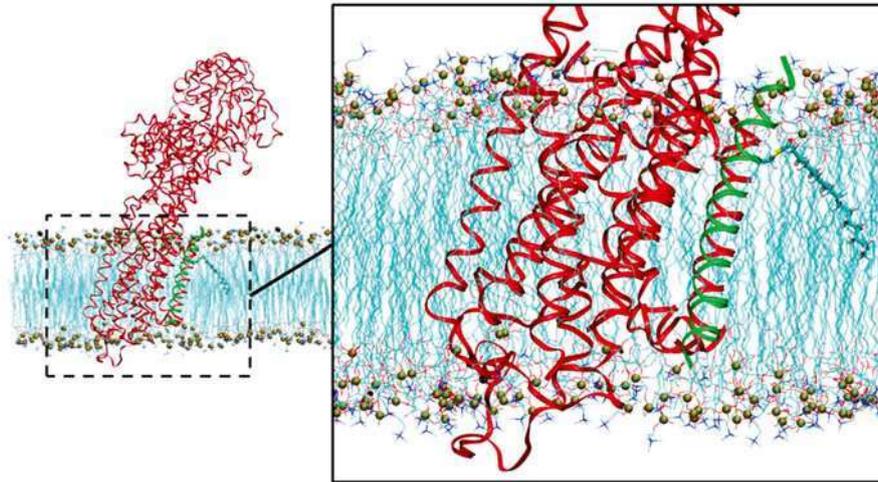


Fig. 10.7 Molecular modeling of Cys9-palmitoylated sarcolipin in interaction with SERCA1a embedded in a POPC bilayer. Molecular modeling of the palmitoylated SLN was made using UCSF Chimera software [103] and the SERCA1a/rSLN complex structure (PDB: 4H1W, [54]) as template. The complex was embedded in a POPC bilayer using the InflateGRO method [105] and data from the OPM database [106]. SERCA1a was tilted by 23° with respect to the membrane normal. Several energy minimization steps were performed using GROMACS [107] with protein atoms harmonically restrained using a force constant of $10,000 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$. Snapshot representations are made using VMD software [108]. rSLN and SERCA1a are depicted as a *green* and a *red ribbon*, respectively. The palmitoyl anchor is represented in licorice and the POPC lipids are in sticks without the hydrogen atoms for the sake of clarity. Phosphorus atoms of POPC are represented as Van der Waal's spheres. Carbon atoms are in cyan, oxygen in *red*, nitrogen in *blue*, phosphorus in *bronze*, sulfur in *yellow*, and hydrogen in *white*

longus (EDL), is also fully palmitoylated/oleoylated and has the same properties as the rabbit SLN after deacylation. Based on a cladogram, we finally postulated that the phenylalanine mutation to cysteine in some species is the result of an evolutionary convergence. We proposed that, besides phosphorylation, S-acylation/deacylation may also regulate SLN activity [31]. Interestingly, acylation is also a feature that distinguishes sarcolipin from phospholamban: none of the three cysteines of PLN located within the membrane domain is acylated [78].

9 Does Sarcolipin Associate with Itself and with Phospholamban?

9.1 Does Sarcolipin Form Homo-Oligomers?

Considering the high degree of similarities between SLN and PLN transmembrane domain, the homo-oligomerization of SLN has been investigated because PLN forms stable pentamers [79, 80]. Indeed, the high-resolution structure of these

PLN pentamers was solved by NMR in the presence of DPC and reconstituted in a DOPC/DOPE bilayer [81, 82]. It has been proposed that this pentameric state should correspond to an inactive form of the PLN in equilibrium with a monomeric active form, the latter being able to interact with SERCA1a for inhibition. However, this hypothesis is challenged by the recent high-resolution crystal structure of a SERCA1a–PLN complex which shows that a dimeric and even a pentameric form of PLN could also interact with SERCA1a [59]. As a matter of fact, the residues involved in the pentamerization motif are localized at the opposite side of the helix than those implicated in the interaction with SERCA1a. It has been demonstrated that PLN homo-oligomerize via a Leucine zipper motif (Leu-x2-Ile-x3-Leu-x2-Ile-x3-Leu, [80–82]). No such motif can be found in SLN amino acid sequences suggesting that SLN, if able to interact with itself, homo-oligomerize via a different motif.

The oligomeric state of SLN was investigated by several groups [83–86, 43]. The study of the oligomerization of hSLN was performed in the presence of nonionic detergents and by centrifugation analysis and cross-linking experiments [86]. In these experiments, the authors show that both SLN and PLN form oligomers but that these oligomers greatly differ. Sarcolipin does not form SDS-resistant oligomers at concentration close to those used for PLN as shown by SDS-PAGE analysis. On contrary to PLN oligomers which are formed at low concentration reaching a pentameric equilibrium state, SLN oligomers appear only at much higher concentrations and seem to never reach a stable oligomeric state as the size of the oligomer increases linearly as a function of SLN concentration. In addition, SLN oligomers were observed by cross-linking in POPC liposomes but only in the presence of a very large excess of cross-linker. Analysis of SLN oligomer formation after reconstitution in DOPC bilayers by solid-state NMR reveals that SLN remains monomeric at millimolar concentration [43].

It has also been suggested that oligomerization of SLN could result in a pore formation as proposed for PLN [83–85]. To demonstrate the formation of pores, SLN was incorporated into a supported lipid bilayer anchored to a mercury electrode through a hydrophilic tetraethyleneoxy chain. As a matter of fact, lipid bilayers tethered to a metal surface via a hydrophilic “spacer,” often called tethered bilayer lipid membranes (tBLMs), may provide a friendly environment to channel-forming peptides and proteins, thus maintaining their functionally active state and allowing an investigation of their putative function. Adding inorganic anions as chloride, sulfate, phosphate, or oxalate in the presence of SLN leads to an increase of the tBLM conductivity whereas the same experiment using inorganic cations does not show a modification of the membrane conductivity. This could suggest that sarcolipin aggregates into an anion-conducting-like pore. But, such a permeabilization cannot occur at physiological pH [84]. The authors suggested that sarcolipin pore activity should participate in the dissipation of the local increase of the luminal transmembrane potential caused by proton counter transport and the translocation in the lumen of the phosphate ions resulting from ATP hydrolysis [83]. Even if the SLN channel permeabilizing effect observed for phosphate ions is modest compared to the ATPase activity, such a translocation of phosphate should improve the

accumulation of calcium in the lumen and limit retro-inhibition of the SERCA1a, resulting in an increase of the turnover at millimolar concentration of calcium as suggested initially by MacLennan et al. [3]. Nevertheless, it has to be considered that SLN oligomerization is observed here in supported DOPC monolayers, an *in vitro* model which is very different from a natural bilayer. Because SLN is a transmembrane peptide, its insertion in a lipid monolayer instead of a bilayer could artificially favor its oligomerization. Smith et al. have demonstrated that co-reconstitution of SLN with native SR membrane does not permeabilize the membrane neither to calcium nor to proton [20]. Moreover, SERCA1a acts as a $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -ATPase (Fig. 10.1), and since the bilayer is impermeable to protons, addition of FCCP, a protonophore, to the vesicles resulted in an increase of the accumulation of calcium [87]. Smith et al. showed that even in the presence of a SLN:SERCA1a 5:1 mol:mol ratio, the greatest accumulation of calcium observed in the presence of FCCP, remains the same as in the control experiment done in the absence of SLN, demonstrating that SLN does not form oligomers leaky to protons [20]. The divergent results found in the literature suggest that the putative oligomerization of SLN has to be carefully investigated in a natural environment in order to validate the relevancy of such mechanism in the context of the regulation of SERCA isoforms and of the SR calcium homeostasis.

9.2 Do SLN and PLN Interact?

Similarly to the ongoing discussion of homo-oligomerization of SLN, the potential interaction of SLN with PLN is also currently under debate. Since SLN and PLN are co-expressed in the *atria* and in several smooth or fast-twitch muscle [4, 12], possible ternary interactions of those two peptides and the rabbit SERCA1a or rabbit SERCA2a isoforms were investigated [45]. Co-overexpression of SLN, PLN, and SERCA isoforms in HEK-293 cells led to a super-inhibition of the calcium uptake in microsomes: calcium affinity decreased by one order of magnitude (at pH 7, $\text{Ca}_{1/2\text{SERCA1a alone}}=0.35 \mu\text{M}$, $\text{Ca}_{1/2\text{SERCA1a+PLN}}=0.79 \mu\text{M}$, $\text{Ca}_{1/2\text{SERCA1a+SLN}}=0.58 \mu\text{M}$, $\text{Ca}_{1/2\text{SERCA1a+PLN+SLN}}=3.0 \mu\text{M}$) and the V_{max} , which was not affected by the expression of only one regulatory peptide, decreased by 20 % for SERCA1a and 50 % for SERCA2a. Using molecular modeling, the authors firstly suggested that a SERCA1a/PLN/SLN ternary complex could be formed (E2-like structure used as SERCA1a model, [58]) with both SLN and PLN in close contact with SERCA1a [46]). However, the same authors recently rejected this hypothesis arguing that the binding groove of SLN within the SERCA1a–SLN complex is too narrow to accommodate an additional transmembrane helix like that of PLN [53]. The high-resolution structure of SERCA1a–SLN complex was obtained using native sarcoplasmic reticulum membrane as protein sources. The structure of the groove is conserved in the high-resolution structure of SERCA1a obtained using a recombinant SLN-free source and the same conditions of crystallization [88–90, 53]. Thus, this suggests that the groove size is governed by the state of the ATPase and not induced by the presence of SLN (or PLN).

It has been proposed that SLN could destabilize PLN pentamers and that this destabilization could result in an increase in PLN monomers and in a super-inhibition of SERCAs. As a matter of fact, site-directed mutagenesis study of phospholamban showed that the equilibrium between the pentameric form (“inactive” form) and the monomeric form (“active” inhibitory form) influences the ATPase activity [91]. Mutations of key residues of the leucine zipper motif induced depolymerization of PLN and an increase in its inhibitory effect on SERCA2a. To date, this super-inhibitory activity is not clearly demonstrated *in vivo*. In addition, in the co-overexpression experiments, the stoichiometry of SLN, PLN or SERCA isoforms which is not indicated could be a source of misinterpretation. It is not demonstrated that the level of expression of the regulatory peptides is sufficient to exert a maximum inhibitory effect on the overexpressed ATPase. As pointed out above, the effect of SLN on the $Ca_{1/2}$ or the V_{max} depends on the system used to characterize the inhibition. Moreover, the expression levels of SLN and PLN *in vivo* are still a matter of debate [92] so caution should be taken not to misinterpret the *in vitro* data in a physiological context.

10 Conclusions

The role of sarcolipin in SERCAs regulation is complex and still subject to debate. Sarcolipin is regulated itself at several levels from the gene to the protein. The presence in myocytes of particular transcription factors (myocyte enhancer factor) is probably responsible of its muscle-specific expression. Furthermore, the presence of different polyadenylation signals among species could also result in differences at the final translation level. Several data are now available on the expression level of SLN from different tissues and from different species. It has been clearly demonstrated that SLN is expressed in several tissues, even in the presence of other regulatory peptides like phospholamban. Sarcolipin expression is not restricted to fast-twitch muscle as initially proposed. The level of expression in one particular tissue from one species to another could also greatly vary, for example, the amount of SLN in the mouse skeletal muscle is about one thousand time lower than in rabbit skeletal muscle [92]. All these data indicate that expression of SLN is fine-tuned at many levels, even before its interaction with Ca^{2+} -ATPases or putative other partners. In addition, interaction of SLN with Ca^{2+} -ATPases is regulated by post-translational modifications. Phosphorylation of its N-terminus, via the β -adrenergic calcium regulation pathway, could trigger its dissociation from the Ca^{2+} -ATPases. Recently, it has been demonstrated that sarcolipin is also S-palmitoylated and S-oleoylated. The exact role of these latter modifications is still unknown but it has been reported that acylation could affect membrane protein localization, stabilization within the membrane, and interaction with other proteins [93]. To date, SLN is the only SERCAs regulatory peptide which is acylated. Interestingly, it is now clear that SLN and PLN do not share the same regulatory mechanism. The recent high-resolution structures of the SERCA1a–SLN complex [53, 54] illustrate and give

new insights into how SLN inhibition arises from the stabilization of a Ca^{2+} -free E1 intermediate state. However, these structures and the comparison with the recent structure of SERCA1a–PLN complex [59] raise the following question: what are the structural and dynamic features of both partners (peptides and SERCAs) that are important for the regulation of SERCAs knowing that SLN and PLN are sometimes expressed in the same cells, at the same time, and in similar amounts [12]? Moreover, although rabbit SERCA1a and human SERCA2a share a high degree of identity (about 85 %), it is worth to mention the presence of a small patch of different amino acids in the N-domain. Many residues from this patch belong to the interaction site of the PLN N-terminus with the SERCAs N-domain, so it could explain part of the functional differences between PLN and SLN as SLN has not such an N-terminal extension [94–96]. Furthermore, the life time of the SLN–SERCAs complex during catalysis remains unclear. The hypothesis that SLN could interact only with a particular catalytic state and the hypothesis that SLN could remain bound to the SERCAs during the whole cycle are both considered in the literature. For example, based on a docking analysis, Winther et al. suggest that sarcolipin does not bind to the $\text{Ca}_2\text{.E1P}$ state as the groove is too narrow [54]. However, we observed that the complex remains formed even in presence of saturating concentration of calcium and of AMPCP which may trigger the ATPase in a $\text{Ca}_2\text{.E1P}$ -like conformation (*unpublished results*).

Numerous studies have recently documented the role of SLN in muscle-based thermogenesis. It has been shown that expression of SLN increases the uncoupling of the ATPase and, consequently the rate of heat production [24, 25]. Furthermore, knock-out mice ($SLN^{-/-}$) or SLN overexpressing mice (SLN^{OE}) were recently extensively used to determine the possible role of SLN in several metabolic pathways [28, 29, 97]. Knock-out mice have a lower body temperature so it suggests that SLN expression is probably critical for cold-induced muscle-based thermogenesis, probably via its interaction with SERCA1a [28, 29]. Additionally, SLN^{OE} mice displayed a higher oxygen consumption and fatty acid oxidation than wild-type mice suggesting a diet-induced thermogenesis [98]. An increase of SLN expression seems to improve skeletal muscle performance by reducing fatigue during a prolonged activity [97]. However, the use of $SLN^{-/-}$ or SLN^{OE} mice was recently debated due to the low level of SLN expression in wild-type mice skeletal muscles. It is unlikely that deleting SLN would have an assessable effect on thermogenesis by the calcium pumps [92]. As rodents possess brown adipose tissue physiologically essentially dedicated to heat production, they probably do not need another efficient muscle-based heat production pathway. Nevertheless, SLN might have a role in muscle-based thermogenesis in larger mammals, most of them being deprived from such brown adipose tissues [99].

Given the importance of SERCAs pump activity in regulating Ca^{2+} handling and the pathogenesis of skeletal muscle diseases, such as myopathy and muscular dystrophies, the recent discovery of several putative regulatory peptides opens interesting possibilities for the treatment of these diseases [7]. It suggests that expression of the different regulatory peptides could act with compensatory effects as MLN might be expressed in SLN- and PLN-deprived mice tissues [7]. However, at the present

time, myoregulin peptides were not detected in vivo [7, 8]: their expression level compared to SLN and PLN in different species and tissues has to be investigated. Interestingly, the sequence coding MLN was found in a mistakenly annotated non-coding mRNA specific from skeletal muscle. Consequently, several unidentified regulatory peptides could also be encoded in the many mRNA sequences currently annotated as noncoding sequences, and their discovery would open the way to a better knowledge of muscle physiology.

Acknowledgments This work was supported by the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) and by grants from the Agence Nationale pour la Recherche and the Ile de France region (Domaine d'Intérêt Majeur Maladies Infectieuses, DIM MALINF).

References

1. Wawrzynow A, Theibert JL, Murphy C et al (1992) Sarcolipin, the “proteolipid” of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, is a unique, amphipathic, 31-residue peptide. *Arch Biochem Biophys* 298:620–623
2. MacLennan D, Yip C, Iles G et al (1972) Isolation of sarcoplasmic reticulum proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 37:469–477
3. Odermatt A, Becker S, Khanna VK et al (1998) Sarcolipin regulates the activity of SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem* 273:12360–12369
4. Odermatt A, Taschner PE, Scherer SW et al (1997) Characterization of the gene encoding human sarcolipin (SLN), a proteolipid associated with SERCA1: absence of structural mutations in five patients with Brody disease. *Genomics* 45:541–553
5. Moller JV, Juul B, le Maire M (1996) Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta* 1286:1–51
6. Kirchberber MA, Tada M, Katz AM (1975) Phospholamban: a regulatory protein of the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* 5:103–115
7. Anderson DM, Anderson KM, Chang CL et al (2015) A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance. *Cell* 160:595–606
8. Magny EG, Pueyo JI, Pearl FM et al (2013) Conserved regulation of cardiac calcium uptake by peptides encoded in small open reading frames. *Science* 341:1116–1120
9. Weintraub H, Davis R, Lockshon D et al (1990) MyoD binds cooperatively to two sites in a target enhancer sequence: occupancy of two sites is required for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5623–5627
10. Piette J, Bessereau JL, Huchet M et al (1990) Two adjacent MyoD1-binding sites regulate expression of the acetylcholine receptor alpha-subunit gene. *Nature* 345:353–355
11. Kozak M (1987) At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol* 196:947–950
12. Vangheluwe P, Schuermans M, Zador E et al (2005) Sarcolipin and phospholamban mRNA and protein expression in cardiac and skeletal muscle of different species. *Biochem J* 389:151–159
13. Babu GJ, Bhupathy P, Carnes CA et al (2007) Differential expression of sarcolipin protein during muscle development and cardiac pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol* 43:215–222
14. Fajardo VA, Bombardier E, Vigna C et al (2013) Co-expression of SERCA isoforms, phospholamban and sarcolipin in human skeletal muscle fibers. *PLoS One* 8, e84304
15. Uemura N, Ohkusa T, Hamano K et al (2004) Down-regulation of sarcolipin mRNA expression in chronic atrial fibrillation. *Eur J Clin Invest* 34:723–730

16. Shanmugam M, Molina CE, Gao S et al (2011) Decreased sarcolipin protein expression and enhanced sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ uptake in human atrial fibrillation. *Biochem Biophys Res Commun* 410:97–101
17. Vittorini S, Storti S, Parri MS et al (2007) SERCA2a, phospholamban, sarcolipin, and ryanodine receptors gene expression in children with congenital heart defects. *Mol Med* 13:105–111
18. Guglielmi V, Vattemi G, Gualandi F et al (2013) SERCA1 protein expression in muscle of patients with Brody disease and Brody syndrome and in cultured human muscle fibers. *Mol Genet Metab* 110:162–169
19. Block BA (1994) Thermogenesis in muscle. *Annu Rev Physiol* 56:535–577
20. Smith WS, Broadbridge R, East JM et al (2002) Sarcolipin uncouples hydrolysis of ATP from accumulation of Ca²⁺ by the Ca²⁺-ATPase of skeletal-muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochem J* 361:277–286
21. de Meis L (1998) Control of heat produced during ATP hydrolysis by the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in the absence of a Ca²⁺ gradient. *Biochem Biophys Res Commun* 243:598–600
22. Mitidieri F, de Meis L (1999) Ca(2+) release and heat production by the endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase of blood platelets. Effect of the platelet activating factor. *J Biol Chem* 274:28344–28350
23. de Meis L (2001) Role of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase on heat production and thermogenesis. *Biosci Rep* 21:113–137
24. de Meis L (2001) Uncoupled ATPase activity and heat production by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. Regulation by ADP. *J Biol Chem* 276:25078–25087
25. Lee AG (2002) A calcium pump made visible. *Curr Opin Struct Biol* 12:547–554
26. Mall S, Broadbridge R, Harrison SL et al (2006) The presence of sarcolipin results in increased heat production by Ca(2+)-ATPase. *J Biol Chem* 281:36597–36602
27. Stammers AN, Susser SE, Hamm NC et al (2015) The regulation of sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPases (SERCA). *Can J Physiol Pharmacol* 19:1–12
28. Bal NC, Maurya SK, Sopariwala DH et al (2012) Sarcolipin is a newly identified regulator of muscle-based thermogenesis in mammals. *Nat Med* 18:1575–1579
29. Bombardier E, Smith IC, Vigna C et al (2013) Ablation of sarcolipin decreases the energy requirements for Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases in resting skeletal muscle. *FEBS Lett* 587:1687–1692
30. Gillard EF, Otsu K, Fujii J et al (1991) A substitution of cysteine for arginine 614 in the ryanodine receptor is potentially causative of human malignant hyperthermia. *Genomics* 11:751–755
31. Montigny C, Decottignies P, Le Marechal P et al (2014) S-palmitoylation and s-oleoylation of rabbit and pig sarcolipin. *J Biol Chem* 289:33850–33861
32. Bhupathy P, Babu GJ, Ito M et al (2009) Threonine-5 at the N-terminus can modulate sarcolipin function in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 47:723–729
33. Gramolini AO, Trivieri MG, Oudit GY et al (2006) Cardiac-specific overexpression of sarcolipin in phospholamban null mice impairs myocyte function that is restored by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2446–2451
34. Montaville P, Jamin N (2010) Determination of membrane protein structures using solution and solid-state NMR. *Methods Mol Biol* 654:261–282
35. Warschawski DE, Arnold AA, Beaugrand M et al (2011) Choosing membrane mimetics for NMR structural studies of transmembrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1808:1957–1974
36. Mascioni A, Karim C, Barany G et al (2002) Structure and orientation of sarcolipin in lipid environments. *Biochemistry* 41:475–482
37. Buck B, Zamoan J, Kirby TL et al (2003) Overexpression, purification, and characterization of recombinant Ca-ATPase regulators for high-resolution solution and solid-state NMR studies. *Protein Expr Purif* 30:253–261

38. Buffy JJ, Buck-Koehntop BA, Porcelli F et al (2006) Defining the intramembrane binding mechanism of sarcolipin to calcium ATPase using solution NMR spectroscopy. *J Mol Biol* 358:420–429
39. Buffy JJ, Traaseth NJ, Mascioni A et al (2006) Two-dimensional solid-state NMR reveals two topologies of sarcolipin in oriented lipid bilayers. *Biochemistry* 45:10939–10946
40. Shi L, Cembran A, Gao J et al (2009) Tilt and azimuthal angles of a transmembrane peptide: a comparison between molecular dynamics calculations and solid-state NMR data of sarcolipin in lipid membranes. *Biophys J* 96:3648–3662
41. De Simone A, Mote KR, Veglia G (2014) Structural dynamics and conformational equilibria of SERCA regulatory proteins in membranes by solid-state NMR restrained simulations. *Biophys J* 106:2566–2576
42. Traaseth NJ, Ha KN, Verardi R et al (2008) Structural and dynamic basis of phospholamban and sarcolipin inhibition of Ca(2+)-ATPase. *Biochemistry* 47:3–13
43. Hughes E, Clayton JC, Kitmitto A et al (2007) Solid-state NMR and functional measurements indicate that the conserved tyrosine residues of sarcolipin are involved directly in the inhibition of SERCA1. *J Biol Chem* 282:26603–26613
44. Shaw G, Morse S, Ararat M et al (2002) Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J* 16:869–871
45. Asahi M, Kurzydowski K, Tada M et al (2002) Sarcolipin inhibits polymerization of phospholamban to induce superinhibition of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases (SERCAs). *J Biol Chem* 277:26725–26728
46. Asahi M, Sugita Y, Kurzydowski K et al (2003) Sarcolipin regulates sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) by binding to transmembrane helices alone or in association with phospholamban. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5040–5045
47. MacLennan DH, Asahi M, Tupling AR (2003) The regulation of SERCA-type pumps by phospholamban and sarcolipin. *Ann N Y Acad Sci* 986:472–480
48. Hughes E, Middleton DA (2003) Solid-state NMR reveals structural changes in phospholamban accompanying the functional regulation of Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem* 278:20835–20842
49. Douglas JL, Trieber CA, Afara M et al (2005) Rapid, high-yield expression and purification of Ca²⁺-ATPase regulatory proteins for high-resolution structural studies. *Protein Expr Purif* 40:118–125
50. Gorski PA, Graves JP, Vangheluwe P et al (2013) Sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) inhibition by sarcolipin is encoded in its luminal tail. *J Biol Chem* 288:8456–8467
51. Tupling AR, Asahi M, MacLennan DH (2002) Sarcolipin overexpression in rat slow twitch muscle inhibits sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and impairs contractile function. *J Biol Chem* 277:44740–44746
52. Pardi A, Wagner G, Wuthrich K (1983) Protein conformation and proton nuclear-magnetic-resonance chemical shifts. *Eur J Biochem* 137:445–454
53. Toyoshima C, Iwasawa S, Ogawa H et al (2013) Crystal structures of the calcium pump and sarcolipin in the Mg²⁺-bound E1 state. *Nature* 495:260–264
54. Winther AM, Bublitz M, Karlsen JL et al (2013) The sarcolipin-bound calcium pump stabilizes calcium sites exposed to the cytoplasm. *Nature* 495:265–269
55. Lund S, Orłowski S, de Foresta B et al (1989) Detergent structure and associated lipid as determinants in the stabilization of solubilized Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 264:4907–4915
56. Montigny C, Arnou B, Champeil P (2010) Glycyl betaine is effective in slowing down the irreversible denaturation of a detergent-solubilized membrane protein, sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA1a). *Biochem Biophys Res Commun* 391:1067–1069
57. Montigny C, Arnou B, Marchal E et al (2008) Use of glycerol-containing media to study the intrinsic fluorescence properties of detergent-solubilized native or expressed SERCA1a. *Biochemistry* 47:12159–12174

58. Toyoshima C, Nomura H (2002) Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* 418:605–611
59. Akin BL, Hurley TD, Chen Z et al (2013) The structural basis for phospholamban inhibition of the calcium pump in sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 288:30181–30191
60. Chen Z, Akin BL, Stokes DL et al (2006) Cross-linking of C-terminal residues of phospholamban to the Ca²⁺ pump of cardiac sarcoplasmic reticulum to probe spatial and functional interactions within the transmembrane domain. *J Biol Chem* 281:14163–14172
61. Chen Z, Stokes DL, Jones LR (2005) Role of leucine 31 of phospholamban in structural and functional interactions with the Ca²⁺ pump of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 280:10530–10539
62. Chen Z, Stokes DL, Rice WJ et al (2003) Spatial and dynamic interactions between phospholamban and the canine cardiac Ca²⁺ pump revealed with use of heterobifunctional cross-linking agents. *J Biol Chem* 278:48348–48356
63. Jones LR, Cornea RL, Chen Z (2002) Close proximity between residue 30 of phospholamban and cysteine 318 of the cardiac Ca²⁺ pump revealed by intermolecular thiol cross-linking. *J Biol Chem* 277:28319–28329
64. Toyoshima C, Asahi M, Sugita Y et al (2003) Modeling of the inhibitory interaction of phospholamban with the Ca²⁺ ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:467–472
65. Akin BL, Chen Z, Jones LR (2010) Superinhibitory phospholamban mutants compete with Ca²⁺ for binding to SERCA2a by stabilizing a unique nucleotide-dependent conformational state. *J Biol Chem* 285:28540–28552
66. Bidwell P, Blackwell DJ, Hou Z et al (2011) Phospholamban binds with differential affinity to calcium pump conformers. *J Biol Chem* 286:35044–35050
67. Berson AE, Young C, Morrison SL et al (1999) Identification and characterization of a myristylated and palmitylated serine/threonine protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 259:533–538
68. Kurioka K, Nakagawa K, Denda K et al (1998) Molecular cloning and characterization of a novel protein serine/threonine kinase highly expressed in mouse embryo. *Biochim Biophys Acta* 1443:275–284
69. Ligos JM, Gerwin N, Fernandez P et al (1998) Cloning, expression analysis, and functional characterization of PKL12, a member of a new subfamily of ser/thr kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 249:380–384
70. Stairs DB, Perry Gardner H, Ha SI et al (1998) Cloning and characterization of Krct, a member of a novel subfamily of serine/threonine kinases. *Hum Mol Genet* 7:2157–2166
71. MacLennan DH, Kranias EG (2003) Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:566–577
72. Simmerman HK, Jones LR (1998) Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 78:921–947
73. Tada M, Kadoma M (1989) Regulation of the Ca²⁺ pump ATPase by cAMP-dependent phosphorylation of phospholamban. *Bioessays* 10:157–163
74. Zhao W, Uehara Y, Chu G et al (2004) Threonine-17 phosphorylation of phospholamban: a key determinant of frequency-dependent increase of cardiac contractility. *J Mol Cell Cardiol* 37:607–612
75. Ubersax JA, Ferrell JE Jr (2007) Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:530–541
76. Gramolini AO, Kislinger T, Asahi M et al (2004) Sarcolipin retention in the endoplasmic reticulum depends on its C-terminal RSYQY sequence and its interaction with sarco(endoplasmic Ca²⁺)-ATPases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16807–16812
77. Gorski PA, Trieber CA, Ashrafi G et al (2015) Regulation of the sarcoplasmic reticulum calcium pump by divergent phospholamban isoforms in zebrafish. *J Biol Chem* 290:6777–6788
78. Mayer EJ, McKenna E, Garsky VM et al (1996) Biochemical and biophysical comparison of native and chemically synthesized phospholamban and a monomeric phospholamban analog. *J Biol Chem* 271:1669–1677

79. Arkin IT, Adams PD, Brunger AT et al (1997) Structural perspectives of phospholamban, a helical transmembrane pentamer. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 26:157–179
80. Simmerman HK, Kobayashi YM, Autry JM et al (1996) A leucine zipper stabilizes the pentameric membrane domain of phospholamban and forms a coiled-coil pore structure. *J Biol Chem* 271:5941–5946
81. Traaseth NJ, Verardi R, Torgersen KD et al (2007) Spectroscopic validation of the pentameric structure of phospholamban. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14676–14681
82. Verardi R, Shi L, Traaseth NJ et al (2011) Structural topology of phospholamban pentamer in lipid bilayers by a hybrid solution and solid-state NMR method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(22):9101–9106
83. Becucci L, Foresti ML, Schwan A et al (2013) Can proton pumping by SERCA enhance the regulatory role of phospholamban and sarcolipin? *Biochim Biophys Acta* 1828:2682–2690
84. Becucci L, Guidelli R, Karim CB et al (2007) An electrochemical investigation of sarcolipin reconstituted into a mercury-supported lipid bilayer. *Biophys J* 93:2678–2687
85. Becucci L, Guidelli R, Karim CB et al (2009) The role of sarcolipin and ATP in the transport of phosphate ion into the sarcoplasmic reticulum. *Biophys J* 97:2693–2699
86. Hellstern S, Pegoraro S, Karim CB et al (2001) Sarcolipin, the shorter homologue of phospholamban, forms oligomeric structures in detergent micelles and in liposomes. *J Biol Chem* 276:30845–30852
87. Levy D, Seigneuret M, Bluzat A et al (1990) Evidence for proton countertransport by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase during calcium transport in reconstituted proteoliposomes with low ionic permeability. *J Biol Chem* 265:19524–19534
88. Clausen JD, Bublitz M, Arnou B et al (2014) SERCA mutant E309Q binds two Ca²⁺ ions but adopts a catalytically incompetent conformation. *EMBO J* 32:3231–3243
89. Jidenko M, Nielsen RC, Sorensen TL et al (2005) Crystallization of a mammalian membrane protein overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11687–11691
90. Marchand A, Winther AM, Holm PJ et al (2008) Crystal structure of D351A and P312A mutant forms of the mammalian sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase reveals key events in phosphorylation and Ca²⁺ release. *J Biol Chem* 283:14867–14882
91. Kimura Y, Kurzydowski K, Tada M et al (1997) Phospholamban inhibitory function is activated by depolymerization. *J Biol Chem* 272:15061–15064
92. Butler J, Smyth N, Broadbridge R et al (2015) The effects of sarcolipin over-expression in mouse skeletal muscle on metabolic activity. *Arch Biochem Biophys* 569:26–31
93. Charollais J, Van Der Goot FG (2009) Palmitoylation of membrane proteins (Review). *Mol Membr Biol* 26:55–66
94. Toyofuku T, Kurzydowski K, Tada M et al (1993) Identification of regions in the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum that affect functional association with phospholamban. *J Biol Chem* 268:2809–2815
95. Toyofuku T, Kurzydowski K, Tada M et al (1994) Amino acids Glu2 to Ile18 in the cytoplasmic domain of phospholamban are essential for functional association with the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 269:3088–3094
96. Toyofuku T, Kurzydowski K, Tada M et al (1994) Amino acids Lys-Asp-Asp-Lys-Pro--Val402 in the Ca²⁺-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum are critical for functional association with phospholamban. *J Biol Chem* 269:22929–22932
97. Sopariwala DH, Pant M, Shaikh SA et al (2015) Sarcolipin overexpression improves muscle energetics and reduces fatigue. *J Appl Physiol* 118:1050–1058
98. Maurya SK, Bal NC, Sopariwala DH et al (2015) Sarcolipin is a key determinant of basal metabolic rate and its overexpression enhances energy expenditure and resistance against diet induced obesity. *J Biol Chem* 24:840–849
99. Gamu D, Bombardier E, Smith IC et al (2014) Sarcolipin provides a novel muscle-based mechanism for adaptive thermogenesis. *Exerc Sport Sci Rev* 42:136–142
100. Galtier N, Gouy M, Gautier C (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* 12:543–548

101. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM et al (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 14:1188–1190
102. Schneider TD, Stephens RM (1990) Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res* 18:6097–6100
103. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC et al (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25:1605–1612
104. Bers DM, Patton CW, Nuccitelli R (2010) A practical guide to the preparation of Ca(2+) buffers. *Methods Cell Biol* 99:1–26
105. Kandt C, Ash WL, Tieleman DP (2007) Setting up and running molecular dynamics simulations of membrane proteins. *Methods* 41:475–488
106. Lomize MA, Pogozheva ID, Joo H et al (2012) OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Res* 40(Database issue):D370–376
107. Pronk S, Pall S, Schulz R et al (2013) GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics* 29:845–854
108. Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14(33-38):27–38

b) Thermogénèse

Le rôle du muscle squelettique dans la thermogénèse est bien connu depuis les premières études biologiques. Le frissonnement musculaire est utilisé comme la première ligne de défense lors d'une exposition aiguë au froid. Le frissonnement consiste en la répétition du processus de contraction-relaxation musculaire activé par des stimulations répétées des jonctions neuromusculaires aboutissant à une augmentation de la concentration cytosolique en Ca^{2+} , ce qui active l'hydrolyse d'ATP et donc une production de chaleur (Haman, 2006). Cependant, il a été démontré que l'homme et la souris peuvent maintenir leur température corporelle durant une exposition aiguë au froid, même lorsque le frissonnement est inhibé (Bal et al., 2012; Haman, 2006). Des études ont aussi montré que, lors d'une acclimatation au froid, le frissonnement est progressivement remplacé par la thermogénèse sans frisson (TSF) qui, comme son nom l'indique, est indépendante du frissonnement musculaire (Aydin et al., 2008).

De nombreuses études utilisant des rongeurs comme modèle ont montré que le tissu adipeux brun (TAB) est le site majeur de la TSF. Les cellules du TAB expriment la protéine UCP1 (UnCoupling Protein 1), dont la fonction est de découpler le transport d'électron de la force proton motrice, tous deux développés dans la membrane interne de la mitochondrie. Or, ce découplage est à la base de la thermogénèse dans le TAB (Meyer et al., 2010). Cependant, chez de nombreux mammifères dont l'homme, bien que le TAB soit abondant au stade néonatal, il décroît fortement à l'âge adulte (Cypess et al., 2009; Rowland et al., 2015). Des études d'adaptation au froid chez des souris génétiquement modifiées et déficientes en UCP1 ont montré que la thermogénèse indépendante de UCP1 existe chez la souris (Ukropec et al., 2006). Parmi les mécanismes identifiés comme étant impliqués dans la thermogénèse sont inclus les cycles métaboliques futiles, notamment une activité de SERCA futile dans le muscle (Bal et al., 2012, 2016; Kazak et al., 2015; Sahoo et al., 2013; She et al., 2007). Parmi ces études, certaines pointent le découplage de l'activité d'hydrolyse de l'ATP de celle de transport de Ca^{2+} chez SERCA1a comme un mécanisme important

dans la TSF musculaire, et que ce découplage serait lié à la SLN (Bal et al., 2012, 2016; Pant et al., 2015; Rowland et al., 2015). Le mécanisme à la base de la TSF induite par la SLN n'est pas encore complètement compris. Des études *in vitro* montrent que, lorsque SERCA1a interagit avec la SLN, l'hydrolyse d'ATP n'est pas inhibée mais le transport de Ca^{2+} est réduit, dû à un relargage du Ca^{2+} dans le cytosol (Mall et al., 2006; Meis, 2000; Smith et al., 2002). Cependant, ces résultats nécessitent d'être confirmés.

c) Simulation de dynamique moléculaire de SERCA1a en interaction avec SLN

Depuis la publication des premières structures du complexe SERCA1a-SLN, des études de simulation de dynamique moléculaire de SERCA1a en interaction avec SLN ont été publiées.

Dans le but d'identifier le mécanisme par lequel SLN induit le découplage du transport du Ca^{2+} avec l'hydrolyse d'ATP chez SERCA1a, Autry *et al.* (2016) ont réalisé une étude par simulation de dynamique moléculaire du complexe. Les résultats montrent une augmentation du tilt de la partie cytosolique de l'hélice TM4. Cette augmentation du tilt modifie l'orientation de la chaîne latérale du résidu Glu309, situé à l'intersection entre la partie membranaire et la partie cytoplasmique de l'hélice TM4, perturbant le site II de fixation du Ca^{2+} et empêchant son occlusion. D'après les auteurs, cette modification du tilt de l'hélice TM4 serait due à des ponts salins entre les résidus Glu2 et Glu7 de SLN et les résidus Lys328 et Arg324 de SERCA1a, respectivement (Autry et al., 2016). Néanmoins, les auteurs ont préalablement retiré l'ion Mg^{2+} présent dans la structure cristallographique et ont choisi de protoner les résidus Glu771 et Glu908. Ces modifications de la structure initiale pourraient aussi expliquer la perturbation des sites de fixation du Ca^{2+} . De plus, la modification de l'environnement électronique autour du résidu Glu309 pourrait expliquer la réorientation de la chaîne latérale et la modification du tilt de l'hélice TM4 pourrait être la conséquence de cette réorientation et non la cause.

Une autre étude réalisée par la même équipe s'intéresse à l'état intermédiaire dans lequel se trouve SERCA1a lorsque l'ATPase interagit avec la SLN. A l'issue de cette étude, les auteurs concluent que, en solution, SLN n'interagit pas avec SERCA1a à l'état E1-Mg²⁺, mais plutôt dans un état intermédiaire ne fixant pas d'ion et dont le résidu Glu771 est protoné (Espinoza-Fonseca et al., 2015). Il est possible que la présence d'un ion Mg²⁺ dans les sites de fixation du Ca²⁺ dans les structures du complexe SERCA1a-SLN soient en fait un artefact dû aux fortes concentrations en Mg²⁺ utilisées pour la cristallisation du complexe (Toyoshima et al., 2013; Winther et al., 2013).

III. Contenu du mémoire de thèse

L'activité de SERCA1a est régulée par des peptides. Parmi ces peptides régulateurs, je me suis intéressé à la sarcolipine. En effet, bien que des structures cristallographiques du complexe SERCA1a-SLN aient été déterminées récemment et que de nombreux travaux de biochimie aient été réalisés, le mécanisme de régulation de SERCA1a par la sarcolipine reste à l'heure actuelle incompris et fait l'objet de nombreux débats (Barbot et al., 2016). D'autres mécanismes de régulation existent, par exemple la palmitoylation de la sarcolipine. Aussi afin de comprendre le rôle structural et dynamique de cette modification post-traductionnelle, j'ai réalisé des travaux *in silico* sur la sarcolipine isolée, dans un environnement membranaire et à l'échelle atomique. En effet, l'environnement membranaire joue un rôle important dans la fonction et la structure des protéines membranaires (Lee, 2011). Ces travaux font l'objet du chapitre III de ce mémoire.

Afin de comprendre le rôle régulateur de l'activité de l'ATPase- Ca^{2+} SERCA1a, j'ai étudié l'effet de la SLN sur la structure et la dynamique de SERCA1a par des méthodes *in silico*. Ces travaux sont exposés dans le chapitre IV.

Pour réaliser ces travaux, j'ai utilisé des méthodes *in silico* décrites dans le chapitre II (Matériel et Méthode). En effet, ces méthodes permettent d'étudier les protéines membranaires dans un environnement lipidique à l'échelle atomique. La dynamique moléculaire utilise une méthode basée sur la physique pour décrire la dynamique d'un système biomoléculaire dans un environnement physiologiquement pertinent (Dror et al., 2010; Durrant and McCammon, 2011; Karplus and McCammon, 2002). De telles simulations, dans lesquelles toutes les molécules, incluant les protéines, les lipides et le solvant, sont représentées à un niveau de détail atomique ou quasi-atomique, nous permettent d'extraire le maximum d'informations possible à partir des données structurales limitées disponibles concernant les interactions protéine-lipides mais aussi de poser des hypothèses quant au rôle de certaines interactions concernant des mécanismes fonctionnels, hypothèses pouvant ensuite être testées expérimentalement (Ash et al., 2004;

Beckstein et al., 2003; Bond and Khalid, 2010; Bond and Sansom, 2004; Domene et al., 2003; Gumbart et al., 2005; Sansom et al., 2002, 2005; Shaw et al., 2010). Par ailleurs, la modélisation gros-grain des systèmes biologiques, dans laquelle le nombre de degrés de liberté du système est réduit permettent d'étudier des systèmes et des intervalles de temps plus importants, le cout en capacité de calcul étant réduit par rapport aux simulations en modèle tout-atome, mais au prix d'une précision plus faible (Marrink et al., 2004, 2007; Monticelli et al., 2008). Une autre méthode in-silico peu couteuse en capacité de calcul et différente de la dynamique moléculaire est l'analyse des modes normaux (ANM). De nombreux outils d'analyse basés sur l'ANM ont été développés (Bahar et al., 1997; Brooks et al., 1983; Go et al., 1983; Hinsen, 1998; Hinsen et al., 1999, 2000; Levitt et al., 1985; Li and Cui, 2002; Marques and Sanejouand, 1995; Mouawad and Perahia, 1993; Schulz, 1991; Tama Florence et al., 2000; Tirion, 1996) et ont montré leur efficacité à décrire les mouvements collectifs de plus large amplitude de plusieurs macromolécules (Hayward, 2001). Cette méthode a déjà été utilisée pour l'étude de l'ATPase- Ca^{2+} , en utilisant un modèle tout-atome (Li and Cui, 2002) ou un modèle simplifié ne considérant que les carbones α de la protéine (Reuter et al., 2003a, 2003b). Néanmoins, aucune étude par ANM de l'ATPase- Ca^{2+} n'a été réalisée en présence d'une membrane ou en présence d'un peptide régulateur.

Chapitre II : Matériel et Méthode

I. La Dynamique Moléculaire

Les techniques biophysiques permettant l'étude des systèmes membranaires sont nombreuses (diffraction aux rayons X (Deisenhofer et al., 1985), RMN à l'état solide (Ketchum et al., 1993), cryo-ME (Gonen et al., 2005) etc...) et les échelles de temps et les résolutions spatiales associées varient suivant les techniques. Néanmoins, les données expérimentales obtenues via ces techniques ne permettent d'établir que des propriétés moyennées sur le temps et sur l'échantillon. L'avantage de la simulation de dynamique moléculaire est qu'elle permet d'étudier des systèmes à une résolution spatiale variant de l'Angström à la centaine de nanomètres et à la résolution temporelle variant de la femtoseconde à la milliseconde. Ces caractéristiques rendent la simulation de dynamique moléculaire complémentaire des techniques expérimentales.

L'étude des systèmes biologiques, constitués de centaines voire de milliers d'atomes et composés de différentes particules (protons, neutrons et électrons), nécessiterait la résolution de l'équation de Schrödinger dépendante du temps. Or, dans le cas de systèmes à plusieurs centaines d'atomes, la résolution de cette équation reste hors de portée.

1. Le champ de force

La mécanique moléculaire (MM), aussi appelée mécanique classique, permet de contourner la limite imposée par la résolution de l'équation de Schrödinger, qui reste hors de portée dans le cas de systèmes à plusieurs centaines d'atomes. Elle repose sur l'approximation de Born-Oppenheimer (Born and Oppenheimer, 1927): les mouvements des électrons autour des noyaux peuvent être traités séparément car la masse des noyaux est bien plus importante que celle des électrons. La modélisation d'un système moléculaire peut alors être décrite comme un ensemble de points de masse fixe, disposés dans un espace euclidien à trois dimensions, et dont l'effet des

électrons est décrit par une fonction d'énergie potentielle. Les variations des positions au cours du temps de ces points, i.e. leur mouvement, est décrit par l'équation suivante :

$$\sum \vec{F}_i = m_i \vec{a}_i = -\vec{\nabla} E_{r_i} \quad (1)$$

$\sum \vec{F}_i$: Somme des forces exercées sur l'atome i ; m_i : Masse de l'atome i ; \vec{a}_i : Accélération de l'atome i ; $\vec{\nabla} E_{r_i}$: Gradient de l'énergie potentielle E_{r_i} et r_i : Position de l'atome

Pour déterminer la fonction d'énergie potentielle du système, il est nécessaire de connaître les paramètres des atomes le composant. Ces paramètres dépendent de données empiriques provenant en général de la combinaison de données expérimentales et de calculs quantiques obtenus sur des molécules modèles. Les différents termes composant la fonction d'énergie potentielle d'un système (E_{total}) peuvent être regroupés en deux catégories, les termes concernant les interactions dites liées (i.e. entre atomes liés par liaison covalente) ($E_{liées}$) et ceux concernant les interactions dites non liées (i.e. entre atomes séparés par plus de deux liaisons covalentes ou de deux molécules différentes) ($E_{non-liées}$) (2).

$$E_{total} = E_{liées} + E_{non-liées} = \sum_{liaisons} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{angles} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{dièdres} V_n [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right] \quad (2)$$

a) Les interactions dites liées

La première partie de la fonction d'énergie potentielle concerne les termes dépendants des interactions liées et correspond à trois types d'énergies : les énergies d'élongation des liaisons covalentes, les énergies de déformation des angles de valence entre deux liaisons covalentes successives et les énergies de déformation des angles dièdres entre quatre atomes successifs (voir fig. 17 et équation 3) :

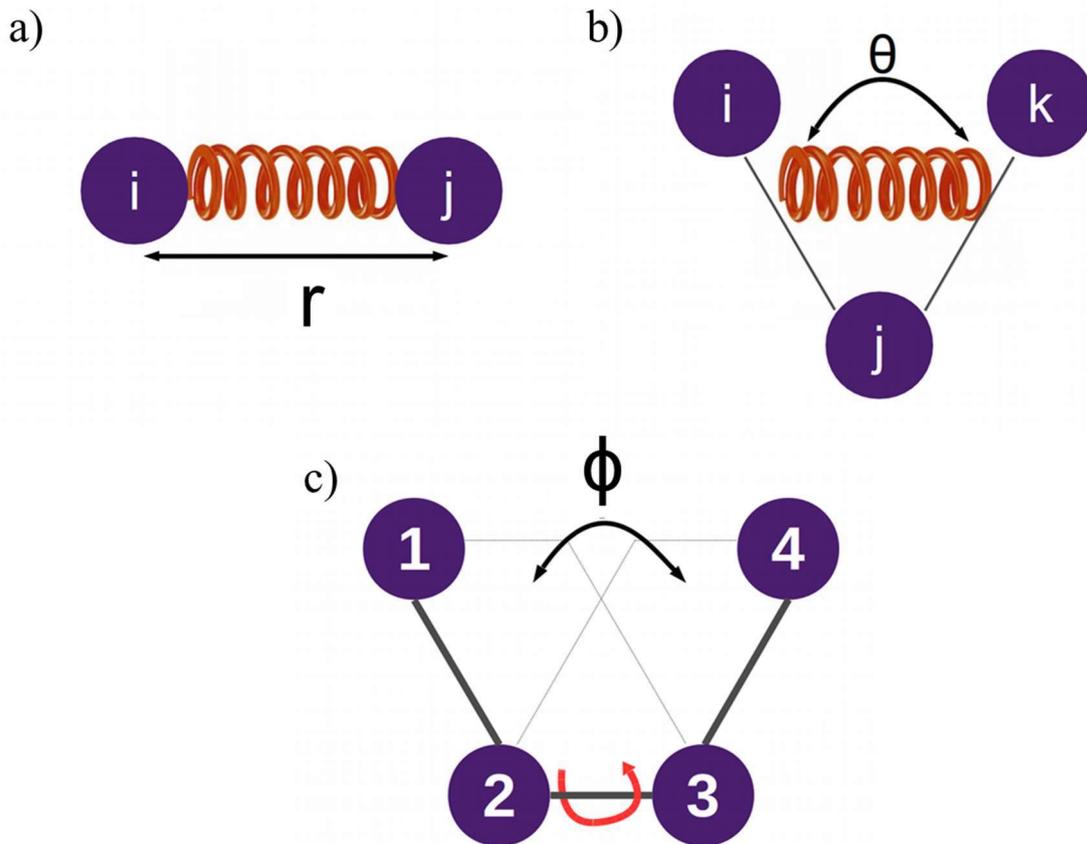


Figure 17 : Les interactions dites liées. a) Représentation de l'oscillation de la longueur r entre deux atomes liés. b) Représentation de l'oscillation de l'angle de valence θ définie par 3 atomes successifs. c) Représentation de l'angle dièdre ϕ les plans définis par les atomes 1, 2 et 3 d'une part et entre les atomes 2, 3 et 4 d'autre part. Figure issue de la thèse de A. Elbahnsi (Elbahnsi, 2017)

$$E_{liantes} = \sum_{liaisons} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{angles} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{dièdres} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] \quad (3)$$

Un potentiel harmonique modélise généralement les deux premiers termes, où K_r et K_θ représentent les constantes de force de rappel associées aux liaisons et aux angles de valence, respectivement, et r_{eq} et θ_{eq} sont les valeurs d'équilibre de longueur de liaison et d'angle de valence respectives. Il est à noter que les liaisons covalentes impliquant l'atome d'hydrogène sont traitées différemment (pour plus de détails, voir la section « I.2. L'intégration des équations du mouvement » du chapitre Matériel et Méthode).

Le dernier terme, correspondant à l'énergie de déformation des angles dièdres, est modélisé par un potentiel périodique avec un développement en série de Fourier. V_n représente la hauteur de la barrière d'énergie de rotation, ϕ l'angle dièdre, n la périodicité de la rotation et γ l'angle de phase.

Parfois, il est nécessaire d'imposer un même plan à certains atomes, comme dans le cas des liaisons peptidiques ou des cycles aromatiques. Pour cela, on ajoute un terme additionnel à la fonction d'énergie. Ce terme $E_{impropre}$ correspond aux dièdres « impropres » et est modélisé avec une fonction harmonique :

$$E_{impropre} = \sum_{impropre} K_\omega (\omega - \omega_{eq})^2 \quad (4)$$

K_ω : Constante de force et ω_{eq} : Valeur d'angle dièdre d'équilibre

b) Les interactions dites non-liées

Les interactions non-liées sont représentées par une somme de deux termes de tous les couples d'atomes i et j pour les interactions de van der Waals (E_{vdW}), modélisées comme un potentiel de Lennard-Jones (E_{LJ}), et les interactions électrostatiques (E_{elec}) :

$$E_{non-liées} = E_{vdW} + E_{elec} = \sum_{i<j} \left(\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} \right) + \sum_{i<j} \left(\frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon_i R_{ij}} \right) \quad (5)$$

A_{ij}, B_{ij} : Paramètres du potentiel de Lennard-Jones ; R_{ij} : Distance entre les atomes i et j ; q_i, q_j : charges partielles des atomes i et j ; ϵ_i : constante diélectrique du milieu ; ϵ_0 : constante diélectrique dans le vide

Les interactions de van der Waals sont modélisées avec le potentiel de Lennard-Jones dit en « 6 – 12 » qui est la résultante des forces répulsives de Pauli (Pauli, 1925) et des forces attractives dites de London (London, 1930):

$$E_{LJ} = 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{R_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{R_{ij}} \right)^6 \right] \quad (6)$$

R_{ij} : Distance entre les atomes i et j ; σ_{ij} : Distance entre i et j lorsque $E_{LJ} = 0$; ϵ_{ij} : Puits d'énergie

La modélisation des interactions électrostatiques entre une paire d'atomes i et j est un potentiel coulombien prenant en compte la distance entre les deux atomes (R_{ij}), leur charge respective (q_i et q_j) et la constante diélectrique du milieu ϵ :

$$E_{elec} = \sum_{i < j} \left(\frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right) = \sum_{i < j} \left(\frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon_r R_{ij}} \right) \quad (7)$$

ϵ_0 : Constante diélectrique du vide ; ϵ_r : Constante diélectrique relative au milieu

2. L'intégration des équations du mouvement

L'étude de l'évolution temporelle d'un système biologique par la simulation de dynamique moléculaire est rendue possible par l'intégration des équations du mouvement de Newton. Les trois algorithmes les plus couramment utilisés sont l'algorithme Position Verlet (Verlet, 1967), l'algorithme Velocity Verlet (Swope et al., 1982) et l'algorithme de Leap-Frog (Berendsen et al., 1984). C'est ce dernier qui a été utilisé pour le calcul de nos simulations.

Supposons que notre système contient N particules, chaque particule i possède une position \vec{r}_i , et on note $\vec{r} = \{\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_n\}$ le vecteur qui contient l'ensemble des positions. De même, $\vec{v} = \{\vec{v}_1, \vec{v}_2, \dots, \vec{v}_n\}$ représente le vecteur de l'espace comprenant l'ensemble des vitesses des particules composant le système. On note \vec{F}_i la force totale qui s'exerce sur la particule i .

Dans l'algorithme de Leap-Frog, les vitesses et positions des particules sont calculées à des instants alternés. On réalise deux développements en série de Taylor à l'ordre 4 pour chaque particule i du système, en $+\delta t$ et $-\delta t$. On a :

$$\vec{r}_i(t + \delta t) = \vec{r}_i(t) + \vec{v}_i(t)\delta t + \frac{\vec{F}_i(t)}{2m_i} \delta t^2 + \frac{d^3\vec{r}_i}{6dt^3} \delta t^3 + \mathcal{O}(\delta t^4) \quad (12)$$

$$\vec{r}_i(t - \delta t) = \vec{r}_i(t) - \vec{v}_i(t)\delta t + \frac{\vec{F}_i(t)}{2m_i} \delta t^2 - \frac{d^3\vec{r}_i}{6dt^3} \delta t^3 + \mathcal{O}(\delta t^4) \quad (13)$$

Si l'on somme ces deux expressions :

$$\vec{r}_i(t + \delta t) + \vec{r}_i(t - \delta t) = 2\vec{r}_i(t) + \frac{\vec{F}_i(t)}{m_i} \delta t^2 + \mathcal{O}(\delta t^4) \quad (14)$$

$$\rightarrow \vec{r}_i(t + \delta t) = 2\vec{r}_i(t) - \vec{r}_i(t - \delta t) + \frac{\vec{F}_i(t)}{m_i} \delta t^2 + \mathcal{O}(\delta t^4) \quad (15)$$

L'expression 15 est commune à l'algorithme Position Verlet et à l'algorithme de Leap-Frog. Dans cette expression, la nouvelle position $\vec{r}_i(t + \delta t)$ de l'atome i à l'instant $t + \delta t$ est connue à partir des positions anciennes de l'atome aux deux instants précédents t et $t - \delta t$, ainsi qu'à partir de la force totale $\vec{F}_i(t)$ qui s'applique sur l'atome i à l'instant précédant t . L'erreur commise sur la nouvelle position est à l'ordre 4, $\mathcal{O}(\delta t^4)$.

En ce qui concerne le calcul des vitesses, on réalise deux nouveaux développements en série de Taylor à l'ordre 2 :

$$\vec{v}_i\left(t + \frac{\delta t}{2}\right) = \frac{\vec{r}_i(t + \delta t) - \vec{r}_i(t)}{\delta t} \quad (16)$$

et

$$\vec{v}_i\left(t - \frac{\delta t}{2}\right) = \frac{\vec{r}_i(t) - \vec{r}_i(t - \delta t)}{\delta t} \quad (17)$$

ce qui donne :

$$\vec{r}_i(t + \delta t) = \vec{r}_i(t) + \vec{v}_i\left(t + \frac{\delta t}{2}\right)\delta t \quad (18)$$

et

$$\vec{r}_i(t - \delta t) = \vec{r}_i(t) - \vec{v}_i(t - \frac{\delta t}{2})\delta t \quad (19)$$

Ainsi, en remplaçant les termes $\vec{r}_i(t + \delta t)$ et $\vec{r}_i(t - \delta t)$ dans l'équation 15 par leurs équivalents déterminés dans les équations 18 et 19, on obtient :

$$\vec{v}_i\left(t + \frac{\delta t}{2}\right) = \vec{v}_i\left(t - \frac{\delta t}{2}\right) + \frac{\vec{F}_i(t)}{m_i}\delta t + \mathcal{O}(\delta t^3) \quad (20)$$

On calcule ainsi la vitesse de chaque particule i à l'instant $t + \frac{\delta t}{2}$ à partir de la force totale $\vec{F}_i(t)$ qui s'applique sur la particule à l'instant t et de la vitesse à l'instant demi-entier précédent $t - \frac{\delta t}{2}$. La nouvelle position de l'atome est obtenue par la relation :

$$\vec{r}_i(t + \delta t) = \vec{r}_i(t) + \vec{v}_i\left(t + \frac{\delta t}{2}\right)\delta t \quad (21)$$

L'initiation de l'algorithme nécessite donc la position $\vec{r}_i(0)$ de chaque particule i à l'instant initial $t = 0$ de la simulation, la vitesse initiale de chaque particule à l'instant demi-entier précédent $-\frac{\delta t}{2}$ et la force totale $\vec{F}_i(0)$ qui s'exerce sur chaque particule i à l'instant initial $t = 0$. L'algorithme permet de calculer les positions $\vec{r}_i(t + \delta t)$ aux instants ultérieurs.

Le choix du pas de temps Δt de l'algorithme d'intégration est important pour la simulation de dynamique moléculaire. Un pas trop court entraînera un temps de simulation trop court mais, à l'inverse, un pas trop long risque d'aboutir à une simulation instable dû à une augmentation trop importante de l'énergie potentielle entre chaque pas d'intégration. Le pas de temps doit être plus petit que le mouvement de plus haute fréquence du système. Dans le cas d'un système biologique, ce mouvement concerne la vibration des liaisons covalentes entre un atome d'hydrogène et un atome lourd. Celle-ci est d'environ 10^{-14} secondes, le pas de temps utilisé est donc de l'ordre de la femtoseconde (10^{-15} s).

Pour augmenter le temps de simulation, on a donc recours à des algorithmes comme SHAKE (Ryckaert et al., 1977) ou LINCS (Hess et al., 1997). Ces algorithmes contraignent les

liaisons entre un hydrogène et un atome lourd à leur valeur d'équilibre, permettant ainsi d'augmenter les pas de temps. Grâce à ce type d'algorithme, la plupart des simulations de dynamique moléculaire en tout-atome sont réalisées avec un pas de temps de 2 femtosecondes.

3. Les conditions périodiques aux bords

La taille des systèmes biologiques étudiés en dynamique moléculaire est beaucoup plus petite que dans l'expérience, où ils sont intégrés au sein de systèmes beaucoup plus vaste et dont la simulation totale est à l'heure actuelle impossible. Néanmoins, il est possible de corrélérer les propriétés du système microscopique simulé avec celles de la phase macroscopique en s'affranchissant des effets de bords. Ainsi, le système simulé, de taille finie et délimité par une cellule unitaire de forme géométrique variant suivant le système (cubique, octaédrique, sphérique...), est répliqué virtuellement à l'infini selon les trois directions de l'espace. C'est ce que l'on appelle les conditions périodiques aux bords ou PBC (Periodic Boundary Conditions). En appliquant ces conditions, si un atome i sort de la boîte de simulation par un bord, ce même atome entre simultanément dans la boîte par le bord d'en face avec la même vitesse et la même direction (voir fig. 18).

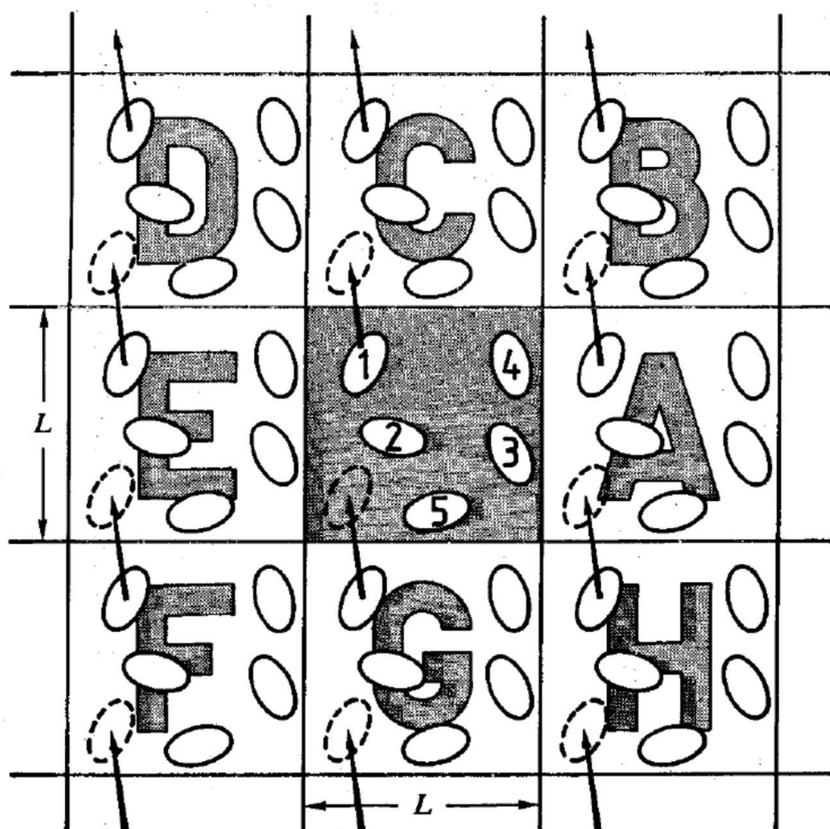


Figure 18 : Représentation d'un système périodique à deux dimensions (extrait du livre 'Computer Simulation of Liquids' (Allen and Tildesley, 1991)). Dans ce système, les molécules peuvent entrer et sortir de chaque boîte en passant n'importe lequel des quatre bords de celle-ci.

Le traitement des interactions entre molécules nécessite une approximation lorsque les conditions périodiques aux bords sont appliquées, notamment l'approximation dite de « l'image minimale ». Cette approximation suppose que chaque molécule i comprise dans la boîte de simulation interagit avec l'image la plus proche de toute autre molécule j . Ainsi, pour le calcul des interactions pour l'atome i , seront pris en compte uniquement les atomes de la même boîte ou des boîtes répliquées avoisinantes situés à l'intérieur d'une sphère de troncature de rayon R_c (aussi appelé cut-off). Au-delà de la sphère, les interactions ne sont pas explicitement prises en compte. Pour éviter qu'un atome interagisse avec sa propre image, le rayon R_c est défini comme étant la moitié du plus petit côté de la boîte de simulation.

4. Le calcul des interactions électrostatiques, la sommation d'Ewald et Particle-Mesh Ewald (PME)

Bien que l'introduction du rayon de troncature permette de réduire considérablement le temps de calcul nécessaire, il faut estimer les énergies d'interactions électrostatiques entre les paires d'atomes i et j . Plus la portée des interactions est faible, plus ces interactions sont fortes. A l'inverse, le système de sphère de troncature est erroné à longue distance car il entraîne une discontinuité de l'énergie au voisinage du cut-off. L'approche la plus utilisée dans le cas de simulations de systèmes périodiques est la sommation d'Ewald (Ewald, 1921). Cette méthode, décrite en 1921 afin d'évaluer les énergies d'interactions à l'intérieur des cristaux ioniques, suppose qu'une particule de la boîte interagit avec toutes les particules de la boîte et avec toutes leurs images se trouvant dans une matrice infinie de boîtes périodiques.

Partant du fait que la somme coulombienne,

$$E_{elec} = \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r R_{ij}} \quad (8)$$

étendue à la boîte centrale ainsi qu'à toutes ces voisines ne converge pas formellement, l'idée directrice de la sommation d'Ewald consiste à décomposer l'équation 8 en une somme dans l'espace direct et une somme dans l'espace réciproque :

$$E_{elec} = \sum_n \frac{1}{|n|} f(n) + \sum_m \frac{1}{|m|} [1 - f(n)] \quad (9)$$

En entourant chaque charge ponctuelle du système d'une distribution de charge gaussienne Q_i :

$$Q_i(R) = q_i \alpha^3 \frac{\exp(-\alpha^2 R^2)}{\sqrt{\pi^3}} \quad (10)$$

où α est un paramètre positif caractérisant la largeur de la distribution gaussienne, la première somme converge rapidement quand $n \rightarrow \infty$, car $f(n)$ décroît très rapidement. La

contribution dans l'espace direct est de courte portée. La seconde somme évaluée dans l'espace réciproque utilise une transformée de Fourier pour résoudre l'équation de Poisson, *i.e.* :

$$\nabla^2 E_i(R) = -4\pi q_i(R) \quad (11)$$

Cette approche permet de faire diminuer la complexité du calcul des interactions électrostatique de N^2 à $N^{3/2}$ (avec N , le nombre d'atomes), notamment en optimisant la largeur α des distributions des gaussiennes et la troncature des interactions de paires dans l'espace direct.

Néanmoins, l'approche de la somme d'Ewald reste onéreuse et d'autres alternatives permettent de diminuer l'investissement informatique dans le calcul des interactions électrostatiques, notamment en réalisant une transformée de Fourier rapide (FFT) pour l'évaluation de la somme dans l'espace réciproque. Pour cela, une grille tridimensionnelle remplissant l'espace de la simulation est construite. Les valeurs des charges des particules du système sont interpolées sur la grille et la distribution de charge correspondante sur cette grille q_i est calculée. En recourant à la méthode FFT, la transformée de la distribution des charges $\hat{q}(k)$ est déterminée sur la base des vecteurs k de l'espace réciproque. La contribution des interactions à longue portée du potentiel électrostatique est alors évaluée selon $\widehat{E}_{long}(k) = \hat{G}(k)\hat{q}(k)$, où $\hat{G}(k)$ est la fonction d'influence définie par $\hat{G}(k) = \hat{\lambda}(k)/\epsilon_0 k^2$, dans lequel $\lambda(k)$ est une distribution dépendant des seuls paramètres géométriques de la boîte. Une transformée inverse permet d'estimer la contribution E_{long} aux différents points de la grille tridimensionnelle. Les forces électrostatiques sont alors déterminées par dérivation numérique du potentiel. Enfin le champ électrique et le potentiel sont interpolés de la grille vers la position des particules (Fig. 19).

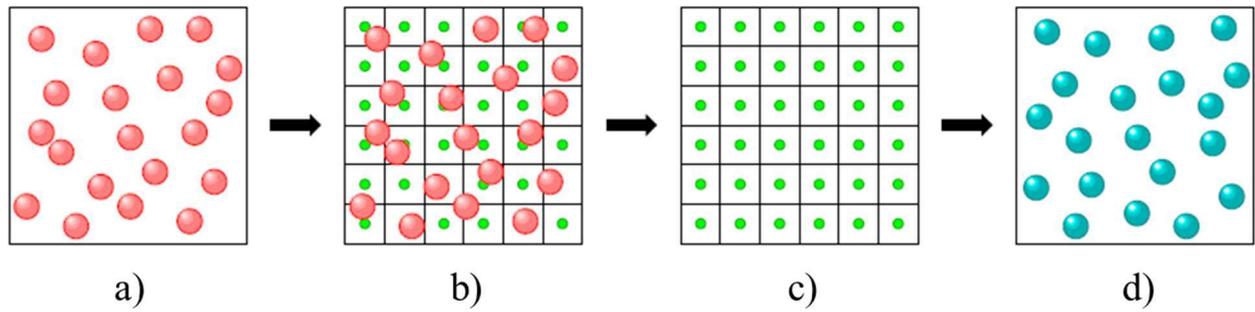


Figure 19 : Représentation de l'approche de type PME sur un système à deux dimensions. Soit un système de particules chargées (a), les charges sont interpolées sur une grille (b). Par l'utilisation d'une transformé de Fourier rapide, le potentiel et les forces sont estimés en chaque point de la grille (c). Les forces sont interpolées en retour vers les particules, dont la position est mise à jour (d).

Ceci constitue l'idée centrale de l'algorithme Particle-mesh Ewald (PME) (Darden et al., 1993; Essmann et al., 1995; Hockney and Eastwood, 1988), utilisé dans nos simulations pour calculer les interactions électrostatiques. Cet algorithme permet de diminuer la complexité du calcul des interactions électrostatiques de $N^{3/2}$ à $N \ln(N)$, par rapport à une sommation d'Ewald classique.

5. La simulation de dynamique moléculaire utilisant des modèles gros-grain

De nombreux phénomènes biologiques se déroulent sur des échelles de temps trop importantes pour être étudiés par des simulations à l'échelle atomique (Ash et al., 2004). Pour pouvoir simuler ces phénomènes, une simplification des modèles moléculaires est donc nécessaire. L'utilisation de modèles moléculaires « gros-grain » représente donc une alternative aux modèles atomiques, permettant de simuler des systèmes plus importants et à des échelles de temps plus grandes que l'utilisation de modèles atomiques tout en obtenant des détails structuraux réalistes. De nombreuses approches différentes ont été développées et plusieurs modèles mésoscopiques existent pour permettre l'étude de systèmes protéine-membrane. Par exemple, Venturoli et al. et Smeijers et al. ont tous deux développé un modèle gros-grain permettant d'étudier les effets d'un mismatch entre la partie hydrophobe d'une protéine hydrophobe et d'une membrane et, en particulier, l'orientation de la protéine et/ou les déformations membranaires qui en résultent (Smeijers et al., 2006; Venturoli et al., 2005). Des approches multiscalaires couplant des niveaux de descriptions atomiques et gros-grain ont aussi été appliqués à l'étude d'interactions de peptides (Shi et al., 2006) ou de protéines (Heath et al., 2007; Neri et al., 2005) avec une membrane. Si l'on considère l'ensemble des différentes approches de modèles gros-grain, le niveau de résolution et le degré de flexibilité des protéines varie de plusieurs particules par acide aminé à une seule particule pour l'ensemble de la protéine, selon la taille de l'objet et des mouvements que l'on souhaite observer. Parmi ces différents modèles, Marrink et al. (Marrink et al., 2004, 2007; Monticelli et al., 2008) a développé un champ de force gros-grain, appelé MARTINI, permettant la simulation de systèmes biologiques membranaires. C'est ce champ de force que nous avons choisi pour simuler le complexe SERCA1a-SLN et que nous allons vous présenter ici.

Dans le modèle MARTINI (Marrink et al., 2004, 2007; Monticelli et al., 2008), plusieurs atomes sont regroupés ensemble au sein d'une particule virtuelle qui interagit avec le système grâce

à un potentiel effectif. La réduction du nombre de degrés de liberté et l'utilisation de fonctions potentielles à plus courte portée rend le modèle très efficace, permettant de réduire le temps de simulation de 2 à 3 ordres de grandeur par rapport à un modèle atomique. Ce modèle a été développé en utilisant la partition de l'énergie libre des chaînes latérales des acides aminés entre phase aqueuse et organique pour sélectionner les paramètres d'interaction non-liée appropriés. Le choix des paramètres concernant les liaisons entre atomes est basé sur la distribution des valeurs d'angle et de distance des liaisons et des angles dièdres, calculée à partir de la Protein Data Bank (PDB).

a) La conversion des données au format MARTINI

Dans le cas du modèle MARTINI, en ce qui concerne les lipides et le solvant, quatre atomes lourds sont représentés par un centre d'interaction (une particule virtuelle), à l'exception des molécules aromatiques. Les molécules aromatiques (e.g. le benzène, le cholestérol ou quelques acides aminés comme le tryptophane) sont représentées à plus grande résolution : deux atomes lourds par particule virtuelle. Le modèle prend en compte 4 types de centres d'interactions (i.e. de particules) : polaire (P), intermédiaire (N), apolaire (C) et chargé (Q). Au sein de chaque type existe des sous-types correspondant aux capacités de la particule à former une liaison hydrogène. Ce sous-type est représenté par une lettre (d = donneur, a = accepteur, da = donneur et accepteur, 0 = aucune capacité) ou par un nombre indiquant le degré de polarité, 1 étant la polarité la plus faible et 5 la plus forte. La figure 20 montre la représentation des 20 acides aminés, ainsi que quelques molécules composant les systèmes biologiques, avec le modèle MARTINI.

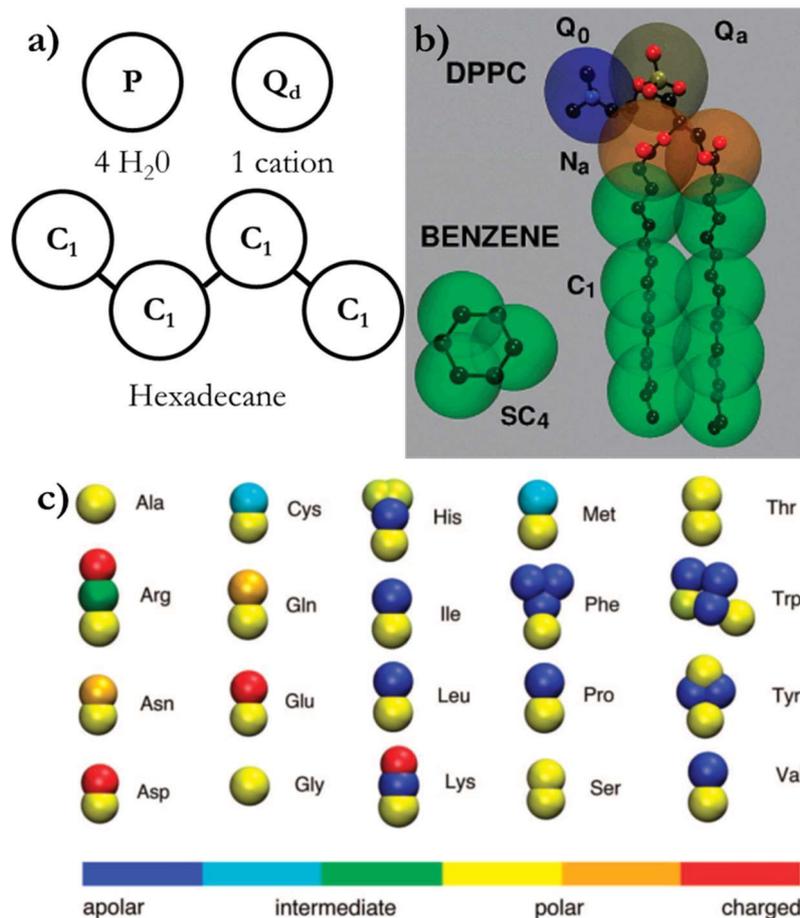


Figure 20 : Représentation de molécules biologiques avec le champ de force MARTINI. a) et b) Représentation en gros grains de molécules présentes dans de nombreux systèmes biologiques. Le S de SC₄ dans la figure b) désigne une classe spéciale de particules utilisée pour représenter les molécules aromatiques. c) représentation en gros grains des 20 acides aminés ainsi que le type de particules les composant. La figure b) est extraite d'une publication de Marrink et al. (Marrink et al., 2007) et la figure c) est extraite d'une publication de Monticelli et al. (Monticelli et al., 2008).

Les acides aminés apolaires (Leu, Pro, Ile, Val, Cys and Met) sont représentés par des particules de type C, les acides aminés polaires non chargés (Thr, Ser, Asn et Gln) par des particules de type P, et ceux chargés négativement (Glu et Asp) par des particules Q. Les acides aminés chargés positivement (Arg et Lys) sont modélisés par une combinaison de particules Q et de particules non chargées. Quant aux chaînes latérales des résidus aromatiques, elles sont représentées par une classe de particules spéciales, au nombre de trois pour la tyrosine, la phénylalanine et l'histidine, et de quatre pour le tryptophane. Les résidus glycine et alanine sont représentés uniquement par la particule du squelette peptidique. Le type de particule peptidique dépend de la structure secondaire de la protéine : libre en solution ou situé sur une région non structurée, les particules du squelette peptidique sont de type P et possède une forte polarité, mais celle-ci est plus

faible pour les particules situées dans des structures secondaires de type hélice α et feuillet β qui sont de type N, les liaisons hydrogènes nécessaires à la structure secondaire étant prises en compte. La proline est moins polaire à cause du manque de d'azote peptidique donneur d'hydrogène.

b) Les interactions non-liées

Deux particules i et j espacées d'une distance r_{ij} interagissent entre elles via un potentiel de Lennard-Jones dont l'équation est la suivante :

$$V_{Lennard-Jones}(r_{ij}) = 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]$$

La force de l'interaction, déterminée par la valeur de la constante ε_{ij} , dépend du type de particule en interaction. La valeur de ε_{ij} varie de 5,6 kJ/mol pour les interactions fortes entre particules polaires, à 2,0 kJ/mol pour les interactions faibles entre particules polaires ou apolaires, i.e. mimant une molécule hydrophobe. La taille effective des particules dépend du paramètre de Lennard-Jones σ et est de 0,47 nm. Pour la classe spéciale de particules utilisée pour les molécules aromatiques, le paramètre σ est légèrement réduit ($\sigma = 0,43$ nm) et ε_{ij} est fixé à 75 % de sa valeur standard. La matrice des interactions suivant le type de particule est présentée dans le tableau 1.

sub	Q				P					N				C					
	da	d	a	0	5	4	3	2	1	da	d	a	0	5	4	3	2	1	
Q	da	O	O	O	II	O	O	O	I	I	I	I	I	IV	V	VI	VII	IX	IX
	d	O	I	O	II	O	O	O	I	I	I	III	I	IV	V	VI	VII	IX	IX
	a	O	O	I	II	O	O	O	I	I	I	I	III	IV	V	VI	VII	IX	IX
	0	II	II	II	IV	I	O	I	II	III	III	III	III	IV	V	VI	VII	IX	IX
P	5	O	O	O	I	O	O	O	O	O	I	I	I	IV	V	VI	VI	VII	VIII
	4	O	O	O	O	O	I	I	II	II	III	III	III	IV	V	VI	VI	VII	VIII
	3	O	O	O	I	O	I	I	II	II	II	II	II	IV	IV	V	V	VI	VII
	2	I	I	I	II	O	II	III	IV	IV	V	VI	VII						
N	1	I	I	I	III	O	II	III	IV	IV	IV	V	VI						
	da	I	I	I	III	I	III	II	II	II	II	II	II	IV	IV	V	VI	VI	VI
	d	I	III	I	III	I	III	II	II	II	II	III	II	IV	IV	V	VI	VI	VI
	a	I	I	III	III	I	III	II	II	II	II	II	III	IV	IV	V	VI	VI	VI
C	0	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	III	III	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	V	VI
	5	V	V	V	V	V	V	IV	IV	IV	IV	V	V						
	4	VI	VI	VI	VI	VI	VI	V	IV	IV	V	V	V	IV	IV	IV	IV	V	V
	3	VII	VII	VII	VII	VI	VI	V	V	IV	VI	VI	VI	IV	IV	IV	IV	IV	IV
	2	IX	IX	IX	IX	VII	VII	VI	VI	V	VI	VI	VI	V	V	V	IV	IV	IV
1	IX	IX	IX	IX	VIII	VIII	VII	VII	VI	VI	VI	VI	V	V	IV	IV	IV	IV	

Tableau 1 : Matrice des interactions pour le champ de force MARTINI. Les chiffres romains (ainsi que le 0) indiquent la valeur de la constante ϵ_{ij} : O : $\sigma = 5.6$ kJ/mol; I : $\sigma = 5.0$ kJ/mol; II : $\sigma = 4.5$ kJ/mol; III : $\sigma = 4.0$ kJ/mol; IV : $\sigma = 3.5$ kJ/mol; V : $\sigma = 3.1$ kJ/mol; VI : $\sigma = 2.7$ kJ/mol; VII : $\sigma = 2.3$ kJ/mol; VIII : $\sigma = 2.0$ kJ/mol; IX : $\sigma = 2.0$ kJ/mol. Le paramètre σ est égal à 0,47 nm, à l'exception des interactions de type IX, pour lesquelles $\sigma = 0,62$ nm. Tableau extrait de l'article de Marrink et al., 2007.

En plus des interactions de Lennard-Jones, les particules chargées (type Q) portant une charge q interagissent via une fonction d'énergie de Coulomb avec une constante diélectrique relative $\epsilon_{rel} = 15$ pour un écrantage explicite :

$$V_{el} = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_{rel}r_{ij}}$$

Les fonctions d'énergies potentielles non-liées sont utilisées dans leur forme « shiftée », i.e. l'énergie et la force atteignent 0 à la distance de coupure (cut-off) $r_{cut} = 1,2$ nm. Le potentiel LJ est « shifté » à partir de $r_{shift} = 0,9$ jusqu'au r_{cut} . Le potentiel électrostatique est aussi « shifté » à partir de $r_{shift} = 0,0$ jusqu'au r_{cut} . Ce « shift » du potentiel électrostatique permet ne pas prendre en compte les interactions non liantes avec les plus proches voisins.

c) Les interactions liées

Les interactions liées entre quatre particules i, j, k et l avec, à l'équilibre, une distance d_b , un angle φ_a , et des angles dièdres ψ_d et ψ_{id} :

$$V_b = \frac{1}{2}K_b(d_{ij} - d_b)^2$$

$$V_a = \frac{1}{2}K_a[\cos(\varphi_{ijk}) - \cos(\varphi_a)]^2$$

$$V_d = K_d[1 + \cos(n\psi_{ijkl} - \psi_d)]$$

$$V_{id} = K_{id}(\psi_{ijkl} - \psi_{id})^2$$

Les valeurs des constantes K sont généralement faibles pour permettre à la molécule en modèle gros-grain d'être assez flexible pour mimer les mouvements collectifs observables en modèle atomique. V_b représente le potentiel de liaison entre deux particules chimiquement liées et V_a est le potentiel d'angle entre particules chimiquement liées. Le potentiel d'angle dièdre V_d est utilisé pour imposer une structure secondaire spécifique au squelette peptidique. Enfin, le potentiel d'angle dièdre impropre V_{id} est utilisé pour empêcher des distorsions hors du plan pour les molécules planaires.

II. L'Analyse des Modes Normaux

1. La résolution de l'équation de Newton

Les modes normaux sont les vibrations internes correspondant aux mouvements intrinsèques. Contrairement à la simulation de dynamique moléculaire qui est considérée comme une méthode numérique car elle permet une résolution approximative de l'équation de Newton en utilisant le potentiel exact, le calcul des modes normaux est analytique car il permet une résolution

exacte en utilisant un potentiel approximatif via un développement en série de Taylor de l'équation de l'énergie potentielle :

$$V(x) = V(x_0) + \left(\frac{dV}{dx}\right)_{x_0} (x - x_0) + \frac{1}{2} \left(\frac{d^2V}{dx^2}\right)_{x_0} (x - x_0)^2 + \dots \quad (22)$$

Si, dans le développement en série de Taylor autour de x_0 , on néglige les termes d'ordre supérieur à 2, on obtient :

$$V(x) = V(x_0) + \left(\frac{dV}{dx}\right)_{x_0} (x - x_0) + \frac{1}{2} \left(\frac{d^2V}{dx^2}\right)_{x_0} (x - x_0)^2 \quad (23)$$

De plus, si x_0 est la position pour la structure d'énergie minimum, $\left(\frac{dV}{dx}\right)_{x_0} = 0$.

Enfin, en choisissant la référence d'énergie égale à 0, $V(x_0) = 0$. On obtient alors :

$$V(x) = \frac{1}{2} \left(\frac{d^2V}{dx^2}\right)_{x_0} (x - x_0)^2 = \frac{1}{2} k(x - x_0)^2 \text{ avec } k = \left(\frac{d^2V}{dx^2}\right)_{x_0} \quad (23)$$

C'est l'approximation harmonique de l'équation de l'énergie potentielle. En utilisant cette approximation, l'équation de Newton devient :

$$F = m \frac{d^2x}{dt^2} = -\frac{dV}{dx} = -k(x - x_0) \leftrightarrow \frac{d^2x}{dt^2} + \frac{k}{m} (x - x_0) = 0 \quad (24)$$

Equation dont la solution est de la forme :

$$x - x_0 = C \cos(\omega t + \phi) \text{ où } \omega = \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (25)$$

L'équation 25 est l'équation d'un ressort auquel est reliée une masse m , et dont la force de rappel est k . C est l'amplitude, ϕ est la phase et ω est la pulsation du mode de vibration.

L'équation 25 est donc la résolution analogique de l'équation de Newton pour un problème à 1 dimension. Dans le cadre d'un système biologique composé de N atomes et modélisé dans un espace cartésien où chaque atome est attribué de coordonnées sur les axes x , y et z , la résolution

de l'équation devient un problème à 3N dimensions. Pour simplifier la résolution, les coordonnées sont pondérées par les masses ($X_i = \sqrt{m_i}x_i, Y_i = \sqrt{m_i}y_i \dots$). On obtient alors :

$$\frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} + \vec{\nabla}_i V = 0 \quad \text{avec } i=1, 2, 3 \dots 3N \quad \text{et } \vec{r}_i =$$

$$\vec{X}_1, \vec{Y}_1, \vec{Z}_1, \vec{X}_2 \dots \vec{X}_N, \vec{Y}_N, \vec{Z}_N$$

Ou, autrement formulé :

$$V(r) = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{3N} \sum_{j=1}^{3N} \left(\frac{\partial^2 V}{\partial r_i \partial r_j} \right)_0 (r_i - r_i^0)(r_j - r_j^0)$$

avec l'indice 0 indiquant la structure d'énergie minimum.

Cette équation peut se résoudre grâce à un calcul matriciel de dimension n avec n= 3N :

$$V(r) \approx \frac{1}{2} ((r_1 - r_1^0) \dots (r_n - r_n^0)) \begin{pmatrix} \left(\frac{\partial^2 V}{\partial r_1 \partial r_1} \right)_0 & \left(\frac{\partial^2 V}{\partial r_1 \partial r_2} \right)_0 & \dots & \left(\frac{\partial^2 V}{\partial r_1 \partial r_n} \right)_0 \\ \left(\frac{\partial^2 V}{\partial r_2 \partial r_1} \right)_0 & \left(\frac{\partial^2 V}{\partial r_2 \partial r_2} \right)_0 & \dots & \left(\frac{\partial^2 V}{\partial r_2 \partial r_n} \right)_0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \left(\frac{\partial^2 V}{\partial r_n \partial r_1} \right)_0 & \left(\frac{\partial^2 V}{\partial r_n \partial r_2} \right)_0 & \dots & \left(\frac{\partial^2 V}{\partial r_n \partial r_n} \right)_0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} (r_1 - r_1^0) \\ \vdots \\ (r_n - r_n^0) \end{pmatrix}$$

$$\Leftrightarrow V \approx \frac{1}{2} r^T H r$$

$$\Leftrightarrow \nabla V \approx H r$$

H est appelée la matrice hessienne (ou le hessien) de l'énergie potentielle. C'est une matrice symétrique dont le nombre de lignes (et donc de colonnes) est n.

L'équation de Newton, en utilisant des coordonnées pondérées par la masse, est :

$$\frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} + \vec{\nabla}_i V = 0 \quad \text{avec } i = 1, 2, \dots 3N$$

Ecrite sous forme matricielle, cela donne :

$$\ddot{r} + Hr = 0$$

Comme la solution à une dimension était $x - x_0 = C \cos(\omega t + \varphi)$, on cherche une solution de la forme $r = Tu$ où les éléments du vecteur u sont $u_k = C_k \cos(\omega_k t + \phi_k)$ et où la matrice T est orthogonale (i.e. $T^T T = T T^T = 1$). On obtient donc :

$$r_i - r_i^0 = \sum_{k=1}^{3N} T_{ik} C_k \cos(\omega_k t + \phi_k) \quad (26)$$

Comme on peut le voir dans l'équation 26, le mouvement de la protéine est donc réduit à une somme de vibrations.

L'équation de Newton écrite sous forme matricielle est :

$$\ddot{r} + Hr = 0$$

$$\Leftrightarrow T\ddot{u} + HTu = 0$$

$$(car r = Tu)$$

$$\Leftrightarrow T^T T \ddot{u} + T^T H T u = 0$$

$$\Leftrightarrow \ddot{u} + T^T H T u = 0$$

$$(car T \text{ est orthogonale, i.e. } T^T T = T T^T = 1)$$

$$\text{Or : } \ddot{u}_k = -\omega_k^2 C_k \cos(\omega_k t + \phi_k) = -\omega_k^2 u_k$$

On a donc :

$$\ddot{u} = -\Lambda u$$

$$(avec \Lambda \text{ une matrice diagonale dont les éléments sont } \lambda_k = \omega_k^2)$$

L'équation de Newton peut donc s'écrire sous la forme :

$$-\Lambda u + T^T H T u = 0$$

$$\leftrightarrow T^T H T = \Lambda$$

Dans cette équation de Newton résolue, Λ est la matrice diagonale des valeurs propres et T est la matrice où chaque colonne est un vecteur propre. Ceci revient à trouver un ensemble de vecteurs q_m tels que :

$$H q_m = \lambda_m q_m$$

Où λ_m est la valeur propre ($\lambda_m = \omega_m^2$ avec ω_m la fréquence) et q_m est le vecteur propre (i.e. le mode normal).

Pour calculer les modes normaux, il faut donc diagonaliser le hessien H . Pour un système composé de N atomes, le calcul des modes normaux produira $3N$ vecteurs propres et valeurs propres, les vecteurs propres correspondant à la direction des vibrations et les valeurs propres à la fréquence des vibrations.

Chaque mode décrit un type de mouvement et l'ensemble des mouvements au sein d'un mode sont corrélés. Il est à noter que plus la fréquence d'un mode sera élevée, plus le mouvement qu'il décrit sera local.

2. Le théorème d'équipartition

En mécanique classique, quand une énergie ϵ est quadratique et la température T est constante, pour chaque degré de liberté α :

$$\langle \epsilon_\alpha \rangle = \frac{1}{2} k_B T$$

avec k_B la constante de Boltzmann

En dynamique moléculaire, on cherche à déterminer la vitesse de chaque atome. Dans le cas des modes normaux, c'est l'amplitude C_m de chaque mode m que l'on cherche à déterminer. En appliquant le théorème d'équipartition, on a :

$$V(r_\alpha) \approx \frac{1}{2}k(r_\alpha - r_\alpha^0)^2 \quad \text{et} \quad r_\alpha - r_\alpha^0 = \Delta r_\alpha =$$

$$\sum_{m=1}^{3N} T_{\alpha m} C_m \cos(\omega_m t + \phi_m)$$

$$\rightarrow \langle \varepsilon_\alpha^{\text{Potentiel}} \rangle = \langle \frac{1}{2} k \Delta r_\alpha^2 \rangle = \frac{1}{2} k_B T$$

$$\leftrightarrow \omega_m^2 \langle \frac{1}{2} C_m^2 \rangle = k_B T$$

$$\rightarrow \langle C_m^2 \rangle = \frac{2k_B T}{\omega_m^2}$$

Il est donc possible de déterminer l'amplitude C_m de chaque mode m . Par contre, la phase ϕ_m ne peut être déterminée. Ainsi, les résultats issus de l'analyse de modes normaux et présentés dans ce manuscrit ont tous été obtenus en testant plusieurs phases aléatoires différentes pour chaque mode d'intérêt, afin de vérifier que ces résultats sont indépendants de la valeur de la phase.

3. La méthode DIMB (Diagonalization In a Mixed Basis)

L'une des principales difficultés rencontrées pour le calcul des modes normaux est la diagonalisation d'une matrice de grande taille dans le cas de systèmes comprenant un nombre important d'atomes. En effet, le hessien est une matrice symétrique. Un hessien d'ordre n ($n=3N$ avec N le nombre d'atomes) contient $\frac{n(n+1)}{2}$ éléments. Ainsi, pour une protéine de 400 résidus (soit environ 4000 atomes), il faut diagonaliser une matrice d'ordre 12 000 contenant 72 006 000 éléments, ce qui nécessite environ 600 Mb de RAM. Pour un complexe protéique de plus grande taille, i.e. de 30 000 résidus par exemple (soit environ 300 000 atomes), il faut diagonaliser une matrice d'ordre 900 000, ce qui nécessite environ 5 Tb de RAM.

Pour pallier à ce problème, deux solutions existent. La première est de diminuer le nombre de degrés de liberté du système. Dans ce cas, plusieurs méthodes existent pour y parvenir. On peut, par exemple, considérer que les seuls degrés de liberté du système sont les angles dièdres. On peut

aussi considérer chaque résidu comme un bloc rigide et leur accorder comme degrés de liberté uniquement les translations et rotations sur trois axes (i.e. 6 degrés de liberté par résidu). On peut encore ne considérer que les carbones alpha de la protéine et les lier entre eux par un réseau de ressorts. Cette approche permet de diminuer drastiquement le coût en capacité de calcul mais aboutira à des modes approximatifs car certains degrés de liberté auront été négligés.

La deuxième approche est l'utilisation d'une méthode itérative. C'est sur cette approche que repose la méthode DIMB développée par Liliane Mouawad et David Perahia (Mouawad and Perahia, 1993; Perahia and Mouawad, 1995). Dans cette méthode, la diagonalisation du hessien est réalisée en diagonalisant des sous matrices du hessien (voir equation 27, les sous-matrices à diagonaliser sont indiquées en rouge) en tenant compte de tous les atomes. Par itérations successives, on combine les modes obtenus de la diagonalisation de ces sous-matrices jusqu'à leur convergence.

$$H = \begin{pmatrix} \mathbf{V}^{AA} & \mathbf{V}^{AB} & \mathbf{V}^{AC} & \mathbf{V}^{AD} \\ \mathbf{V}^{BA} & \mathbf{V}^{BB} & \mathbf{V}^{BC} & \mathbf{V}^{BD} \\ \mathbf{V}^{CA} & \mathbf{V}^{CB} & \mathbf{V}^{CC} & \mathbf{V}^{CD} \\ \mathbf{V}^{DA} & \mathbf{V}^{DB} & \mathbf{V}^{DC} & \mathbf{V}^{DD} \end{pmatrix} \quad (27)$$

Cette méthode permet d'obtenir les modes exacts, sans approximation. Néanmoins, les calculs peuvent être longs, en fonction de la précision demandée. Le choix de l'exactitude est laissé à l'utilisateur qui choisit le nombre de degrés de liberté par sous matrices. Plus ce nombre est petit, plus il y aura de sous-matrice à diagonaliser et plus les calculs seront longs à converger. La relation entre le nombre d'éléments dans la matrice à diagonaliser et le nombre de degrés de liberté par sous-matrice est le suivant :

$$s = (n_{chose})^2$$

avec s le nombre d'éléments à diagonaliser et n_{chose} le nombre de degrés de liberté par sous matrice choisi par l'utilisateur.

III. Création des systèmes et paramétrisation

1. Le complexe SERCA1a-SLN inséré dans une membrane de POPC

a) Les simulations de dynamique moléculaire en modèle atomique

Pour étudier l'effet de la SLN sur la conformation de SERCA1a à l'état E1 dans une membrane, 4 systèmes ont été construits :

- 2 systèmes comportant SERCA1a complexé à la SLN
- 2 systèmes comportant SERCA1a isolé

La bicouche lipidique, commune aux 4 systèmes, est composée de 376 molécules de 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC). Les POPC ont été choisis car les têtes polaires de phosphatidylcholine sont les composants phospholipidiques majeurs de la membrane du réticulum sarcoplasmique (70 % du contenu phospholipidique). De plus, les chaînes palmitates et oléates représentent 40% du contenu en acides gras des membranes du réticulum sarcoplasmique (Bick et al., 1998; Gould et al., 1987). Enfin, les lipides de POPC s'assemblent en bicouche avec une épaisseur membranaire d'environ 30 Å, correspondant à une épaisseur membranaire fonctionnellement optimale (Starling et al., 1993). La bicouche a été générée avec le serveur Web CHARMM-GUI (Jo et al., 2008).

Le modèle d'eau utilisé est le modèle TIP3P (Jorgensen et al., 1983). Le nombre de molécules d'eau dans ces systèmes est d'environ 55 800 (voir tableau 2).

Nom du Système	SERCA1a	SERCA1a bis	SERCA1a-SLN	SERCA1a-SLN bis
Nombre de POPC	377	377	376	376
Autre molécule(s)	ATP	ATP	ATP	ATP
Nombre de molécules d'eau	55816	55816	55857	55857
Composition ionique	K ⁺ : 189 Cl ⁻ : 173 Mg ²⁺ : 7 (5 + 2*) Na ⁺ : 1*	K ⁺ : 189 Cl ⁻ : 173 Mg ²⁺ : 7 (5 + 2*) Na ⁺ : 1*	K ⁺ : 189 Cl ⁻ : 173 Mg ²⁺ : 7 (5 + 2*) Na ⁺ : 1*	K ⁺ : 189 Cl ⁻ : 173 Mg ²⁺ : 7 (5 + 2*) Na ⁺ : 1*
Temps de simulation (ns)	217	217	217	217

Tableau 2 : Description des différents systèmes. Les étoiles (*) concernent les ions déjà présents dans la structure obtenue par diffraction aux rayons X

Les concentrations salines du système, KCl et MgCl sont de 100 mM et 3 mM, respectivement (Espinoza-Fonseca et al., 2014). Une même concentration a été appliquée au système grâce à l'option '-conc' de la fonction 'genion' de GROMACS version 5.0.2. Puis 21 ions K⁺ pour les systèmes sans SLN ont été ajoutés au système pour neutraliser la charge globale négative de SERCA1a (la SLN possédant une charge globale de +1, seuls 20 ions K⁺ ont été ajoutés lorsque celle-ci est présente dans le système).

La structure de SERCA1a, ainsi que celle de la SLN dans les systèmes où elle est présente, proviennent toutes deux de la structure du complexe SERCA1a-SLN obtenue par diffraction aux rayons X (code PDB : 3w5a (Toyoshima et al., 2013)). Nous avons préféré cette structure à l'autre structure du complexe SERCA1a-SLN (code PDB : 4h1w (Winther et al., 2013)) car des acides

aminés sont manquant dans la structure de Winther *et al.*. De plus, la structure de la SLN est moins bien résolue.

En ce qui concerne SERCA1a, le groupement acétyle, présent à l'extrémité N_{ter} de la protéine, a été remplacé par un groupement NH₃⁺. L'ion Mg²⁺ présent dans le site de fixation du Ca²⁺ dans la structure initiale a été conservée. De même, l'ion Na⁺, présent dans la structure initiale où il interagit avec les résidus Lys712, Ala714, GLu715, Ala730 et Glu732 du domaine P, a aussi été conservé. La structure du complexe comporte un analogue de l'ATP (le TNP-ATP) dans le site de fixation de l'ATP de SERCA1a. Cet analogue de l'ATP a été retiré dans tous les systèmes pour être remplacé par une molécule d'ATP provenant d'une autre structure de SERCA1a à l'état E1 (code PDB : 1t5s (Sørensen et al., 2004)). Les molécules d'eau et l'ion Mg²⁺ accompagnant l'ATP dans cette structure ont été conservés. Il en est de même pour les molécules d'eau structurales, présentes dans le site de fixation du Ca²⁺ dans la structure initiale. Le tableau 2 récapitule les différences entre les quatre systèmes.

L'état de protonation des résidus ionisables a été attribué en utilisant l'outil PROPKA3.1 (Olsson et al., 2011; Søndergaard et al., 2011), disponible sur le serveur web PDB2PQR (Dolinsky et al., 2004).

L'insertion du complexe SERCA1a-SLN dans une bicouche de POPC a été réalisée grâce au serveur Web CHARMM-GUI et en utilisant la base de données OPM (Lomize et al., 2012). Les dimensions de la boîte de simulation sont de 12.8 nm sur l'axe X, 12.8 nm sur l'axe Y et 17 nm sur l'axe Z.

Conditions de simulation

Les simulations ont été réalisées avec le logiciel GROMACS version 5.0.2 (Berendsen et al., 1995) en utilisant les champs de force Lipid14 (Dickson et al., 2014) pour les lipides et Amber99SB (Hornak et al., 2006) pour la protéine.

La minimisation de l'énergie du système solvaté a été réalisée en utilisant l'algorithme de la « Méthode de la Plus Grande Pente » (« steepest descent algorithm » en anglais) sur 50 000 étapes avec une valeur de tolérance $F_{\max} = 1\,000 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-1}$, puis l'algorithme « Gradient Conjugué » (Hestenes and Stiefel, 1952) sur 50 000 étapes avec une valeur de tolérance $F_{\max} = 100 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-1}$.

Les équations du mouvement de dynamique moléculaire ont été calculées en utilisant l'algorithme 'Leap-frog', dans un ensemble NPT (Nombre d'atomes, Pression et Température constante) avec une pression de 1 bar et une température de 310 K. Le thermostat de Nosé-Hoover (Hoover, 1985; Nosé, 1984) a été utilisé durant les étapes d'équilibration et de production, séparément pour la protéine, la bicouche et le solvant. Le barostat de Parinello-Rahman (Parrinello and Rahman, 1981; Rahman and Stillinger, 1971) a été utilisé durant les étapes d'équilibration et de production, en conditions semi-isotropiques. Un pas d'intégration de 2 fs a été choisi, en utilisant l'algorithme LINCS (Hess et al., 1997). Des conditions aux limites périodiques ont été appliquées sur les trois dimensions du système. La méthode V-Switch a été utilisée pour les interactions de van der Waals de 1,0 nm à 1,2 nm. Une sommation des PME (Particle Mesh Ewald) avec un cut-off de 1,2 nm a été appliquée pour les interactions électrostatiques.

L'équilibration a été réalisée pendant 17 ns avec des contraintes de positions fortes ($100\,000 \text{ kJ/mol.nm}^2$) dans les trois dimensions. Pendant les 5 premières secondes de l'équilibration, les contraintes ont été appliquées sur l'ensemble des atomes de la protéine puis, successivement, uniquement sur les atomes lourds de la protéine pendant 2 nanosecondes, sur les atomes lourds du squelette peptidique pendant 5 nanosecondes et sur les carbones α pendant 5 nanosecondes.

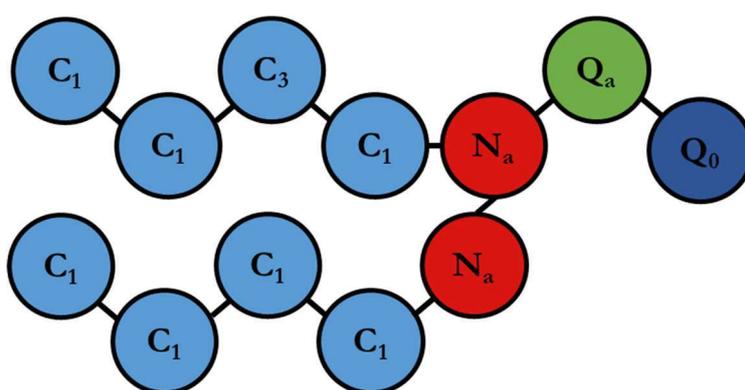
La production de chaque simulation ont été démarrées avec deux jeux de vitesses différents correspondant à 310 K. Les coordonnées des atomes ont été sauvegardées toutes les 2 picosecondes. La durée des simulations est résumée dans le tableau 2.

b) Les simulations de dynamique moléculaire en modèle gros-grain

Dans le but d'étudier le complexe SERCA1a-SLN dans une membrane sur des échelles de temps supérieures à celles permises en modèle atomique, un système en modèle gros-grain a été construit en utilisant le mapping et le champ de force MARTINI (Marrink et al., 2004, 2007; Monticelli et al., 2008).

Après conversion de la structure du complexe SERCA1a-SLN du modèle atomique au modèle MARTINI, SERCA1a est composé de 2 116 particules (contre 15 435 atomes en modèle atomique) et la SLN est composée de 74 particules (contre 549 atomes en modèle atomique). La bicouche lipidique est composée de 423 molécules de POPC. Le mapping MARTINI du POPC est présenté en figure 21.

Le modèle d'eau utilisé est le modèle d'eau MARTINI non polarisé (Marrink et al., 2004). Le nombre de particules d'eau dans ce système est de 11 807, le mapping MARTINI des molécules



1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

Figure 21 : Représentation MARTINI d'une molécule de POPC. Le groupement choline est représenté par une particule chargée incapable de former des liaisons hydrogènes, le groupement phosphate est représenté par une particule chargée accepteur d'hydrogène, les groupements carbonyle sont représentés par des particules intermédiaires accepteurs d'électrons et les chaînes aliphatiques sont représentés par 4 particules apolaires, pour la chaîne palmitate comme pour la chaîne oléate. La seule distinction entre les deux chaînes est la présence d'une particule C₃ dont la polarité est plus importante et qui est censée mimer la présence de la double liaison.

d'eau étant de 4 molécules pour 1 particule, ceci équivaut à 47 228 molécules d'eau en modèle atomique. Un inconvénient du champ de force MARTINI est que l'eau a une température de fusion supérieure à 0°C et peut donc geler à température ambiante, sous certaines conditions. Pour remédier à ce problème, la version 2.0 du modèle MARTINI a introduit un type spécial de particule d'eau dont les interactions avec les autres particules d'eau empêchent la formation de glace, le paramètre σ des interactions Lennard-Jones ayant été augmenté de 0,57 nm. 621 de ces particules d'eau antigel ont été ajoutées au système, soit 5 % de la totalité de l'eau du système. Dans le but d'obtenir une concentration en NaCl de 0,1 M, 149 ions Cl⁻ et 171 ions Na⁺ (24 de plus que les ions Cl⁻ pour obtenir une charge globale du système neutre) ont été ajoutés au système.

L'insertion du complexe SERCA1a-SLN dans une bicouche de POPC a été réalisée grâce au programme InflateGRO2 (Schmidt and Kandt, 2012) et l'orientation de la protéine a été déterminée à partir de la base de données OPM (Lomize et al., 2012). La dimension de la boîte de simulation est de 11,7 nm sur l'axe X, 11,7 nm sur l'axe Y et 17,3 nm sur l'axe Z.

Conditions de simulation

Les simulations ont été réalisées avec le logiciel GROMACS version 5.0.4 (Berendsen et al., 1995) en utilisant le champ de force MARTINI version 2.2 et le réseau élastique Elnedyn version 2.2 permettant de maintenir la structure secondaire de la protéine (Periole et al., 2009).

La minimisation de l'énergie du système solvaté a été réalisée en utilisant l'algorithme de la « Méthode de la Plus Grande Pente » sur 100 000 étapes avec une valeur de tolérance $F_{\max} = 100 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-1}$, puis l'algorithme « Gradient Conjugué » (Hestenes and Stiefel, 1952) sur 100 000 étapes avec une valeur de tolérance $F_{\max} = 10 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-1}$.

Les équations du mouvement de dynamique moléculaire ont été calculées en utilisant l'algorithme 'Leap-frog', dans un ensemble NPT (Nombre d'atomes, Pression et Température constante) avec une pression de 1 bar et une température de 310 K. Le thermostat de Berendsen

(Berendsen et al., 1984) a été utilisé durant les étapes d'équilibration et de production, séparément pour la protéine, la bicouche et le solvant. Le barostat de Berendsen (Berendsen et al., 1984) a été utilisé durant les étapes d'équilibration et de production, en conditions semi-isotropiques. Un pas d'intégration de 20 fs a été choisi, en utilisant l'algorithme LINCS (Hess et al., 1997). Des conditions aux limites périodiques ont été appliquées sur les trois dimensions du système. La méthode V-Switch a été utilisée pour les interactions de van der Waals de 0,9 nm à 1,2 nm. Une sommation des PME (Particle Mesh Ewald) avec un cut-off de 1.2 nm a été appliqué pour les interactions électrostatiques.

L'équilibration a été réalisée pendant 100 ns avec des contraintes de positions (1 000 kJ/mol.nm²) dans les trois dimensions sur les particules de la protéine. Les étapes de production de chaque simulation ont été ensuite réalisées sans contraintes et pendant une durée de 5 μ s. Les coordonnées des particules ont été sauvegardées toutes les 20 ns.

c) L'analyse des modes normaux

Une étape importante pour le calcul des modes normaux est la minimisation d'énergie du système. En effet, l'approximation harmonique (voir équation 24) n'est valable qu'au voisinage du minimum d'énergie (i.e. que x_0 est la structure d'énergie minimum et donc que $\left(\frac{dV}{dx}\right)_{x_0} = 0$). Cela nécessite donc que l'énergie du système soit au minimum avant de calculer les modes normaux. En pratique, une très faible valeur du rms du gradient de l'énergie (GRMS) est nécessaire :

$$GRMS = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{3N} \left(\frac{\partial V}{\partial r_i}\right)^2}{3N}} \approx 10^{-4} kcal/mol. \text{Å}$$

Quand le gradient n'est pas infinitésimal, le calcul des modes aboutit à des valeurs propres négatives correspondant à des fréquences imaginaires.

Nous avons directement utilisé les systèmes que nous avons générés pour les simulations de dynamique moléculaire. L'eau libre a été supprimée dans les deux systèmes car nous n'en avons pas besoin pour le calcul des modes. Une couche d'eau a néanmoins été conservée autour de la protéine pour éviter que les domaines exposés au solvant de SERCA1a soient minimisés dans le vide. Nous avons ensuite appliqué un protocole de minimisation intensif à nos systèmes en utilisant CHARMM (Brooks et al., 1983, 2009) version 36 et son champ de force associé (Best et al., 2012; Klauda et al., 2010). Ce protocole est divisé en trois étapes :

- Minimisation de l'ATP : La longueur des liaisons entre les atomes de phosphores et les atomes d'oxygènes des groupements phosphates de l'ATP étaient trop élevées par rapport à leur valeur de référence. Nous avons donc réalisé une première minimisation avec l'algorithme de la « Méthode de la Plus Grande Pente » (Hestenes and Stiefel, 1952) pendant 10 étapes en appliquant des contraintes fortes sur l'ensemble des atomes du système, à l'exception de ceux composant les groupements phosphates de l'ATP.
- Minimisation avec contraintes harmoniques : Six cycles de 100 pas de minimisation ont été réalisés en utilisant l'algorithme du « Gradient Conjugué » (Hestenes and Stiefel, 1952) et en appliquant des contraintes harmoniques décroissantes sur l'ensemble des atomes du système.
- Minimisation sans contraintes : Cette dernière étape de minimisation a été réalisée en enchainant plusieurs cycles de 1000 étapes avec l'algorithme du « Gradient Conjugué » (Hestenes and Stiefel, 1952), jusqu'à ce que la valeur du GRMS atteigne 10^{-4} kcal/mol.Å, soit 21 cycles dans le cas du complexe SERCA1a-SLN et 22 cycles dans le cas de SERCA1a isolée.

2. Paramétrisation de l'ancre acyle

La dérivation des charges RESP (Restrained ElectroStatic Potential) pour la cystéine palmitoylée compatible avec le champ de force Amber99SB (Hornak et al., 2006) a été réalisée en utilisant le serveur Web RED version 3.0 (Dupradeau et al., 2010; Vanqualef et al., 2011). La dérivation des charges RESP est basée sur l'approche 'Building Blocks'. Dans cette approche, la cystéine palmitoylée est découpée en différents fragments chimiques élémentaires avec des conformations bien définies (Dupradeau et al., 2010; Gouin et al., 2007; Vanqualef et al., 2011). La cystéine palmitoylée a été découpée en deux fragments moléculaires : le résidu cystéine et la chaîne acyle (fig. 22). Le fragment cystéine a été bloqué avec un groupement acetyl ($\text{CH}_3\text{-CO}$) sur son extrémité N_{ter} , un groupement N-méthylamine (NH-CH_3) sur son extrémité C_{ter} et un groupement methyl sur le soufre de l'extrémité de sa chaîne latérale. La chaîne acyle, en conformation all-trans, a été bloquée avec un groupement sulfhydryle (SH). Les contraintes de charge pour chaque groupement bloquant sont nulles. Des contraintes de charge ont été appliquées pour les groupements N-H et C=O du squelette peptidique de la cystéine ($\text{N} = -0.41$; $\text{H} = 0.27$; $\text{C} = 0.59$; $\text{O} = -0.56$) et deux orientations moléculaires différentes (conformations en hélice- α et en feuillet- β (Cieplak et al., 1995)) ont été prises en compte pour le calcul des charges.

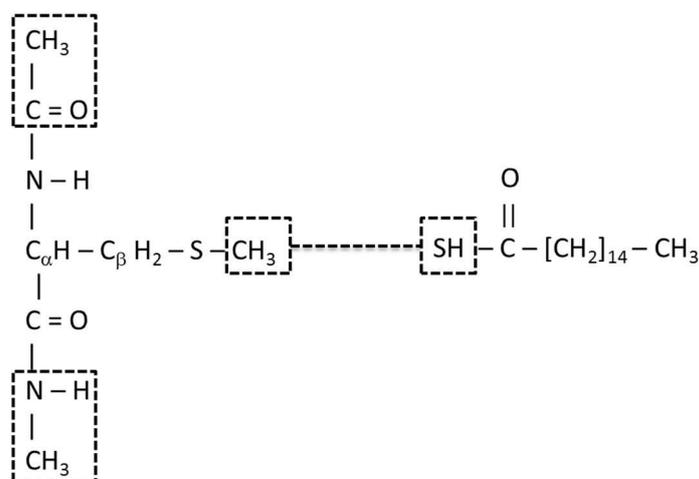


Figure 22 : Représentation de la fragmentation de la cystéine palmitoylée pour la dérivation des charges RESP. Les groupements bloquants ajoutés aux fragments sont encadrés par des pointillés.

L'optimisation de la géométrie, le calcul des fréquences et du MEP (Potentiel Electrostatique Moyen) de chaque bloc ont été réalisés en phase gazeuse avec le programme Gaussian09_A02 (Frisch et al., 2009) en utilisant le niveau théorique HF/6-31G* (Hehre et al., 1969, 1970, 1972). Les conformations des 'Building Blocks' ayant les plus faibles minima énergétiques ont été conservées pour la procédure de calcul des charges. L'ajustement des charges a été réalisé avec le programme RESP, implémenté dans le serveur RED. Le type de charge RESP_A1, compatible avec le type d'atome du champ de force Amber99SB a été sélectionné. L'algorithme de Connolly (Connolly, 1983a, 1983b) a été utilisé pour calculer la grille de points utilisée pour le calcul des MEP. L'orientation moléculaire de chaque géométrie utilisée a été contrôlée avec l'algorithme de réorientation des corps rigides.

Les liaisons manquantes, les angles et les dièdres sont issus de la publication de Oda et al. (Oda et al., 2013) et ajoutés au champ de force. L'annexe 1 résume les paramètres de la cystéine palmitoylée.

3. La SLN isolée insérée dans une membrane de POPC

Pour étudier l'effet de l'acylation sur la SLN isolée dans une bicouche lipidique, 6 systèmes ont été construits :

- 2 systèmes comprenant la SLN de lapin non acylée
- 2 systèmes comprenant la SLN de lapin palmitoylée
- 2 systèmes comprenant la SLN humaine

Seule la partie protéique varie entre ces systèmes. La composition lipidique (POPC) et le type d'eau est le même. Le nombre de lipides, de molécules d'eau et d'ions varie peu (voir tableau

3)

Nom du système	Modification post-traductionnelle	Nombre de POPC	Nombre de molécules d'eau	Composition ionique	Taille du système	Temps de simulation (ns)
SLN de lapin	-	128	5253	Cl ⁻ : 1	6,3 x 6,6 x 7,7	1317
SLN de lapin bis	-	128	5253	Cl ⁻ : 1	6,3 x 6,6 x 7,8	1017
SLN de lapin palmitoylée	Palmitoylation sur Cys9	126	4346	Cl ⁻ : 1	6,4 x 6,7 x 6,8	600
SLN de lapin palmitoylée bis	Palmitoylation sur Cys9	126	4346	Cl ⁻ : 1	6,5 x 6,9 x 7,7	617
SLN humaine	-	126	5253	Cl ⁻ : 1	6,4 x 6,7 x 7,6	1017
SLN humaine bis	-	126	5253	Cl ⁻ : 1	6,4 x 6,7 x 7,6	1017

Tableau 3 : Description des différents systèmes.

Le modèle d'eau utilisé est le modèle TIP3P (Jorgensen et al., 1983). Le nombre de molécules d'eau dans ces systèmes varie de 4346 à 5271 suivant le système (voir tableau 3). La membrane étant composée de POPC, un lipide zwitterionique à pH 7 et la SLN possédant une charge globale de +1, un ion Cl⁻ a été ajouté pour neutraliser la charge globale du système.

La structure initiale de la SLN provient de la structure du complexe SERCA1a-SLN obtenue par diffraction aux rayons X (code PDB : 3w5a (Toyoshima et al., 2013)). A l'exception de l'ajout des atomes d'hydrogène, aucune modification n'a été réalisée sur la structure initiale, sauf pour les systèmes comprenant une SLN acylée. L'ajout de l'ancre palmitate a été réalisé grâce à l'outil 'Join Models' de Chimera (Pettersen et al., 2004).

L'insertion de la protéine au sein de la membrane a été réalisée grâce à l'outil InflateGRO (Kandt et al., 2007) en utilisant une bicouche de POPC préalablement équilibrée. Un tilt initial de 0 ° a été choisi.

La protonation des résidus chargés (i.e. Glu2, Arg3, Arg6, Glu7 et Arg27) a été réalisée en considérant le milieu à pH 7.

Les simulations ont été réalisées avec le logiciel GROMACS (Berendsen et al., 1995) version 4.6.2 en utilisant les champs de force Slipids (Jämbeck and Lyubartsev, 2012a, 2012b) pour les lipides et Amber99SB (Hornak et al., 2006) pour la protéine. Les paramètres de l'ancre acyle décrits précédemment ont été ajoutés au champ de force.

La minimisation a été réalisée en utilisant l'algorithme de la « Méthode de la Plus Grande Pente » sur 1 000 000 d'étapes avec une valeur de tolérance $F_{\max} = 1\ 000\ \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-1}$.

Les équations du mouvement de dynamique moléculaire ont été calculées en utilisant l'algorithme 'Leap-frog', dans un ensemble NPT (Nombre d'atomes, Pression et Température constante) avec une pression de 1 bar et une température de 310 K. Le thermostat de Nosé-Hoover (Hoover, 1985; Nosé, 1984) a été utilisé durant les étapes d'équilibration et de production, séparément pour la protéine, la bicouche et le solvant. Le barostat de Parrinello-Rahman (Parrinello and Rahman, 1981; Rahman and Stillinger, 1971) a été utilisé durant les étapes d'équilibration et de production, en conditions semi-isotropiques. Un pas d'intégration de 2 fs a été choisi, en utilisant en parallèle l'algorithme LINCS (Hess et al., 1997) pour contraindre l'oscillation des liaisons entre les hydrogènes et les atomes lourds de la protéine à leur valeur d'équilibre. Des conditions aux limites périodiques ont été appliquées sur les trois dimensions du système. La méthode V-Switch a été utilisée pour les interactions de van der Waals de 1,0 nm à 1,2 nm. Une sommation des PME (Particle Mesh Ewald) avec un cut-off de 1,2 nm a été appliqué pour les interactions électrostatiques.

L'équilibration a été réalisée en appliquant le même protocole que celui utilisé pour les systèmes SERCA1a-SLN insérés dans une bicouche de POPC (voir section III.1 du Matériel et Méthode).

Les étapes de production de chaque simulation ont été démarrées avec deux jeux de vitesses différents (correspondant à 310 K). Le tableau 3 résume la durée des trajectoires générées pour les différentes simulations.

IV. Programmes d'analyse des données

Les données issues de simulations de dynamique moléculaires en tout-atome consistent en l'ensemble des coordonnées des atomes composant le système étudié et ce pour chaque image séparée par un pas de temps Δt . Ainsi, la quantité de données générées pour une simulation de l'ordre de plusieurs centaines de nanosecondes sur un système de plusieurs dizaines de milliers d'atomes est conséquente. Pour en extraire une information précise, il est donc nécessaire d'utiliser et de développer des programmes adaptés.

Certains programmes de simulations comme GROMACS (Berendsen et al., 1995) ou CHARMM (Brooks et al., 1983) possèdent des outils permettant l'analyse de ces données. Cependant, les outils proposés par ces programmes permettent de réaliser uniquement les analyses les plus couramment effectuées par les dynamiciens. Or, la diversité des systèmes biologiques et donc des problématiques scientifiques qui leurs sont associées obligent les dynamiciens à recourir à d'autres outils informatiques.

Ainsi, compte tenu de cette problématique, j'ai écrit tout au long de ma thèse de nombreux programmes d'analyse me permettant d'extraire des paramètres précis parmi cette quantité importante de données. Le développement de ces programmes a été réalisé en utilisant le langage de programmation Python et certains de ces modules associés, tel que le module NumPy qui contient de nombreuses fonctions mathématiques prédéfinies ou le module MdTraj (McGibbon et al., 2015) qui permet de lire une trajectoire de dynamique moléculaire et contient de nombreuses fonctions d'analyses prédéfinies.

1. L'épaisseur de la membrane

La diffusion aux rayons X et la diffusion aux neutrons sont les deux techniques les plus largement utilisées pour l'étude structurale des bicouches lipidiques. La meilleure résolution de l'épaisseur d'une bicouche obtenue par diffusion aux rayons X correspond à la distance D_{HH} qui est la distance entre les têtes polaires des lipides (i.e., les groupements phosphates). A contrario, la diffusion aux neutrons est parfaitement adaptée pour l'analyse de l'épaisseur de Luzatti D_B , mesurée grâce au contraste élevé entre l'eau deutérée et les lipides protonés (Kucerka et al., 2009). Cependant, une comparaison des données expérimentales avec des résultats issus de simulations de dynamiques moléculaires en tout-atome d'une bicouche de POPC montre que l'épaisseur D_{HH} est mieux reproduite pour le champ de force Slipids, comparée à l'épaisseur de Luzatti D_B (Jämbeck and Lyubartsev, 2012a, 2012b).

Le programme Python 'Zp_distribution.py' permet d'analyser la distribution sur l'axe Z des groupements phosphates d'une bicouche de PC en prenant en compte la nomenclature des atomes pour le champ de force Slipids.

Pour cela, le programme extrait les coordonnées sur l'axe Z de l'ensemble des atomes composant les groupements phosphates (i.e. les atomes P, O11, O12, O13 et O14) et ce pour chaque lipide de la membrane. Il calcule ensuite le centre de la bicouche à chaque image pour discriminer les lipides du feuillet supérieur de ceux du feuillet inférieur puis calcule la distribution du centre de masse sur l'axe Z des groupements phosphates des deux feuillets, en prenant en compte le numéro atomique de chaque atome dans le calcul. La différence entre les maximas des deux distributions, celle du feuillet supérieur et celle du feuillet inférieur de la bicouche, permet d'obtenir l'épaisseur de la membrane.

2. Le tilt

Le tilt d'une hélice transmembranaire représente son inclinaison vis-à-vis de la normale au plan de la membrane (fig. 23). Le programme Python 'Helix_tilt.py' permet de calculer l'angle τ d'une hélice transmembranaire par rapport à la normale à la membrane et en fonction du temps.

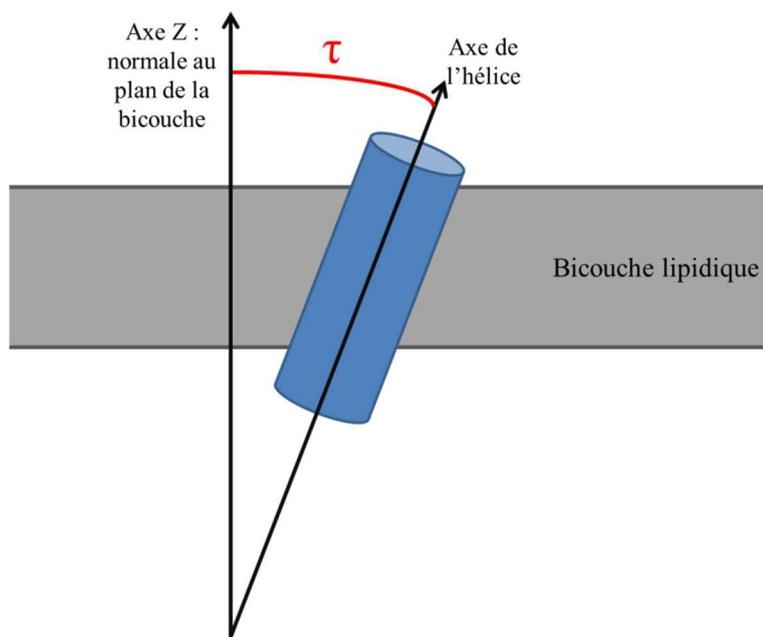


Figure 23 : Représentation du tilt d'une hélice transmembranaire

Pour cela, il définit les coordonnées des atomes du squelette peptidique de la protéine (C, C α , N) des résidus compris dans l'hélice transmembranaire pour chaque image de la simulation et calcule une matrice d'inertie. Il détermine ensuite la plus petite des trois valeurs propres de cette matrice et, à partir de la projection sur l'axe Z du vecteur qui lui est associé (i.e. sa coordonnée sur l'axe Z), calcule l'angle entre ce vecteur et l'axe Z qui équivaut à la normale au plan de la bicouche.

3. Position des atomes dans la membrane

Expérimentalement, il est possible d'estimer l'enfouissement d'une protéine membranaire au sein d'une bicouche lipidique en utilisant la diffraction aux rayons X (Luecke et al., 1999), la résonance paramagnétique électronique (Brotherus et al., 1981) ou encore la spectroscopie de fluorescence (Powl et al., 2003). Cependant, ces techniques restent pour la plupart des mesures indirectes de l'analyse du positionnement d'une molécule dans une bicouche lipidique. L'analyse des données issues de simulation de dynamique moléculaire d'un système membranaire permet le calcul de l'enfouissement d'une molécule au sein d'une bicouche lipidique, à partir des coordonnées de la molécule sur l'axe Z qui, par convention, est orthogonal au plan de la bicouche.

Les programmes Python ‘alphaCarbon_Z_Coordinates.py’, ‘acyl_Height.py’ et ‘Leaflet_Heights.py’ permettent d’analyser la position moyenne relative sur l’axe Z des atomes sélectionnés. Dans le but de comparer les résultats des différentes simulations entre eux, le centre de la bicouche sur l’axe Z est calculé et est soustrait à la coordonnée en Z de l’atome étudié, et ce pour chaque image.

En ce qui concerne le programme ‘alphaCarbon_Z_Coordinates.py’, une analyse de la position relative des carbones α en fonction du temps est aussi réalisée, et ce pour chaque résidu.

4. Les paramètres d’ordre Carbone – Deutérium S_{CD}

En RMN du solide, le paramètre d’ordre Carbone – Deutérium est une mesure de l’anisotropie du mouvement de la liaison C – D analysée et permet l’étude de son orientation moyenne sur une période donnée (i.e. le temps de l’analyse). Il est défini comme tel :

$$S_{CD} = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle$$

Avec θ l’angle à un instant t entre la liaison C – D et la normale au plan de la bicouche.

Dans la littérature, le S_{CD} est rarement évoqué. On lui préférera le $|S_{CD}|$ ou le $-S_{CD}$. Les programmes Python ‘Scd_analyzer.py’ et ‘Scd_palm.py’ permettent donc de calculer ces deux paramètres pour les carbones des chaînes aliphatiques des lipides et de l’ancre palmitate, respectivement. Il est à noter que, dans le cas de nos simulations, ces carbones sont hydrogénés et non deutérés. C’est donc la liaison C – H qui est prise en compte.

Pour cela, les programmes extraient les coordonnées du vecteur C – H et calculent l’angle entre ce vecteur et l’axe Z. L’opération est répétée pour chaque hydrogène lié au carbone et pour chaque carbone de la chaîne aliphatique analysée (i.e. les chaînes sn1 et sn2 pour les lipides et l’ancre palmitate pour la cystéine palmitoylée) et la moyenne est calculée pour chaque carbone dans le cas où plus d’un hydrogène y est lié, et ce pour chaque image de la trajectoire. Les valeurs des angles

de chaque carbone sont ensuite moyennées sur l'ensemble des images pour réaliser le calcul du S_{CD} pour chaque liaison C – H.

5. Nombre de lipides dans l'anneau lipidique

Dans le cadre des interactions protéine-lipides, on distingue 3 classes de lipides: les lipides dits « structuraux » qui établissent des interactions fortes avec les résidus de la protéine, les lipides substrats (comme les phosphosérines pour les ATPases de type P4 (Palmgren and Nissen, 2011)) et l'anneau lipidique. Les lipides composant la première couche directement en contact avec la région transmembranaire d'une protéine constituent l'anneau lipidique. Ces lipides interagissent généralement de manière non-spécifique avec la protéine. Du fait de cette absence de spécificité, la composition de l'anneau lipidique est souvent similaire à la composition lipidique du reste de la membrane. La nature des lipides composant cet anneau est néanmoins importante pour déterminer l'état conformationnel de la protéine membranaire et influe sur son activité, via des liaisons hydrogènes entre les têtes polaires des lipides et les résidus de la protéine mais aussi via les interactions hydrophobes entre la protéine et les lipides de l'anneau (Lee, 2005, 2011).

Le programme Python 'lipidNumberByLeaflet.py' permet d'analyser la variation du nombre de lipides composant cet anneau autour de la SLN en fonction du temps, et d'étudier l'effet de la palmitoylation sur le nombre de lipides composant cet anneau. Pour cela, le programme compte le nombre de lipides dont le centre de masse est à une distance inférieure ou égale à une valeur choisie par l'utilisateur du centre de masse d'un résidu de la protéine, et ce pour chaque résidu. Pour déterminer la valeur référence idéale, une analyse du nombre de lipides composant l'anneau en fonction de différentes valeurs références a été réalisée. On observe qu'à partir de 5 Å, le nombre de lipides composant l'anneau évolue de façon linéaire par rapport à la valeur du cut-off. L'aire par lipide d'un POPC dans une membrane à une température de 303 K et une pression d'1 atm est de $0,643 \pm 0,013 \text{ nm}^2$ (Kučerka et al., 2011). Nous avons donc choisi la valeur référence arbitraire de

0,9 nm pour définir la taille de notre anneau lipidique, afin de nous assurer que l'anneau lipidique contient la première couche lipidique autour de la protéine.

Cette définition de l'anneau lipidique est utilisée pour toute analyse où une comparaison entre les lipides de l'anneau et les autres lipides de la bicouche est réalisée

6. Interactions protéine-lipides

Il existe des programmes pour analyser les diverses interactions entre une protéine membranaire et les lipides adjacents issues de simulations de dynamique moléculaire. Cependant, à ma connaissance, ces programmes analysent les « contacts » entre deux atomes ou groupes d'atomes (i.e. les images ou la distance entre les deux interactants est inférieure à une distance donnée). Il suffit que la distance entre les deux interactants soit supérieure à une distance donnée pour que le programme considère que l'interaction est rompue. Or, quelle que soit la nature de la liaison analysée, la distance entre les deux interactants fluctue autour d'une valeur moyenne, notamment à cause de l'agitation thermique du système. La distance entre les deux interactants peut être supérieure à la valeur référence de façon ponctuelle sans que l'interaction soit rompue. De même, deux molécules peuvent être séparées par une distance inférieure à la valeur référence sans qu'il n'y ait réellement d'interaction. Il est donc nécessaire de prendre cet aspect en compte lors de l'analyse d'une interaction.

Un programme écrit par N. Perrot (Perrot, 2015) pour l'analyse des interactions hydrophobes entre les lipides et une protéine dans le cas d'un système composé d'une hélice transmembranaire insérée dans une bicouche prend en compte ces variations de la distance entre deux interactants. Il a été utilisé pour développer le programme Python « lip-prot_interactions.py » présenté ici.

Le but de ce programme est de décrire graphiquement l'ensemble des interactions entre une protéine membranaire et les lipides qui interviennent au sein d'une simulation de dynamique

moléculaire en tout-atome. Pour cela, il mesure à chaque image la distance entre les atomes lourds de la protéine et ceux des lipides.

Lorsque toutes les distances ont été mesurées et enregistrées pour la totalité des images composant la trajectoire, le programme vérifie si les distances sont inférieures ou égales à un cut-off choisi par l'utilisateur. Si c'est le cas, le programme indique qu'il y a contact hydrophobe.

Le logiciel analyse ensuite l'évolution des contacts hydrophobe au cours du temps pour y déceler des interactions hydrophobes. En effet, une distinction est faite entre contact hydrophobe et interaction hydrophobe. Une interaction est considérée comme telle si le contact hydrophobe est maintenu pendant plus de 500 ps. De plus, si une interaction est décelée (i.e. que le contact est maintenu pendant plus de 500 ps) mais que celle-ci est interrompue par une perte de contact inférieur ou égale à 200 ps, le programme ne considère pas la perte de l'interaction (i.e. le gap est effacé). La figure 24 montre la différence entre un contact hydrophobe (fig. 24a) et une interaction hydrophobe (fig 24b).

Le programme génère un fichier renseignant de l'ensemble des interactions hydrophobes entre la protéine et les lipides sur toute la trajectoire analysée, le numéro du résidu protéique est renseigné pour chaque interaction. Pour chaque résidu interagissant avec un lipide dans la simulation, le programme indique le nombre de lipides formant une interaction avec ce résidu durant la trajectoire, la durée de l'interaction la plus longue et le lipide concerné, ainsi que la durée moyenne d'interaction si plusieurs interactions avec des lipides ont été observées pour ce résidu.

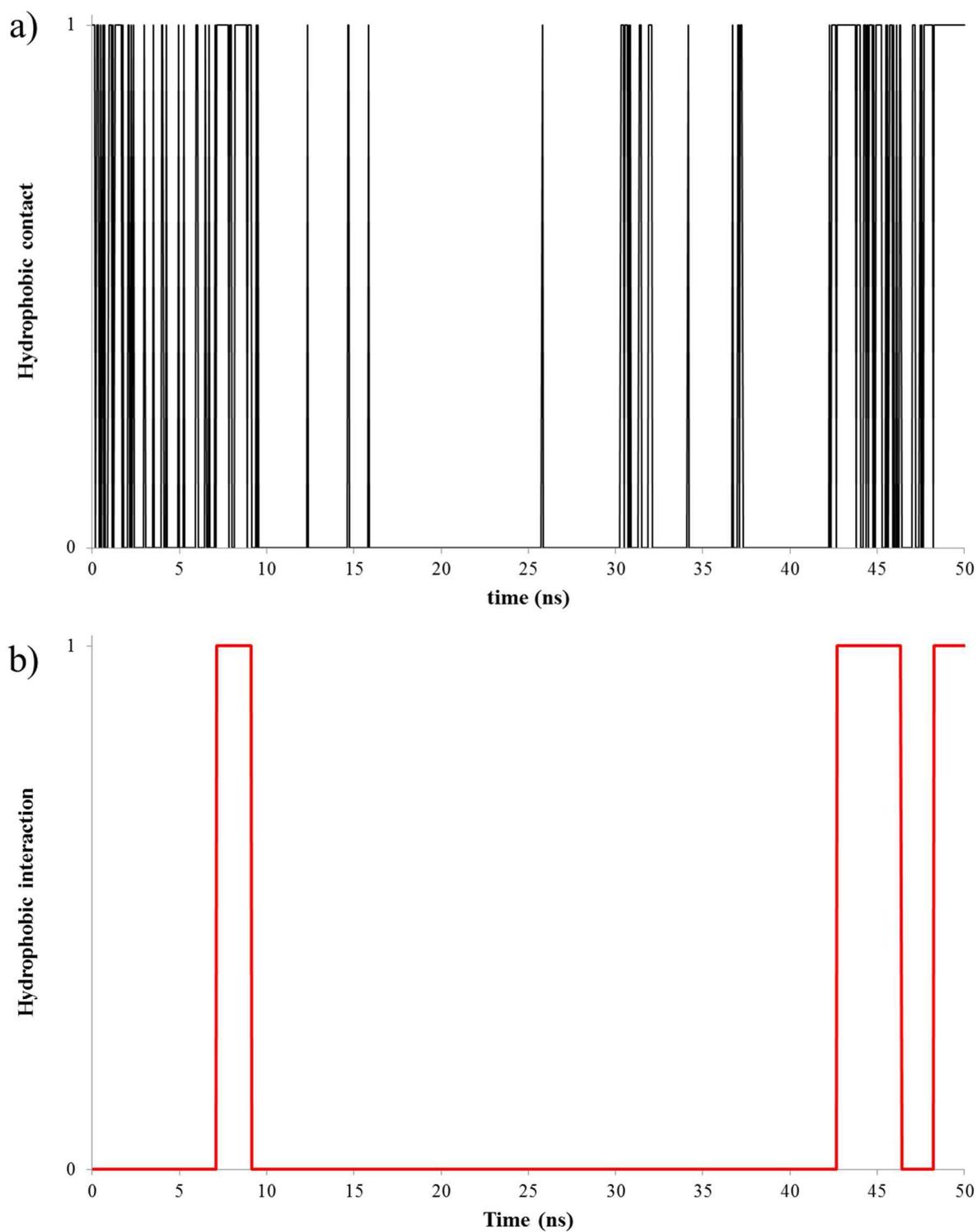


Figure 24 : a) Evolution du contact hydrophobe en fonction du temps entre deux résidus (cut-off = 8,5 Å). b) Evolution de l'interaction hydrophobe en fonction du temps entre deux résidus (cut-off = 8,5 Å).

Chapitre III : La Sarcolipine

La SLN est un régulateur de SERCA1a et la plupart des publications concernant ce peptide traitent de son interaction avec l'ATPase et de ses effets sur la fonction de SERCA1a. Quelques études ont été réalisées sur le peptide seul, traitant notamment de la structure et de l'orientation du peptide humain en présence de détergent (Buck et al., 2003; Buffy et al., 2006a; Mascioni et al., 2002) ou de phospholipides (Buffy et al., 2006b). Cependant, ces études ont été réalisées sur la SLN humaine. Or, la séquence du peptide varie suivant les espèces et, chez certaines d'entre elles, un résidu cystéine est présent en position 9 (fig. 25) et permet à la SLN de subir une modification post-traductionnelle, la palmitoylation. Cette modification post-traductionnelle consiste en l'ajout d'une chaîne aliphatique sur la chaîne latérale du résidu Cys9, via la formation d'une liaison thioester. Le rôle de cette acylation sur la SLN reste inconnu à l'heure actuelle.

La palmitoylation d'une protéine membranaire soulève de nombreuses questions. En effet,

Lapin	¹ MERS	⁵ TRELC	¹⁰ LNFTV	¹⁵ VLITV	²⁰ ILWL	²⁵ LVRSY	³⁰ QY
Humain	¹ MGIN	⁵ TRELF	¹⁰ LNFTI	¹⁵ VLITV	²⁰ ILMWL	²⁵ LVRSY	³⁰ QY

Figure 25 : Comparaison des séquences en acides aminés de la SLN de lapin et humaine. En noir, les résidus identiques. En couleurs, les résidus différents : en vert, les résidus hydrophobes ; en orange, les résidus polaires ; en bleu et en rouge, les résidus chargés positivement et négativement respectivement.

alors que pour les protéines solubles cette modification post-traductionnelle assure leur ancrage à la membrane, ce rôle n'est pas nécessaire pour les protéines membranaires. Différentes études ont permis de mettre en évidence plusieurs rôles possibles de l'acylation: modification du positionnement dans la membrane en imposant une inclinaison à la protéine (Abrami et al., 2008; Morozova and Weiss, 2010); modification de la capacité à diffuser dans le plan de la membrane (Kim Wook et al., 2014); régulation des interactions avec d'autres partenaires protéiques (Lakkaraju et al., 2012); compartimentation dans certains domaines membranaires via des interactions avec des lipides spécifiques (Delint-Ramirez et al., 2011).

Aussi, pour étudier le comportement de la SLN isolée et notamment comprendre le rôle de la palmitoylation du peptide chez certaines espèces, nous avons réalisé des simulations de dynamique moléculaire en tout-atome de la SLN de lapin, palmitoylée et non palmitoylée, ainsi que de la SLN humaine. La structure initiale de la SLN de lapin est extraite des données de diffraction aux rayons X du complexe SERCA1a-SLN (code PDB : 3w5a (Toyoshima et al., 2013)). Pour les simulations avec l'ancre palmitoylée, nous avons au préalable paramétré l'ancre (voir Matériel et méthode) et nous avons dû ajouter l'ancre palmitoylée sur la cystéine 9 car elle n'est pas présente dans la structure cristallographique. En effet, la carte de densité électronique ne révèle pas la présence d'une acylation au niveau du résidu Cys9. La SLN de lapin est structurée en hélice alpha du résidu 3 au résidu 27 dans la structure cristallographique du complexe. La structure initiale de la SLN humaine provient des données expérimentales publiées par Buffy et al. (Buffy et al., 2006b). Ces données ont été obtenues en présence de lipides DOPC/DOPE (4/1) par RMN du solide et montrent une structure en hélice du résidu Ile3 au résidu Arg27. Ces structures ont ensuite été insérées dans une bicouche de POPC hydratée pour les simulations de dynamique moléculaire (voir section Matériel et méthode).

I. Structure secondaire

La structure secondaire de la SLN a été suivie au cours de la dynamique (fig. 26). Dans toutes les dynamiques de la SLN de lapin, acylée ou non, et dans une des simulations de la SLN humaine (fig 26f), la protéine conserve une structuration en hélice alpha, mais celle-ci s'étend du résidu Thr5 au résidu Arg27. Le premier tour d'hélice disparaît au cours de la dynamique dès les premiers pas de dynamique (dans le cas de la SLN de lapin non acylée, fig 26b) ou au bout de plusieurs centaines de ns (dans le cas de SLN de lapin palmitoylée par exemple fig 26d). Dans le cas de la SLN humaine (fig 26e), le N-ter adopte une structuration de type Turn, tandis que l'hélice en C-terminale s'arrête au résidu Leu25. Une structure similaire est observée pendant les premières nanosecondes de l'une des simulations de la SLN de lapin palmitoylée (fig. 26d). Cependant, l'extrémité N-terminale étant différente entre la SLN de lapin et la SLN humaine, les interactions permettant la formation de ce coude le sont aussi (fig. 27). Dans le cas de la SLN humaine, la courbure de l'extrémité N-terminale est due à une interaction entre le groupement hydroxyle de Thr5 et le groupement carbonyle de Gly2, tandis que dans le cas de la SLN de lapin palmitoylée, c'est le groupement carbonyle de Met1 qui interagit avec le groupement amine peptidique de Arg3 ou avec celui de Ser4. Néanmoins, comme le montre la figure 26, cette structure est peu observée pour la SLN de lapin, acylée ou non. En ce qui concerne la SLN humaine, il est à noter qu'en présence de détergent (DPC ou SDS) la SLN humaine adopte une structure en hélice alpha du résidu Arg6 au résidu Arg27, les extrémités N- et C-terminales étant désordonnées (Buffy et al., 2006b).

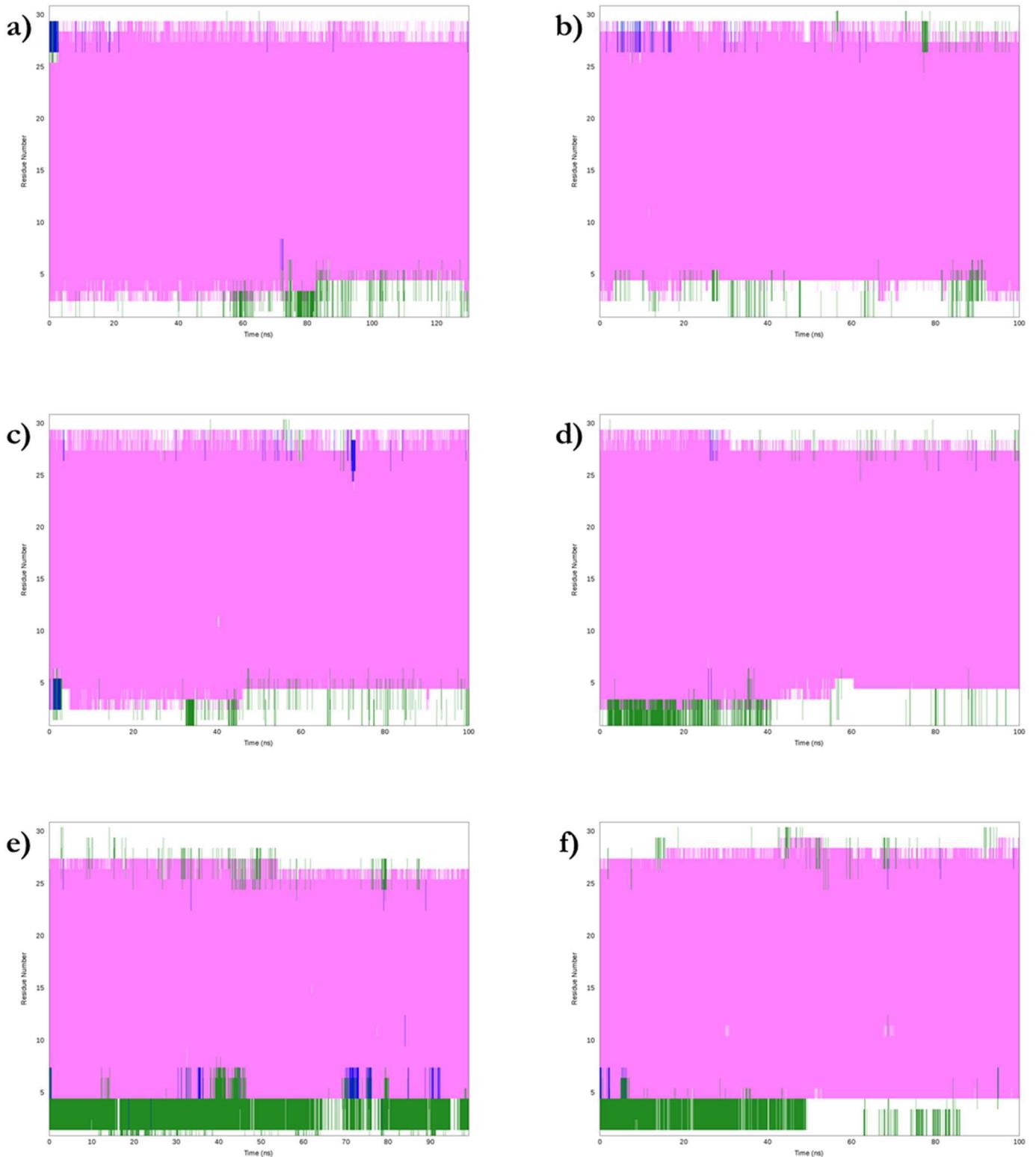


Figure 26 : Evolution de la structure secondaire de la SLN pour les simulations de dynamique moléculaire de la SLN de lapin non acylée (**a et b**), palmitoylée (**c et d**) et la SLN humaine (**e et f**). Le rose correspond à une structure secondaire en hélice α , le bleu à une structure secondaire en hélice 3-10, le vert à un coude β et le blanc à une absence de structure secondaire. Structure secondaire déterminée en utilisant l'algorithme STRIDE (Frishman and Argos, 1995).

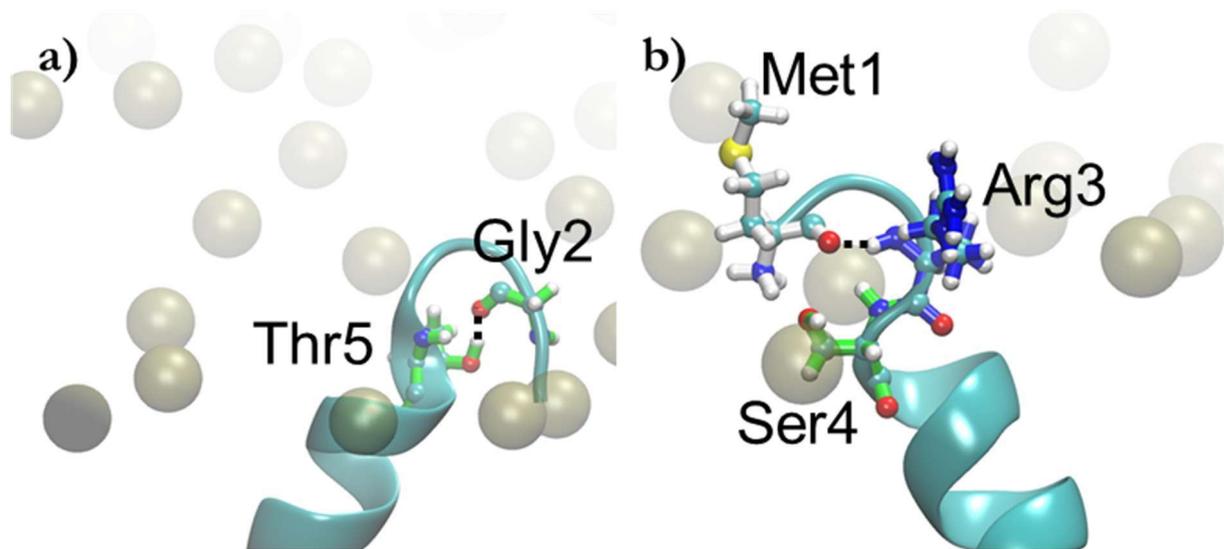


Figure 27 : Structure de l'extrémité Nter de la SLN pour les simulations de la SLN humaine (a) et de la SLN de lapin palmitoylée (b). La protéine est représentée en ruban cyan. Les résidus d'intérêt sont représentés en boules et bâtons. Les atomes de phosphore des lipides adjacents du feuillet supérieur sont représentés en boules kaki transparentes. Les interactions entre atomes sont représentées par des traits noirs pointillés.

La structuration de l'extrémité N-terminale n'est pas présente dans la structure initiale de la SLN humaine mais se forme dès les premières nanosecondes de la simulation et est retrouvée dans nos deux trajectoires, bien qu'elle soit rompue à la moitié d'une des deux simulations.

Nous n'observons aucune différence de structure secondaire entre la SLN non acylée et la SLN palmitoylée. La modification de l'orientation dans la bicouche étant un rôle connu de la palmitoylation chez certaines protéines membranaires (Abrami et al., 2008), nous nous sommes donc intéressés à l'orientation de la protéine dans la bicouche et à un éventuel effet de l'ancre acyle sur celle-ci.

II. L'inclinaison de la SLN dans la membrane

L'inclinaison de l'hélice par rapport à la normale à la bicouche a été mesurée au cours de la dynamique et moyennée (tableau 4 et figure 28). Quelle que soit la SLN (de lapin, acylée ou non, ou humaine), les valeurs obtenues sont très proches et varient entre 26° et 29° pour un écart-type d'environ $6-7^\circ$. Tout d'abord, bien que le peptide ait été inséré dans une position perpendiculaire au plan de la membrane, i.e. avec un tilt de 0° , on observe que l'inclinaison de la protéine a été

modifié durant les étapes de chauffage et d'équilibration de nos systèmes (17 ns, non montré sur la figure 28) L'évolution du tilt montre que celui-ci varie beaucoup durant les trajectoires, et ce pour l'ensemble de nos systèmes, comme le montre la déviation standard de la moyenne du tilt, qui varie entre 6 et 8° suivant le système. Les valeurs moyennes du tilt sont légèrement supérieures à la valeur de $23 \pm 2^\circ$ obtenue pour la SLN humaine insérée dans un mélange DOPC/DOPE (4/1) en RMN du solide par Buffy *et al.* (Buffy et al., 2006b) mais sont en accord avec la valeur de $28 \pm 6^\circ$ obtenue par simulation de dynamique moléculaire de la SLN humaine insérée dans une bicouche de DOPC par Shi *et al.* (Shi et al., 2009). Les différences observées entre la donnée expérimentale et les données de simulation de dynamique moléculaire pourraient être dû à la nature différente des lipides de la bicouche, la valeur de tilt publiée par Buffy *et al.* ayant été obtenue expérimentalement dans une bicouche mixte (DOPC/DOPE), alors que la valeur de tilt publiée par Shi *et al.* a été obtenue expérimentalement dans une bicouche pure (DOPC), tout comme les valeurs issues de nos simulations (POPC). En effet, la présence de lipides possédant une tête polaire de type PE entraîne une augmentation de l'épaisseur de la bicouche et en conséquence un tilt de l'hélice transmembranaire inférieur à celui obtenu en l'absence de PE.

SLN tilt in POPC bilayer (°)					
Rabbit SLN	Rabbit SLN	Rabbit palmitoylated SLN	Rabbit palmitoylated SLN	Human SLN	Human SLN
27 ± 7	28 ± 6	27 ± 6	29 ± 7	27 ± 8	26 ± 7

Tableau 4 : Tilt moyen de la SLN pour les simulations de dynamique moléculaire de la SLN non acylée, la SLN palmitoylée et la SLN humaine. Le tilt a été déterminé en calculant l'angle entre l'axe de la protéine et l'axe Z, considéré comme normale au plan de la bicouche.

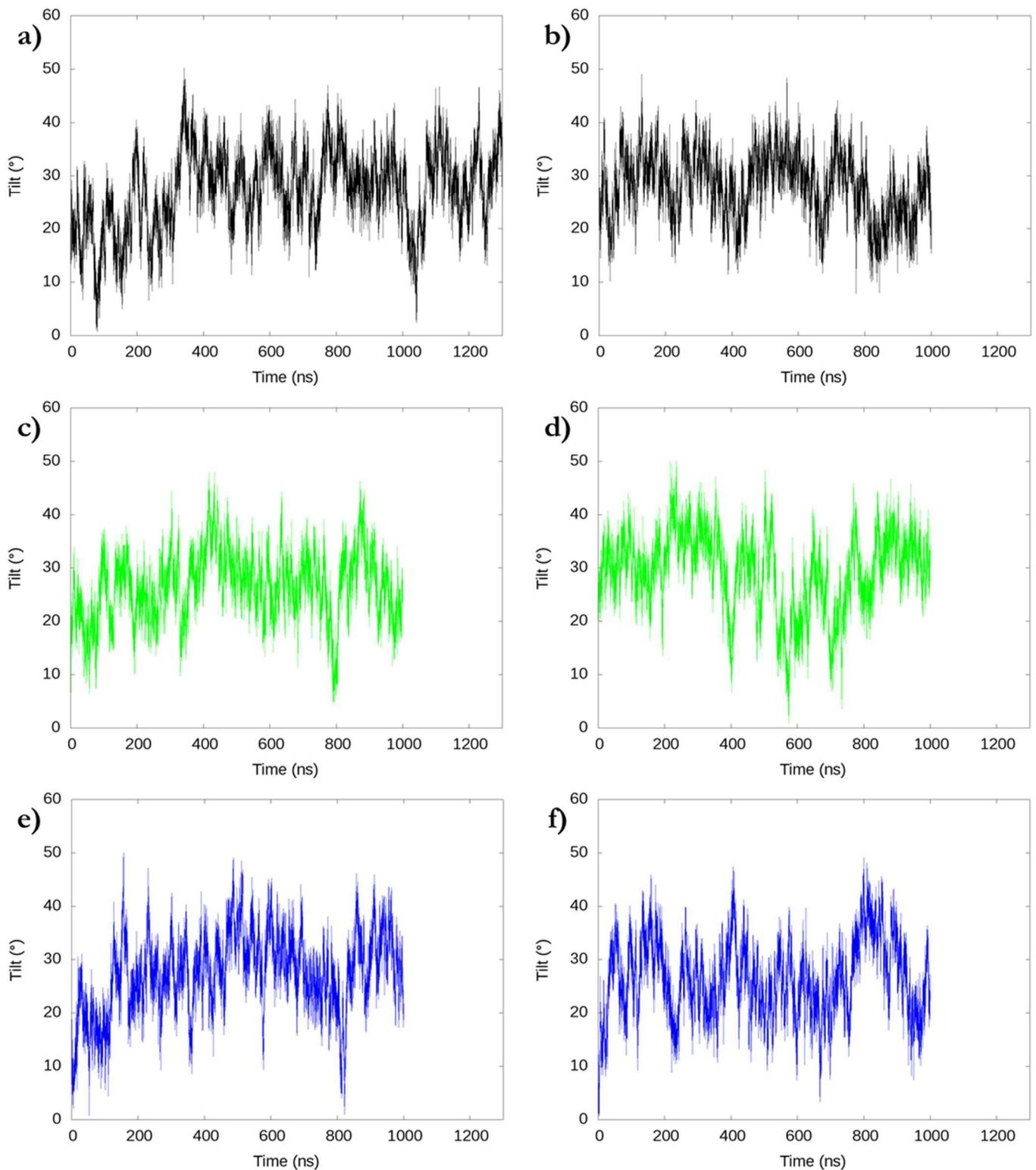


Figure 28 : Evolution du tilt de la SLN pour les simulations de dynamique moléculaire de la SLN de lapin non acylée (a et b), palmitoylée (c et d) et la SLN humaine (e et f). Le tilt a été déterminé en calculant l'angle entre l'axe de la protéine et l'axe Z, considéré comme normale au plan de la bicouche.

Néanmoins, l'analyse de nos systèmes ne montre pas de différence en ce qui concerne le tilt de la SLN. Ainsi, contrairement à ce qui est décrit dans certaines publications (Abrami et al.,

2008; Morozova and Weiss, 2010) nous n'avons pas mis en évidence d'effet de l'acylation sur le tilt de l'hélice. Ce résultat est en accord avec l'étude menée par Flach et al. (Flach et al., 1999) sur un autre peptide transmembranaire de 33-35 résidus, qui montre que l'acylation n'a pas d'incidence sur le tilt de l'hélice ni même sur la structure secondaire de l'hélice comme dans notre cas.

Nous nous sommes donc intéressés à un autre paramètre permettant d'estimer l'orientation d'une protéine dans une bicouche, l'azimut.

III. La rotation de la SLN sur son axe

Des valeurs de l'azimut de la SLN humaine ont été publiées par l'équipe de G. Veglia, provenant de données expérimentales obtenues par RMN du solide (De Simone et al., 2014), ainsi que de données provenant de simulations de dynamique moléculaire (Shi et al., 2009), les valeurs étant de 29° et de 66° , respectivement. Dans les deux cas, l'analyse de l'azimut a été réalisée en utilisant comme atome de référence le carbone α du résidu Trp23 et, comme nous pouvons l'observer, ces valeurs ne se recoupent pas. Une même analyse a donc été réalisée sur nos trajectoires. L'évolution de l'azimut dans nos simulations (fig. 29) montre que la protéine réalise des rotations sur son axe et que l'azimut varie beaucoup, comme le montre aussi la déviation standard de la moyenne de l'azimut (tableau 5), qui varie entre 18° et 30° suivant le système. Les azimuts moyens sont proches entre les différents systèmes, variant entre 38° et 48° avec un écart-type moyen de 23° (Tableau 5). Il est intéressant de remarquer que les valeurs d'azimut obtenues entraînent une orientation de l'hélice commune pour les SLN de lapin et humaine en plaçant le résidu 9 sur la face orientée du côté luminal (fig. 30, exemple avec la SLN de lapin palmitoylée), conformément aux résultats de Veglia *et al.*

SLN azimuth in POPC bilayer (°)					
Rabbit SLN	Rabbit SLN	Rabbit palmitoylated SLN	Rabbit palmitoylated SLN	Human SLN	Human SLN
38±20	44±27	42±24	48±18	38±30	44±20

Tableau 5 : Azimut moyen de la SLN pour les simulations de dynamique moléculaire de la SLN non acylée, la SLN palmitoylée et la SLN humaine. L'azimut a été déterminé en utilisant le carbone α du résidu Trp23 comme atome de référence.

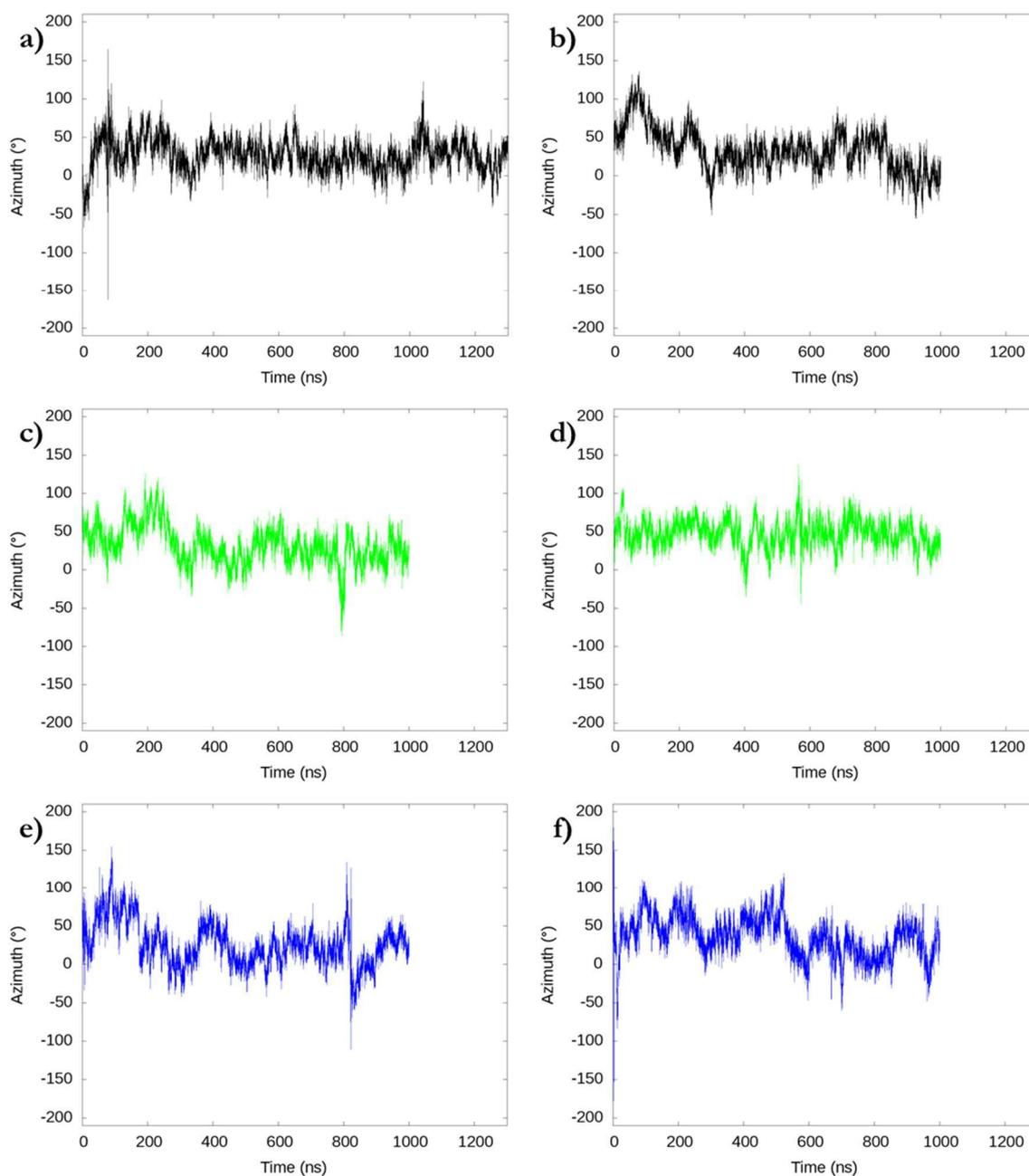


Figure 29 : Evolution de l'azimut de la SLN pour les simulations de dynamique moléculaire de la SLN de lapin non acylée (a et b), l palmitoylée (c et d) et la SLN humaine (e et f). L'azimut a été déterminé en utilisant le carbone α du résidu Trp23 comme atome de référence.

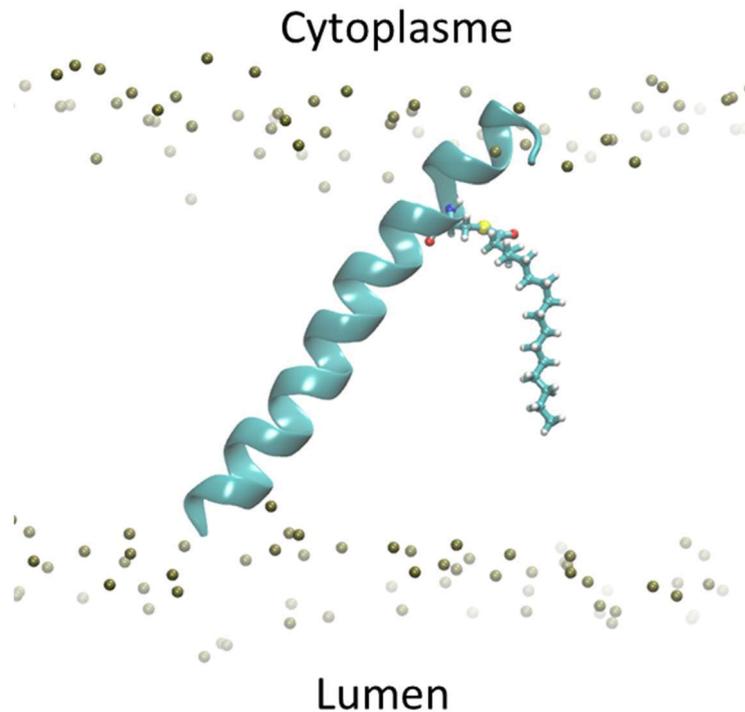


Figure 30 : SLN de lapin palmitoylée insérée dans une bicouche de POPC. Donnée issue de la dernière image de la trajectoire de la SLN palmitoylée de lapin. Le peptide est représenté en ruban bleu. Le résidu Cys9 palmitoylé est représenté en boules et bâtons. Les phosphores des lipides de la bicouche sont représentés par des sphères kaki.

Néanmoins, à l’instar de ce qui a été observé pour le tilt, nous ne voyons pas de différence entre les systèmes en ce qui concerne l’azimut de la SLN. Nous nous sommes donc intéressés à l’enfouissement de la SLN au sein de la bicouche.

IV. Le coefficient de diffusion latéral

Le coefficient de diffusion latérale de la protéine au sein de la bicouche a été calculé sur le temps de la dynamique (Tableau 6). Les valeurs obtenues sont très proches pour les différents systèmes variant de 15,9 à 18,3 $\mu\text{m}^2/\text{s}$. Les valeurs obtenues sont du même ordre de grandeur que celles obtenues pour des peptides membranaires comparables (Ramadurai et al., 2010; Venable et al., 2017). Par contre, nos résultats sont en contradiction avec des travaux qui montrent expérimentalement un coefficient de diffusion latérale plus faible en présence de l’ancre acyle (Kim Wook et al., 2014).

Lateral diffusion coefficient D_T ($\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$)

	Rabbit SLN	Rabbit SLN	Palmitoylated Rabbit SLN	Palmitoylated Rabbit SLN	Human SLN	Human SLN
D_T	17,1	15,9	16,7	17,8	17,7	18,3

Tableau 6 : Coefficient de diffusion latérale de la SLN isolée. Données issues des simulations de dynamique moléculaire de la SLN de lapin, palmitoylée ou non, et de la SLN humaine.

V. L'enfouissement de la protéine dans la bicouche

L'enfouissement de la SLN dans la bicouche a été évalué à partir de la position moyenne relative des carbones alpha de chacun des acides aminés dans la bicouche (Figure 31). La position moyenne relative sur l'axe représentant la normale à la bicouche est calculée par rapport au centre de la bicouche (i.e. la coordonnée 0 sur cet axe correspond à la coordonnée du centre de masse des phosphores des lipides sur ce même axe) mais en ne considérant que les lipides de l'anneau lipidique autour de la protéine. On ne constate pas de différence pour la SLN de lapin, qu'elle soit acylée ou non. La partie N-terminale, du résidu Met1 au résidu Ser4, est exposée à l'interface eau/membrane tandis que dans le cas de la SLN humaine, elle est enfouie dans la bicouche. Cette différence est la conséquence directe de la séquence N-terminale de la SLN, polaire chargée dans le cas de la SLN de lapin et hydrophobe dans le cas de la SLN humaine. Du côté C-terminal, les deux protéines ont exactement la même séquence. L'extrémité C-terminale est enfouie dans la bicouche à l'exception du résidu Tyr31 dans toutes les simulations de la SLN de lapin acylée ou non, ainsi que dans une des simulations de la SLN humaine. Cependant, une des simulations de la SLN humaine diffère. En effet, nous remarquons que la protéine est plus enfouie dans la bicouche du côté N-terminal et que cet enfouissement entraîne l'exposition à l'interface des trois derniers acides aminés Tyr29, Gln30 et Tyr31. Les deux acides aminés Tyr29 et Gln30, du fait de leur exposition au solvant, perdent leur structure en hélice comme vue dans la figure 26.

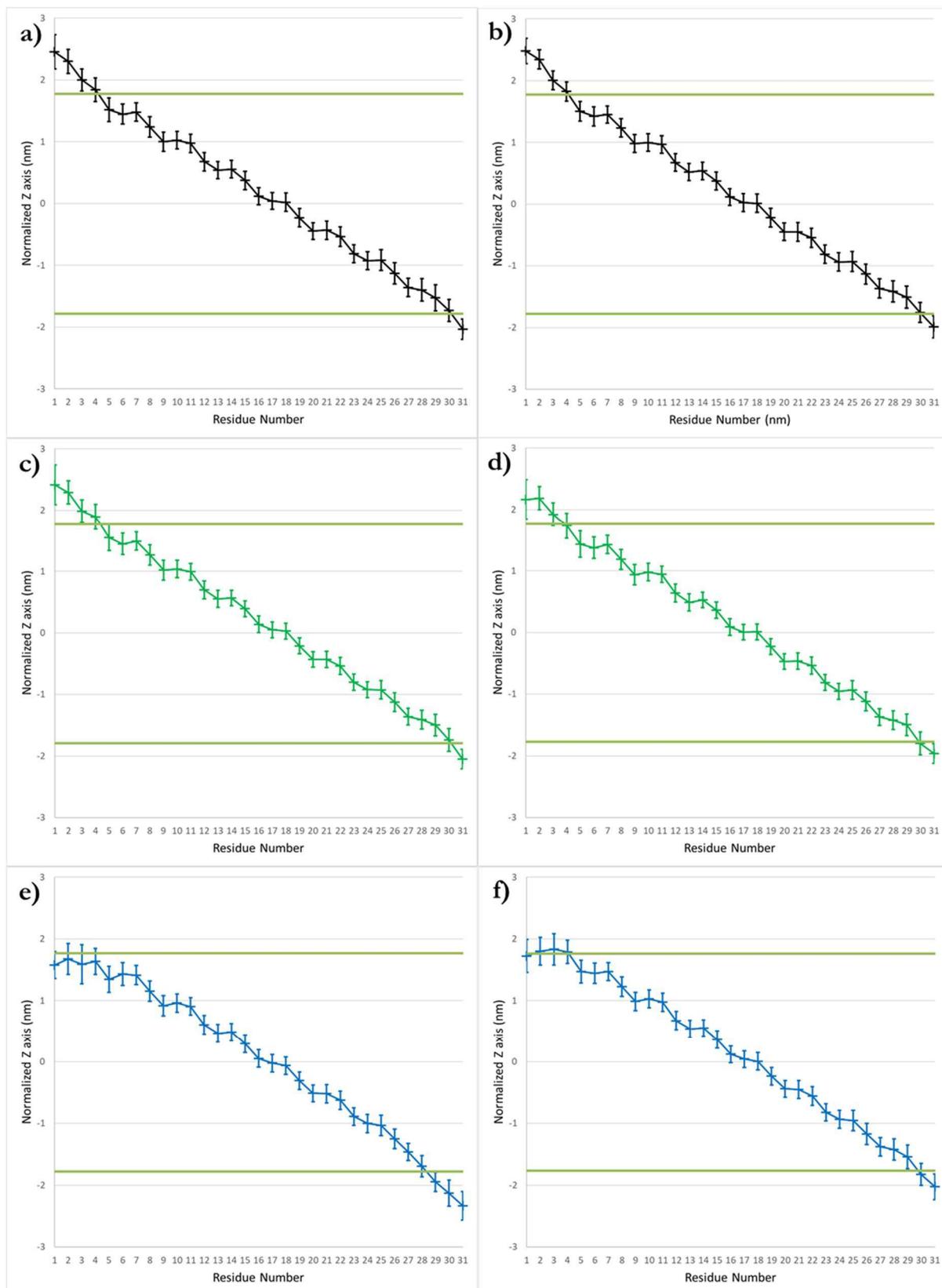


Figure 31 : Enfouissement de la SLN dans la membrane pour les simulations de dynamique moléculaire de la SLN de lapin non acylée (**a et b**), palmitoylée (**c et d**) et de la SLN humaine (**e et f**). La position des carbones α de chaque résidu a été mesurée sur l'axe Z, en considérant la position sur ce même axe du centre de masses des phosphores de l'anneau lipidique autour du peptide comme origine. Le trait en vert représente la position des phosphores des lipides composant l'anneau lipidique.

Néanmoins, la visualisation des trajectoires montre une déformation de la bicouche au voisinage de la SLN, nous avons donc comparé l'épaisseur locale de la membrane avec son épaisseur globale en mesurant la distribution des atomes de phosphore de l'ensemble de lipides de la bicouche et de l'anneau lipidique sur l'axe Z (fig. 32 et tableau 7). En global, l'épaisseur est 39 Å pour la SLN de lapin et pour la SLN humaine. Ces valeurs sont supérieures à la valeur de 37,6 Å de la distance $2z_p$ (correspondant à la distance entre les phosphores des feuillet supérieur et inférieur) expérimentale d'une bicouche de POPC pure (Kucerka et al., 2005). Néanmoins, ces valeurs ont été obtenues à une température de 303 K, tandis que nos simulations ont été réalisées à 310 K. Localement, c'est à dire en ne considérant que la première couronne de lipides autour de la protéine, l'épaisseur est réduite dans tous les cas et vaut entre 35 et 36 Å suivant les systèmes. La SLN influe donc localement sur l'épaisseur de la membrane en induisant un creux local dans la membrane.

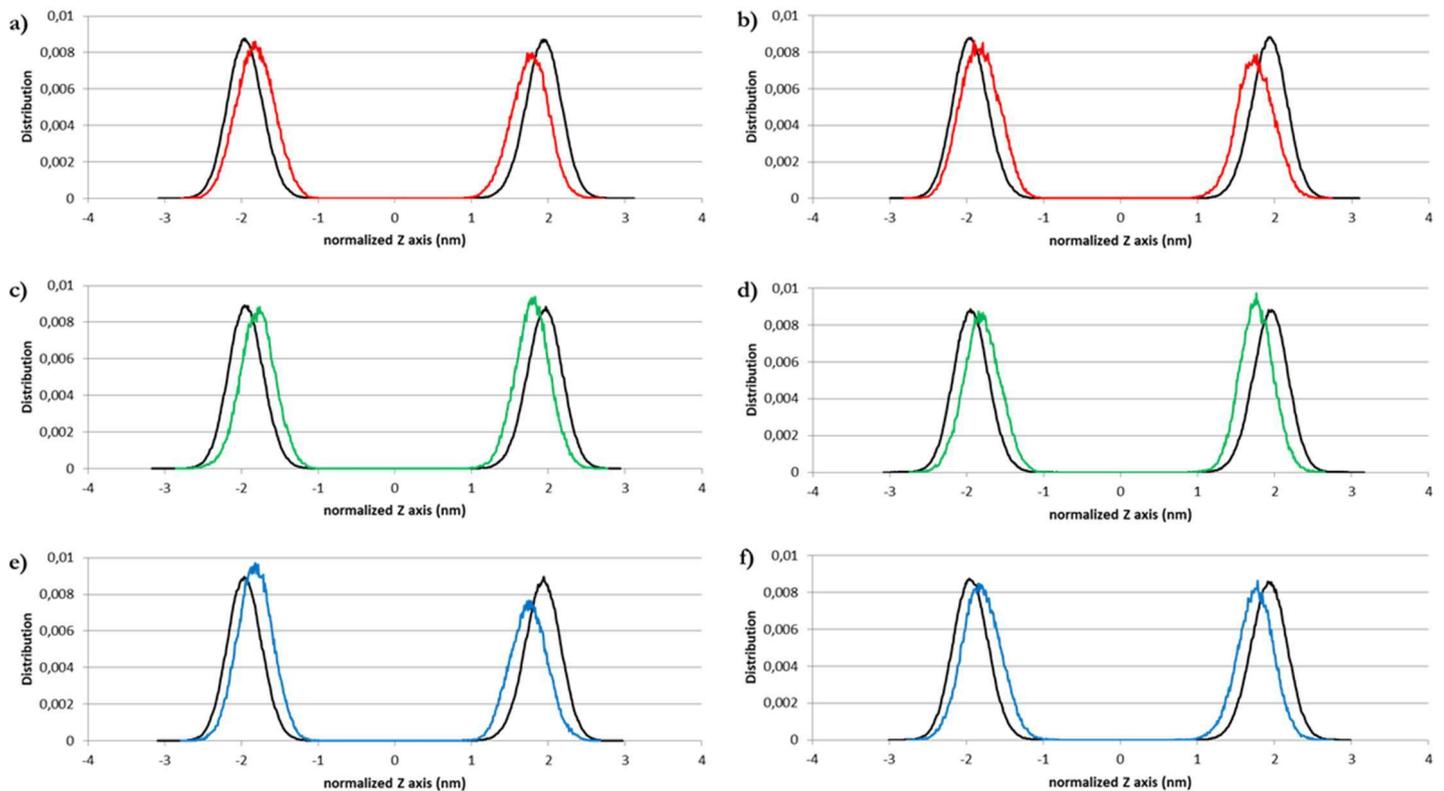


Figure 32 : Epaisseur locale et globale de la membrane de POPC. Distribution des atomes de phosphore de la bicouche sur l'axe Z pour l'ensemble des lipides (courbes noires) et pour ceux de l'anneau lipidique (courbes en couleur), l'origine sur l'axe Z correspondant au centre de masses des atomes de phosphore de l'ensemble de la bicouche. Données issues des simulations de dynamique moléculaire de la SLN de lapin non acylée (a et b), de la SLN de lapin palmitoylée (c et d) et de la SLN humaine (e et f).

Bilayer thickness (Å)						
	Rabbit	Rabbit	Palmitoylated	Palmitoylated	Human	Human
	SLN	SLN	Rabbit SLN	Rabbit SLN	SLN	SLN
Global thickness	39±1	39±1	39±1	39±1	39±1	39±1
Local thickness	36±2	35±2	36±2	35±2	35±2	35±2

Tableau 7 : Epaisseur de la bicouche de POPC. L'épaisseur de la bicouche a été calculée en mesurant la distance entre la moyenne des positions des atomes de phosphore du feuillet supérieur et inférieur sur l'axe Z. L'épaisseur locale concerne uniquement les lipides composant l'anneau lipidique (i.e. dont le centre de masse est à 9 Å ou moins du centre de masse d'un résidu).

VI. Les paramètres d'ordre des lipides et de l'ancre palmitoylé

Le paramètre d'ordre S_{CD} des différents carbones des deux chaînes aliphatiques des lipides a été calculé et comparé aux données expérimentales issues de la RMN- 2H (Figure 33, courbes noires). Les profils des $-S_{CD}$ des simulations sont en accord avec les valeurs expérimentales. Pour la chaîne palmitoylé, nous obtenons le profil caractéristique, i.e. les paramètres d'ordre sont inférieurs près du centre de la bicouche où l'amplitude des mouvements des chaînes est grand. Les paramètres d'ordre augmentent ensuite jusqu'à une valeur plateau près des têtes polaires où les mouvements sont plus restreints. Pour la chaîne oléate, un profil similaire à la chaîne palmitoylé est obtenu sauf autour de la double liaison (carbones 9 et 10), où les paramètres chutent brusquement vers des valeurs nulles à cause de l'orientation préférentielle adoptée par cette liaison (i.e. proche de l'angle magique).

Comme attendu, un profil identique est observé entre tous nos systèmes pour l'analyse de l'ensemble des lipides de la bicouche. Cependant, afin d'observer une éventuelle perturbation locale de la bicouche induite par la SLN, nous avons réalisé une même analyse en considérant uniquement les lipides de la première couche entourant la protéine (fig. 33, courbes en couleur). Lorsqu'on compare le profil obtenu pour les chaînes aliphatiques de l'anneau lipidique entourant la SLN avec celui obtenu pour l'ensemble des lipides de la membrane, nous observons une diminution des valeurs des $-S_{CD}$ pour l'ensemble des carbones des chaînes palmitoyles en ce qui concerne les lipides de l'anneau, ce qui traduit un désordre plus important, i.e. une dynamique plus grande des chaînes latérales en contact avec la SLN. En ce qui concerne les carbones des chaînes oléoyles, on observe un effet similaire, bien que le carbone C2 varie peu entre les deux profils.

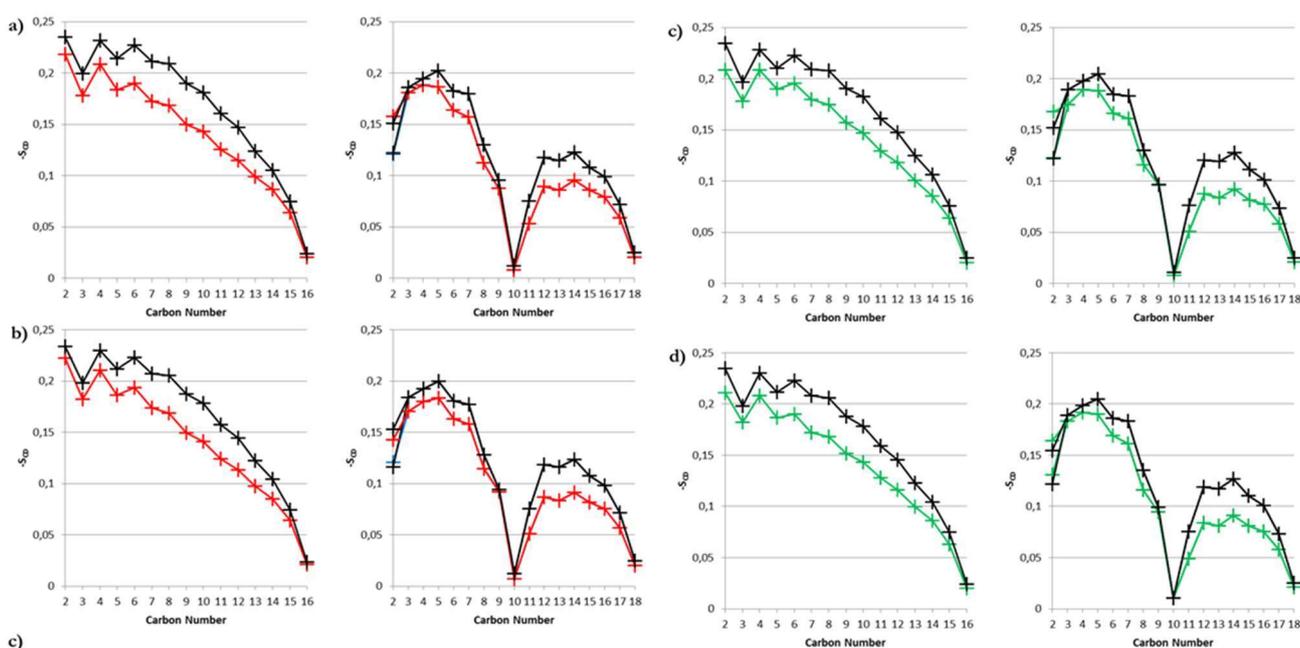


Figure 33 : $-S_{CD}$ des carbones des chaînes aliphatiques des POPC de la bicouche. Données issues des simulations de la SLN de lapin, non acylée (a et b) et palmitoylée (c et d). Le $-S_{CD}$ des carbones des chaînes palmitates (à droite) et oléates (à gauche) des POPC a été calculé pour l'ensemble de la bicouche (courbes noire) et pour l'anneau lipidique (courbes colorées).

Dans le cas des simulations de la SLN de lapin acylée, nous avons aussi calculé le paramètre d'ordre $-S_{CD}$ des différents carbones de la chaîne acyle et l'avons comparé aux valeurs de cette même chaîne pour les lipides (Fig. 34). Pour l'une des simulations, nous observons une superposition des profils, à l'exception des carbones 2 et 3. Dans l'autre cas, les valeurs des

carbones de l'ancre palmitoylé sont plus faibles que celles de la chaîne palmitoylé des lipides. Ainsi, bien que les valeurs de $-S_{CD}$ des carbones de l'ancre palmitoylé diffère entre les deux simulations, le profil de la courbe reste similaire et, dans les deux cas, nous observons que la chaîne palmitoylé est soumise à des contraintes de mouvement différentes (Gonzalez-Horta et al., 2008; Olausson et al., 2012). Les premiers carbones de la chaîne, près des groupes carbonyles, sont moins contraints lorsque la chaîne est liée au peptide que lorsque la chaîne est liée à la tête polaire des lipides.

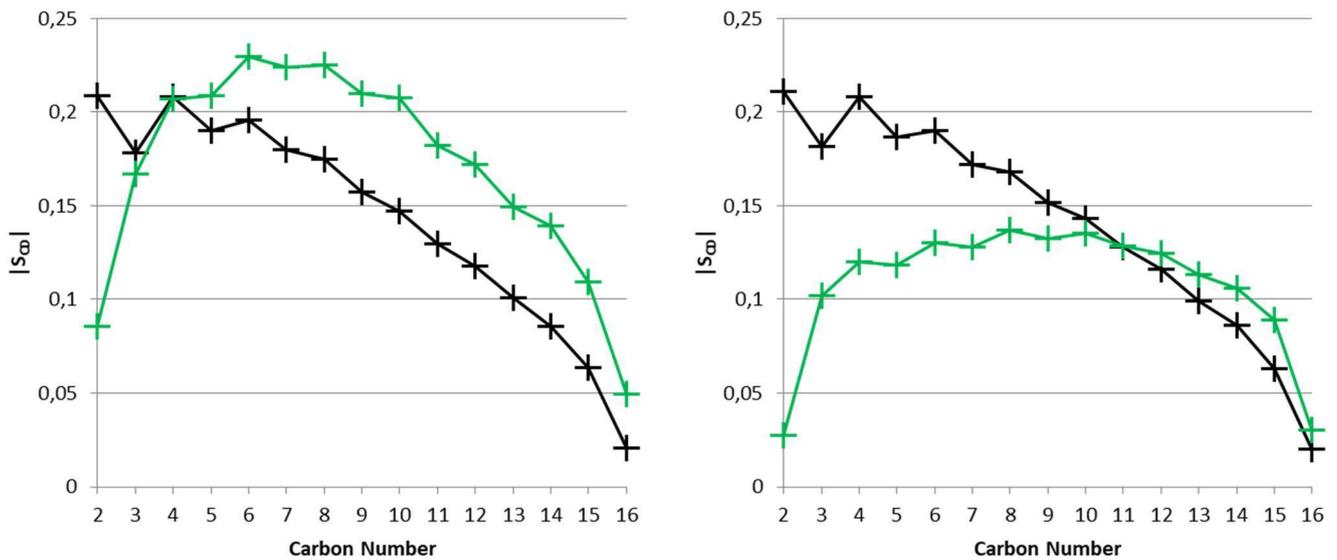


Figure 34 : $|S_{CD}|$ des carbones de l'ancre palmitate de la SLN de lapin et des chaînes palmitates des POPC de l'anneau lipidique. Données issues des deux simulations de SLN de lapin palmitoylée. La courbe noire présente les $|S_{CD}|$ des carbones des lipides de l'ensemble de la bicouche. Les courbes vertes correspondent aux $|S_{CD}|$ des carbones de l'ancre palmitate.

VII. Conclusion et perspectives

Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet notable de la palmitoylation sur la SLN isolée au cours des simulations de dynamique moléculaire. Que ce soit au niveau de la structure secondaire, la comparaison des différentes simulations a montré que la structuration en hélice de la SLN insérée dans une bicouche de POPC est stable. Seules les extrémités N et C-terminales sont désordonnées. Les extrémités N-terminales, dont les séquences primaires diffèrent selon les espèces, sont désordonnées jusqu'au résidu 5 dans tous les cas. L'orientation de l'hélice au sein de la bicouche en termes d'inclinaison et d'azimut est très proche dans les différentes simulations, avec une inclinaison d'environ 27° et un azimut moyen de 42° qui expose une face de l'hélice comprenant le résidu 9 du côté luminal. L'enfouissement de l'hélice dans la bicouche n'est pas affecté par la palmitoylation, par contre localement, autour de la protéine, la bicouche est moins épaisse. La déformation locale affecte les deux feuillets membranaires de la même manière dans le cas de la SLN de lapin non acylée alors que la déformation locale est uniquement sur le feuillet côté cytoplasmique dans le cas de la SLN de lapin acylée et humaine.

Pour confronter les valeurs des paramètres d'ordre obtenus sur la chaîne palmitoylée avec des données expérimentales, une collaboration avec un groupe de chimistes a été engagée et quelques milligrammes de peptide synthétique acylé ont été obtenus. L'obtention d'un échantillon de SLN avec une ancre acylée deutérée devrait permettre d'enregistrer des expériences de RMN du deutérium et l'analyse de ces données nous permettra d'obtenir les valeurs expérimentales des paramètres d'ordre et ainsi de valider la paramétrisation de l'ancre palmitoylée.

Un des rôles potentiels de la palmitoylation des protéines membranaires serait de favoriser des interactions avec des lipides spécifiques. En effet, la palmitoylation serait un moyen de stabiliser la bicouche en ségrégeant des lipides spécifiques et en induisant un ordre local dans la membrane via l'interdigitation avec des lipides (Plasencia et al., 2008; Roldan et al., 2017). Pour étudier cet

effet, l'étude de la SLN insérée dans une bicouche de composition hétérogène de lipides pourrait être envisagée.

Cette étude de la structure et de la conformation de la SLN isolée dans une bicouche de POPC nous a permis de caractériser sa structure secondaire, son orientation, son enfouissement, sa capacité à diffuser dans une membrane, ainsi que son effet sur les lipides adjacents. Dans le chapitre suivant, nous nous sommes intéressés à la fonction de la SLN, i.e. la régulation de l'activité de l'ATPase Ca^{2+} SERCA1a. Pour cela, nous avons étudié le complexe SERCA1a-SLN dans une bicouche de POPC en utilisant la simulation de dynamique moléculaire et l'analyse des modes normaux.

Chapitre IV : Le complexe SERCA1a-SLN

Pour comprendre les effets de la SLN sur la structure et la dynamique de SERCA1a à l'échelle de l'atome, nous avons fait le choix d'utiliser des méthodes *in-silico* pour étudier SERCA1a dans une membrane, en présence ou non de SLN. Pour réaliser cette étude, 4 simulations de dynamique moléculaires de SERCA1a inséré dans une bicouche de POPC ont été réalisées, dont deux en présence de SLN. La structure de SERCA1a utilisée pour ces simulations est celle du complexe SERCA1a-SLN obtenue par Toyoshima et al. (code PDB : 3w5a (Toyoshima et al., 2013)) (pour plus de détails sur les conditions de simulation et les données utilisées pour la création des systèmes, voir la partie III.3 du chapitre II : Matériel et Méthode). Dans cette première partie, nous présenterons l'évolution de la structure et de la dynamique de SERCA1a dans nos simulations de dynamique moléculaire.

I. Structure et dynamique de SERCA1a dans les trajectoires des simulations de dynamique moléculaire

1. RMSD des carbones α de SERCA1a

A l'issue des simulations de dynamique moléculaires, nous obtenons 4 trajectoires de 217 ns chacune, chauffage et équilibration inclus (17 ns). Pour estimer la stabilité de SERCA1a dans ces trajectoires, nous avons analysé le RMSD des carbones α , en utilisant comme structure de référence la structure cristallographique initiale du complexe. On observe une augmentation importante du RMSD allant rapidement jusqu'à 4 Å, et pouvant atteindre 7 Å (fig.35a à 35d). Cette augmentation a lieu dès les premières picosecondes de la simulation, pendant les étapes de chauffage et d'équilibration du système (fig 35e à 35h).

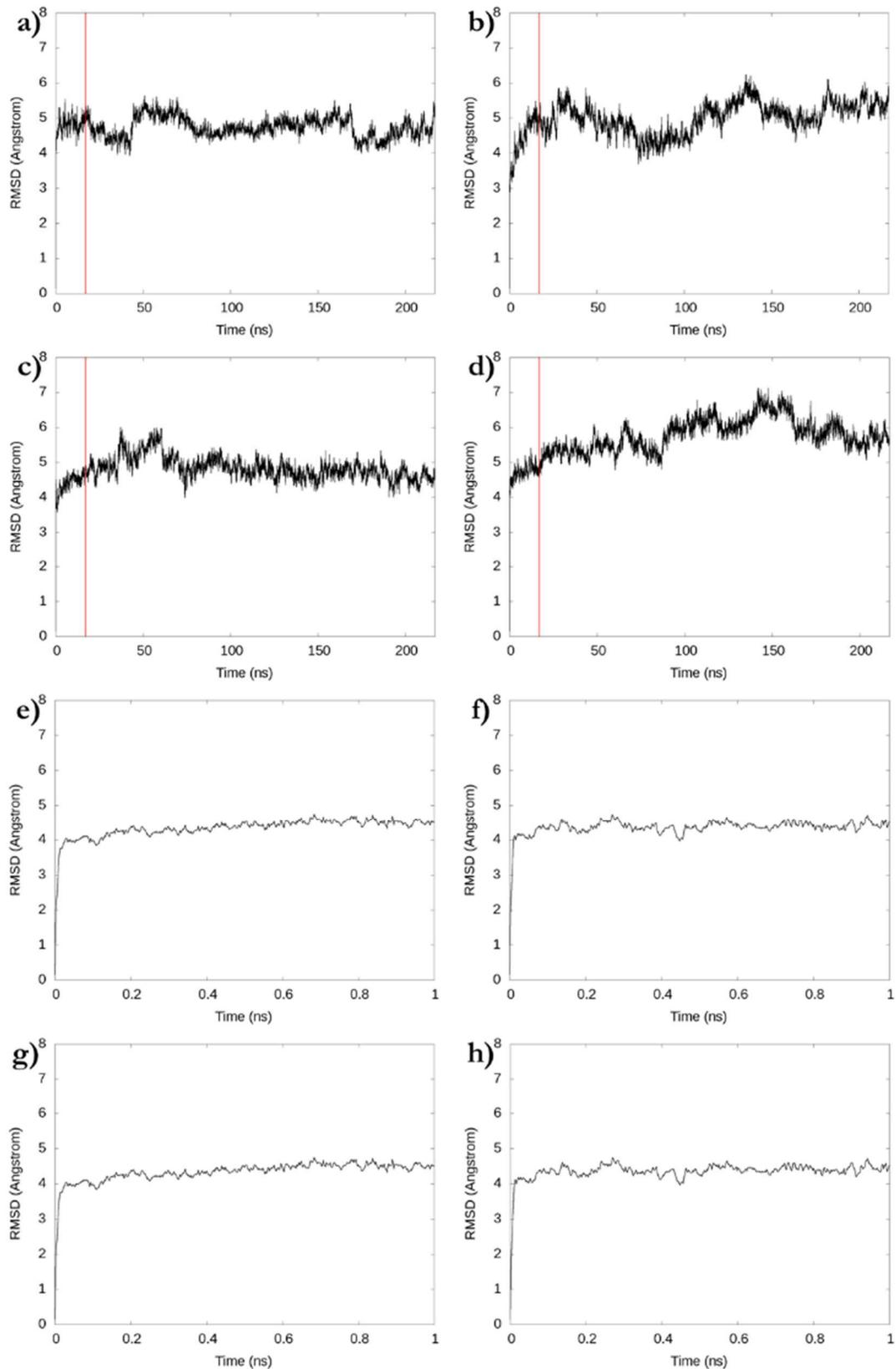


Figure 35 : RMSD des carbones α de SERCA1a. Données issues des simulations de dynamique moléculaire de SERCA1a (a, e), SERCA1a bis (b, f), SERCA1a-SLN (c, g) et SERCA1a-SLN bis (d, h), en utilisant comme référence la structure du complexe [code PDB : 3w5a]. Le trait vertical rouge correspond au début de la phase de production. Les panneaux e à h correspondent à un zoom sur la première nanoseconde des trajectoires représentées respectivement dans les panneaux a à d

Les valeurs de RMSD sont très supérieures aux valeurs généralement trouvées dans la littérature. Afin de chercher la raison de ces valeurs importantes, nous avons calculé séparément le RMSD de l'ensemble des domaines cytoplasmiques et celui du domaine membranaire. Nous avons comparé ces résultats avec les RMSDs de l'ensemble de la protéine dans le but d'observer quelle région de la protéine contribue le plus aux RMSD importants (fig. 36a à 36d). Nous observons que le RMSD du domaine transmembranaire (courbe rouge) est peu élevé (2 à 4 Å) et ses variations sont faibles comparées au RMSD des domaines cytoplasmiques (courbes vertes) dont les variations suivent celles du RMSD global de SERCA1a (courbes noires). Ces résultats montrent que ce sont principalement les mouvements des domaines cytoplasmiques qui sont responsables des valeurs élevées des RMSD globaux.

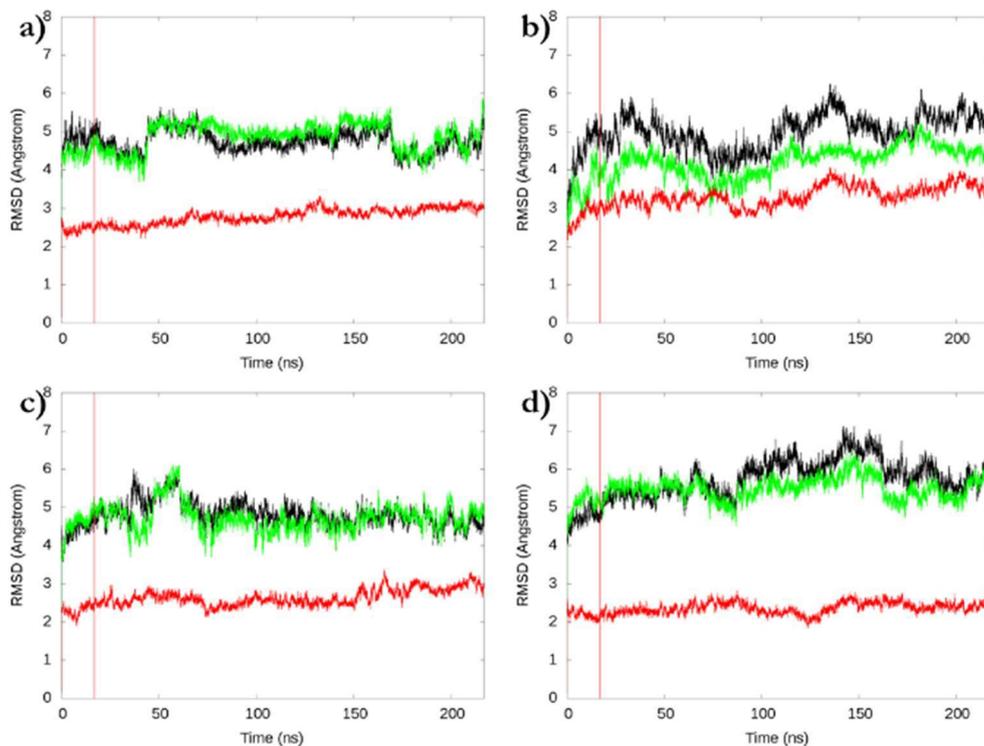


Figure 36 : RMSD des carbones α des domaines cytoplasmiques, du domaine transmembranaire et de l'ensemble de SERCA1a. Données issues des simulations de dynamique moléculaire de SERCA1a (a), SERCA1a bis (b), SERCA1a-SLN (c) et SERCA1a-SLN bis (d), en utilisant comme référence la structure de SERCA1a à l'état SLN.E1.Mg²⁺ (code PDB : 3w5a). Les RMSD des domaines cytoplasmiques, du domaine transmembranaire et de l'ensemble de SERCA1a sont représentés en rouge, en vert et en noir, respectivement. Le trait rouge vertical correspond au début de la phase de production.

En visualisant les trajectoires des simulations, nous avons observé des mouvements importants des domaines cytoplasmiques, correspondant à des mouvements de diffusion en « semi-liberté », les domaines cytoplasmiques étant liés au domaine TM par des boucles. Les domaines A et N se rapprochent et s'éloignent durant les trajectoires et le domaine P, directement lié au domaine N, se déplace de façon plus ou moins dépendante du domaine N suivant la simulation. Dans le but d'étudier ces mouvements nous avons mesuré la distance séparant les centres de masses des domaines dans nos trajectoires (fig 37a à 37d et tableau 8). On observe que les domaines A et N sont ceux qui se rapprochent le plus l'un de l'autre, passant de 42 Å dans la structure cristallographique à 33,5 Å en moyenne dans nos simulations. Cette distance entre les deux domaines est proche de celle observée dans la structure E1.2Ca²⁺. Les domaines N et P se rapprochent aussi légèrement l'un de l'autre dans deux des quatre simulations et s'approchent de la valeur observée à l'état E1.2Ca²⁺. Quant aux domaines A et P, ils se rapprochent légèrement dans l'ensemble des simulations et la distance moyenne entre les deux domaines est proche de celle observée à l'état E1.2Ca²⁺ pour trois d'entre elles.

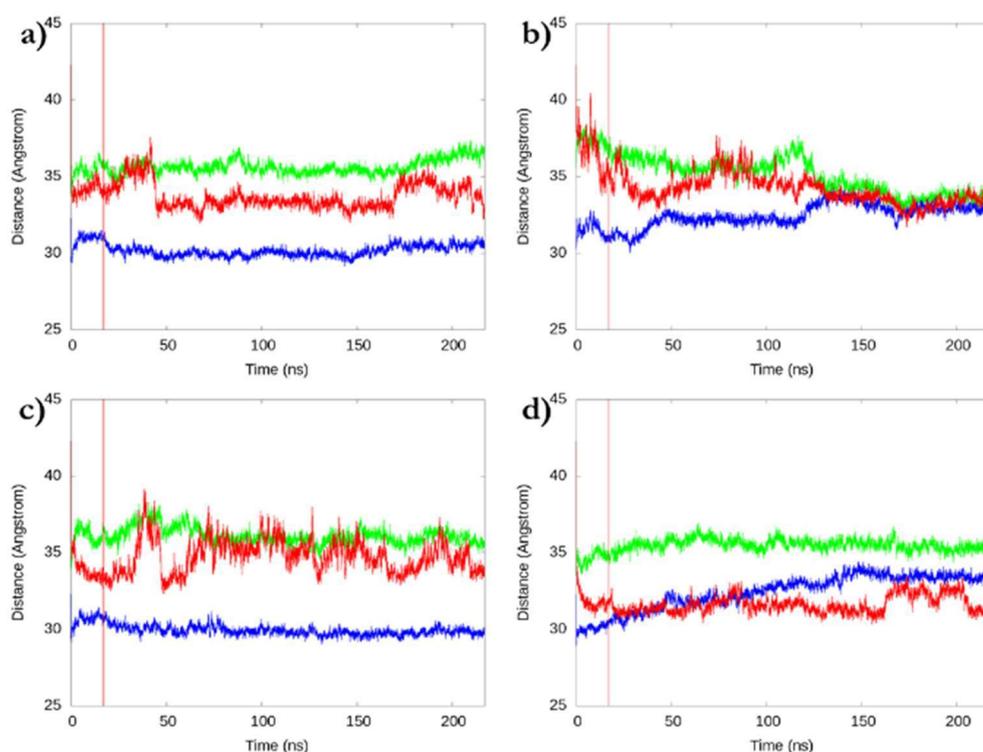


Figure 37 : Mouvements des domaines cytoplasmiques de SERCA1a. Evolution des distances séparant les centres de masse des domaines N et A (rouge), N et P (bleu) et A et P (vert) au cours des simulations de dynamique moléculaire de SERCA1a (e), SERCA1a bis (f), SERCA1a-SLN (g) et SERCA1a-SLN bis (h). Le trait rouge vertical correspond au début de la phase de production.

Cytoplasmic Domains Distances (Ångström)			
	A-P	N-A	N-P
E1.2Ca ^{2+*}	35.1	32.2	30.1
E2 [*]	34.0	37.6	33.5
SLN.E1.Mg ^{2+*}	36.8	42.3	32.3
E1.Mg ^{2+*}	36.3	42.8	32.1
SERCA1a ^o	35.6 ± 0.5	33.7 ± 0.8	30.1 ± 0.3
SERCA1a bis ^o	35.0 ± 1.1	34.1 ± 0.9	32.5 ± 0.7
SERCA1a-SLN ^o	36.1 ± 0.5	34.8 ± 1.1	29.8 ± 0.3
SERCA1a-SLN bis ^o	35.5 ± 0.4	31.6 ± 0.6	32.6 ± 1.0

Tableau 8 : Distance entre les centres de masse des domaines cytoplasmiques de SERCA1a à différents états.
^{*}Données issues des structures de SERCA1a à l'état E1.2Ca²⁺ (code PDB : 1vfp), E2 (code PDB : 3w5d), SLN.E1.Mg²⁺ (code PDB : 3w5a) et E1.Mg²⁺ (code PDB : 3w5b), toutes quatre obtenues par diffraction aux rayons X avec une résolution de 2,9 Å, 2,45 Å, 3,01 Å et 3,2, respectivement. ^oMoyennes des distances entre les domaines cytoplasmiques pour les 200 nanosecondes correspondant à la phase de production de nos simulations de dynamique moléculaire.

2. RMSF des carbones α de SERCA1a

Toujours dans l'objectif d'étudier la stabilité de la structure de SERCA1a dans nos simulations, nous avons analysé le RMSF des carbones α de SERCA1a (ainsi que de la SLN lorsque celle-ci est présente) dans nos trajectoires (fig 38a à 38d). Si le RMSF permet d'estimer le mouvement des atomes d'une structure par rapport à une structure de référence, la RMSF permet lui d'estimer les fluctuations d'un atome en calculant la moyenne de son déplacement durant la trajectoire. On observe peu de différences entre les domaines cytoplasmiques (A en rouge, N en orange et P en vert) et le domaine TM (en noir), montrant une stabilité des structures interne à chaque domaine. Cependant, on observe l'existence de quelques pics, qui concernent tous des résidus situés dans des boucles exposées au solvant : (i) les résidus 195 à 198, situés sur une boucle du domaine A. (ii) les résidus Ser504 ou Arg505 suivant la simulation, tous deux situés sur une boucle du domaine N. (iii) les résidus 859 à 894, composant la boucle qui lie les hélices TM7 et

TM8 (fig. 39). En ce qui concerne la SLN (en violet sur les figures 38c et 38d), on remarque que les résidus des régions N_{ter} et C_{ter} fluctuent plus que ceux situés dans la région transmembranaire de la SLN.

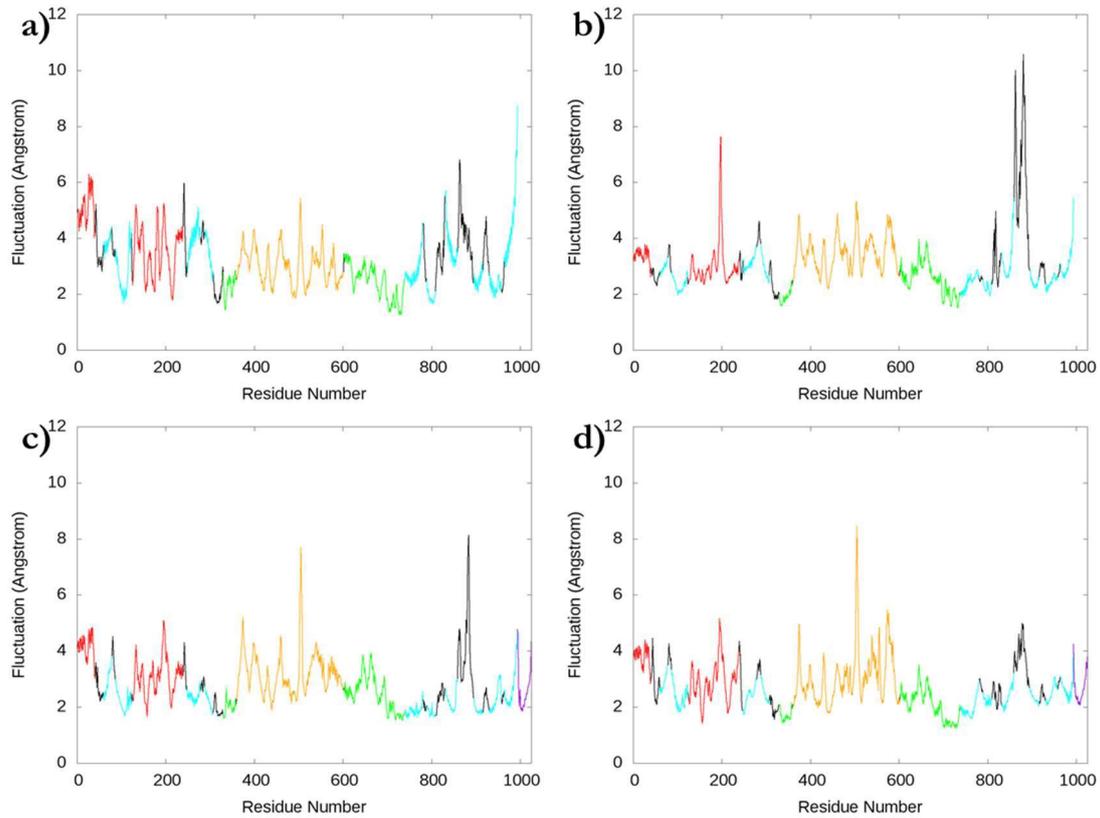


Figure 38 : RMSF des carbones α . Donnée issues des simulations SERCA1a (a), SERCA1a bis (b), SERCA1a-SLN (c) et SERCA1a-SLN bis (d). Les domaines cytoplasmiques A, N et P sont représentés en rouge, orange et vert, respectivement. Le domaine TM est représenté en noir. Les autres régions de SERCA1a sont représentées en cyan. La SLN est représenté en violet et commence au résidu 995 et finit au résidu 1025 (c et d).

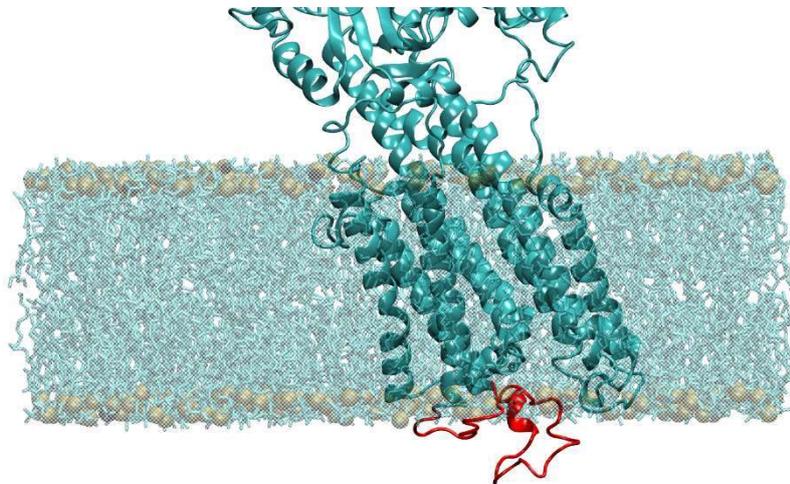


Figure 39 : SERCA1a sans SLN dans une bicouche de POPC. La région la plus flexible de la protéine, allant du résidu 859 au résidu 894, est en rouge. On observe que cette région exposée au solvant est constituée d'un tour d'hélice lié par deux boucles aux hélices TM7 et TM8. SERCA1a est représenté en ruban cyan et les lipides sont représenté en bâtons.

3. Conservation de la structure secondaire de SERCA1a

Enfin, pour vérifier si la structure de SERCA1a est conservée dans nos trajectoires, une analyse de la conservation de la structure secondaire a été réalisée en utilisant l'outil Timeline du logiciel VMD (Humphrey et al., 1996). La référence pour juger de la conservation de la structure est la structure cristallographique de SERCA1a-SLN, qui est la structure initiale à partir de laquelle nos systèmes ont été construits (code PDB : 3w5a) (tableau 9). L'analyse montre que la structure secondaire est conservée environ 80 % de la durée de la trajectoire pour l'ensemble des simulations. Le domaine A est le domaine cytoplasmique dont la structure est la moins conservée (75 à 77 % de la trajectoire), tandis que le domaine P est celui dont la structure est la plus conservée (88 à 89 % de la trajectoire). Le domaine P est situé entre les domaines TM et N, avec lesquels il forme de nombreuses interactions fortes, ce qui semble stabiliser sa structure. La structure secondaire du domaine P est bien conservée et le RMSF des carbones α des résidus de ce domaine sont inférieurs à ceux des autres domaines de SERCA1a (voir fig 38). Ce n'est pas le cas du domaine A qui est uniquement lié au domaine TM par 3 longues boucles et qui forme des interactions faibles avec les domaines N et P. Sa structure secondaire est moins conservée et les RMSF des carbones α des résidus de ce domaine sont plus importants que ceux des autres domaines de la protéine. En ce qui concerne les hélices du domaine transmembranaire, celles dont la structure est la mieux conservée sont TM1, TM4, TM5, TM9 et TM10. Nous observons une perte importante de la structure secondaire de TM2 et TM6, en présence et en absence de SLN, malgré le contact direct entre ces hélices et le peptide. Pour ce qui est de TM2 dans l'état SLN.E1.Mg²⁺, cette hélice commence au résidu 86 pour finir au résidu 122 et est composée d'une partie transmembranaire (résidus 86 à 104) et d'une partie cytosolique (résidus 105 à 122) (fig. 40). La déstructuration observée dans nos simulations concerne la région C_{ter} de l'hélice qui est exposée au solvant (cytoplasme) (voir Annexe 2). Cette région de TM2 est déstructurée à l'état E2, des résidus 119 à 123 dans la structure cristallographique de E2~P (code PDB : 3b9b (Olesen et al., 2007)), et des résidus 109 à 114 et 112

à 114 dans les structures cristallographiques à l'état E2 (codes PDB : 3b9r (Olesen et al., 2007) et 3w5d (Toyoshima et al., 2013)). Dans nos simulations, la déstructuration de cette hélice est probablement due aux mouvements importants du domaine A, directement lié à TM2, l'hélice devant se déformer pour permettre ces mouvements.

En ce qui concerne l'hélice TM6, sa structure secondaire sera détaillée dans la partie IV.III.2 de ce chapitre.

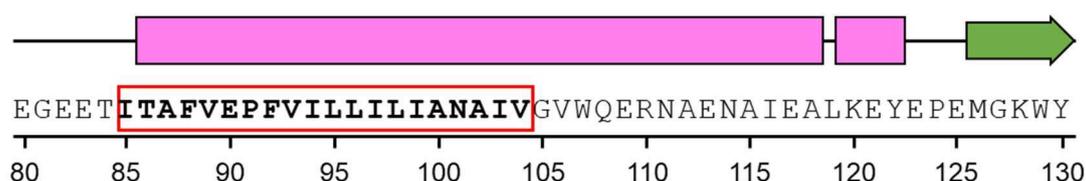


Figure 40 : Séquence et structure secondaire de TM2. Le rectangle rose correspond à une structure secondaire en hélice α et la flèche verte à une structure secondaire en coude β . Les résidus encadrés en rouge sont les résidus transmembranaires. Structure secondaire déterminée en utilisant l'algorithme STRIDE (Frishman and Argos, 1995) et domaine hydrophobe déterminé grâce au serveur Web OPM (Lomize et al., 2012)

	Secondary Structure Conservation (%)			
	SERCA1a	SERCA1a bis	SERCA1a-SLN	SERCA1a-SLN bis
SERCA1	81.2 ± 1.6	82.7 ± 1.5	81.9 ± 1.4	81.3 ± 1.5
N Domain	84.7 ± 3.1	86.2 ± 3.0	81.1 ± 3.8	82.9 ± 3.1
P Domain	88.7 ± 2.8	87.7 ± 3.4	89.5 ± 2.8	88.9 ± 3.1
A Domain	75.1 ± 4.6	74.6 ± 4.1	75.5 ± 4.1	77.3 ± 4.3
TM1	94.1 ± 0.6	94.0 ± 1.1	93.8 ± 2.2	93.9 ± 1.7
TM2	63.6 ± 11.5	82.0 ± 4.9	77.0 ± 7.8	73.3 ± 11.7
TM3	88.0 ± 5.6	89.9 ± 5.2	88.2 ± 3.4	88.1 ± 3.7
TM4	98.5 ± 5.0	98.0 ± 4.8	99.4 ± 2.8	97.6 ± 3.5
TM5	96.3 ± 3.9	92.8 ± 5.7	93.4 ± 5.1	94.8 ± 4.2
TM6	59.9 ± 13.2	83.5 ± 8.2	76.8 ± 16.7	67.7 ± 20.3
TM7	87.8 ± 3.9	90.2 ± 5.6	88.2 ± 2.5	80.0 ± 9.8
TM8	80.8 ± 7.1	81.6 ± 6.4	78.3 ± 6.3	81.9 ± 7.5
TM9	96.5 ± 5.0	93.1 ± 5.7	94.0 ± 4.6	94.1 ± 3.9
TM10	93.4 ± 4.2	94.4 ± 4.2	97.0 ± 3.7	94.9 ± 3.7

Tableau 9 : Conservation de la structure secondaire de SERCA1a, des domaines cytoplasmiques et des hélices du domaine TM. Données issues des simulations de dynamique moléculaire. La conservation de la structure secondaire a été calculée en comparant la structure secondaire à chaque frame avec celle du frame initial.

4. Les interactions de SERCA1a avec la bicouche

Toujours dans le but de vérifier la qualité des trajectoires, nous avons réalisé une étude du profil d'interaction de SERCA1a à l'état SLN.E1.Mg²⁺ avec les lipides adjacents dans nos simulations et avons comparé nos résultats avec ceux publiés par Norimatsu et al. (2017). En effet, récemment, Norimatsu *et al.* ont obtenu les structures cristallographiques de SERCA1a à différents états fonctionnels dans un mélange lipides/détergent/protéine et ont mis en évidence de nombreux lipides. Dans leur analyse de ces structures, les auteurs ont démontré que les interactions avec les lipides diffèrent suivant l'état, E1 ou E2, de SERCA1a. Ces résultats confirment une publication antérieure décrivant déjà ce phénomène (Sonntag et al., 2011). Leurs données montrent que la protéine change son orientation vis-à-vis de la membrane suivant son état dans le cycle fonctionnel, afin de minimiser le coût énergétique engendré par les larges mouvements internes des hélices transmembranaires. Deux classes de résidus sont impliquées dans ces changements d'orientation, les résidus tryptophanes qui sont situés sur les extrémités des hélices TM et participent à la minimisation énergétique, et les résidus arginines et lysines dont les longues chaînes latérales leur permettent d'utiliser les lipides comme point d'ancrage afin de faciliter les changements conformationnels.

Nous retrouvons dans nos simulations la plupart des interactions importantes protéine-lipides décrites à partir des structures aux rayons X de SERCA1a (voir Annexes 3 et 4 pour une description détaillée). Les chaînes latérales des résidus aromatiques (tryptophanes, tyrosines et phénylalanine) présentent deux types de comportements suivant leur position dans la membrane : pour les résidus situés à l'interface lipide/solvant, leur chaîne latérale se positionne de façon à ce que le plan de leur cycle aromatique soit parallèle à celui de la bicouche, comme cela est décrit généralement pour les protéines membranaires (Killian and von Heijne, 2000) ; pour les résidus enfouis dans la membrane, le contraire est observé et le cycle aromatique est soit plaqué contre le domaine TM, soit inséré entre deux queues aliphatiques de lipides adjacents. Parmi les résidus

formant des interactions avec la bicouche à l'état E1.2Ca²⁺ d'après Norimatsu et al. mais n'interagissant pas avec les lipides adjacents dans nos simulations, il y a le résidu Tyr867 qui est situé sur la boucle très fluctuante liant TM7 et TM8 et représentée en rouge sur la figure 39, ainsi que le résidu Arg110 situé sur la partie de l'hélice TM2 qui est exposée au solvant et qui se déstructure dans nos simulations. Néanmoins, le profil d'interaction de SERCA1a dans nos simulations est très proche de celui observé dans les cristaux de SERCA1a à l'état E1.2Ca²⁺ (Norimatsu et al., 2017) suggérant que l'ATPase se comporte de la même façon dans un mélange mixte détergent/lipides que dans une bicouche pure de POPC.

La comparaison de nos simulations avec les structures cristallographiques à l'état E2 montre aussi quelques différences et des interactions observées dans ces structures entre les lipides et des résidus situées sur la boucle très fluctuante liant TM7 et TM8 (Trp854 et Tyr867), ainsi qu'avec des résidus situés sur la partie cytoplasmique de TM2 ne sont pas observées dans nos simulations. Néanmoins, à l'exception de ces régions, le profil d'interaction protéine-lipide de SERCA1a dans nos simulations reste proche de celui des structures cristallographiques à l'état E2.

Cependant, nous observons une différence entre nos système simulés en présence et en absence de SLN. Le résidu Arg324, connu pour former des interactions avec la bicouche lorsque SERCA1a est à l'état E2 (Norimatsu et al., 2017), forme aussi des interactions avec la bicouche dans nos simulations mais uniquement lorsque la SLN est absente. . Cette interaction est rendue possible en absence du peptide car des lipides peuvent être en contact avec l'hélice TM6. Or, le résidu Arg324 (fig. 41) est situé sur l'hélice S4 (en jaune), hélice cytoplasmique succédant à TM4 dans la séquence et située au-dessus de la cavité formée par les hélices TM2, TM6 (en rouge) et TM9 dans laquelle vient se fixer la SLN. Cette interaction ne peut donc avoir lieu en présence de SLN et est en contradiction avec les structures cristallographiques de SERCA1a en présence de lipides obtenues par Norimatsu et al. (2017) car aucun lipide en contact avec TM6 n'est observé lorsque SERCA1a est à l'état E1, ce qui est le cas dans nos simulations. Néanmoins, l'anneau

lipidique n'est pas totalement reconstitué dans ces structures et d'autres structures cristallographiques à l'état E1 montrent une interaction entre ce résidu et la tête polaire d'un lipide pour SERCA1a à l'état E1.2Ca²⁺ (Drachmann et al., 2014). L'arginine 324 fait partie des résidus décrits par Norimatsu *et al.* comme accompagnant les changements conformationnels de SERCA1a et son interaction avec la bicouche semble donc importante vis-à-vis de la fonction de SERCA1a. Ce résidu a aussi été décrit comme interagissant avec le PLN (Yamasaki et al., 2004) qui se loge au même site que la SLN (Akin et al., 2013). Dans la structure cristallographique du complexe SERCA1a-SLN, ce résidu interagit avec le résidu Glu7 de la partie N-terminale de la SLN. Dans nos simulations en présence de SLN, on retrouve des interactions avec la partie N-terminale de la SLN (Glu2 ou Glu7).

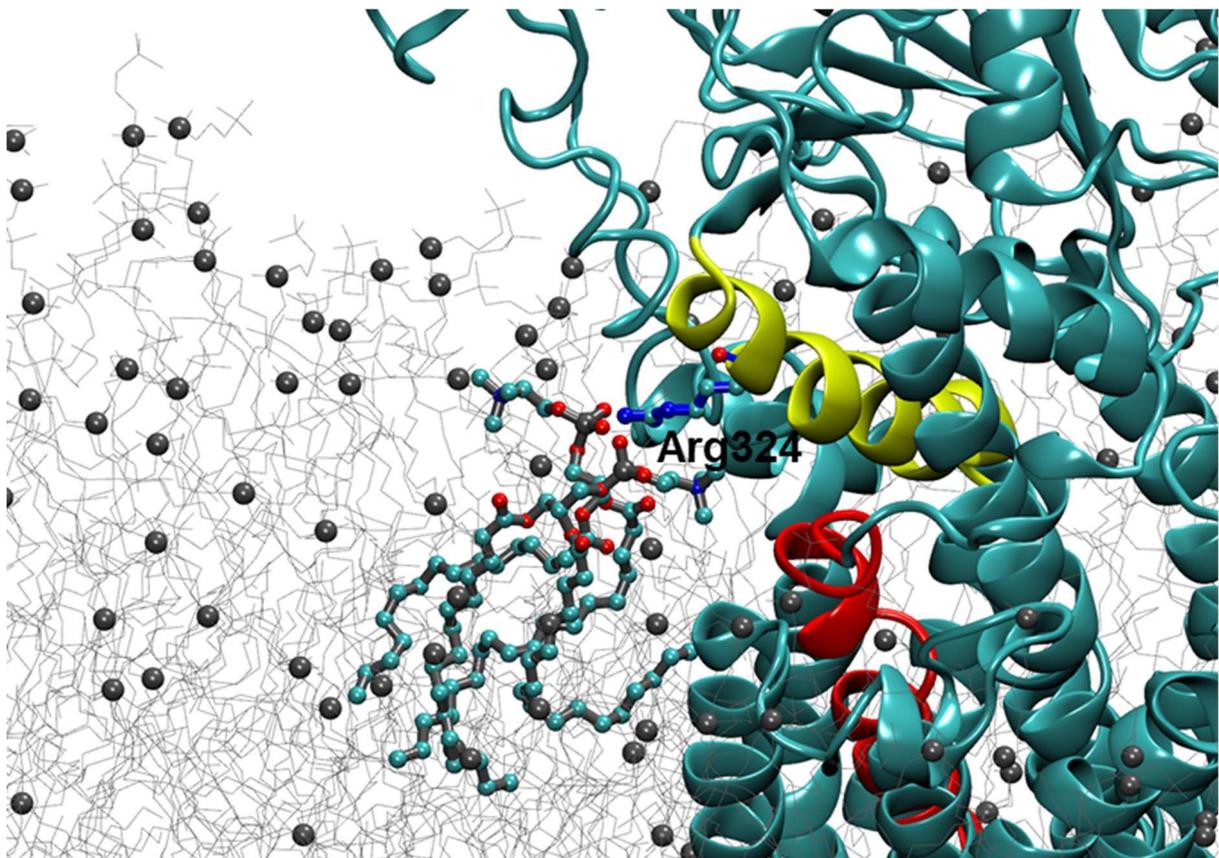


Figure 41 : Interaction entre Arg324 et deux lipides occupant la cavité de fixation de la SLN. Image issue d'une des simulations sans SLN. SERCA1a est représenté en ruban cyan. Les résidu Arg324, situé sur l'hélice S4 (en jaune), est représenté en boules et bâtons, tout comme les lipides avec lesquels il interagit. TM6 est représentée en rouge. Les autres lipides de la bicouche sont représentés en lignes grises et leurs atomes de phosphore par une sphère grise.

Le profil d'interaction de SERCA1a avec la membrane dans nos simulations est proche celui observé dans des structures cristallographiques de SERCA1a en présence de lipides et de

détergent, et la comparaison avec les structures cristallographiques de SERCA1a à l'état E1.2Ca²⁺ et à l'état E2 montre qu'il est difficile de dire si le profil d'interaction protéine-lipide de SERCA1a à l'état E1.Mg²⁺ est plus proche de celui de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺ ou à l'état E2. Néanmoins, l'absence de SLN permet aux lipides de la membrane d'occuper la cavité entre TM2, TM6 et TM9 et d'interagir avec des résidus basiques comme Arg324. L'interaction entre Arg324 et la membrane est maintenue pendant toute la durée de la trajectoire. Dans nos simulations, l'interaction de Arg324 avec les têtes polaires des lipides induit une courbure de la protéine et rapproche les domaines P et N de la membrane dans une des simulations en absence de SLN, montrant une différence entre les systèmes simulés en présence ou en absence de SLN. Comme nous pouvons le voir sur la figure 41, le lipide en interaction avec Arg324 n'est pas profondément enfoui au sein du sillon dans lequel vient se fixer la SLN et reste relativement éloigné de TM6.

5. Différence entre les structures en présence et absence de SLN

En plus des interactions entre la membrane et des résidus situés dans la cavité de fixation de la SLN, une autre différence a été observée entre les simulations en présence et en absence de SLN. Une des particularités de la structure du complexe par rapport aux autres structures de SERCA1a est la position de l'hélice TM1, plus enfouie dans la membrane, ce qui permet la formation d'une ouverture augmentant l'exposition des sites de fixation du calcium au cytoplasme. Nous avons donc étudié la position de TM1 vis-à-vis de la membrane dans nos simulations pour comprendre comment l'interaction de SERCA1a avec SLN influe sur celle-ci.

L'analyse de l'évolution de la position du centre de masse de TM1 par rapport à la normale au plan de la bicouche (i.e. l'axe Z dans nos systèmes) dans nos simulations de dynamique moléculaire (fig. 42). On observe un déplacement vers des valeurs positives (i.e. vers le cytoplasme) de la position de TM1 en absence de SLN. De plus, la largeur à mi-hauteur de la distribution des positions est plus importante en absence de SLN, démontrant une plus grande variation de la position de TM1 selon la normale à la membrane.

La visualisation des trajectoires montre que la présence de SLN contraint la position de TM1 au sein de la membrane via les nombreux contacts que TM2 forme à la fois avec TM1 et la SLN, ce qui lie les mouvements des trois hélices entre elles. En absence de SLN, les mouvements de TM2 sont moins contraints, tout comme ceux de TM1.

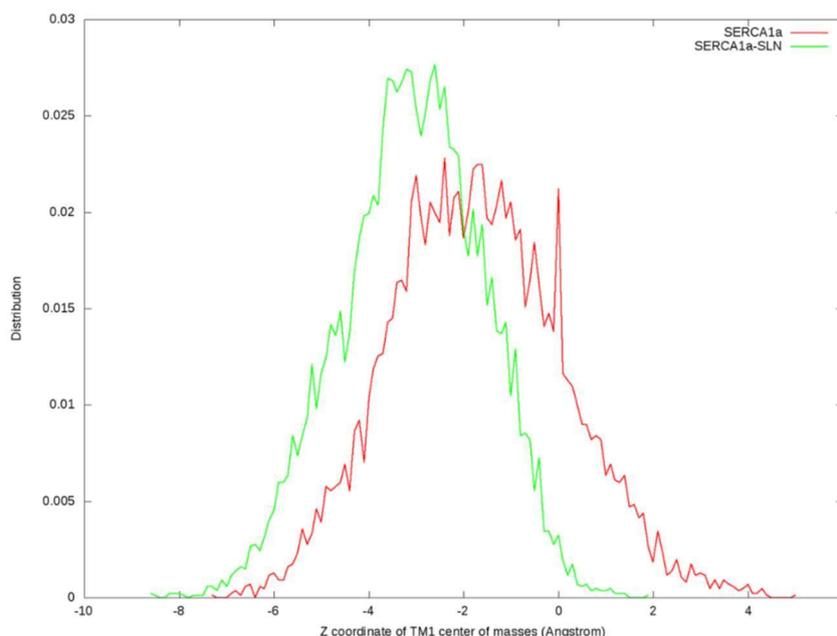


Figure 42 : Position de TM1 dans la bicouche. Distribution de la coordonnée sur l'axe Z du centre de masse de TM1 pour les trajectoires de simulations de dynamique moléculaire, en présence (en vert) et en absence (en rouge) de SLN. Les distributions prennent en compte les deux trajectoires pour chaque système (i.e. 'SERCA1a' et 'SERCA1a bis' pour SERCA1a, et 'SERCA1a-SLN' et 'SERCA1a-SLN bis' pour SERCA1a-SLN). L'origine de l'axe correspond au centre de la membrane, calculé pour chaque frame en prenant le centre de masse des phosphores de la bicouche comme référence.

6. En résumé

L'analyse des trajectoires issues des simulations de dynamique moléculaire montre que la conformation de SERCA1a à l'état E1.Mg²⁺-SLN inséré dans une bicouche de POPC en présence de solvant, diffère de manière importante de celle observée dans la structure du complexe obtenue par diffraction des rayons X (code PDB : 3w5a (Toyoshima et al., 2013)), comme le montre notre analyse du RMSD. Ceci est dû au mouvement des domaines cytoplasmiques de SERCA1a, qui se rapprochent de la conformation observée à l'état E1.2Ca²⁺.

L'analyse du RMSF des carbones α montre que les régions de SERCA1a fluctuant le plus sont celles situées sur des régions déstructurées et exposées au solvant. L'analyse de la conservation

de la structure secondaire de SERCA1a montre que la structure est conservée à 80% environ. Les régions dont la structure est la moins conservée sont le domaine A, qui forme peu d'interaction avec les autres domaines de la protéine, et la région cytoplasmique de l'hélice TM2, qui est liée au domaine A et est exposée au solvant.

La comparaison des structures issues des trajectoires de SERCA1a en présence et en absence de SLN a montré une différence de distribution de la position du centre de masse de TM1. La position en présence de SLN résulte en une plus grande ouverture de la bouche, facilitant l'accès au site du calcium, en bon accord avec les structures cristallographiques, mais qui pourrait aller à l'encontre de l'inhibition de SERCA1a par la SLN. L'analyse de nos trajectoires ne nous a pas permis d'observer des différences structurales susceptibles d'expliquer cette inhibition. En effet, aucune différence n'a été observée sur les sites fonctionnels de SERCA1a, i.e. les sites de fixation du Ca^{2+} (à part leur accessibilité) et le site de phosphorylation. Ceci pourrait être imputé à la longueur des trajectoires (200 ns) qui ne serait pas suffisante pour observer des différences structurales significatives. Il faudrait peut-être pour cela des trajectoires beaucoup plus longues, de plusieurs microsecondes, pour voir de telles modifications structurales. Notre seule possibilité d'atteindre des temps plus longs était de calculer des trajectoires en gros grain en utilisant le champ de force MARTINI (Marrink et al., 2004, 2007; Monticelli et al., 2008).

II. Simulations avec le champ de force MARTINI

Dans le champ de force MARTINI (Marrink et al., 2004, 2007; Monticelli et al., 2008), la protéine est représentée par un ensemble de particules, regroupant chacune environ quatre atomes lourds. De même, quatre molécules d'eau sont regroupées dans une seule particule. Quant à la membrane, chaque POPC a sa tête polaire représentée par quatre particules et chacune de ses chaînes aliphatiques par quatre autres particules (voir Matériel et Méthode). Une simulation de dynamique moléculaire de 5 μ s du complexe SERCA1a-SLN inséré dans la bicouche et entouré d'une boîte d'eau, système similaire à celui étudié en tout atome a été réalisée.

1. Structure et dynamique de SERCA1a

Afin de vérifier la qualité de cette trajectoire, nous avons calculé le RMSD de la protéine en utilisant comme structure de référence, la structure cristallographique du complexe au format MARTINI sur l'ensemble de la trajectoire, ainsi que sur les 200 premières et les 200 dernières nanosecondes pour pouvoir comparer la trajectoire avec celles obtenues pour les simulations en tout atome (fig. 43). Le RMSD varie peu durant la trajectoire et le RMSD moyen est de $1,8 \pm 0,2$ sur les premières 200 nanosecondes et de $1,6 \pm 0,1$ sur les 200 dernières, la moyenne sur l'ensemble de la trajectoire étant de $1,7 \pm 0,2$ Å. Pour estimer la stabilité de la structure du complexe dans la trajectoire, nous avons aussi analysé le RMSF des particules du squelette peptidique des deux protéines, ces particules représentant les atomes de la chaîne peptidique de chaque résidu (fig. 44). On observe un RMSF globalement plus faible que dans nos simulations en modèle tout-atome. Les domaines fluctuent tous avec la même intensité. Le pic observé pour les résidus 195 à 198 du domaine A en modèle atomique est observé ici aussi mais celui concernant la boucle qui lie les hélices TM7 et TM8 (résidus 859 à 894) n'est pas retrouvé en modèle MARTINI. Les fluctuations les plus importantes sont observées pour les résidus Met1 à Glu7 de la SLN (995 à 1001 sur la figure 34).

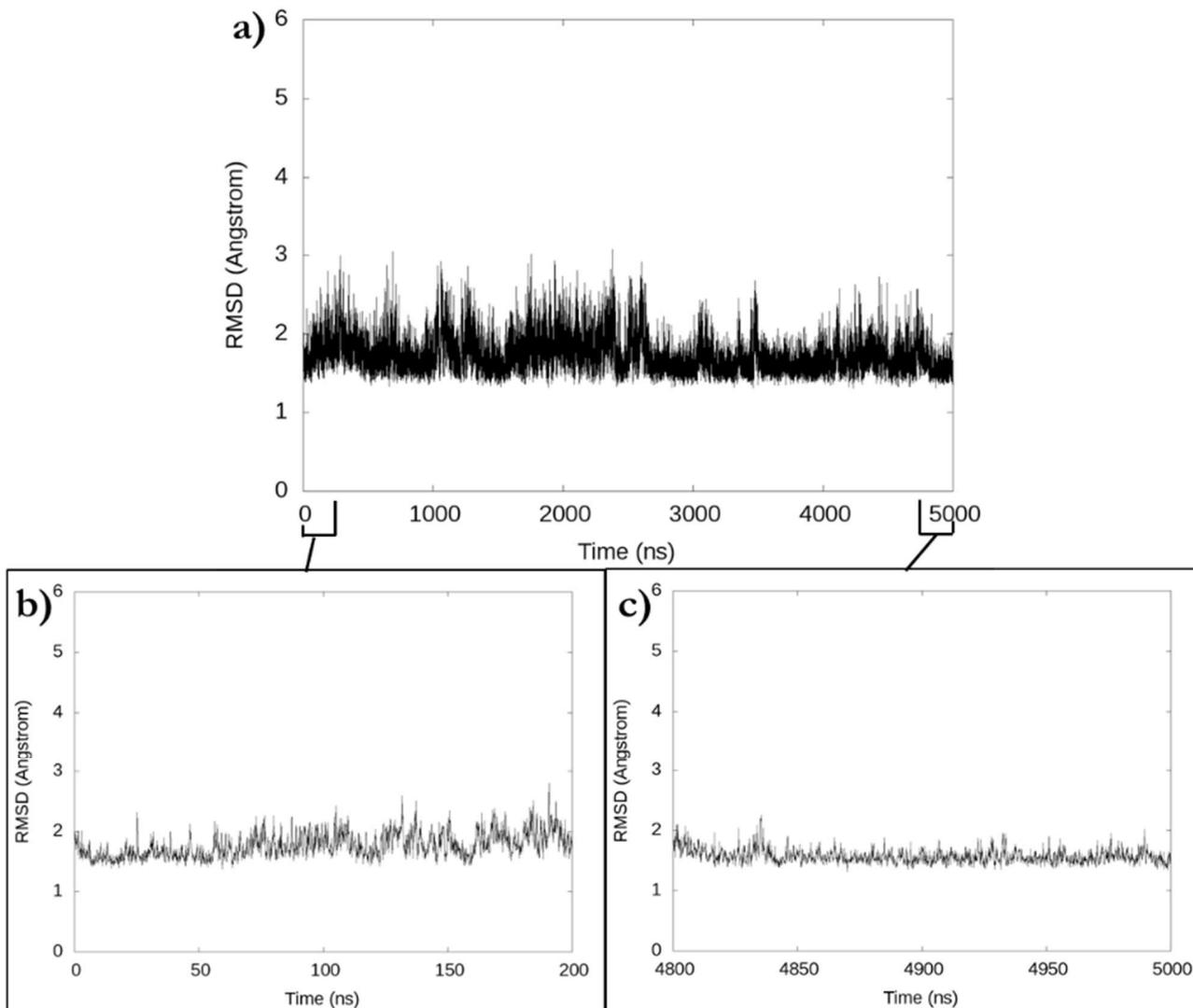


Figure 43 : RMSD des particules du squelette peptidique de SERCA1a. Données issues de la simulation dynamique moléculaire en modèle MARTINI du complexe SERCA1a en utilisant comme référence la structure du complexe [code PDB : 3w5a] au format MARTINI (a). Les panneaux b à c correspondent à un zoom sur les 200 premières et les 200 dernières nanosecondes de la trajectoire, respectivement.

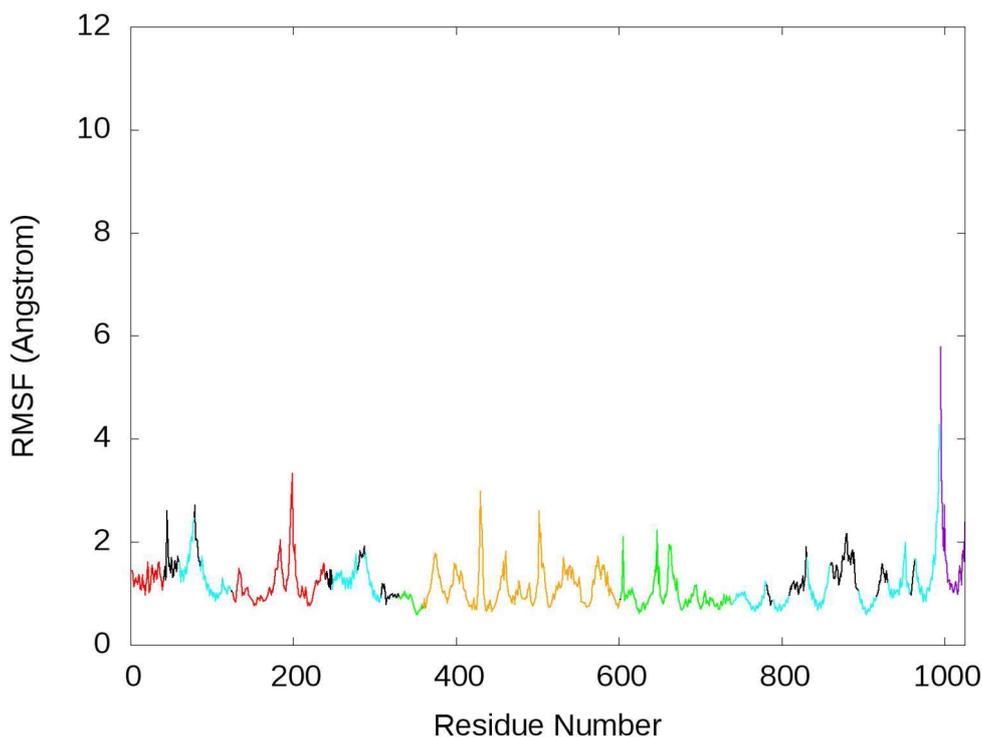


Figure 44 : RMSF des particules du squelette peptidique de SERCA1a. Donnée issues de la simulation du complexe SERCA1a –SLN au format MARTINI. Les domaines cytoplasmiques A, N et P sont représentés en rouge, orange et vert, respectivement. Le domaine TM est représenté en noir. Les autres régions de SERCA1a sont représentées en cyan. La SLN est représenté en violet et commence au résidu 995 pour finir au résidu 1025.

La visualisation de la trajectoire confirme les analyses du RMSD. La structure tertiaire de la protéine varie moins pendant 5 microsecondes en modèle MARTINI que pendant 217 ns en modèle tout-atome. Pour nous en assurer, nous avons mesuré la distance entre les centres de masses des domaines cytoplasmiques durant la simulation, à l’instar de l’analyse réalisée sur les dynamiques en modèle tout-atome. Les résultats montrent que les distances entre domaines varient peu au cours de la trajectoire (fig. 45a). Lorsqu’on compare ces valeurs avec celles des simulations en modèle tout-atome sur un intervalle de temps comparable (i.e. les 200 nanosecondes de la phase de production en modèle tout-atome et les 200 premières nanosecondes de la phase de production en modèle MARTINI) (fig. 45b à d), on remarque des variations beaucoup plus importantes pour les simulations en tout-atome, notamment pour la distance séparant les domaines N et A (fig. 45b). Ces résultats montrent que les mouvements entre domaines cytoplasmiques, observés en modèle tout-atome, ne le sont pas en modèle MARTINI.

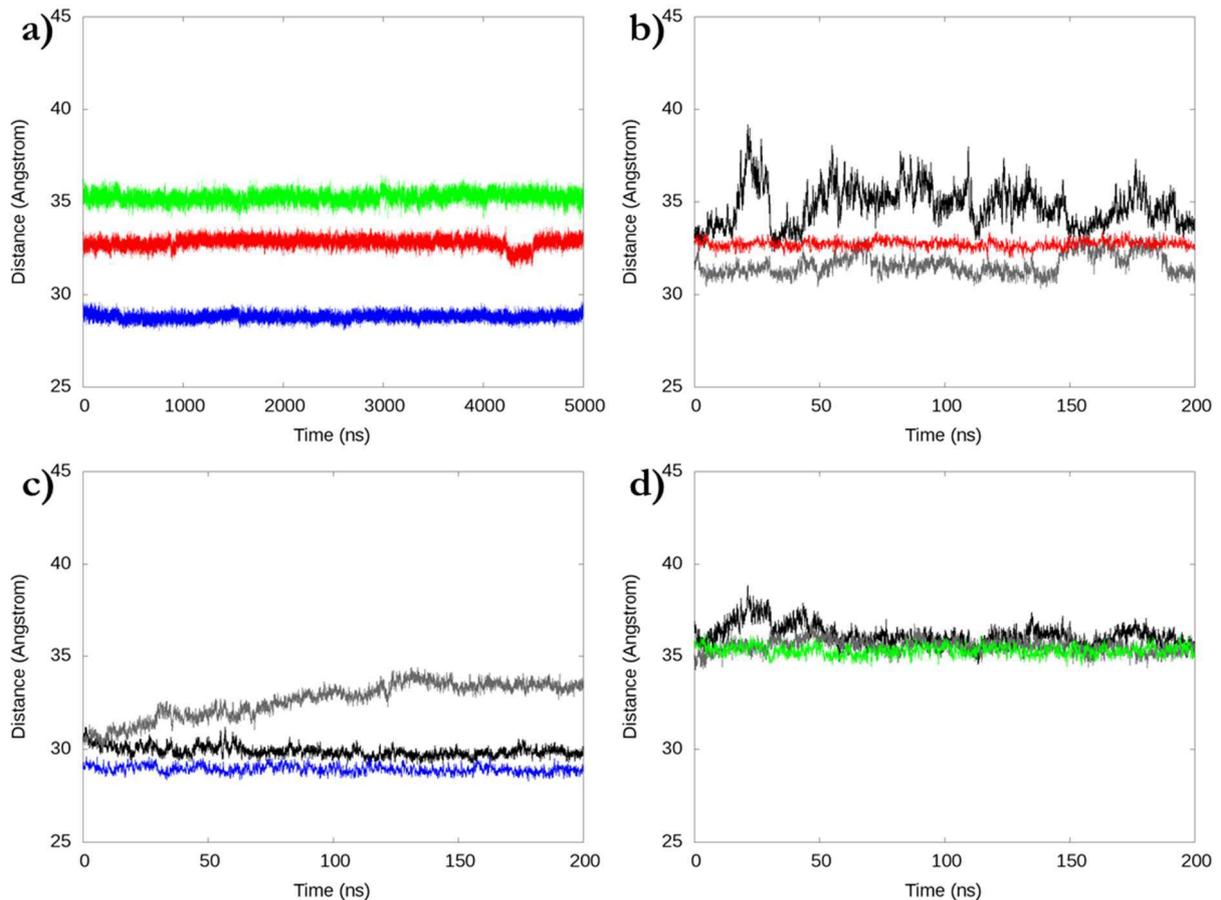


Figure 45 : Mouvements des domaines cytoplasmiques de SERCA1a. a) Evolution des distances séparant les centres de masse des domaines N et A (rouge), N et P (bleu) et A et P (vert) au cours de la simulation de dynamique moléculaire de SERCA1a-SLN en modèle MARTINI. **b à d)** Evolution de la distance séparant les domaines N et A (b), N et P (c) et A et P (d) pour les 200 premières secondes de la phase de production de la simulation en modèle MARTINI (courbes rouge, bleue et verte, respectivement) et pour les 200 nanosecondes de la phase de production en modèle tout-atome (courbes noires et grises ; données issues des simulations SERCA1a-SLN et SERCA1a-SLN bis, respectivement).

La comparaison du RMSD et du RMSF de SERCA1a en modèle MARTINI par rapport au modèle atomique montre que la protéine est plus stable en modèle gros-grain. Sa structure tertiaire est contrainte, ce qui ne permet pas les mouvements entre domaines cytoplasmiques. En effet, ces simulations ont été réalisées en utilisant le réseau élastique ElnDyn (Periole et al., 2009), qui maintient la structure de la protéine pour empêcher un dépliement de la protéine, ce qui pourrait expliquer ces faibles valeurs.

Toujours dans le but d'évaluer la qualité de notre trajectoire en modèle MARTINI, nous sommes intéressés à un autre paramètre important pour les systèmes protéines/membrane, la diffusion de la protéine dans le plan de la bicouche.

2. La diffusion de SERCA1a dans la bicouche

Afin d'estimer la capacité de SERCA1a à diffuser dans la membrane, une analyse du déplacement du centre de masse du domaine transmembranaire dans le plan de la bicouche pour une même durée que celle de nos simulations en tout atome, i.e. 200 ns, a été réalisée (fig. 46). On remarque que la protéine explore une surface importante durant ce laps de temps, avec un déplacement de 30 Å sur l'axe des X et des Y. Une analyse identique sur les simulations de dynamique moléculaire en modèle atomique montre que la protéine explore une surface beaucoup plus petite sur un même intervalle de temps (fig. 47). Pour quantifier cette différence, nous avons calculé le coefficient de diffusion latérale de SERCA1a.

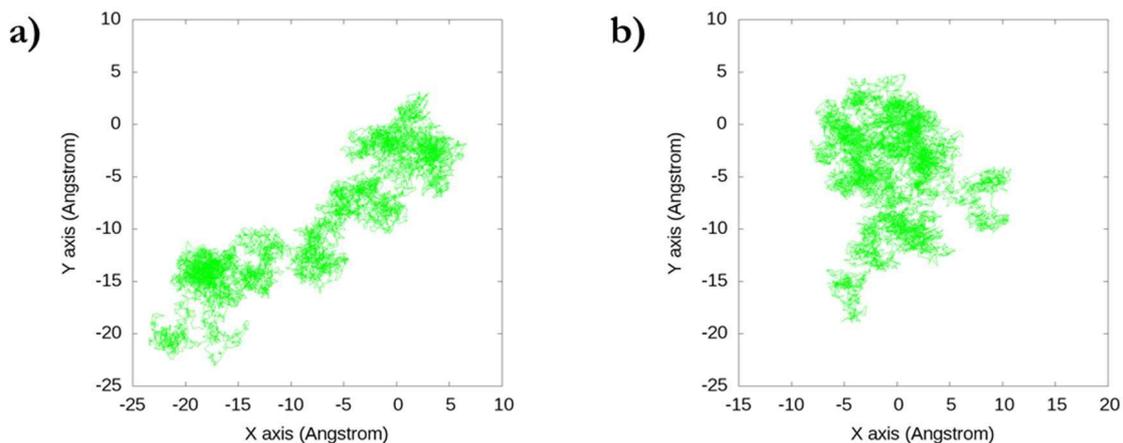


Figure 46 : Diffusion de SERCA1a dans la bicouche. Coordonnées du centre de masse du domaine membranaire de SERCA1a dans le plan de la bicouche pour le complexe SERCA1a-SLN dans la simulation de dynamique moléculaire en gros-grain avec le champ de force MARTINI. **a)** Diffusion pour les 200 premières nanosecondes. **b)** Diffusion pour les 200 dernières nanosecondes.

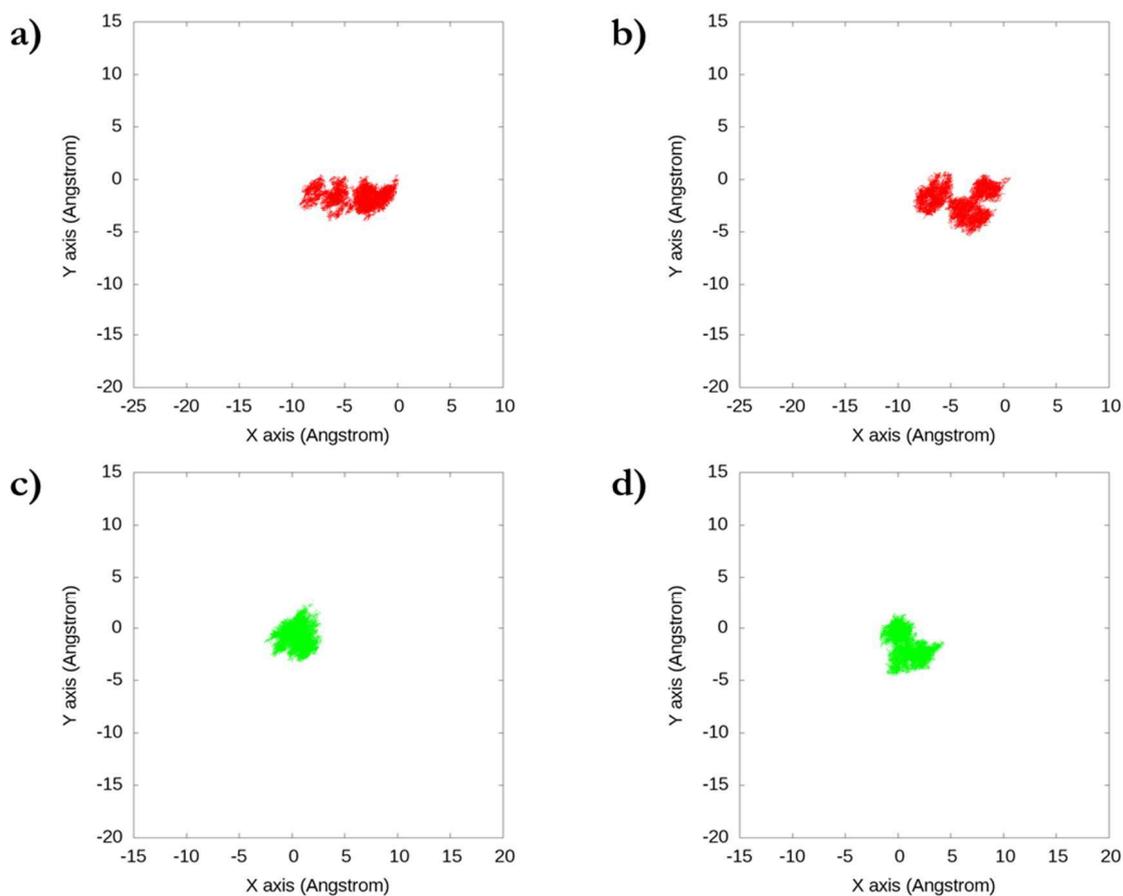


Figure 47 : Diffusion de SERCA1a dans la bicouche. Coordonnées du centre de masse du domaine membranaire de SERCA1a dans le plan de la bicouche pour les systèmes SERCA1a (a), SERCA1a bis (b), SERCA1a-SLN (c) et SERCA1a-SLN bis (d) dans les simulations de dynamique moléculaire en tout atome.

L'équation est la suivante (Popescu et al., 2005; Ramadurai et al., 2010) :

$$D_T = \frac{\langle \Delta r^2 \rangle}{4\Delta t}$$

Les calculs ont été réalisés sur 200 ns et avec un Δt de 20 ps. Les résultats de ce calcul sont présentés dans le tableau 10.

Lateral diffusion coefficient D_T ($\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)

	SERCA1a	SERCA1a bis	SERCA1a-SLN	SERCA1a-SLN bis	SERCA1a-SLN MARTINI
D_T	10.2	10.2	10.0	10.2	28.5

Tableau 10 : Coefficient de diffusion latérale de SERCA1a. Données issues des simulations de dynamique moléculaire en modèle atomique et MARTINI, sur un intervalle de 200 ns et un pas de temps de 20 ps.

On observe un coefficient de diffusion latérale 2,8 fois plus important en modèle MARTINI par rapport au modèle tout-atome. Ces résultats montrent que le champ de force tout-atome et le champ de force MARTINI représentent différemment la diffusion de la protéine dans la membrane. Ceci est en accord avec les observations rapportées pour d'autres protéines membranaires (Liao et al., 2017; Ramadurai et al., 2010).

3. En résumé

L'utilisation du modèle MARTINI pour la simulation de dynamique moléculaire a l'avantage de permettre d'obtenir des trajectoires d'une durée plus importante et donc d'observer des phénomènes biologiques plus lent. Malheureusement, la comparaison de la capacité de SERCA1a à diffuser dans la bicouche en modèle MARTINI et en modèle tout-atome montre que le champ de force MARTINI surestime le coefficient de diffusion par rapport au modèle tout-atome. De plus, on observe une grande stabilité de la structure du complexe, comme le montre les RMSD et RMSF de SERCA1a-SLN, qui est probablement due au modèle élastique dans le champ de force MARTINI, qui par définition, maintient la structure.

Cette forte stabilité est donc artificielle et ne nous permet pas de voir les déplacements des domaines tels que observés dans la dynamique en tout-atome, ce qui nous fait douter de la capacité d'une telle dynamique de produire les éventuelles modifications structurales attendues suite au retrait de la SLN. Nous nous sommes tournés vers l'analyse de modes normaux afin de comprendre les effets de la SLN sur la fonction de SERCA1a.

III. Analyse des Modes Normaux

Pour étudier l'effet de SLN sur la structure de SERCA1a par analyse des modes normaux, nous avons généré deux systèmes, l'un où SERCA1a est en interaction avec la SLN et l'autre où la SLN a été retirée du complexe. Nous sommes partis d'une structure identique pour les deux systèmes, i.e. la structure du complexe SERCA1a-SLN (code PDB : 3w5a), la même qui a été utilisée dans les simulations de dynamique moléculaire décrites précédemment. Nous avons ensuite inséré SERCA1a (en interaction ou non avec SLN suivant le système) dans une bicouche de POPC et ajouté le solvant et les ions avec CHARMM-GUI. Nous avons ensuite réalisé une minimisation d'énergie en supprimant au préalable toute molécule d'eau et d'ion à plus d'une couche d'hydratation de la protéine, c.à.d. à plus de 4 Å d'un atome lourd.

A l'issue de cette minimisation, le RMSD des carbones α de SERCA1a est de 1,03 Å entre les deux systèmes. En partant d'une structure identique, la minimisation nous a donc permis d'obtenir deux structures légèrement différentes de SERCA1a. Ces deux systèmes ont ensuite été utilisés pour réaliser le calcul des modes normaux.

1. Modèle de réseau élastique

Nous avons choisi d'utiliser d'abord le modèle ENM (Elastic Network Model) où ne sont considérés que les carbones α , liés par des ressorts. L'avantage de ce modèle sur celui en tout-atome est que le calcul des modes est très rapide et nécessite une faible puissance de calcul. En effet, le calcul des 100 modes de plus basses fréquences pour les 1025 carbones α de SERCA1a-SLN a duré 5 secondes, en utilisant des sous-programmes développés au laboratoire CMIB (Chemistry, Modeling and Imaging for Biology) de l'Institut Curie, insérés dans la version 36 de CHARMM.

Nous avons comparé les modes des deux systèmes (avec et sans SLN) en projetant chaque mode de l'un sur l'ensemble des modes de l'autre, dans le but d'observer leurs différences (fig. 48). Nous limitons la présentation aux 50 premiers modes de chaque système (en dehors des 6 modes de translations-rotations globales, qui ne sont pas pris en compte) afin d'en faciliter la lecture. Ces modes correspondent aux plus basses fréquences représentant les mouvements les plus amples (qui ne sont pas toujours les plus collectifs). On observe que la plupart des 50 premiers modes d'un système trouve son équivalent dans les modes de l'autre, indiquant l'absence d'effet de la SLN sur une grande partie des mouvements.

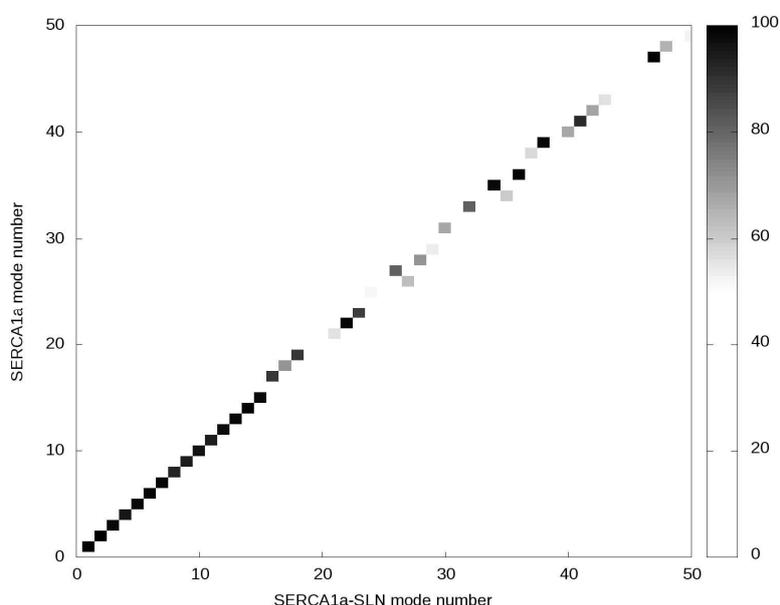


Figure 48 : Comparaison des modes calculés en modèle ENM pour SERCA1a avec et sans SLN. Chaque mode d'un système a été projeté sur l'ensemble des modes de l'autre système. Une valeur de 100 indique deux modes totalement identiques.

Afin de voir la propension que la protéine a d'aller de l'état $E1.Mg^{2+}$ vers l'état $E1.2Ca^{2+}$, nous avons projeté les modes sur le vecteur différence entre les coordonnées de $E1.Mg^{2+}$ (avec et sans SLN) et $E1.2Ca^{2+}$ (structure cristallographique, 1vfp). La somme cumulative du carré de ces projections (fig. 49) montre une plus grande propension du système pour aller vers l'état $E1.2Ca^{2+}$ en présence de SLN. Ce résultat est en contradiction avec les observations expérimentales qui montrent que la présence de la SLN est incompatible avec l'état $E1.2Ca^{2+}$ de SERCA1a (Toyoshima et al., 2013).

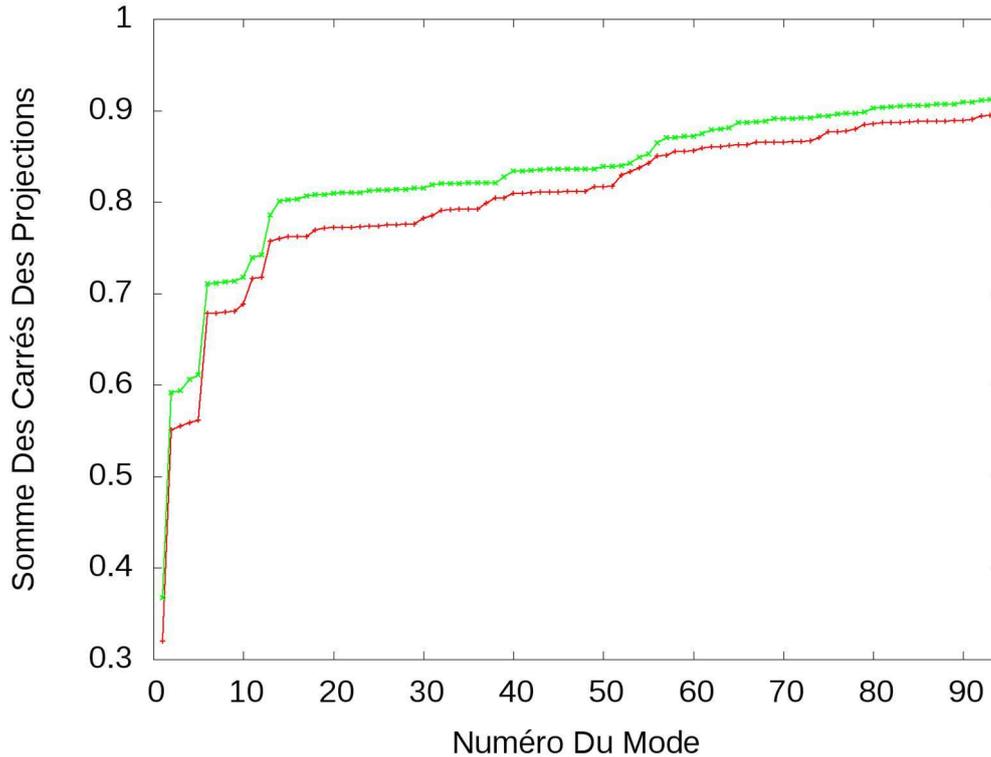


Figure 49 : Somme des carrés des projections des modes en modèle ENM sur les vecteurs de transition $\text{SLN.E1.Mg}^{2+} \rightarrow \text{E1.2Ca}^{2+}$ ou $\text{E1.Mg}^{2+} \rightarrow \text{E1.2Ca}^{2+}$. Le vecteur de transition a été déterminé en superposant les carbones α des hélices TM6 à TM10 de E1.2Ca^{2+} (code PDB : 1vfp) sur ceux de la structure à partir de laquelle ont été calculés les modes, i.e., SLN.E1.Mg^{2+} (en vert) et E1.Mg^{2+} (en rouge).

Nous avons alors considéré que la prise en compte des chaînes latérales pourrait améliorer les résultats. Pour cela, nous avons utilisé la méthode NOLB (NOn-Linear rigid Blocks) (Hoffmann and Grudin, 2017) qui se base sur la modèle RTB (Rotation-Translation Blocks) (Durand Philippe et al., 2004; Tama Florence et al., 2000). Ce modèle consiste à considérer chaque résidu de la protéine comme un bloc rigide possédant 6 degrés de liberté (3 translations et 3 rotations). A l'instar du modèle ENM, cette méthode a l'avantage d'être rapide et peu coûteuse en puissance de calcul. En effet, le calcul des 100 modes de plus basses fréquences pour les 1025 blocs de SERCA1a-SLN a duré environ 4 minutes. Cependant, l'analyse des modes calculés par cette méthode montre des mouvements similaires à ceux observés avec la méthode ENM.

Ceci peut être expliqué par le fait que les modes normaux, surtout dans les modèles ENM et RTB, dépendent principalement de la forme du système étudié et la forme de SERCA1a change peu en présence et en absence de SLN. Par contre, l'ajout de la membrane modifie la forme du

système. Or, la membrane n'est pas un élément accessoire dans ce système, d'où la nécessité d'étudier les modes normaux en modèle tout-atome et en présence de lipides.

2. Modèle tout-atome

Nous avons alors réalisé le calcul des modes en utilisant le modèle tout-atome en tenant compte non seulement de la protéine mais aussi de la membrane POPC et de la couche d'eau et d'ions autour des régions exposées au solvant de la protéine (des côtés cytoplasme et lumen). Ce système en présence de SLN comporte 70483 atomes. Pour cela la méthode DIMB (Diagonalization In a Mixed Basis) a été utilisée, mais dans une version de CHARMM qui a été adaptée au CMIB pour tourner sur des cartes GPU. Ce calcul a pris une dizaine de jours et plusieurs milliers d'itérations pour atteindre une excellente convergence pour les vecteurs propres, à moins de 0,03.

A l'issue du calcul, nous avons comparé les modes obtenus pour nos deux systèmes (fig. 50). Contrairement aux modes calculés en modèle ENM, des différences sont observées entre les modes de nos deux systèmes, et ceci à partir du mode 14, qui est toujours un mode collectif.

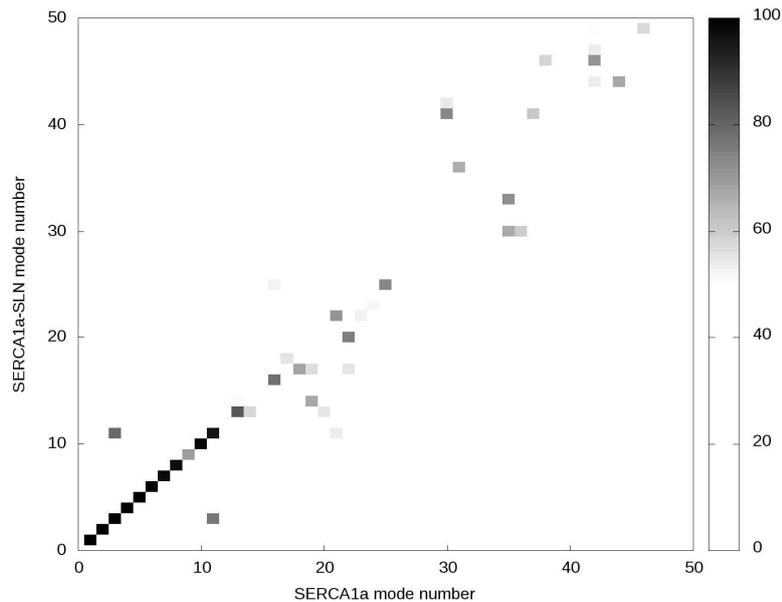


Figure 50 : Comparaison des modes calculés en modèle tout-atome pour SERCA1a avec et sans SLN. Chaque mode d'un système a été projeté sur l'ensemble des modes de l'autre système. Une valeur de 100 indique deux modes totalement identiques.

La visualisation des trajectoires calculées à partir de chaque mode montre que des mouvements de rapprochement des domaines cytoplasmiques entre eux, tels qu'observés dans les dynamiques moléculaires, sont retrouvés avec les modes normaux, que ce soit en tout-atome, en ENM ou en RTB. Ceci montre la persistance de ces mouvements collectifs quelle que soit la méthodologie utilisée. Cependant, avec les modes en tout-atome, nous observons en plus des mouvements de rapprochement entre les domaines cytoplasmiques et la membrane, correspondant de ce fait, à un rapprochement entre ces domaines et le domaine transmembranaire. Ce mouvement est absent dans les modèles ENM et RTB, probablement dû à l'absence de la membrane. Nous choisissons donc de continuer l'étude des effets de la SLN sur SERCA1a par analyse de modes normaux en modèle tout-atome uniquement.

3. Effet de la SLN sur les changements conformationnels de SERCA1a

Comme dans son cycle fonctionnel SERCA1a à l'état E1(mimé ici par l'état E1.Mg²⁺ obtenu par les cristallographes) en présence de SLN est entouré par les états E1.2Ca²⁺ et E2 (voir Introduction), nous avons projeté les modes obtenus en présence et en absence de SLN sur les vecteurs différence entre la structure E1.Mg²⁺ et E1.2Ca²⁺ (1vfp) d'une part et E2 (3w5c) d'autre part (fig. 51 et 52, respectivement), à l'instar de l'analyse réalisée à partir des modes normaux calculés en modèle ENM.

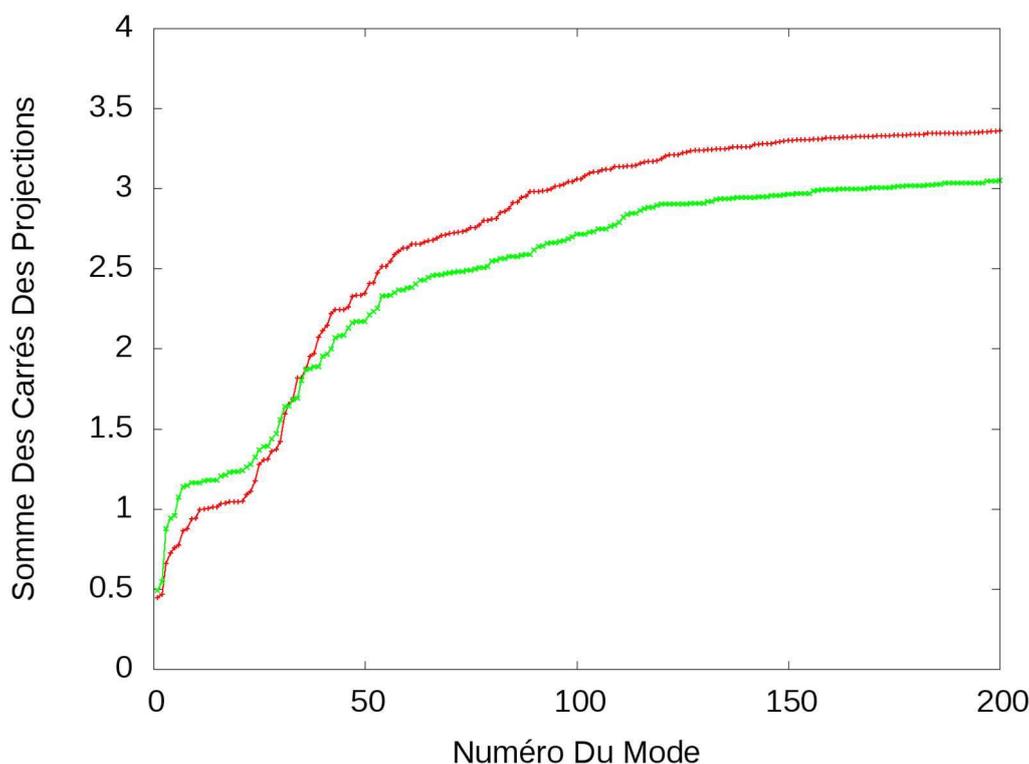


Figure 51 : Somme des carrés des projections des modes en modèle tout-atome sur les vecteurs de transition SLN.E1.Mg²⁺ → E1.2Ca²⁺ ou E1.Mg²⁺ → E1.2Ca²⁺. Le vecteur de transition a été déterminé en superposant les carbones α des hélices TM6 à TM10 de E1.2Ca²⁺ (code PDB : 1vfp) sur ceux de la structure à partir de laquelle ont été calculés les modes, i.e., SLN.E1.Mg²⁺ (en vert) et E1.Mg²⁺ (en rouge).

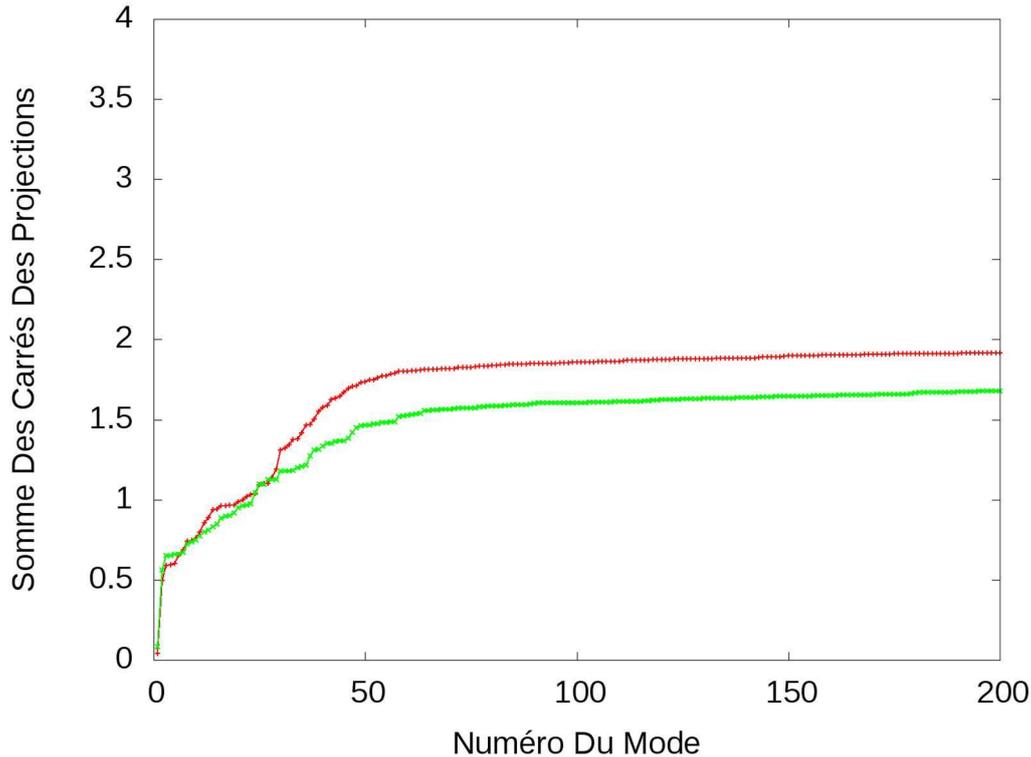


Figure 52 : Somme des carrés des projections des modes en modèle tout-atome sur les vecteurs de transition SLN.E1.Mg²⁺ → E2 ou E1.Mg²⁺ → E2. Le vecteur de transition a été déterminé en superposant les carbones α des hélices TM6 à TM10 de E1.2Ca²⁺ (code PDB : 3w5c) sur ceux de la structure à partir de laquelle ont été calculés les modes, i.e., SLN.E1.Mg²⁺ (en vert) et E1.Mg²⁺ (en rouge).

On observe que la somme des carrés des projections des modes en présence de SLN est inférieure à celle en absence du peptide, que ce soit pour la transition vers E1.2Ca²⁺ ou vers E2. Ainsi, les résultats montrent que la présence de SLN diminue la capacité de SERCA1a à l'état E1.Mg²⁺ à réaliser la transition vers l'état E1.2Ca²⁺, ainsi que vers l'état E2. De plus, la comparaison des figures 51 et 52 montre que SERCA1a à l'état E1.Mg²⁺, que ce soit en absence ou en présence de SLN, est plus apte à réaliser la transition vers l'état E1.2Ca²⁺ que vers l'état E2, ce qui est en bon accord avec les données expérimentales. Cependant, on n'observe aucun mode qui, à lui seul, représente ces transitions. Pour cela, nous avons adopté pour l'analyse des mouvements la création de trajectoires de dynamique basées sur l'addition de tous les modes calculés. Deux trajectoires ont été ainsi créées à partir de chaque jeu de modes, l'une avec toutes les phases de vibration à zéro et l'autre avec des phases aléatoires.

4. La position de l'hélice TM1 dans la bicouche

L'analyse des simulations de dynamique moléculaire de SERCA1a en présence et en absence de SLN présentée dans la partie I de ce chapitre nous a montré notamment que la SLN exerce une contrainte sur TM1, l'obligeant à prendre une position plus enfouie dans la bicouche. Pour vérifier si nous obtenons la même chose avec les modes normaux, nous avons réalisé une analyse similaire de la position de l'hélice TM1 dans les trajectoires créées à partir des modes (fig. 53). La distribution des coordonnées du centre de masse de TM1 suivant l'axe Z normal à la membrane montre un déplacement vers le lumen (valeurs négatives) en présence de la SLN, accentuant l'enfouissement de l'hélice. Ces résultats confirment donc ceux observés en dynamique moléculaire.

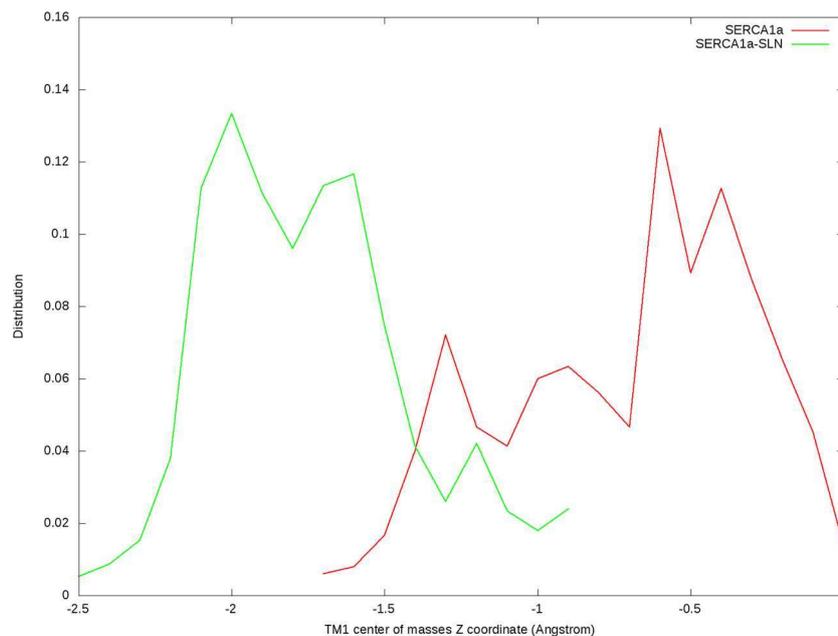


Figure 53 : Distribution de la coordonnée sur l'axe Z du centre de masse de l'hélice TM1. Données issues de l'analyse des trajectoires générées en superposant l'ensemble des modes, en présence (en vert) et en absence (en rouge) de SLN. Les distributions prennent en compte les six trajectoires pour chaque. L'origine de l'axe correspond au centre de la membrane, calculé pour chaque frame en prenant le centre de masse des phosphores de la bicouche comme référence.

A l'issue de l'analyse des simulations de dynamique moléculaire, nous avons émis l'hypothèse que la position de TM1 était contrainte par SLN via les contacts que forment TM1 et SLN avec TM2. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons donc étudié les corrélations des

mouvements entre ces trois hélices (fig. 54 et 55). Nous observons que, en présence comme en absence de SLN, les mouvements de TM1 et de la partie N-terminale de TM2 sont corrélés (fig. 54). Par ailleurs, en présence de SLN, la partie N-terminale de TM2 est très fortement corrélée avec la partie C-terminale de la SLN, du fait de leur orientation inversée (fig. 55b). Ce qui a pour résultat que les mouvements de TM1 sont aussi corrélés avec ceux de la partie C-terminale de la SLN (fig. 55a).

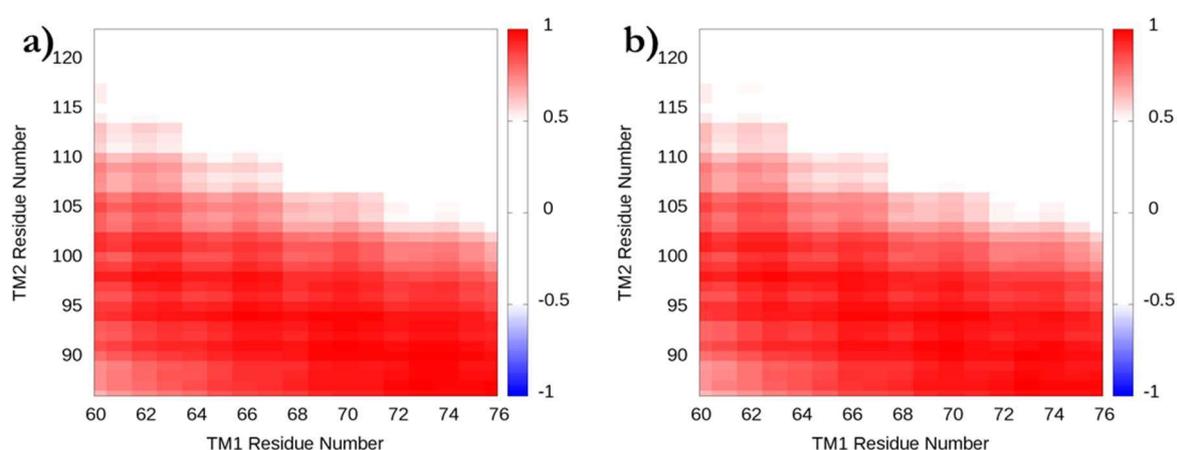


Figure 54 : Corrélation des mouvements des carbones α des résidus de l'hélice TM1 avec ceux des carbones α des résidus de l'hélice TM2. Données issues de l'analyse des trajectoires générées par addition des modes pour SERCA1a en absence de SLN (a) et en présence de SLN (b).

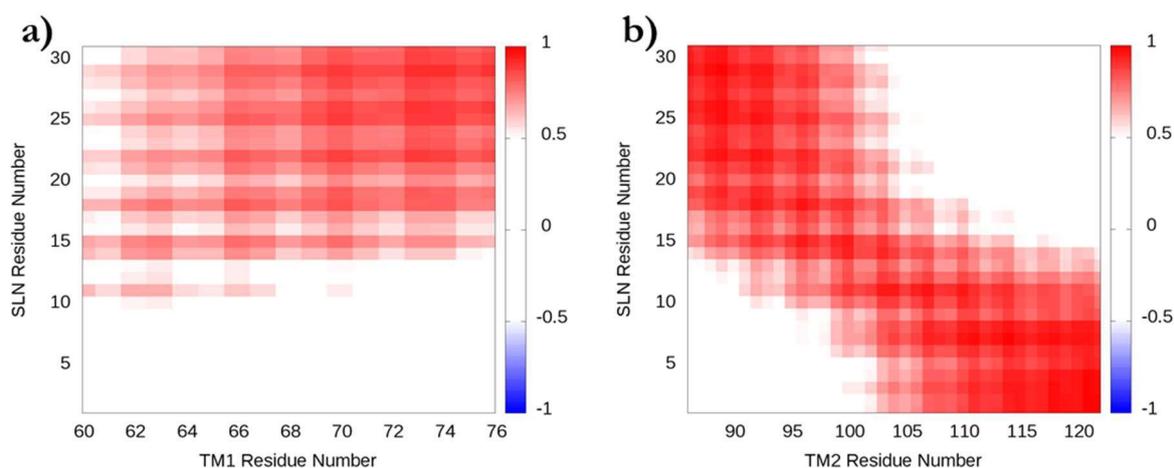


Figure 55 : Corrélation des mouvements des carbones α des résidus de la SLN avec ceux des carbones α des résidus de l'hélice TM1 (a) et avec ceux des carbones α des résidus de l'hélice TM2 (b). Données issues de l'analyse des trajectoires générées par addition des modes pour SERCA1a en présence de SLN.

L'analyse des données issues du calcul des modes normaux nous a permis de retrouver des résultats expérimentaux : 1) la SLN inhibe la transition de SERCA1a vers l'état E1.2Ca²⁺, en accord avec les conclusions de Toyoshima *et al.* (2013), 2) la présence de la SLN permet l'ouverture d'une « bouche » exposant les sites de fixation du Ca²⁺ au cytosol en contraignant TM1 dans une position enfouie dans la membrane. Cette « bouche » est observée uniquement dans des structures du complexe SERCA1a-SLN (les structures 3w5a (Toyoshima et al., 2013) et 4h1w (Winther et al., 2013)) et nos données issues de l'analyse des modes normaux ainsi que de nos dynamiques moléculaires le démontrent.

L'observation d'effets de la SLN déjà décrits par des méthodes expérimentales nous permet d'être confiant concernant la qualité de nos données issues du calcul des modes normaux. Cependant, le mécanisme de régulation de SERCA1a par la SLN est toujours incompris à l'heure actuelle, aussi dans le but d'observer un éventuel effet de la SLN sur la structure de SERCA1a et pouvant affecter la fonction de l'ATPase, nous avons poursuivi nos analyses et étudié les fluctuations de la structure de SERCA1a.

5. Les fluctuations de SERCA1a

Les fluctuations des carbones α de SERCA1a, basées sur les modes normaux (fig. 56) diffèrent de celles observées dans les trajectoires de dynamique moléculaire. Tout d'abord, leur valeur est nettement plus faible, car il a été montré que les modes normaux sous-estiment toujours la valeur des fluctuations (Hayward, 2001). C'est donc la valeur relative des différents résidus qui est intéressante. Alors que dans les trajectoires de dynamique moléculaire tous les domaines présentent des niveaux de fluctuations similaires, celles calculées à partir des modes normaux sont plus différenciées : les fluctuations des carbones α des résidus des domaines cytoplasmiques sont plus importantes que celles du domaine TM, et le domaine N fluctue le plus, suivi des domaines A puis P. Ceci reflète bien le degré d'exposition au solvant et donc de liberté de mouvement de chaque domaine.

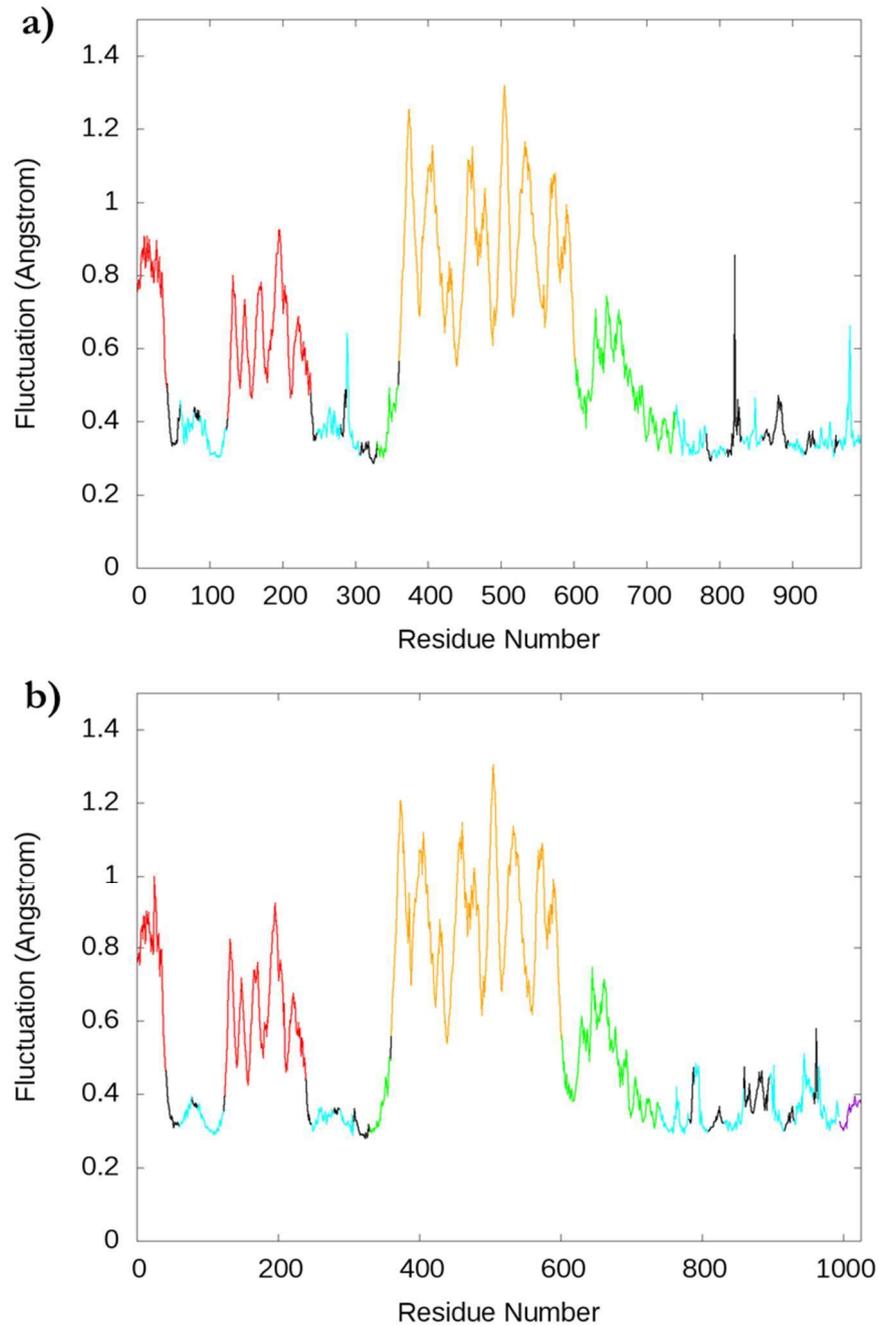


Figure 56 : Fluctuations des carbones α de SERCA1a. Données calculés à partir des modes pour les systèmes SERCA1a (a) et SERCA1a-SLN (b). Les domaines cytoplasmiques A, N et P sont représentés en rouge, orange et vert, respectivement. Le domaine TM est représenté en noir. Les autres régions de SERCA1a sont représentées en cyan. La SLN est représenté en violet et commence au résidu 995 pour finir au résidu 1025 (b).

Les pics observés en dynamique moléculaire concernent: (i) les résidus 195 à 198, situés sur une boucle du domaine A sont parmi les plus fluctuants du domaine (ii) les résidus Ser504 et Arg505, tous deux situés sur une boucle du domaine N sont les résidus les plus fluctuants de ce domaine (iii) les résidus 859 à 894, composant la boucle qui lie les hélices TM7 et TM8 est une

région très fluctuante du domaine TM. L'analyse des fluctuations des carbones α de SERCA1a en présence de SLN montre aussi des fluctuations importantes de la partie N-terminale de TM6 (résidus 789 à 797 et, résidu 799) qui ne sont pas retrouvées pour l'ATPase seule (fig. 57). Cet effet de la SLN sur TM6 est intéressant car cette hélice TM possède trois résidus impliqués dans les sites de fixation du Ca^{2+} , les résidus Asn796, Thr799 et Asp800. Nous nous sommes donc intéressés à la dynamique des sites de fixation du Ca^{2+} en présence et en absence de SLN.

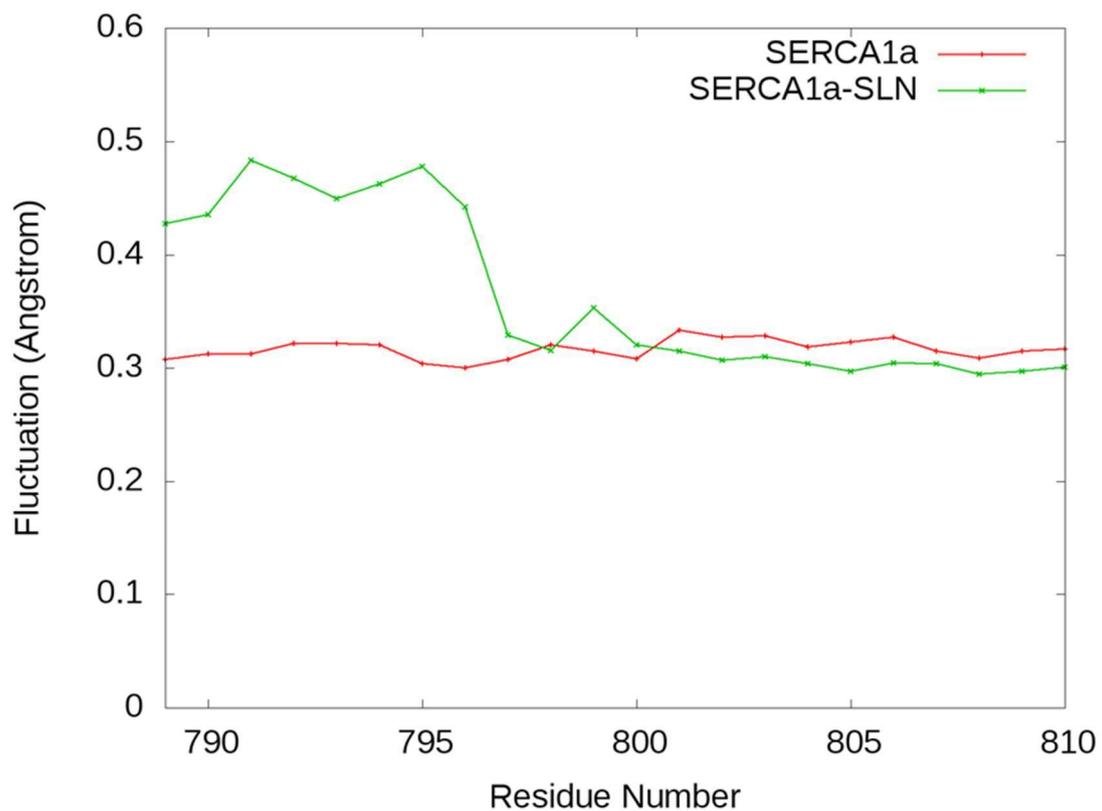


Figure 57 : Fluctuations des carbones α des résidus de TM6 pour SERCA1a en présence de SLN (vert) et en absence de SLN (rouge) à partir des modes.

6. Les sites de fixation du Calcium

Les sites de fixation du Ca^{2+} de SERCA1a consistent en deux sites adjacents localisés au sein du domaine membranaire et constitués de résidus acides ou polaires. Le site I est composé des résidus Glu771 (TM5), Asp768 (TM5), Thr799 (TM6), Asp800 (TM6), et Glu908 (TM8), tandis que le site II est composé des résidus Val304, Ala305, Ile 307, Glu 309 (tous situés sur TM4), Asn796 (TM6) et Asp800 (TM6). Le résidu Asp800 est le seul résidu commun aux deux sites.

Lorsqu'on compare les deux structures du complexe SERCA1a-SLN disponibles dans la littérature, aucune ne présente d'ion Ca^{2+} en interaction avec les résidus du site I ou II de fixation du Ca^{2+} . Afin de stabiliser la structure, le choix a été fait par les cristallographes de travailler en présence de concentration millimolaire de magnésium afin de piéger un état conformationnel le plus proche possible de l'état E1 préfigurant la fixation des ions calcium (Toyoshima et al., 2013; Winther et al., 2013).

La structure publiée par Toyoshima et al. (Toyoshima et al., 2013) a été obtenue avec un unique ion Mg^{2+} fixé sur un site intermédiaire entre les sites I et II. Ce site unique, appelé site I' par l'auteur est composé des résidus Glu771 (TM5, site II) et Asp800 (TM6, site I/II) qui forment tous deux une interaction bidentate avec le cation (Toyoshima et al., 2013). La comparaison des sites de fixation du Ca^{2+} à l'état SLN.E1. Mg^{2+} (code PDB : 3w5a (Toyoshima et al., 2013)) et à l'état E1.2 Ca^{2+} (code PDB : 1vfp (Toyoshima and Mizutani, 2004)) montre que, à l'état SLN.E1. Mg^{2+} , les hélices comprenant le site de fixation sont plus écartées les unes des autres (fig. 58). En conséquence, les résidus Asn796 et Thr799 (tous deux situés sur TM6) sont trop éloignés des sites de fixation pour participer à la fixation d'un cation. De plus, l'orientation des chaînes latérales des résidus Glu309 (TM4) et Asn768 (TM5) empêche ces résidus de participer à la fixation d'un cation. Dans la structure de SERCA1a à l'état E1- Mg^{2+} et sans SLN, la chaîne latérale de Glu309 est orientée vers les sites de fixation, contrairement à ce qui est observé dans la structure en présence du peptide. L'ion Mg^{2+} est présent dans les deux structures, ce qui laisse à penser que ces

modifications de la conformation des sites de fixation du Ca^{2+} n'est pas uniquement due à la présence d'un cation différent (le Mg^{2+}) mais aussi à la présence de SLN.

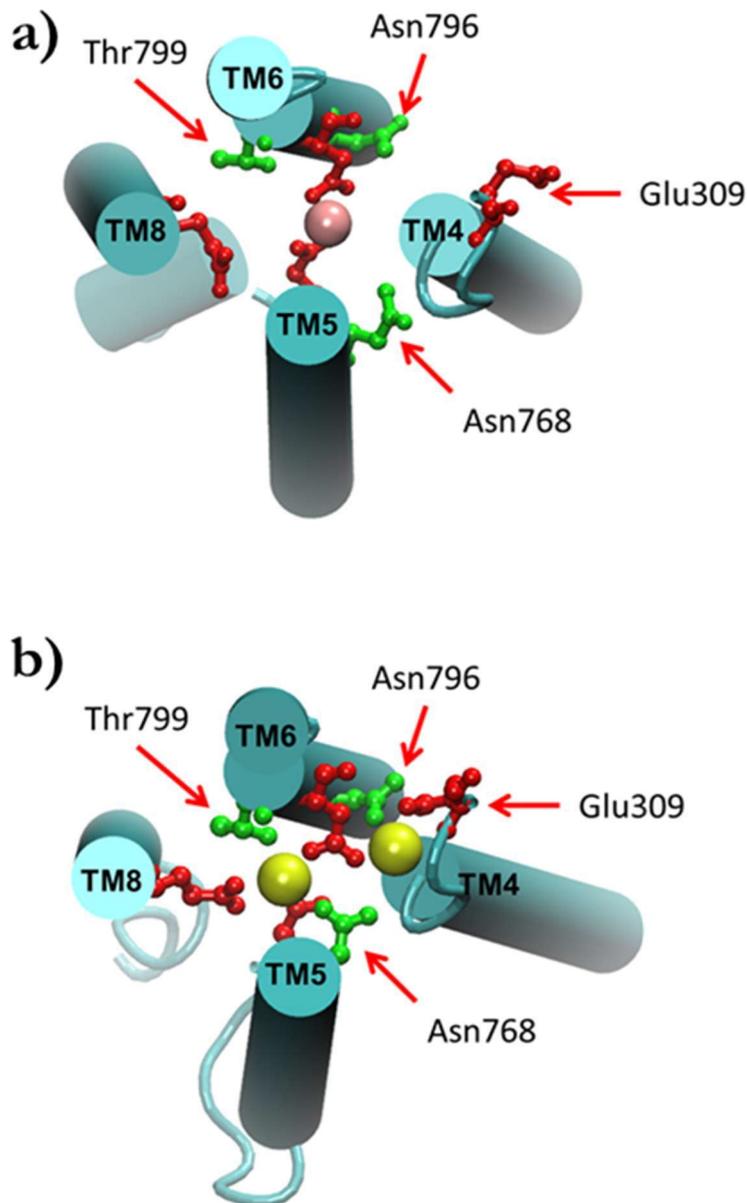


Figure 58 : Sites de fixation du Ca^{2+} et du Mg^{2+} . Comparaison des sites de fixation à l'état SLN.E1.Mg²⁺ et en présence de SLN (a) [code PDB : 3w5a], et à l'état E1-2Ca²⁺ (b) [code PDB : 1vfp]. Les hélices transmembranaires sont représentées par des cylindres colorés en cyan. Les résidus sont représentés par des sphères et bâtons dont la couleur indique la nature des résidus (rouge pour les résidus acides et vert pour les résidus polaires). Les cations sont représentés par des sphères, de couleur rose pour le Mg^{2+} et jaune pour le Ca^{2+} .

Ainsi, bien que nous n'ayons pas observé de différences particulières entre les simulations de dynamiques moléculaires de SERCA1a avec et sans SLN en ce qui concerne les sites de fixation du Ca^{2+} , les données expérimentales montrent que l'interaction avec la SLN perturbe ces sites.

Afin d'observer si l'effet de la SLN sur les fluctuations de la structure de TM6 influe sur cette région de SERCA1a dans nos données issues de l'analyse des modes normaux, les fluctuations des chaînes latérales des acides aminés composant ces sites, ont été étudiées en présence et en absence de SLN.

a) Fluctuations des chaînes latérales des résidus des sites de fixation du Ca²⁺

L'analyse des fluctuations des atomes lourds des chaînes latérales des résidus des sites de fixation du Ca²⁺ calculées à partir des modes pour les systèmes en présence et en absence de SLN (tableau 11) montre des fluctuations plus importantes en présence de SLN, à l'exception des résidus Val304 et Glu309 situés sur l'hélice TM4. Le résidu pour lequel les fluctuations augmentent le plus en présence de la SLN est le résidu Asn796 (67 % d'augmentation).

Side Chains fluctuations for Ca ²⁺ binding site residue (Å)				
Residue	Site	TM	SERCA1a	SERCA1a-SLN
Val304	I	TM4	0.37	0.32
Ala305	I	TM4	0.32	0.35
Ile307	I	TM4	0.36	0.37
Glu309	I	TM4	0.43	0.40
Asn768	II	TM5	0.32	0.37
Glu771	II	TM5	0.31	0.39
Asn796	I	TM6	0.30	0.50
Thr799	II	TM6	0.32	0.40
Asp800	I/II	TM6	0.31	0.33
Glu908	II	TM8	0.33	0.34

Tableau 11 : Fluctuation des chaînes latérales des résidus du site de fixation du Ca²⁺ de SERCA1a en présence et en absence de SLN, après application des modes. Les valeurs représentent la moyenne des fluctuations des atomes lourds des chaînes latérales.

Nous venons de voir que l'interaction avec la SLN augmente les fluctuations des chaînes latérales de résidus impliqués dans la fixation des ions Ca^{2+} et localisés sur TM5, TM6 et TM8. Seuls certains résidus des sites situés sur TM4 voient les fluctuations de leurs chaînes latérales diminuer en présence de la SLN. Parmi les quatre hélices transmembranaires portant des résidus impliqués dans les sites de fixation du Ca^{2+} , seule TM6 est en interaction directe avec la SLN. Cette hélice possède notamment le résidu Asp800 qui est le seul résidu commun aux sites de fixation I et II, et le résidu Asn796 qui est celui dont les fluctuations augmentent le plus en présence de SLN. Ces résultats sont cohérents avec ceux de l'analyse des fluctuations des carbones α des résidus de TM6 (voir fig. 57) car on observe que, parmi les résidus des sites de fixation des Ca^{2+} situés sur TM6, seule la chaîne latérale du résidu Asn796 fluctue significativement plus en présence de SLN. Or, ce résidu est le seul situé sur la partie N-terminale de TM6 dont les fluctuations des carbones α augmentent en présence du peptide. Le résidu Thr799, situé sur une partie de l'hélice dont les fluctuations des carbones α diffèrent moins entre les deux systèmes voit aussi moins de différence dans la fluctuation de sa chaîne latérale entre les deux systèmes. Cette corrélation entre les fluctuations des carbones α et celles de la chaîne latérale est encore plus marquée pour le résidu Asp800. L'implication importante de TM6 dans les sites de fixation du Ca^{2+} et les fluctuations importantes de sa structure en présence de SLN, laisse penser que cette hélice pourrait être impliquée dans les perturbations des sites de fixation observées en présence de SLN. Nous nous sommes donc intéressés à TM6 en détail.

b) Le rôle de l'hélice TM6

Pour comprendre pourquoi l'interaction avec SLN modifie les fluctuations de TM6 et comment cet effet impacte les sites de fixations, nous avons étudié la structure de SERCA1a en présence et en absence de SLN, après la minimisation énergétique réalisée pour le calcul des modes normaux. En effet, nous avons remarqué qu'à l'issue de cette minimisation, la structure de TM6 est différente entre les deux systèmes (fig. 59). Lorsque la SLN est absente, un coude β se forme sur la région $^{800}\text{DG}^{801}$, entraînant une cassure entre les deux régions de TM6 structurées en hélice α . La structure minimisée du complexe SERCA1a-SLN montre une interaction de l'Asn11 de la SLN avec la Thr805 et une liaison hydrogène entre le groupement NH peptidique du résidu Thr805 et le groupement carbonyle de Gly801, résidu situé en position *i*-4 sur l'hélice. En absence de la SLN, c'est le groupement OH de la chaîne latérale de Thr805 qui interagit avec le groupement carbonyle de Gly801 (fig. 59c). Dans la structure minimisée en absence de SLN, la liaison hydrogène CO-NH 801-805 est rompue et remplacée par la liaison entre le groupement OH de Thr805 et le groupement carbonyle de Gly801, accentuant par là-même le coude de l'hélice.

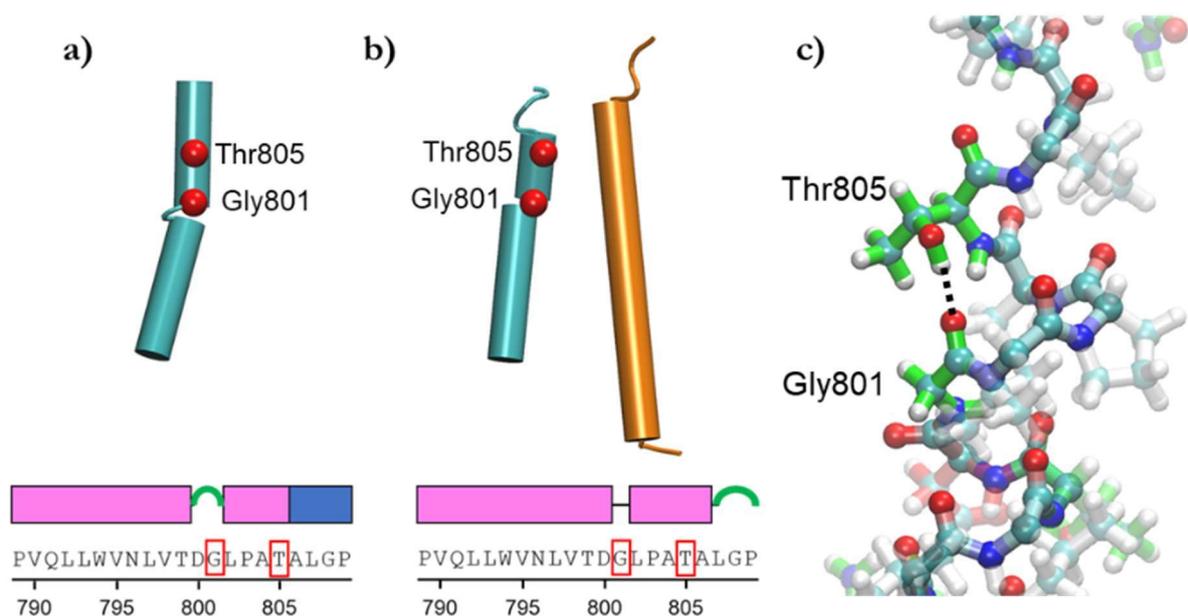


Figure 59 : TM6 en présence et en absence de SLN. Représentation de TM6 (résidus 789 à 812) dans la structure de SERCA1a minimisée en présence de SLN (a) et dans la structure de SERCA1a minimisée en absence de SLN (b). La représentation de la structure secondaire de l'hélice TM6 a été réalisée avec l'algorithme STRIDE (Frishman and Argos, 1995) Le rectangle rose correspond à une structure secondaire en hélice α , le rectangle bleu à une structure secondaire en hélice 3-10 et le coude vert à une structure secondaire en coude β . La figure c) représente l'interaction entre le groupement hydroxyle de la chaîne latérale du résidu Thr805 et l'oxygène peptidique de Gly801, observée uniquement pour SERCA1a minimisée en absence de SLN.

Le redressement de TM6 en présence de SLN éloigne les résidus Asn796, Thr799 et Asp800 des sites de fixation du Ca^{2+} , ce qui explique la configuration des sites dans la structure du complexe SERCA1a-SLN (voir fig. 59). Une analyse des contacts entre hélices montre que la présence de SLN diminue le nombre de contacts entre TM6 et les hélices TM4 et TM5, elles aussi impliquées dans les sites de fixation (tableau 12). Seul, le nombre de contacts entre TM6 et TM8 (la quatrième hélice impliquée dans les sites de fixation du Ca^{2+}) augmentent en présence de SLN.

	SERCA1a				SERCA1a-SLN			
	TM4	TM5	TM6	TM8	TM4	TM5	TM6	TM8
TM4	X	10	9	0	X	14	5	0
TM5	8	X	9	20	10	X	7	20
TM6	15	8	X	10	10	5	X	15
TM8	0	17	12	X	0	18	15	X

Tableau 12 : Contacts entre hélices TM. Nombre d'atomes lourds d'une hélice transmembranaire (colonne) en contact (distance de 4 Å ou moins) avec un atome lourd d'une autre hélice transmembranaire (ligne) pour la structure minimisée de SERCA1a en présence et en absence de SLN. Les cases vertes représentent les cas où le nombre de contact a diminué lorsqu'on compare les deux systèmes. Le rouge indique l'inverse. Seul les cas concernant les contacts entre hélices portant des résidus des sites de fixation du Ca²⁺ sont colorés.

La diminution du nombre de contacts entre hélices peut expliquer l'augmentation des fluctuations des chaînes latérales des résidus des sites de fixation en présence de SLN. Néanmoins, ceci n'explique pas l'augmentation des fluctuations des carbones α de la partie N_{ter} de l'hélice TM6.

Une particularité des structures de SERCA1a à l'état obtenues par Norimatsu et al. (2017) est l'absence de lipide en contact avec TM6. Dans la structure minimisée en absence de SLN, nous observons la même chose. La seule différence entre les deux systèmes en ce qui concerne l'environnement de TM6 est donc la présence ou l'absence de SLN. La présence du peptide et les interactions et contacts qu'il forme avec TM6 devrait restreindre les fluctuations de l'hélice mais le contraire est observé.

Dans la structure minimisée du complexe, SLN est en contact avec 13 lipides et forme des liaisons hydrogène avec les groupements phosphates de lipides adjacents via les résidus Arg6 et Arg27 du peptide. Or, une analyse des fluctuations des atomes de phosphore de ces 13 lipides et leur comparaison avec celles des carbones α de la protéine (fig. 60) montre que les fluctuations de certains de ces 13 lipides (vert kaki) sont plus élevées que celles du domaine TM (cyan), ainsi que de la SLN (violet). Cette fluctuation est particulièrement élevée pour le lipide qui est en contact avec le résidu Thr13 de SLN (Lipid #13, voir figure 60). Etant donné que le résidu Asn11 de la

SLN, proche d'un demi tour d'hélice du résidu Thr13, est en interaction avec le résidu Thr805 (TM6) de SERCA1a, nous proposons que les fluctuations de ces lipides pourraient être transmises à TM6 par l'intermédiaire de SLN. Or, en absence de la SLN, aucun lipide n'est en contact direct avec TM6, ce qui pourrait expliquer la diminution des fluctuations des carbones α de la région N-terminale de TM6. L'analyse des fluctuations de tous les lipides montre que plus les lipides sont loin de la protéine plus les fluctuations sont importantes, comme c'est le cas pour l'eau « libre » (Voir Annexe 5).

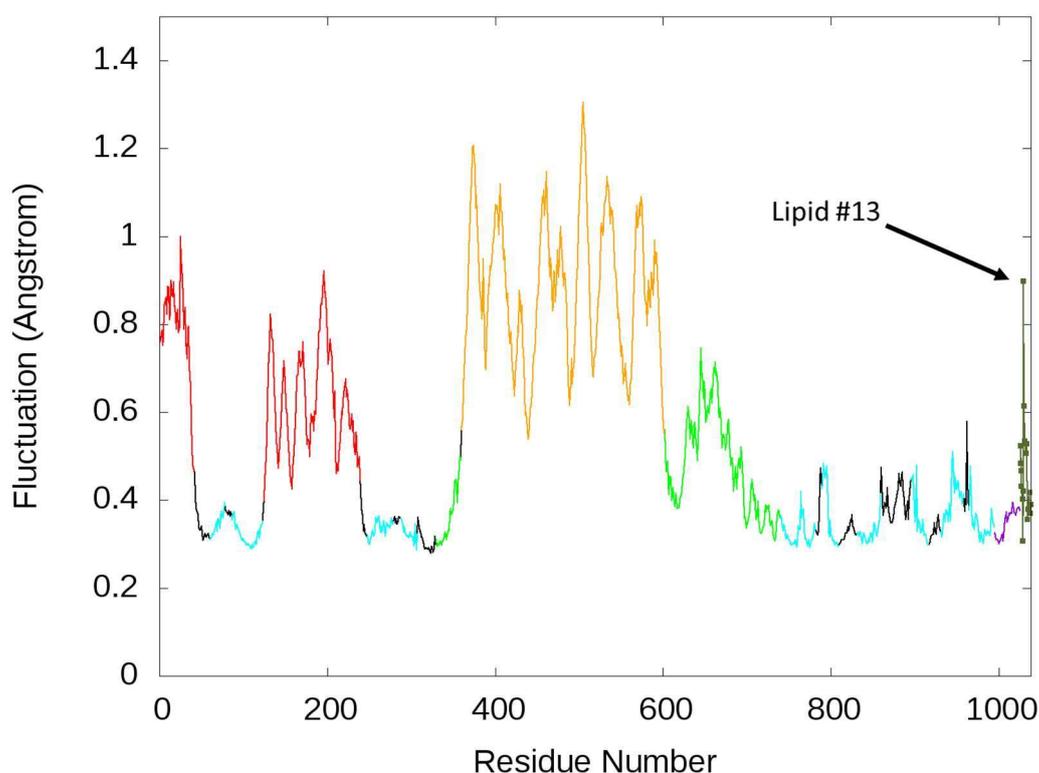


Figure 60 : Les fluctuations du complexe SERCA1a-SLN. Fluctuations des carbones α et des phosphores des lipides pour le système SERCA1a-SLN, calculés à partir des modes. Les domaines cytoplasmiques A, N et P sont représentés en rouge, orange et vert, respectivement. Le domaine TM est représenté en cyan. Les autres régions de SERCA1a sont représentées en noir. La SLN est représentée en violet et commence au résidu 995 et finit au résidu 1025. Les phosphores des lipides sont représentés par des points vert kaki, à partir du résidu 1026.

Pour résumer, nos résultats montrent que l'interaction avec SLN perturbe à la fois la position et la dynamique des résidus des sites de fixation du Ca^{2+} , les rendant plus fluctuant et leur conférant une conformation inapte à fixer les ions Ca^{2+} . L'effet de l'interaction avec SLN sur la conformation des sites du Ca^{2+} a été observé en partie grâce à l'analyse des structures minimisées

de nos deux systèmes. Cette analyse nous a aussi permis d'observer un deuxième effet de l'interaction avec SLN sur un autre site fonctionnel de SERCA1a, le site de phosphorylation.

7. Le site de phosphorylation

Comme pour l'ensemble des protéines de la famille des ATPases de type P, le résidu phosphorylable de SERCA1a est un résidu aspartate située sur le domaine P, dans le motif de phosphorylation DKTG. Dans le cas de SERCA1a ce résidu est l'Asp351, dont l'autophosphorylation permet à la protéine de réaliser la transition de l'état E1 vers l'état E2. Le site de phosphorylation fait face au site de fixation de l'ATP sur le domaine N. Lorsqu' à l'état E1, une molécule d'ATP est fixée sur le domaine N, son phosphate γ est orienté vers le motif DKTG du site de phosphorylation, où il interagit avec la Thr353 avant le transfert du phosphate à l'aspartate.

Lorsque l'on compare la position de l'ATP entre nos deux structures minimisées, avec et sans SLN, on remarque une translation de 2,5 Å de l'ATP rapprochant, en absence de SLN, le phosphate γ accompagné de l'ion Mg^{2+} , de Thr353 du site de phosphorylation. Nous nous sommes demandé quelle était la cause de ce rapprochement. N'ayant rien trouvé dans l'environnement immédiat de l'ATP qui pourrait expliquer cela, nous avons observé la structure en présence de SLN afin de comprendre ce qui pourrait alors empêcher ce rapprochement. Nous avons trouvé dans ce système un ion K^+ en contact direct avec le phosphate γ de l'ATP, qui pourrait empêcher la translation du nucléotide de manière artefactuelle. Cet ion n'étant pas constitutif de la structure et pouvant présenter un éventuel artefact, nous avons reconstruit le système en présence de SLN, avec l'environnement du solvant de SERCA1a sans SLN. Pour cela, nous avons repris la structure de SERCA1a-SLN insérée dans la bicouche de POPC avant minimisation d'énergie et lui avons ajouté la couche d'eau et d'ions prise de la structure de SERCA1a sans SLN. Nous avons par la suite minimisé l'énergie et effectué tous les calculs présentés précédemment dans le parite III de ce chapitre (modes normaux, dynamiques basées sur les modes, projections et fluctuations) et avons

trouvé les mêmes résultats, montrant que les calculs ne sont pas dépendants du positionnement de l'eau et des ions autour de la protéine.

A l'issue de la minimisation de cette nouvelle structure, le rapprochement du phosphate γ de l'ATP de Thr353 n'est pas observé, démontrant que le positionnement différent de l'ATP est bien dû à l'absence de SLN et non à un environnement ionique différent, bien que les sites de l'ATP et de la SLN soient séparés de 35 Å. Le paragraphe suivant a pour but de comprendre les raisons de ce déplacement de l'ATP.

a) Effet de la SLN sur le site de phosphorylation

Comme décrit plus haut, dans le cas du système minimisé en absence de SLN, le phosphate γ de l'ATP est plus proche du domaine P (fig. 61a). L'ion Mg^{2+} accompagnant l'ATP interagit avec l'oxygène du squelette peptidique de Thr353 (Tableau 13). De plus, un oxygène du phosphate γ forme des liaisons hydrogène avec le groupement hydroxyle et le groupement NH de Thr353. En présence de la SLN, l'ATP est trop éloigné de Thr353 pour que ces interactions puissent avoir lieu (fig. 61b).

Distance between Thr353 and ATP γ phosphate (\AA)		
	SERCA1a-SLN	SERCA1a
Thr353 (O) – Mg^{2+}	4.70	2.41
Thr353 ($\text{O}\gamma 1$) – ATP ($\text{O}\gamma$)	3.56	2.94
Thr353 (N) – ATP ($\text{O}\gamma$)	4.62	2.87

Tableau 13 : Interactions entre le résidu Thr353 et le phosphate γ de l'ATP pour les structures minimisées de SERCA1a en présence et en absence de SLN, ainsi que pour la structure de SERCA1a à l'état E1.2Ca^{2+} obtenue par diffraction aux rayons X [code PDB : 1vfp]. Les valeurs représentent les distances entre atomes en Angstrom.

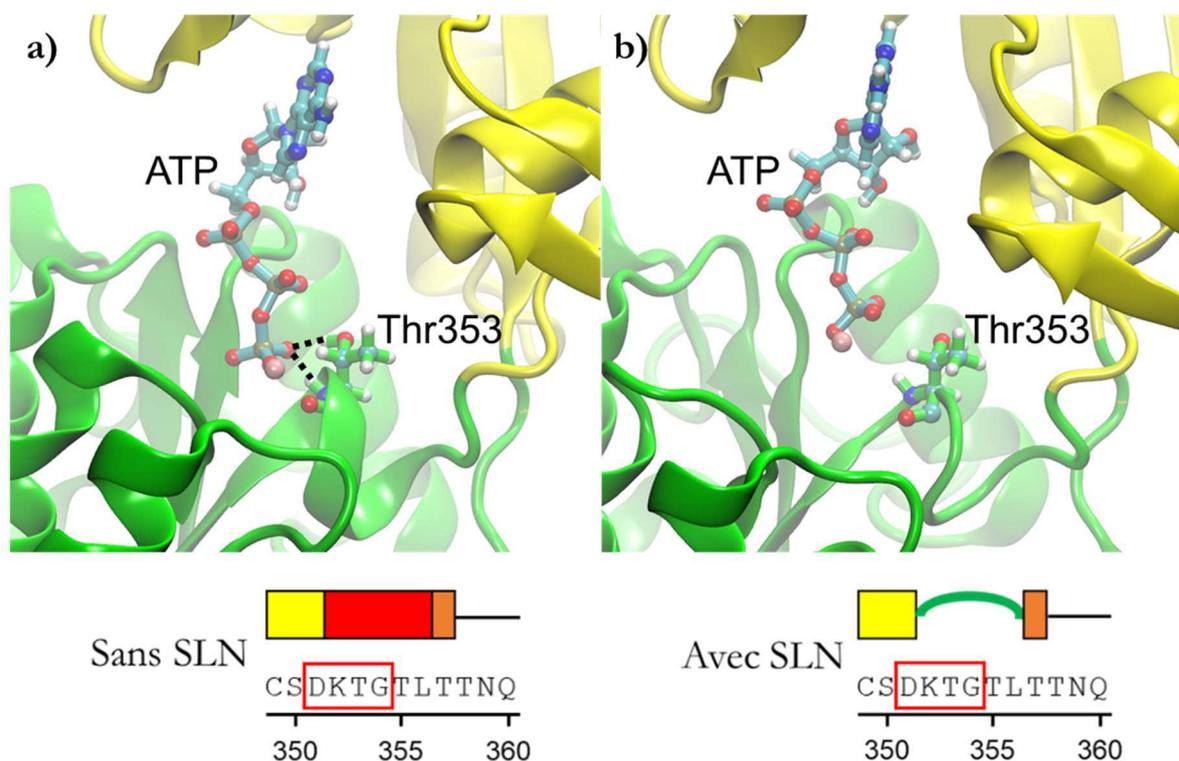


Figure 61 : Interactions entre le phosphate γ et des résidus du domaine P pour la structure de SERCA1a minimisée en absence de SLN (**a**) et pour la structure de SERCA1a minimisée en présence de SLN (**b**). Les domaines P et N sont représentés en ruban, coloré en jaune pour le domaine N et en vert pour le domaine P. La molécule d'ATP et le résidu Thr353 sont représentés par des sphères et bâtons. L'ion Mg^{2+} est représenté par une sphère de couleur rose. Les liaisons hydrogène sont représentées par des traits noirs pointillés. La structure secondaire de la région du domaine P comprenant le motif $^{351}\text{DKTG}^{354}$ (encadré rouge) est représentée en dessous de la figure correspondante. Le rectangle jaune correspond à une structure secondaire en hélice α , le rouge à une structure secondaire en hélice π , le rectangle orange à une structure secondaire en pont isolé et le coude vert à une région non-structurée.

Nous observons que Thr353, du motif DKTG, est porté par une boucle allant du résidu Asp351 au résidu Thr357, qui est non structurée en présence de SLN, mais qui se structure en un tour d'hélice π en son absence (fig. 61). Cette structuration amène le carbonyle de Thr353 à pointer

vers le Mg^{2+} de l'ATP, et résultant en la formation de deux liaisons hydrogène supplémentaires entre des atomes d'oxygène du phosphate γ d'une part et les groupements NH et hydroxyle de Thr353 d'autre part.

Pour comprendre quels résidus sont impliqués dans la stabilisation de cette structure secondaire en absence de SLN, nous avons analysé les interactions formées par les groupements amide et carbonyle du squelette peptidique de cette région (fig. 62a). Les groupements carbonyles des résidus Asp351 et Lys352 forment des liaisons hydrogène avec, respectivement, les groupements NH des résidus Leu356 et Thr357. Ces liaisons hydrogène au sein du squelette entre un résidu i et $i+5$ sont caractéristiques des hélices π . De plus il y a formation d'une liaison entre le NH de Gly354 et le C=O de Thr357. Les seuls résidus dont les groupements carbonyle et amide du squelette ne forment pas de liaison hydrogène avec les autres résidus de la boucle sont au nombre de deux : Thr353, dont le C=O interagit avec le Mg^{2+} et dont le NH forme une liaison hydrogène avec le phosphate γ et Thr355 dont le C=O forme une liaison hydrogène avec le NH du résidu Phe740, situé sur l'extrémité N-terminale de TM5. Contrairement aux autres interactions

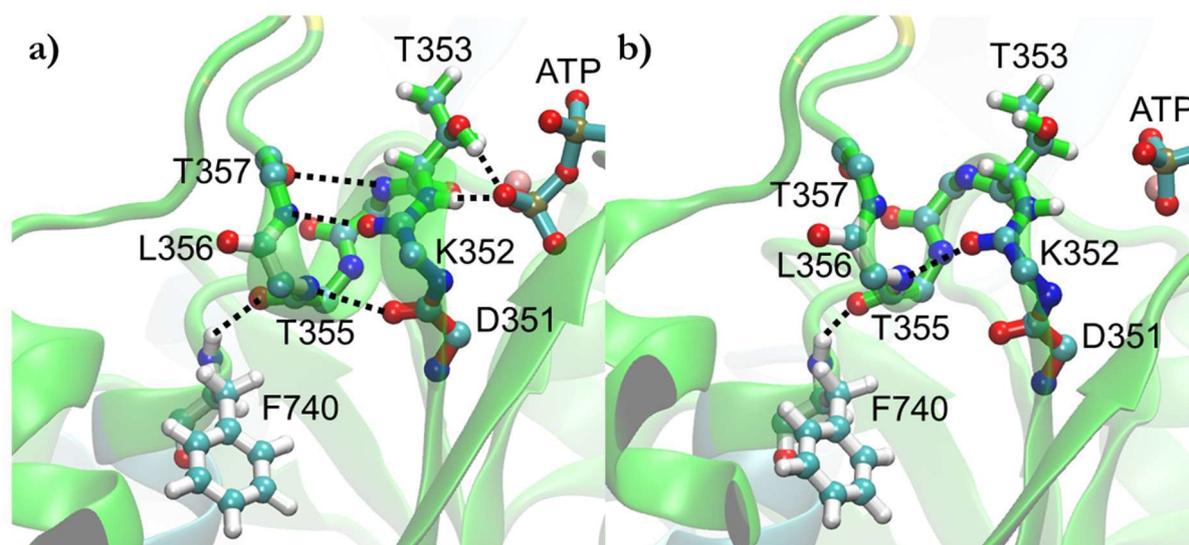


Figure 62 : Structuration différente du site de phosphorylation en présence ou en absence de SLN. Données issues des structures minimisées de SERCA1a à l'état E1. Mg^{2+} seul (a) et en présence de SLN (b). Le domaine P est représenté en vert. En ce qui concerne les résidus cités dans le texte, en boules et bâtons sur la figure, seul les atomes lourds du squelette peptidique ont été représentés, à l'exception des résidus Thr353 et Phe740. L'ATP est lui aussi représenté en boules et bâtons. L'ion Mg^{2+} est représenté par une sphère rose. Les liaisons hydrogènes sont représentées par des traits pointillés.

observées dans le système sans SLN, cette liaison entre Thr355 et Phe740 est aussi retrouvée dans le système en présence de SLN (fig. 62b). Or, nous observons une légère différence de la position de l'extrémité N-terminale de TM5 entre les systèmes avec et sans SLN, pouvant expliquer la différence de structuration de l'hélice π via l'interaction Phe740 – Thr355. En effet, Phe740, localisée à l'extrémité N-terminale de TM5, est positionné différemment en présence de SLN à cause d'une courbure de l'hélice TM5 (courbure absente en absence de SLN). Cette courbure est située au milieu de l'hélice, au niveau du résidu Asn756, dont la liaison hydrogène intra-hélice avec le résidu Phe760 en position $i+4$ est absente en présence de SLN. Or, TM5 a de nombreux contacts avec TM6. Nous remarquons que parmi les résidus de TM6 en contact, la position de la chaîne latérale de Leu807 diffère. En présence de SLN, celle-ci est orientée en direction de TM5 et génère un encombrement stérique qui perturbe les liaisons hydrogène stabilisant la structure en hélice α de TM5 (fig. 63b). Les interactions que forment TM6 et TM5 entre elles, à l'instar de celle de la liaison hydrogène entre Asn810 et Asn756 (fig. 63), empêchent TM5 de se décaler pour réduire l'encombrement stérique avec Leu807. En absence de SLN, la chaîne latérale de Leu807 est orientée différemment, et nous n'observons pas d'encombrement stérique perturbant la stabilité de l'hélice. Le groupement carbonyle du résidu Asn756 forme une liaison avec le NH du résidu situé en $i+4$ et l'hélice n'est pas courbée, contrairement à ce qui observé en présence du peptide. La

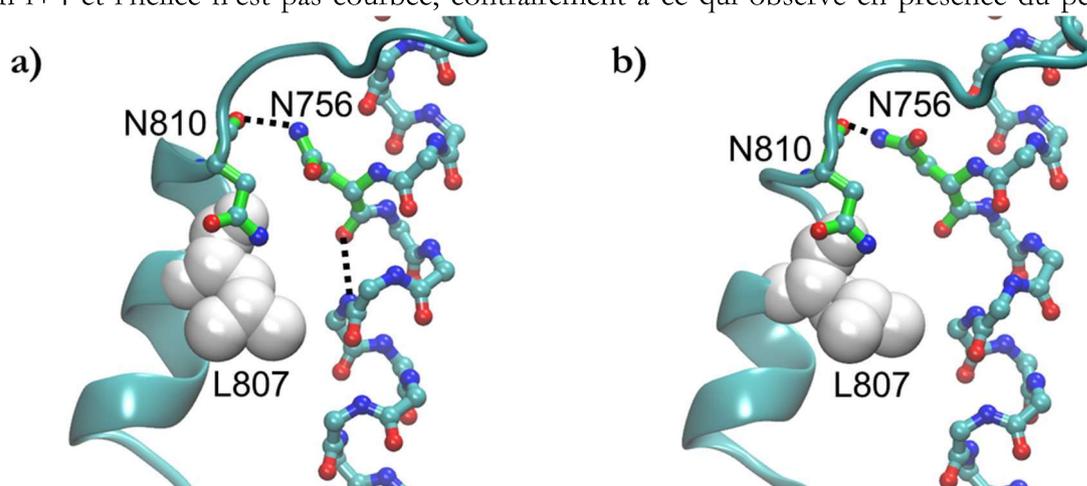


Figure 63 : Interactions entre TM5 et TM6 en présence ou en absence de SLN. Données issues des structures minimisées de SERCA1a à l'état $E1.Mg^{2+}$ seul (a) et en présence de SLN (b). La protéine a été représenté en ruban cyan. Les résidus cités dans le texte sont représentés en boules et bâtons. Les liaisons hydrogènes sont représentées par des traits pointillés.

rupture de la structure en hélice α entraînant la courbure de de TM5 explique pourquoi la position du résidu Phe740, situé à l'extrémité N-terminale de TM5 est modifié entre les deux systèmes. En conclusion, la courbure et le redressement des hélices TM5 et TM6 permet, via de nombreuses interactions, l'effet indirect de la SLN vers le site de phosphorylation (éloigné de plus de 35 Å de la SLN).

Pour confirmer nos résultats, nous les avons confrontés aux structures cristallographiques de SERCA1a disponibles dans la Protein DataBank.

b) Comparaison avec les structures cristallographiques de SERCA1a

Dans le cycle fonctionnel de SERCA1a, l'état E1-2Ca²⁺ est celui précédant la phosphorylation de l'ATPase sur le résidu Asp351 (voir introduction). L'analyse de la structure cristallographique de SERCA1a à l'état E1.2Ca²⁺ (code PDB : 1vfp) montre des interactions entre l'ATP et le site de phosphorylation identiques à celles observées dans le système SERCA1a sans SLN et le motif DKTG est situé sur un tour d'hélice. Néanmoins dans cette structure, la liaison hydrogène entre le carbonyle de Thr355 et l'amine de Phe740 qui liait TM5 au site de fixation est absente.

Dans la structure cristallographique du complexe SERCA1a-SLN, cette structure en tour d'hélice du motif DKTG n'est pas observée et le phosphate γ de l'ATP est trop éloigné de Thr353 pour former une liaison hydrogène forte avec celui-ci (tableau 14). Une structure cristallographique de SERCA1a à l'état E1.Mg²⁺ en absence de SLN (code PDB : 3w5b) a été publiée en même temps que celle du complexe, obtenue à partir de cristaux de SERCA1a recombinant (code PDB 3w5b, (Toyoshima et al., 2013)). Dans cette structure, la position de l'ATP est similaire à celle observée dans la structure minimisée de SERCA1a sans SLN (tableau 14), montrant bien que cette position n'est pas un artefact de minimisation. De même, nous retrouvons la liaison hydrogène entre la chaîne latérale de Thr353 et le phosphate γ de l'ATP. A l'instar des nos résultats, la comparaison des structures cristallographiques de SERCA1a à l'état E1-Mg²⁺ montre que l'absence de SLN

induit une structuration en tour d'hélice du site de phosphorylation et l'interaction entre le phosphate γ du nucléotide et le résidu Thr353. Néanmoins, nous n'observons pas l'interaction entre le carbonyle de Thr353 et le Mg^{2+} associé à l'ATP. Dans les deux structures, l'ion Mg^{2+} est trop éloigné du site de phosphorylation pour interagir avec lui. De plus, l'ion Mg^{2+} est plus éloigné du phosphate γ de l'ATP par rapport à ce que nous avons pu observer dans nos structures minimisées ou dans la structure cristallographique de SERCA1a à l'état E1.2Ca²⁺. Enfin, en ce qui concerne la liaison entre Thr355 et Phe740 permettant de lier TM5 au site, est similaire dans les deux structures cristallographiques à l'état E1-Mg²⁺, en présence comme en absence de SLN.

Distance between atoms (Å)			
	SLN.E1.Mg ²⁺	E1.Mg ²⁺	E1.2Ca ²⁺
Thr353 (O) – Mg ²⁺	4.53	4.83	2.16
Thr353 (O γ) – ATP (O γ)	3.29	2.53	2.57
Thr353 (N) – ATP (O γ)	4.70	4.94	2.99
Thr355 (O) – Phe740 (N)	3.17	3.04	6.29

Tableau 14 : Interactions des résidus du domaine P impliqués dans la perturbation du site de phosphorylation par la SLN. Valeurs issues des structures cristallographiques de SERCA1a à l'état SLN.E1.Mg²⁺ (code PDB : 3w5a), E1.Mg²⁺ (code PDB : 3w5b) et E1.2Ca²⁺ (code PDB : 1vfp).

La rupture de la structure en hélice α n'est pas observée dans la structure cristallographique du complexe et est due à la minimisation d'énergie. Néanmoins, la résolution de 3.0 Å de cette structure cristallographique pourrait expliquer que nous n'observions pas cet effet sur la structure de TM5.

Nos données et l'analyse des structures nous a permis de montrer que la SLN a un effet indirect sur le site de phosphorylation, situé à 35 Å de la SLN, permettant l'interaction entre le phosphate γ de l'ATP et le résidu Thr353. Cette interaction est nécessaire à la phosphorylation de l'ATP, comme le montre l'analyse de la structure cristallographique de SERCA1a à l'état E1.2Ca²⁺,

état préliminaire à la phosphorylation. D'après nos résultats, nous émettons l'hypothèse que cet effet est transmis de la SLN au site via les interactions du peptide avec TM6, ce qui va perturber la structure de TM5 et donc influencer sur le site de phosphorylation via une interaction entre Phe740, situé à l'extrémité de TM5, et un résidu du site (fig. 64). Cette hypothèse nécessite néanmoins d'être confirmée expérimentalement.

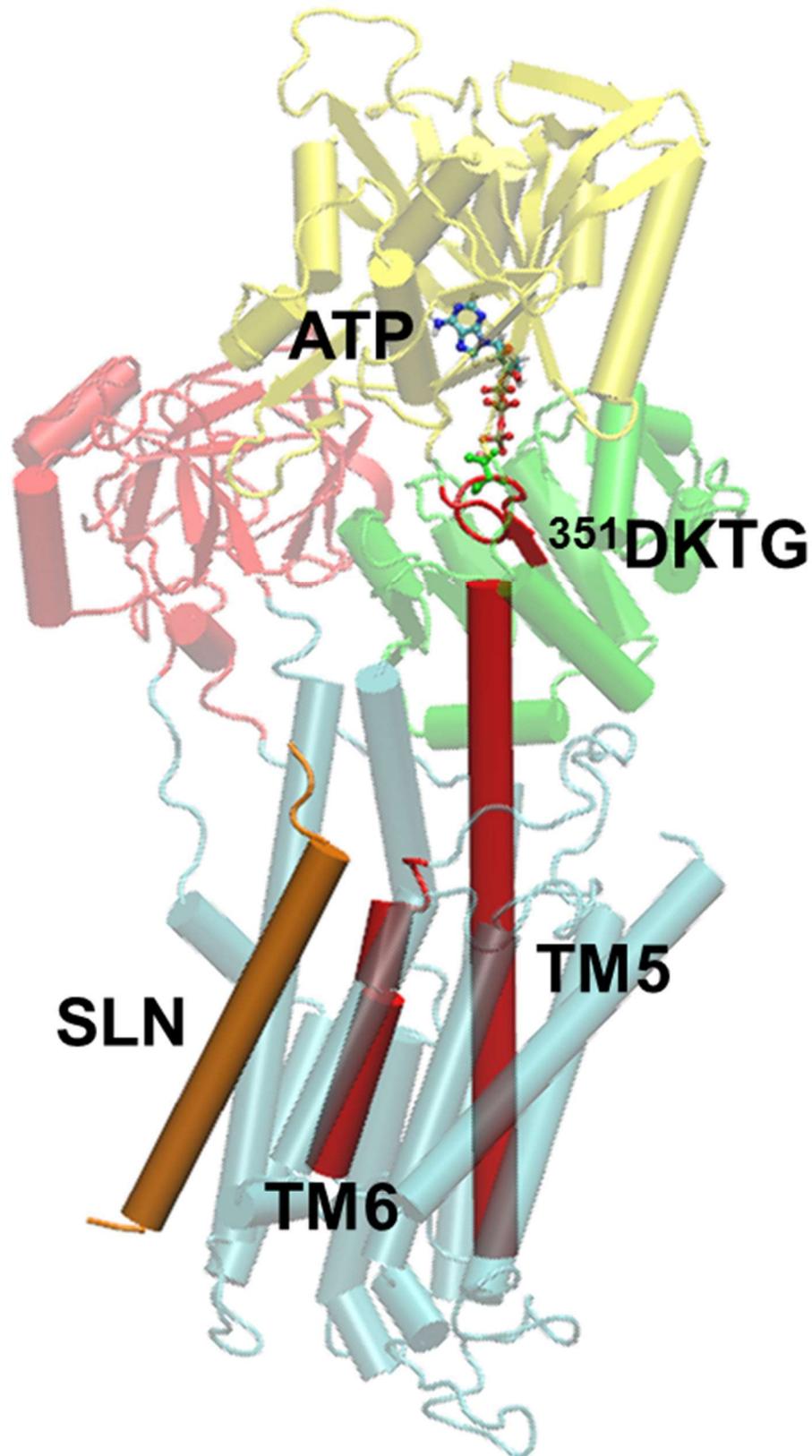


Figure 64 : Transmission des mouvements de SLN jusqu'au site de phosphorylation via TM6 et TM5. SLN est représentée par un cylindre coloré en orange. TM6 et TM5 sont représentés par des cylindres colorés en magenta. Le domaine ³⁵¹DKTG du site de phosphorylation est aussi représenté en magenta. L'ATP et le résidu Thr353 sont représentés par des sphères et bâtons. Les domaines N, P et A sont représentés, respectivement en couleur jaune, vert et rouge.

8. En résumé

L'étude de la capacité de SERCA1a à l'état SLN.E1.Mg²⁺, en présence ou non de la SLN, à réaliser une transition vers les états E1.2Ca²⁺ et E2 montre que la SLN inhibe ces deux transitions. Cet effet négatif de SLN sur le cycle fonctionnel de SERCA1a est en accord avec le rôle d'inhibiteur de l'activité de SERCA1a de la SLN (Asahi et al., 2002, 2003; Buffy et al., 2006a; Douglas et al., 2005; Gorski et al., 2013; Hughes and Middleton, 2003; Hughes et al., 2007; MacLennan et al., 2003; Odermatt et al., 1998b; Tupling et al., 2002).

Les résultats présentés dans cette partie III montrent aussi que la SLN affecte de façon indirecte deux régions de SERCA1a indispensables à sa fonction : les sites de fixation du Ca²⁺ et le site de phosphorylation. Ces effets indirects sont transmis via TM6 dont la SLN modifie à la fois la structure et la dynamique.

Les modifications conformationnelles de TM6 entraînent un positionnement de résidus du site de fixation du Ca²⁺ défavorable à la liaison du Ca²⁺. De plus, les fluctuations des chaînes latérales des résidus impliqués dans la liaison au Ca²⁺ et situés sur TM6 augmentent du fait de l'augmentation des fluctuations de la partie N_{ter} de TM6.

Les interactions entre SLN et TM6 sont donc centrales dans le mécanisme de régulation de SERCA1a par le peptide.

IV. Discussion

Cette étude *in silico* du complexe SERCA1a-SLN inséré dans une bicouche de POPC nous a permis de mettre en évidence des effets de l'interaction de la SLN avec SERCA1a et de comprendre comment l'interaction avec ce peptide transmembranaire inhibe la fonction de SERCA1a.

Environnement membranaire

Du point de vue du cycle fonctionnel de SERCA1a, l'état SLN.E1.Mg²⁺ mime un état précédant l'état E1.2Ca²⁺ et succède à l'état E2 (Toyoshima et al., 2013; Winther et al., 2013). En accord avec les travaux de Toyoshima et al. (Norimatsu et al., 2017), l'analyse des sites d'interaction de SERCA1a avec les lipides et répertoriés dans la littérature, indique que le profil d'interaction protéine-lipides de SERCA1a à l'état SLN.E1.Mg²⁺ est proche de ceux des deux états, i.e. l'état E1.2Ca²⁺ et l'état E2. Cependant, la présence de la SLN empêche le résidu Arg324 d'interagir avec les lipides adjacents. Or ce résidu a été décrit par Toyoshima comme participant aux transitions conformationnelles de SERCA1a via son interaction avec la bicouche. De plus, la pompe ATPasique à l'état SLN.E1.Mg²⁺ reste plus apte à réaliser la transition vers l'état E1.2Ca²⁺ que vers l'état E2, indépendamment de la présence du magnésium présent dans la forme cristalline..

Influence de la Sarcolipine sur le positionnement de TM1

Toyoshima *et al.* ont proposé que le blocage par la SLN de la transition de SERCA1a de l'état SLN.E1.Mg²⁺ vers l'état E1.2Ca²⁺ résulterait de l'interaction de la SLN avec TM2 qui en contraignant la position de TM2 empêcherait le changement conformationnel nécessaire à cette transition (Toyoshima et al., 2013). En effet, à l'état SLN.E1.Mg²⁺, la SLN a de nombreux contacts avec TM2. De plus, il n'est pas possible de positionner la SLN dans la structure E1.2Ca²⁺ (code

1vfp (Toyoshima and Mizutani, 2004)), du fait de l'encombrement stérique entre les chaînes latérales de la SLN et celles de TM2, (fig. 65) (Winther et al., 2013).

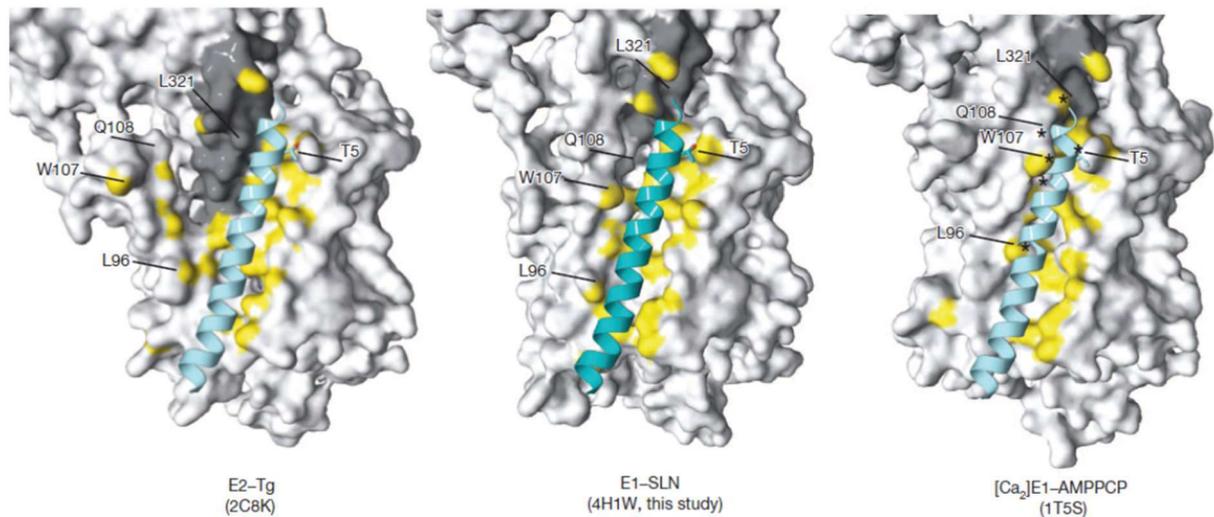


Figure 65 : Interaction entre la SLN et SERCA1a à différents états. SERCA1a est représenté en volume et la SLN est représentée en ruban bleu. Figure extraite de Winther et al. (2013)

L'interaction de la SLN avec TM2 jouerait un rôle indirect, i.e. via TM1, sur la plus grande ouverture de la cavité contenant les sites de fixation du Ca²⁺ vers le cytosol pour SERCA1a à l'état SLN.E1.Mg²⁺ (Toyoshima et al., 2013; Winther et al., 2013). En effet, nos résultats indiquent que lorsque la SLN est présente, TM1 est plus enfouie dans la membrane et sa position est plus stable que lorsque la SLN est absente. Or, la position plus enfouie de TM1 entraîne l'ouverture de la bouche d'accès aux sites de fixation du Ca²⁺. Cette position de TM1 est liée en partie aux nombreux contacts entre des chaînes latérales de TM1 et TM2 et aux corrélations des mouvements de ces hélices.

Etant donné, qu'à l'état E1.2Ca²⁺, les sites de fixation du Ca²⁺ ne sont pas accessibles, la fermeture de l'accès aux sites de fixation du Ca²⁺ aurait donc lieu lors de la transition de l'état SLN.E1.Mg²⁺ vers l'état E1.2Ca²⁺ et nécessiterait le retrait de la SLN.

Influence de la Sarcolipine sur l'hélice TM6 et sur les sites de fixation du calcium

L'interaction de la SLN avec TM6 impacte les trois résidus impliqués dans la coordination du Ca^{2+} (Asn796, Thr799 et Asp800) situés sur cette hélice. En présence de la SLN, TM6 (Pro789-Pro809) adopte une structure en hélice α quasiment continue (fig. 59), tandis qu'en absence de la SLN la région $^{799}\text{TDGL}^{802}$ se structure en coude β . La structuration différente de cette région en présence de la SLN éloigne les trois résidus de TM6 impliqués dans la liaison du Ca^{2+} du site d'interaction. Nos données montrent que cette différence de structuration est notamment due à la chaîne latérale du résidu Thr805 qui forme une interaction avec la chaîne latérale du résidu Asn11 de la SLN lorsque celle-ci est présente et qui forme une interaction avec l'oxygène peptidique de Gly801 en absence de SLN. Des études fonctionnelles de SERCA1a en utilisant une protéine SERCA1a mutée au niveau du résidu Thr805 (T805A) montrent une diminution de l'affinité pour le Ca^{2+} de ce mutant de SERCA1a (Asahi et al., 2000, 2003; Clarke et al., 1989; Rice and MacLennan, 1996). La mutation du résidu Thr805 en alanine (T805A) pourrait augmenter la propension structurale à former une hélice de cette séquence, de plus du fait de l'absence de groupement hydroxyle, le résidu 805 ne forme pas d'interaction avec l'oxygène peptidique du résidu Gly801. La structure de cette séquence semble donc très importante pour la fixation du calcium. Par ailleurs, des analyses structurales de la séquence en acides aminés Glu785-Asn810 comprenant TM6 par RMN en solution et en présence de détergent (Soulié et al., 1999) ont montré la présence d'une région charnière flexible de l'hélice ($^{797}\text{LVTDGL}^{802}$), comprenant les résidus Thr799 et Asp800 et à proximité du résidu Asn796. Cette région charnière décrite par Soulié *et al.*, comprend donc la région déstructurée ($^{799}\text{TDGL}^{802}$) observée dans nos données. Cette région déstructurée est située en amont de Pro803 (motif GXP). Il a été montré que le motif GXP localisé dans une hélice transmembranaire pouvait jouer le rôle de charnière moléculaire capable de faire plier et pivoter cette hélice de façon dynamique (Wilman et al. 2014). Des études fonctionnelles des mutants G801A (G801A (Andersen et al., 1992), G801V (Andersen et al., 1992; Vilsen and Andersen, 1992)) et Pro803 (P803A (Vilsen et al., 1989)) de SERCA1a montre une diminution de l'affinité de

ces mutants pour le Ca^{2+} , démontrant l'importance de la présence de ce motif GXP sur TM6 vis-à-vis des sites de fixation du Ca^{2+} .

La SLN impacte également la dynamique des résidus de TM6 impliqués dans la fixation du Ca^{2+} . En effet, en présence de la SLN, et après application des modes normaux, les fluctuations des carbones α des résidus de la partie N_{ter} de TM6 (Pro789-Thr799) augmentent ainsi que les fluctuations des chaînes latérales des résidus Asn796, Thr799 et Asp800.

De plus, la comparaison des sites de fixation du Ca^{2+} à l'état E1.2 Ca^{2+} et dans la structure du complexe SERCA1a-SLN minimisée montre que la position et l'orientation des chaînes latérales des résidus Glu309, Asn768, Asn796 et Thr799, impliqués dans les sites de fixation du Ca^{2+} , ne permet pas la liaison de deux ions Ca^{2+} dans les sites lorsque la SLN interagit avec SERCA1a. La chaîne latérale du résidu Glu309, impliquée dans la fixation du deuxième Ca^{2+} , est trop éloignée du site pour pouvoir interagir avec un ion dans le site II. Cette perturbation des sites de fixation du Ca^{2+} contribuerait à la diminution de l'affinité de SERCA1a pour le Ca^{2+} lorsque la SLN interagit avec SERCA1a (Asahi et al., 2002; Buffy et al., 2006a; Douglas et al., 2005; Gorski et al., 2013; Hughes and Middleton, 2003; Hughes et al., 2007; MacLennan et al., 2003; Odermatt et al., 1998b).

Récemment, Toyoshima et ses collaborateurs ont obtenu une structure du complexe SERCA1a-SLN avec un ion Ca^{2+} lié au domaine transmembranaire (communication orale, 15th International ATPase conference – Na, K ATPase and related ATPase, Otsu, Japan (2017)). Dans cette structure, l'ion est fixé au site II, mais le site I est vide. Cette structure semble confirmer l'hypothèse de Autry et al. (Autry et al., 2016), proposant que le site I ne puisse pas lier un ion Ca^{2+} en présence de SLN. Ceci est particulièrement étonnant du fait que les ions calcium se fixent en file indienne (Møller et al., 2010) mais pourrait expliquer comment la SLN inhiberait le transport, ce qui pour le moment reste à démontrer in vitro.

Cependant, la concentration en Ca^{2+} varie beaucoup dans le cytosol des cellules musculaires squelettiques au cours du processus de contraction et de relaxation musculaire. En effet, la

concentration cytosolique en Ca^{2+} augmente d'un facteur d'au moins de 10 lorsque le muscle est contracté ($\sim 10^{-6}$ M) par rapport à la phase de relaxation musculaire (inférieure à 10^{-7} M). Il est donc possible que, lorsque le muscle est à l'état contracté, la concentration en Ca^{2+} cytosolique soit assez élevée pour que le Ca^{2+} puisse se fixer malgré une faible affinité de SERCA1a pour cet ion. Ainsi, la SLN permettrait une fixation du Ca^{2+} uniquement à forte concentration, i.e. lors de la contraction musculaire. Néanmoins, la fixation des deux ions Ca^{2+} dans les sites de fixation n'est pas simultanée, le site I fixe d'abord le premier ion Ca^{2+} puis le site II fixe le deuxième Ca^{2+} (Møller et al., 2010). Une étude récente du complexe SERCA1a-SLN par simulation de dynamique moléculaire montre que la fixation du deuxième ion Ca^{2+} dans le site I est incompatible avec l'interaction avec la SLN car cette fixation nécessiterait une réorientation de la chaîne latérale du résidu Glu309 entraînant une diminution du tilt de l'hélice S4 (Autry et al., 2016). Or, l'interaction entre les résidus Glu2 et Glu7 de la SLN et les résidus Arg324 et Lys328 de SERCA1a (S4) empêchent ce redressement de l'hélice S4. Notre analyse des fluctuations des chaînes latérales des résidus impliqués dans les sites de fixation du Ca^{2+} montre que Val304 et Glu309, situé sur TM4, fluctuent moins. Il est possible que cette fluctuation moins importante soit due à l'interaction de la SLN avec l'hélice S4 (i.e. la partie cytoplasmique de l'hélice TM4), ce qui contraindrait les possibilités de mouvement de ces deux résidus. L'analyse de la structure de SERCA1a obtenue à l'état E1.Mg²⁺:ATP en absence de SLN montre que la chaîne latérale de Glu309 est orientée différemment, sa chaîne latérale est pointée vers les sites de fixation du Ca^{2+} et ferme l'accès aux sites via le cytoplasme (code PDB : 3w5b (Toyoshima et al., 2013)). Ce n'est pas le cas dans la structure du complexe SERCA1a-SLN (3w5a (Toyoshima et al., 2013)). Ainsi, même à forte concentration en Ca^{2+} , il n'est pas possible que deux ions Ca^{2+} soient liés par ces sites de fixation en présence de SLN.

Ainsi, la SLN, par son interaction avec TM2 et TM6, augmenterait l'accessibilité aux sites de fixation du Ca^{2+} tout en diminuant l'affinité de SERCA1a pour le Ca^{2+} permettant à SERCA1a de ne fixer le Ca^{2+} qu'à haute concentration en Ca^{2+} cytosolique. Néanmoins, l'interaction de SLN avec TM2 bloque aussi la transition de SERCA1a de l'état SLN.E1.Mg²⁺ vers l'état E1.2Ca²⁺, il est

donc nécessaire que l'interaction entre SERCA1a et SLN soit rompue pour que la transition se fasse. Notre hypothèse est que, lorsque la concentration en Ca^{2+} cytosolique est assez importante pour qu'un Ca^{2+} soit fixé par le site II, le mouvement de l'hélice S4 nécessaire à cette fixation entraîne la rupture de l'interaction entre SERCA1a et SLN et permette donc à SERCA1a de réaliser la transition vers l'état E1.2Ca^{2+} et s'autophosphoryler. Par ce mécanisme, il y aurait un retard dans le démarrage de l'ATPase induit par la présence de SLN lors de la contraction musculaire, l'ATPase ayant une affinité de l'ordre du μM pour le calcium.

Effet indirect de la Sarcolipine sur le site de phosphorylation

L'inhibition de la phosphorylation de SERCA1a par la SLN montre que la fonction de ce peptide n'est pas uniquement de diminuer l'affinité de SERCA1a pour le Ca^{2+} mais aussi d'agir comme un verrou empêchant la phosphorylation de SERCA1a en absence de Ca^{2+} . En effet, la pompe ATPasique n'ayant pas encore fixé de Ca^{2+} , l'hydrolyse d'un ATP pour phosphoryler SERCA1a est inutile. Si la SLN permet de diminuer l'affinité de SERCA1a pour le Ca^{2+} et qu'ainsi, la pompe ATPasique fixe le Ca^{2+} uniquement en condition de contraction musculaire c'est-à-dire à haute concentration de calcium (plusieurs dizaines de μM), le fait que la SLN inhibe en même temps la phosphorylation de SERCA1a permettrait à la cellule du muscle squelettique d'optimiser la consommation d'ATP nécessaire à la diminution de la concentration cytosolique en Ca^{2+} , et donc au déclenchement de la relaxation musculaire. En effet, la fixation des deux ions Ca^{2+} dissocie le complexe, le peptide ne pouvant interagir avec SERCA1a à l'état E1-2Ca^{2+} (voir fig. 65). La présence de SLN garantit donc que l'ATPase soit phosphorylée tant que le Ca^{2+} n'a pas été fixé. L'interaction avec la SLN permettrait donc de réguler subtilement l'activité de SERCA1a.

L'analyse de nos données issues du calcul des modes normaux de SERCA1a en présence et en absence de SLN montre qu'en absence de SLN, le groupement phosphate γ de l'ATP se rapproche du site de phosphorylation et les oxygènes du groupement phosphate interagissent avec le groupement hydroxyle de la chaîne latérale du résidu Thr 353. De plus, le Mg^{2+} , qui interagit avec

un oxygène du phosphate γ de l'ATP dans les deux systèmes, interagit aussi avec l'oxygène du squelette peptidique du résidu Thr353 en absence de la SLN. Cette position du phosphate γ de l'ATP dans le site de phosphorylation de SERCA1a ainsi que les interactions que ce groupement réalise avec le résidu Thr353 sont aussi observés dans la structure de SERCA1a à l'état E1.2Ca²⁺, i.e. l'état précédant la phosphorylation de SERCA1a (code PDB : 1vfp (Toyoshima and Mizutani, 2004)). Ces interactions sont aussi observées dans la structure de SERCA1a à l'état E1.Mg²⁺ obtenue en absence de SLN (code PDB : 3w5b (Toyoshima et al., 2013)).

Sarcolipine, découplage et thermogénèse

Des études montrent que l'interaction avec SLN diminue l'affinité de SERCA1a pour le Ca²⁺ mais ne modifie pas son activité d'hydrolyse de l'ATP (Mall et al., 2006; Meis, 2000; Smith et al., 2002). Les auteurs de ces études déduisent que l'interaction avec SLN induit un découplage de l'activité de transport de Ca²⁺ avec celle de l'hydrolyse de l'ATP. De plus, il a été suggéré, en se basant notamment sur ces résultats, que la SLN serait impliquée dans la thermogénèse non frissonnante (voir Introduction) en induisant une hydrolyse futile de l'ATP via ce découplage (Bal et al., 2012, 2016; Pant et al., 2015; Rowland et al., 2015). Nos résultats montrant que la SLN inhibe aussi la phosphorylation de SERCA1a, ne sont pas en accord avec ces travaux.

L'effet d'inhibition de la phosphorylation par la SLN est en accord avec les travaux de Hughes et ses collaborateurs (Hughes and Middleton, 2003; Hughes et al., 2007). En effet, ces travaux montrent que la V_{max} de SERCA1a diminue lorsque l'ATPase interagit avec SLN. De plus, une diminution de 80 % du nombre de μ moles d'ATP hydrolysé par minute et par mg en présence de SLN, démontre que l'interaction avec SLN inhibe l'activité d'hydrolyse de l'ATP de SERCA1a. Les effets de la SLN sur les sites de fixation du Ca²⁺ et sur le site de phosphorylation ne sont pas observés dans les trajectoires de dynamique moléculaire. L'interaction entre la chaîne latérale du résidu Asn11 de la SLN et la chaîne latérale du résidu Thr805 de SERCA1a mise en évidence dans les structures minimisées bien qu'observé dans 21 % de la trajectoire pour

SERCA1a-SLN et dans 39 % de la trajectoire pour SERCA1a-SLN bis n'est pas stable au cours des simulations. L'absence d'une interaction stable entre l'Asn11 et la Thr805 dans nos simulations pourrait être responsable des différences de résultats observées avec l'analyse des modes normaux. Une étude fonctionnelle du complexe SERCA1a-SLN montre une diminution de l'affinité de SERCA1a pour le Ca^{2+} (Asahi et al., 2003). Cependant, lorsque les auteurs utilisent une protéine SERCA1a mutée au niveau du résidu Thr805 (T805A), cette diminution n'est plus observée. L'interaction Asn11-Thr805 se fait via le groupement hydroxyle de la chaîne latérale de Thr805. La perte de ce groupement entraîne donc la rupture de cette interaction. Ces résultats démontrent l'importance de l'interaction Asn11-Thr805 pour la fonction de régulation de la SLN (Asahi et al., 2003).

V. Conclusion

L'analyse de nos données obtenues *in silico* et leurs comparaisons avec les données de la littérature a mis en évidence plusieurs effets de l'interaction de la SLN avec SERCA1a, ainsi que les caractéristiques de SERCA1a dans le complexe SLN.E1.Mg²⁺ :

- SERCA1a dans le complexe SLN.E1.Mg²⁺ est plus enclin à réaliser la transition vers l'état E1.2Ca²⁺ que vers l'état E2 et la SLN inhibe ces deux transitions.
- Le profil d'interaction de SERCA1a à l'état SLN.E1.Mg²⁺ avec la bicouche est proche de ceux observés à l'état E1.2Ca²⁺ et à l'état E2. Néanmoins, la présence de la SLN inhibe l'interaction entre Arg324 et la bicouche, interaction connue pour accompagner SERCA1a lors de certaines transitions conformationnelles (Norimatsu et al., 2017).
- La SLN influe sur la position de TM1 permettant ainsi l'ouverture de la cavité contenant les sites de fixation du Ca^{2+} et augmentant l'accessibilité aux sites de fixation du Ca^{2+} côté cytosolique.

- L'interaction avec la SLN perturbe les sites de fixation du Ca^{2+} via des interactions avec la partie luminale de l'hélice TM6. Cette hélice présente une région ⁷⁹⁹TGDL, structurée en coude β en absence de SLN, tandis que cette hélice est quasiment continue en présence de SLN.
- L'interaction de la SLN avec TM6 se répercute sur la longue hélice TM5, venant perturber à distance et probablement inhiber la phosphorylation du résidu Asp351.
- L'analyse de nos données ne montre pas de découplage de l'activité de transport du Ca^{2+} avec celle de l'hydrolyse de l'ATP.

Perspectives

L'étude *in silico* du complexe SERCA1a-SLN a montré l'importance de l'interaction entre le résidu Asn11 de la SLN et le résidu Thr805 de SERCA1a dans l'inhibition de SERCA1a par la SLN. Une étude fonctionnelle du complexe SERCA1a-SLN en utilisant une protéine SERCA1a dont le résidu Thr805 a été muté en alanine montre que la perte de l'interaction avec le résidu Asn11 de la SLN, induite par la mutation, permet à SERCA1a de retrouver une affinité normale (Asahi et al., 2003). Les auteurs de cet article montrent aussi que la mutation du résidu Asn11 de la SLN en alanine inhibe la formation du complexe SERCA1a-SLN. Néanmoins, aucune étude fonctionnelle du complexe n'a été réalisée avec une SLN mutée pour le résidu Asn11. De plus, concernant le complexe SERCA1a-SLN avec SERCA1a muté pour le résidu Thr805 (T805A), seule l'affinité de SERCA1a pour le Ca^{2+} a été étudiée. Une étude du complexe SERCA1a-SLN concernant son affinité pour le nucléotide, l'activité d'hydrolyse de l'ATP ou encore sa capacité à se phosphoryler, avec SERCA1a muté au niveau du résidu Thr805 ou avec SLN mutée au niveau du résidu Asn11, permettrait de confirmer l'importance de cette interaction.

Notre étude a été réalisée à partir de la structure du complexe SERCA1a-SLN publiée par Toyoshima et al. (code PDB : 3w5a (Toyoshima et al., 2013)). Une autre structure du complexe a été publiée simultanément par Winther et al. (code PDB : 4h1w (Winther et al., 2013)). Cette structure diffère de celle de Toyoshima et al., notamment en ce qui concerne les sites de fixation du Ca^{2+} . Dans la structure de Winther et al., deux ions Mg^{2+} sont observés au sein du domaine TM, formant des interactions différentes de celles observées pour les ions Ca^{2+} à l'état E1-2 Ca^{2+} . De plus, chacun de ces ions Mg^{2+} interagit uniquement avec les résidus d'une même hélice, l'hélice TM4 via les résidus Val304, Ala305, Ala306 et Glu309 pour l'un et l'hélice TM6 via les résidus Asn796 et Asp800 pour l'autre. Nous n'observons donc pas l'interaction entre les résidus Glu771 (TM5) et Asp800 (TM6) médiée par un ion Mg^{2+} formant des interactions bidendates avec les deux résidus, comme c'est le cas dans la structure publiée par Toyoshima et al.. Il serait donc intéressant

de réaliser le même type d'étude sur la structure publiée par Winther et al. pour vérifier si les effets induits par l'interaction de la SLN avec SERCA1a nécessitent des interactions spécifiques du ou des ions Mg^{2+} avec certains résidus des sites de fixation du Ca^{2+} ou s'ils sont retrouvés quel que soit le type d'interaction formé par le ou les ions Mg^{2+} .

Par ailleurs, les seules structures du complexe SERCA1a-SLN disponibles ont été obtenues avec SERCA1a à l'état SLN.E1. Mg^{2+} . Nous avons essayé de positionner SLN dans la cavité formée par les hélices TM2, TM6 et TM9 pour SERCA1a à l'état E1.2 Ca^{2+} et avons observé que la position de TM2 dans cet état rend impossible l'interaction entre SERCA1a et SLN via cette cavité suggérant qu'une fois les deux ions Ca^{2+} , la SLN ne peut plus interagir avec l'ATPase. De plus, nous n'avons aucune information sur une éventuelle interaction entre la SLN et SERCA1a dans d'autres états de son cycle fonctionnel. Des études d'interaction entre SERCA1a recombinante et SLN de synthèse, en couplant par exemple des expériences de chromatographie d'exclusion stérique avec des expériences de spectrométrie de masse pourraient être envisagées sur le modèle de ce qui a déjà été réalisé sur des membranes de réticulum native par le laboratoire (Montigny et al., 2014). En effet, le laboratoire possède les outils pour obtenir des quantités d'ATPase recombinante suffisante pour les études fonctionnelles (2014).

Mes travaux portant sur la régulation de la fonction de SERCA1a par la SLN ont montré que la SLN influe de façon fine et complexe, directe et indirecte, sur la structure et la dynamique de SERCA1a. Nous envisagerons par la suite d'ajouter l'ancre palmitoylé à la SLN dans les études *in silico* et d'évaluer ses effets sur la fonction de SERCA1a. Des études expérimentales sur la SLN acylée synthétique en interaction avec SERCA1a, en cours au laboratoire et en synergie avec les expériences *in silico*, devraient permettre de mieux comprendre les différents mécanismes de régulation.

Enfin, d'autres régulateurs de SERCA1a ayant été récemment découverts (voir Introduction), la stratégie mise en œuvre lors de cette étude *in silico* de l'interaction SERCA1a-SLN,

en l'appliquant à l'étude de l'interaction de ces peptides avec SERCA1a, devrait permettre de comprendre le mécanisme de régulation possible de SERCA1a de ces autres peptides régulateurs, notamment en comparant les interactions avec le domaine membranaire de SERCA1a et, plus précisément, les hélices TM2 et TM6.

Annexes

Annexe 1 : Paramètres de la cystéine palmitoylée

Paramètres de la Cystéine palmitoylée tels qu'ils sont définis dans les fichiers composant le champ de force Amber99SB modifié utilisé pour nos simulations. Les charges sont écrites dans le fichier « aminoacids.rtp » et les paramètres de liaison, d'angles et de dièdre sont écrits dans le fichier « ffbonded.itp ».

- **Charges :**

La dérivation des charges RESP (Restrained ElectroStatic Potential) compatibles avec le champ de force Amber99SB a été réalisée en utilisant le serveur Web RED version 3.0 (Dupradeau et al., 2010; Vanquelef et al., 2011).

Colonne 1 : Nom de l'atome ; **Colonne 2 :** Type d'atome ; **Colonne 3 :** Charge ; **Colonne 4 :** Numéro de l'atome

```
[ CYP ]
[ atoms ]
  N      N      -0.41570    1
  H      H       0.27190    2
  CA     CT       0.07550    3
  HA     H1       0.07600    4
  CB     CT      -0.21120    5
  HB1    H1       0.14670    6
  HB2    H1       0.14670    7
  SG     S       -0.23010    8
  CD     C       0.41340    9
  OE2    O      -0.46800   10
  CE1    CT       0.09920   11
  HE11   HC       0.0232    12
  HE12   HC       0.0232    13
  CZ     CT      -0.0120    14
  HZ1    HC       0.0183    15
  HZ2    HC       0.0183    16
  CH     CT      -0.0101    17
  HH1    HC      -0.0077    18
  HH2    HC      -0.0077    19
  CQ     CT       0.0149    20
  HQ1    HC      -0.0024    21
  HQ2    HC      -0.0024    22
  CI     CT       0.0201    23
  HI1    HC      -0.0044    24
  HI2    HC      -0.0044    25
  CK     CT       0.0082    26
  HK1    HC      -0.0056    27
  HK2    HC      -0.0056    28
  CL     CT       0.02     29
  HL1    HC      -0.0099    30
  HL2    HC      -0.0099    31
  CM     CT       0.0152    32
```

HM1	HC	-0.0080	33
HM2	HC	-0.0080	34
CN	CT	0.0183	35
HN1	HC	-0.0080	36
HN2	HC	-0.0080	37
CX	CT	0.0170	38
HX1	HC	-0.0076	39
HX2	HC	-0.0076	40
CO	CT	0.0224	41
HO1	HC	-0.0106	42
HO2	HC	-0.0106	43
CP	CT	0.0034	44
HP1	HC	-0.0067	45
HP2	HC	-0.0067	46
CR	CT	0.0117	47
HR1	HC	-0.0007	48
HR2	HC	-0.0007	49
CS	CT	0.0336	50
HS1	HC	-0.0027	51
HS2	HC	-0.0027	52
CT	CT	-0.0762	53
HT1	HC	0.0151	54
HT2	HC	0.0151	55
HT3	HC	0.0151	56
C	C	0.59730	57
O	O	-0.56790	58

- **Liaison (Oda et al., 2013):**

Colonne 1 : atome i ; **Colonne 2 :** atome j ; **Colonne 3 :** fonction; **Colonne 4 :** b_0 (nm); **Colonne 5 :** k_b (kJ/mol.nm²)

```
[ bondtypes ]
C S      1      0.1769      174840.9
```

- **Angles (Oda et al., 2013):**

Colonne 1 : atome i ; **Colonne 2 :** atome j ; **Colonne 3 :** atome k ; **Colonne 4 :** fonction; **Colonne 5 :** θ_0 (°); **Colonne 6 :** c_{th} (kJ/mol.rad²)

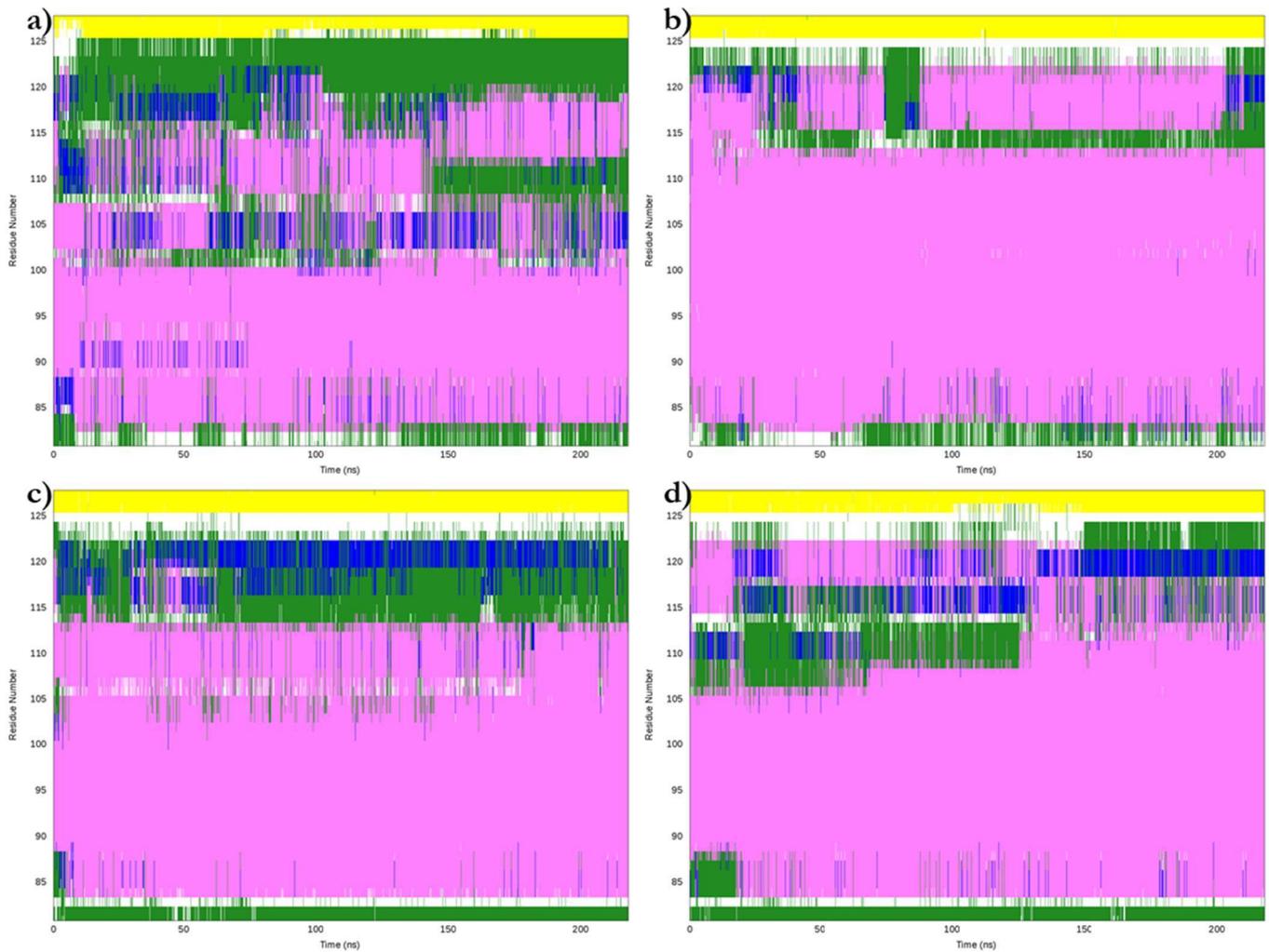
```
[ angletypes ]
C S CT      1      81.535      259.490
CT C S      1     104.807      373.630
O C S      1      99.676      272.230
```

- **Dièdre (Oda et al., 2013):**

Colonne 1 : atome i ; **Colonne 2 :** atome j ; **Colonne 3 :** atome k ; **Colonne 4 :** atome l ; **Colonne 5 :** fonction; **Colonne 6 :** phase; **Colonne 7 :** k_d (kJ/mol); **Colonne 8 :** p_n

```
[ dihedraltypes ]
X      C      S      X      9      180.00      18.711278      2
```

Annexe 2 : Evolution de la structure secondaire de TM2



Evolution de la structure secondaire de TM2. Données issues des simulations de dynamique moléculaire SERCA1a (a), SERCA1a bis (b), SERCA1a-SLN (c) et SERCA1a-SLN bis (d). Le rose correspond à une structure secondaire en hélice α , le bleu à une structure secondaire en hélice 3-10, le jaune à une structure secondaire en configuration étendue, le vert à un coude β et le blanc à une absence de structure secondaire. Structure secondaire déterminée en utilisant l'algorithme STRIDE (Frishman and Argos, 1995).

Annexe 3 : Interactions avec les lipides adjacents pour les résidus interagissant avec la membrane à l'état E1-2Ca²⁺

Simulation SERCA1a. Les résidus en gras sont les résidus formant une interaction directe avec les lipides dans la structure obtenue par diffraction aux rayons de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺ (Norimatsu et al., 2017). Les résidus en rouges sont les résidus ne formant pas d'interactions avec un lipide dans nos simulations.

Interactions with lipids for residues known to interact with lipids in the E1-2Ca ²⁺ state			
Res number	Res type	Number of interactions	Longest interaction time (ns)
57	Phe	3	174
60	Leu	22	46,35
63	Arg	29	65,2
73	Phe	17	33,85
77	Trp	35	147,5
78	Phe	36	172,65
92	Phe	14	34,1
99	Ile	3	5,3
103	Ile	8	61,35
110	Arg	19	139,55
259	Gln	13	198,05
262	Lys	47	79,85
274	Ile	16	83,6
276	Ile	17	73,6
288	Trp	19	172,6
289	Ile	17	146,5
780	Ala	16	52,6
781	Leu	19	54,85
831	Gly	27	104,75
858	Tyr	11	111,35

Simulation SERCA1a (suite du tableau). Les résidus en gras sont les résidus formant une interaction directe avec les lipides dans la structure obtenue par diffraction aux rayons de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺ (Norimatsu et al., 2017). Les résidus en rouges sont les résidus ne formant pas d'interactions avec un lipide dans nos simulations.

Interactions with lipids for residues known to interact with lipids in the E1-2Ca ²⁺ state			
Res number	Res type	Number of interactions	Longest interaction time (ns)
867	Tyr	1	3,9
924	Arg	37	42,8
928	Trp	28	108,4
931	Ile	26	125,95
932	Trp	5	217,5
950	Val	18	99,4
952	Pro	21	106,4
964	Leu	20	176,95
968	Leu	33	39,75
972	Lys	36	91,65
989	Arg	7	179,8
990	Asn	32	102,15
991	Tyr	42	52,5

Simulation SERCA1a bis. Les résidus en gras sont les résidus formant une interaction directe avec les lipides dans la structure obtenue par diffraction aux rayons de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺ (Norimatsu et al., 2017). Les résidus en rouges sont les résidus ne formant pas d'interactions avec un lipide dans nos simulations.

Interactions with lipids for residues known to interact with lipids in the E1-2Ca²⁺ state			
Res number	Res type	Number of interactions	Longest interaction time (ns)
57	Phe	11	45,55
60	Leu	22	52,1
63	Arg	16	122,25
73	Phe	16	18,55
77	Trp	31	114,45
78	Phe	31	121,5
92	Phe	11	82,45
99	Ile	2	3,45
103	Ile	7	116,85
110	Arg	11	5,75
259	Gln	29	82,05
262	Lys	54	48,5
274	Ile	11	114,1
276	Ile	12	217,05
288	Trp	41	84,1
289	Ile	9	156,05
780	Ala	28	26,4
781	Leu	22	108,55
831	Gly	20	101,55
858	Tyr	7	40,3

Simulation SERCA1a bis (suite du tableau). Les résidus en gras sont les résidus formant une interaction directe avec les lipides dans la structure obtenue par diffraction aux rayons de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺ (Norimatsu et al., 2017). Les résidus en rouges sont les résidus ne formant pas d'interactions avec un lipide dans nos simulations.

Interactions with lipids for residues known to interact with lipids in the E1-2Ca²⁺ state			
Res number	Res type	Number of interactions	Longest interaction time (ns)
867	Tyr	8	32.2
924	Arg	49	109
928	Trp	28	62.2
931	Ile	23	97.45
932	Trp	10	217.05
950	Val	21	51.2
952	Pro	29	48.45
964	Leu	26	119.5
968	Leu	17	116.75
972	Lys	24	197.2
989	Arg	13	70.45
990	Asn	35	80.4
991	Tyr	52	104.75

Simulation SERCA1a-SLN. Les résidus en gras sont les résidus formant une interaction directe avec les lipides dans la structure obtenue par diffraction aux rayons de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺ (Norimatsu et al., 2017). Les résidus en rouges sont les résidus ne formant pas d'interactions avec un lipide dans nos simulations.

Interactions with lipids for residues known to interact with lipids in the E1-2Ca²⁺ state			
Res number	Res type	Number of interactions	Longest interaction time (ns)
57	Phe	9	67
60	Leu	22	24.95
63	Arg	31	146
73	Phe	14	39.4
77	Trp	21	171.35
78	Phe	25	65.9
92	Phe	2	5
99	Ile	0	0
103	Ile	7	20.35
110	Arg	0	0
259	Gln	28	105.75
262	Lys	20	217.05
274	Ile	2	216.65
276	Ile	16	158.5
288	Trp	33	68.6
289	Ile	18	47.55
780	Ala	20	123.2
781	Leu	17	85.7
831	Gly	27	53.55
858	Tyr	15	104.55

Simulation SERCA1a-SLN (suite du tableau). Les résidus en gras sont les résidus formant une interaction directe avec les lipides dans la structure obtenue par diffraction aux rayons de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺ (Norimatsu et al., 2017). Les résidus en rouges sont les résidus ne formant pas d'interactions avec un lipide dans nos simulations.

Interactions with lipids for residues known to interact with lipids in the E1-2Ca²⁺ state			
Res number	Res type	Number of interactions	Longest interaction time (ns)
867	Tyr	33	51.5
924	Arg	37	131.85
928	Trp	33	45.15
931	Ile	13	190.6
932	Trp	4	215.2
950	Val	8	60.05
952	Pro	5	4.1
964	Leu	15	216.95
968	Leu	23	33.3
972	Lys	16	133
989	Arg	3	200.75
990	Asn	22	216.65
991	Tyr	32	73

Simulation SERCA1a-SLN bis. Les résidus en gras sont les résidus formant une interaction directe avec les lipides dans la structure obtenue par diffraction aux rayons de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺ (Norimatsu et al., 2017). Les résidus en rouges sont les résidus ne formant pas d'interactions avec un lipide dans nos simulations.

Interactions with lipids for residues known to interact with lipids in the E1-2Ca²⁺ state			
Res number	Res type	Number of interactions	Longest interaction time (ns)
57	Phe	15	39.5
60	Leu	27	74.75
63	Arg	9	105.7
73	Phe	9	9.45
77	Trp	36	111.05
78	Phe	32	106
92	Phe	13	32.7
99	Ile	0	0
103	Ile	6	18.25
110	Arg	2	9.05
259	Gln	22	135.1
262	Lys	36	119.15
274	Ile	20	55.8
276	Ile	20	82.6
288	Trp	15	217.05
289	Ile	15	63.3
780	Ala	32	68.2
781	Leu	23	46.65
831	Gly	30	56.65
858	Tyr	17	186.05

Simulation SERCA1a-SLN bis (suite du tableau). Les résidus en gras sont les résidus formant une interaction directe avec les lipides dans la structure obtenue par diffraction aux rayons de SERCA1a à l'état E1-2Ca²⁺ (Norimatsu et al., 2017). Les résidus en rouges sont les résidus ne formant pas d'interactions avec un lipide dans nos simulations.

Interactions with lipids for residues known to interact with lipids in the E1-2Ca ²⁺ state			
Res number	Res type	Number of interactions	Longest interaction time (ns)
867	Tyr	33	51.5
924	Arg	37	131.85
928	Trp	33	45.15
931	Ile	13	190.6
932	Trp	4	215.2
950	Val	8	60.05
952	Pro	5	4.1
964	Leu	15	216.95
968	Leu	23	33.3
972	Lys	16	133
989	Arg	3	200.75
990	Asn	22	216.65
991	Tyr	32	73

Annexe 4 : Interactions avec les lipides adjacents pour les résidus interagissant avec la membrane à l'état E2

Simulation SERCA1a Les résidus en gras sont les résidus formant une interaction directe avec les lipides dans la structure obtenue par diffraction aux rayons de SERCA1a à l'état E2 (Norimatsu et al., 2017). Les résidus en rouges sont les résidus ne formant pas d'interactions avec un lipide dans nos simulations.

Interactions with lipids for residues known to interact with lipids in the E2 state			
Res number	Res type	Number of interactions	Longest interaction time (ns)
49	Leu	24	96,65
50	Trp	27	217
63	Arg	29	65,2
77	Trp	35	147,5
78	Phe	36	172,65
84	Thr	9	46,7
85	Ile	21	135,85
101	Asn	0	0
107	Trp	18	70,35
108	Gln	0	0
110	Arg	19	139,55
259	Gln	13	198,05
262	Lys	47	79,85
277	Gly	13	115,25
279	Phe	1	10,4
280	Asn	25	42,5
283	Val	0	0
324	Arg	7	214,65
831	Gly	27	104,75
832	Trp	3	200,45

Simulation SERCA1a (suite du tableau). Les résidus en gras sont les résidus formant une interaction directe avec les lipides dans la structure obtenue par diffraction aux rayons de SERCA1a à l'état E2 (Norimatsu et al., 2017). Les résidus en rouges sont les résidus ne formant pas d'interactions avec un lipide dans nos simulations.

Interactions with lipids for residues known to interact with lipids in the E2 state			
Res number	Res type	Number of interactions	Longest interaction time (ns)
854	Trp	1	120,3
858	Tyr	11	111,35
867	Tyr	1	3,9
924	Arg	37	42,8
928	Trp	28	108,4
931	Ile	26	125,95
949	Tyr	20	147,65
952	Pro	21	106,4
964	Leu	20	176,95
972	Lys	36	91,65
989	Arg	7	179,8
990	Asn	32	102,15
991	Tyr	42	52,5

Simulation SERCA1a bis. Les résidus en gras sont les résidus formant une interaction directe avec les lipides dans la structure obtenue par diffraction aux rayons de SERCA1a à l'état E2 (Norimatsu et al., 2017). Les résidus en rouges sont les résidus ne formant pas d'interactions avec un lipide dans nos simulations.

Interactions with lipids for residues known to interact with lipids in the E2 state			
Res number	Res type	Number of interactions	Longest interaction time (ns)
49	Leu	8	165.7
50	Trp	26	87.45
63	Arg	16	122.25
77	Trp	31	114,45
78	Phe	31	121,5
84	Thr	14	29,85
85	Ile	27	27.75
101	Asn	0	0
107	Trp	31	93.5
108	Gln	0	0
110	Arg	11	5.75
259	Gln	29	82.05
262	Lys	54	48.5
277	Gly	19	63.05
279	Phe	7	18.9
280	Asn	21	128,75
283	Val	0	0
324	Arg	9	216,2
831	Gly	20	101,85
832	Trp	11	213,15

Simulation SERCA1a bis (suite du tableau). Les résidus en gras sont les résidus formant une interaction directe avec les lipides dans la structure obtenue par diffraction aux rayons de SERCA1a à l'état E2 (Norimatsu et al., 2017). Les résidus en rouges sont les résidus ne formant pas d'interactions avec un lipide dans nos simulations.

Interactions with lipids for residues known to interact with lipids in the E2 state			
Res number	Res type	Number of interactions	Longest interaction time (ns)
854	Trp	16	90.45
858	Tyr	7	40.3
867	Tyr	8	32.2
924	Arg	49	109
928	Trp	28	62.2
931	Ile	23	97.45
949	Tyr	32	85.05
952	Pro	29	48.45
964	Leu	26	119.5
972	Lys	24	197.2
989	Arg	13	70.45
990	Asn	35	80.4
991	Tyr	52	104.75

Simulation SERCA1a-SLN. Les résidus en gras sont les résidus formant une interaction directe avec les lipides dans la structure obtenue par diffraction aux rayons de SERCA1a à l'état E2 (Norimatsu et al., 2017). Les résidus en rouges sont les résidus ne formant pas d'interactions avec un lipide dans nos simulations.

Interactions with lipids for residues known to interact with lipids in the E2 state			
Res number	Res type	Number of interactions	Longest interaction time (ns)
49	Leu	11	130.75
50	Trp	25	117.55
63	Arg	31	146
77	Trp	21	171.35
78	Phe	25	65.9
84	Thr	13	80.3
85	Ile	21	56
101	Asn	0	0
107	Trp	6	54.05
108	Gln	0	0
110	Arg	0	0
259	Gln	28	105.75
262	Lys	20	217.05
277	Gly	13	158.05
279	Phe	2	4.45
280	Asn	17	39.1
283	Val	0	0
324	Arg	0	0
831	Gly	27	53.55
832	Trp	14	61

Simulation SERCA1a-SLN (suite du tableau). Les résidus en gras sont les résidus formant une interaction directe avec les lipides dans la structure obtenue par diffraction aux rayons de SERCA1a à l'état E2 (Norimatsu et al., 2017). Les résidus en rouges sont les résidus ne formant pas d'interactions avec un lipide dans nos simulations.

Interactions with lipids for residues known to interact with lipids in the E2 state			
Res number	Res type	Number of interactions	Longest interaction time (ns)
854	Trp	0	0
858	Tyr	15	104.55
867	Tyr	33	51.5
924	Arg	37	131.85
928	Trp	33	45.15
931	Ile	13	190.6
949	Tyr	25	110.2
952	Pro	5	4.1
964	Leu	15	216.95
972	Lys	16	133
989	Arg	3	200.75
990	Asn	22	216.65
991	Tyr	32	73

Simulation SERCA1a-SLN bis. Les résidus en gras sont les résidus formant une interaction directe avec les lipides dans la structure obtenue par diffraction aux rayons de SERCA1a à l'état E2 (Norimatsu et al., 2017). Les résidus en rouges sont les résidus ne formant pas d'interactions avec un lipide dans nos simulations.

Interactions with lipids for residues known to interact with lipids in the E2 state			
Res number	Res type	Number of interactions	Longest interaction time (ns)
49	Leu	12	147.95
50	Trp	24	214.95
63	Arg	9	105.7
77	Trp	36	111.05
78	Phe	32	106
84	Thr	8	82.05
85	Ile	13	56.7
101	Asn	0	0
107	Trp	4	16.95
108	Gln	0	0
110	Arg	2	9.05
259	Gln	22	135.1
262	Lys	36	119.15
277	Gly	16	65.25
279	Phe	2	1.55
280	Asn	18	187.05
283	Val	0	0
324	Arg	0	0
831	Gly	30	56.65
832	Trp	21	118.15

Simulation SERCA1a-SLN bis (suite du tableau). Les résidus en gras sont les résidus formant une interaction directe avec les lipides dans la structure obtenue par diffraction aux rayons de SERCA1a à l'état E2 (Norimatsu et al., 2017). Les résidus en rouges sont les résidus ne formant pas d'interactions avec un lipide dans nos simulations.

Interactions with lipids for residues known to interact with lipids in the E2 state			
Res number	Res type	Number of interactions	Longest interaction time (ns)
854	Trp	7	60.1
858	Tyr	17	186.05
867	Tyr	10	12.3
924	Arg	24	117.8
928	Trp	29	90.65
931	Ile	15	62.95
949	Tyr	17	177.3
952	Pro	9	4.8
964	Leu	14	94.55
972	Lys	49	65.25
989	Arg	34	24.8
990	Asn	30	46.55
991	Tyr	30	217

Annexe 5 : Fluctuation des lipides de la bicouche

Les fluctuations des atomes de phosphore de la bicouche ont été comparées à celles des carbones α de SERCA1a et de la SLN. On observe que les fluctuations des lipides sont plus élevées que celles du domaine TM de SERCA1a. La numérotation des lipides de la membrane, générée par CHARMM-GUI (Jo et al., 2008), a été réalisée en partant du lipide le plus proche pour finir par le plus éloigné et en commençant par le feuillet supérieur. L'analyse des fluctuations de tous les lipides montre que plus les lipides sont loin de la protéine plus les fluctuations sont importantes, comme c'est le cas pour l'eau « libre ».

Ces résultats sont observés dans nos données issues de nos simulations de dynamique moléculaire en tout atome (fig. 1) et dans celles issues du calcul des modes (fig 2) :

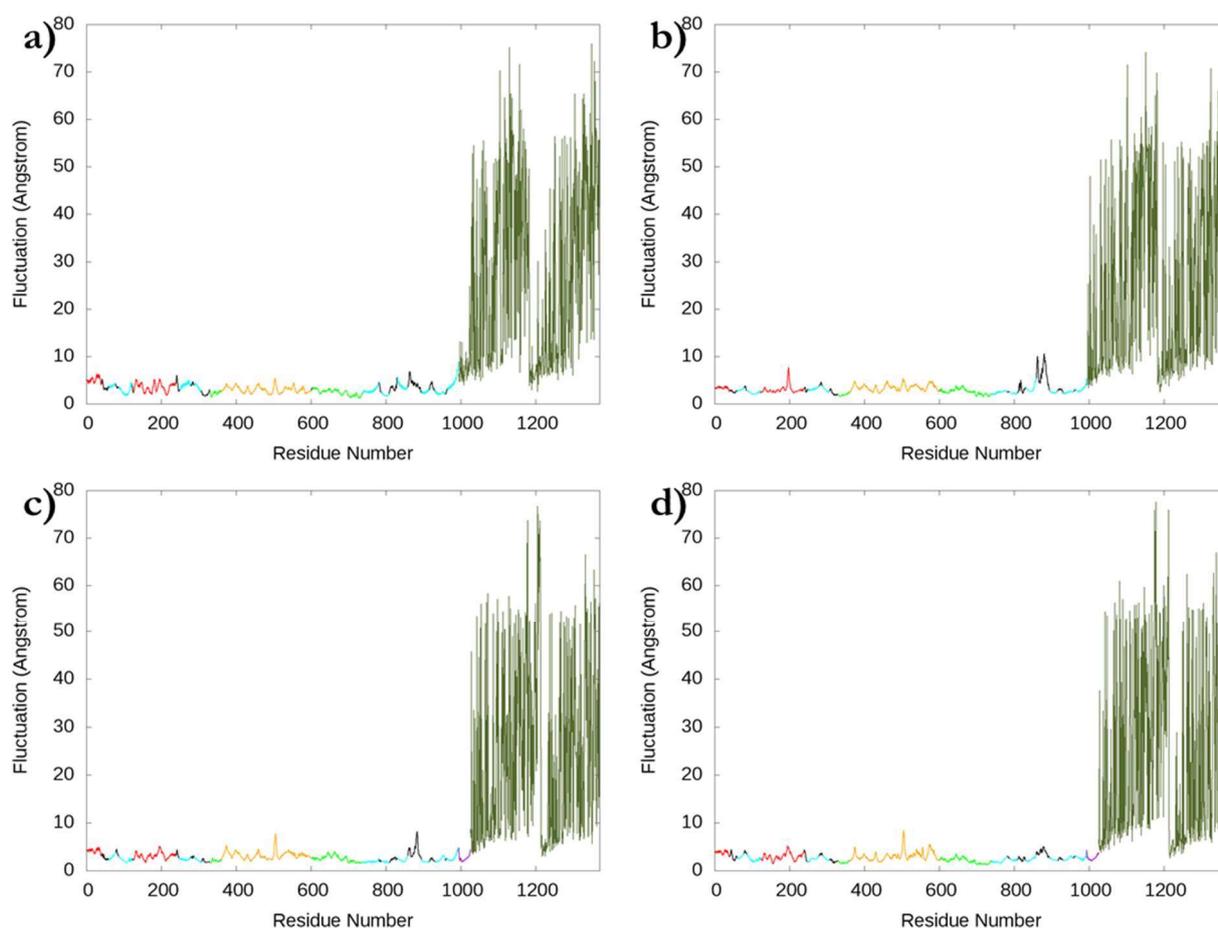


Figure 1 : Fluctuations des carbones α et des atomes de phosphores des lipides Données issues des simulations de dynamique moléculaire de SERCA1a (a), SERCA1a bis (b), SERCA1a-SLN (c) et SERCA1a-SLN bis (d). Les domaines cytoplasmiques A, N et P sont représentés en rouge, orange et vert, respectivement. Le domaine TM est représenté en cyan. Les autres régions de SERCA1a sont représentées en noir. La SLN est représenté en violet et commence au résidu 995 et finit au résidu 1025 (b). Les phosphores des lipides sont représentés en vert kaki.

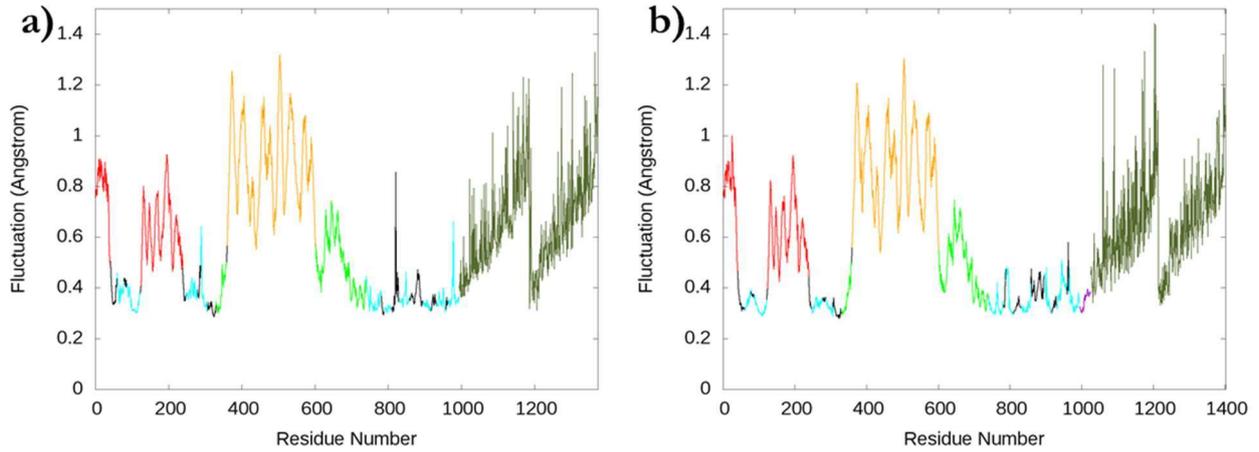


Figure 2 : Fluctuations des carbones α et des atomes de phosphores des lipides Données issues du calcul des modes de SERCA1a (a) et SERCA1a-SLN (b). Les domaines cytoplasmiques A, N et P sont représentés en rouge, orange et vert, respectivement. Le domaine TM est représenté en cyan. Les autres régions de SERCA1a sont représentées en noir. La SLN est représenté en violet et commence au résidu 995 et finit au résidu 1025 (b). Les phosphores des lipides sont représentés en vert kaki.

Références

- Abrami, L., Kunz, B., Iacovache, I., and Goot, F.G. van der (2008). Palmitoylation and ubiquitination regulate exit of the Wnt signaling protein LRP6 from the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 5384–5389.
- Abu-Abed, M., Mal, T.K., Kainosho, M., MacLennan, D.H., and Ikura, M. (2002). Characterization of the ATP-binding domain of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase: probing nucleotide binding by multidimensional NMR. *Biochemistry (Mosc.)* *41*, 1156–1164.
- Akin, B.L., Chen, Z., and Jones, L.R. (2010). Superinhibitory Phospholamban Mutants Compete with Ca²⁺ for Binding to SERCA2a by Stabilizing a Unique Nucleotide-dependent Conformational State. *J. Biol. Chem.* *285*, 28540–28552.
- Akin, B.L., Hurley, T.D., Chen, Z., and Jones, L.R. (2013). The structural basis for phospholamban inhibition of the calcium pump in sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *288*, 30181–30191.
- Albers, R.W. (1967). Biochemical aspects of active transport. *Annu. Rev. Biochem.* *36*, 727–756.
- Andersen, J.P. (1995a). Dissection of the functional domains of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase by site-directed mutagenesis. *Biosci. Rep.* *15*, 243–261.
- Andersen, J.P. (1995b). Functional consequences of alterations to amino acids at the M5S5 boundary of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. Mutation Tyr763-->Gly uncouples ATP hydrolysis from Ca²⁺ transport. *J. Biol. Chem.* *270*, 908–914.
- Andersen, J.P., Vilsen, B., and MacLennan, D.H. (1992). Functional consequences of alterations to Gly310, Gly770, and Gly801 located in the transmembrane domain of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *267*, 2767–2774.
- Anderson, D.M., Anderson, K.M., Chang, C.-L., Makarewich, C.A., Nelson, B.R., McAnally, J.R., Kasaragod, P., Shelton, J.M., Liou, J., Bassel-Duby, R., et al. (2015). A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance. *Cell* *160*, 595–606.
- Andersson, J., Hauser, K., Karjalainen, E.-L., and Barth, A. (2008). Protonation and hydrogen bonding of Ca²⁺ site residues in the E2P phosphoenzyme intermediate of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase studied by a combination of infrared spectroscopy and electrostatic calculations. *Biophys. J.* *94*, 600–611.
- Anthonisen, A.N., Clausen, J.D., and Andersen, J.P. (2006). Mutational analysis of the conserved TGES loop of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* *281*, 31572–31582.
- Aravind, L., Galperin, M.Y., and Koonin, E.V. (1998). The catalytic domain of the P-type ATPase has the haloacid dehalogenase fold. *Trends Biochem. Sci.* *23*, 127–129.
- Asahi, M., McKenna, E., Kurzydowski, K., Tada, M., and MacLennan, D.H. (2000). Physical interactions between phospholamban and sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases are dissociated by elevated Ca²⁺, but not by phospholamban phosphorylation, vanadate, or thapsigargin, and are enhanced by ATP. *J. Biol. Chem.* *275*, 15034–15038.

- Asahi, M., Kurzydowski, K., Tada, M., and MacLennan, D.H. (2002). Sarcolipin inhibits polymerization of phospholamban to induce superinhibition of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases (SERCA). *J. Biol. Chem.* *277*, 26725–26728.
- Asahi, M., Sugita, Y., Kurzydowski, K., De Leon, S., Tada, M., Toyoshima, C., and MacLennan, D.H. (2003). Sarcolipin regulates sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) by binding to transmembrane helices alone or in association with phospholamban. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 5040–5045.
- Ash, W.L., Zlomislic, M.R., Oloo, E.O., and Tieleman, D.P. (2004). Computer simulations of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* *1666*, 158–189.
- Autry, J.M., Thomas, D.D., and Espinoza-Fonseca, L.M. (2016). Sarcolipin Promotes Uncoupling of the SERCA Ca²⁺ Pump by Inducing a Structural Rearrangement in the Energy-Transduction Domain. *Biochemistry (Mosc.)* *55*, 6083–6086.
- Axelsen, K.B., and Palmgren, M.G. (1998). Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.* *46*, 84–101.
- Aydin, J., Shabalina, I.G., Place, N., Reiken, S., Zhang, S.-J., Bellinger, A.M., Nedergaard, J., Cannon, B., Marks, A.R., Bruton, J.D., et al. (2008). Nonshivering thermogenesis protects against defective calcium handling in muscle. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *22*, 3919–3924.
- Bahar, I., Atilgan, A.R., and Erman, B. (1997). Direct evaluation of thermal fluctuations in proteins using a single-parameter harmonic potential. *Fold. Des.* *2*, 173–181.
- Bal, N.C., Maurya, S.K., Sopariwala, D.H., Sahoo, S.K., Gupta, S.C., Shaikh, S.A., Pant, M., Rowland, L.A., Bombardier, E., Goonasekera, S.A., et al. (2012). Sarcolipin is a newly identified regulator of muscle-based thermogenesis in mammals. *Nat. Med.* *18*, 1575–1579.
- Bal, N.C., Maurya, S.K., Singh, S., Wehrens, X.H.T., and Periasamy, M. (2016). Increased Reliance on Muscle-based Thermogenesis upon Acute Minimization of Brown Adipose Tissue Function. *J. Biol. Chem.* *291*, 17247–17257.
- Barbot, T., Montigny, C., Decottignies, P., le Maire, M., Jaxel, C., Jamin, N., and Beswick, V. (2016). Functional and Structural Insights into Sarcolipin, a Regulator of the Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPases. pp. 153–186.
- Beckstein, O., Biggin, P.C., Bond, P., Bright, J.N., Domene, C., Grottesi, A., Holyoake, J., and Sansom, M.S.P. (2003). Ion channel gating: insights via molecular simulations. *FEBS Lett.* *555*, 85–90.
- Becucci, L., Cembran, A., Karim, C.B., Thomas, D.D., Guidelli, R., Gao, J., and Veglia, G. (2009). On the function of pentameric phospholamban: ion channel or storage form? *Biophys. J.* *96*, L60–62.
- Bellolell, L., Prieto, J., Serrano, L., and Coll, M. (1994). Magnesium binding to the bacterial chemotaxis protein CheY results in large conformational changes involving its functional surface. *J. Mol. Biol.* *238*, 489–495.
- Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., van Gunsteren, W.F., DiNola, A., and Haak, J.R. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* *81*, 3684–3690.

- Berendsen, H.J.C., van der Spoel, D., and van Drunen, R. (1995). GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput. Phys. Commun.* *91*, 43–56.
- Berman, M.C., McINTOSH, D.B., and Kench, J.E. (1974). Calcium Uptake and Lipid Composition of Sarcoplasmic Reticulum from Rapidly Glycolysing Muscle. *Biochem. Soc. Trans.* *2*, 1000–1003.
- Best, R.B., Zhu, X., Shim, J., Lopes, P.E.M., Mittal, J., Feig, M., and Mackerell, A.D. (2012). Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone φ , ψ and side-chain $\chi(1)$ and $\chi(2)$ dihedral angles. *J. Chem. Theory Comput.* *8*, 3257–3273.
- Bick, R.J., Van Winkle, W.B., and Taffet, G.E. (1998). Cardiac sarcoplasmic reticulum membrane lipid asymmetries. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *853*, 365–367.
- Blaskovic, S., Blanc, M., and van der Goot, F.G. (2013). What does S-palmitoylation do to membrane proteins? *FEBS J.* *280*, 2766–2774.
- Bobe, R., Bredoux, R., Corvazier, E., Lacabartz-Porret, C., Martin, V., Kovács, T., and Enouf, J. (2005). How many Ca(2)+ATPase isoforms are expressed in a cell type? A growing family of membrane proteins illustrated by studies in platelets. *Platelets* *16*, 133–150.
- Bond, P.J., and Khalid, S. (2010). Antimicrobial and cell-penetrating peptides: structure, assembly and mechanisms of membrane lysis via atomistic and coarse-grained molecular dynamics simulations. *Protein Pept. Lett.* *17*, 1313–1327.
- Bond, P.J., and Sansom, M.S.P. (2004). The simulation approach to bacterial outer membrane proteins. *Mol. Membr. Biol.* *21*, 151–161.
- Born, M., and Oppenheimer, R. (1927). Zur Quantentheorie der Molekeln. *Ann. Phys.* *389*, 457–484.
- Brody, I.A. (1969). Muscle contracture induced by exercise. A syndrome attributable to decreased relaxing factor. *N. Engl. J. Med.* *281*, 187–192.
- Brooks, B.R., Bruccoleri, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S., and Karplus, M. (1983). CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* *4*, 187–217.
- Brooks, B.R., Brooks, C.L., Mackerell, A.D., Nilsson, L., Petrella, R.J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., et al. (2009). CHARMM: The biomolecular simulation program. *J. Comput. Chem.* *30*, 1545–1614.
- Brotherus, J.R., Griffith, O.H., Brotherus, M.O., Jost, P.C., Silvius, J.R., and Hokin, L.E. (1981). Lipid-protein multiple binding equilibria in membranes. *Biochemistry (Mosc.)* *20*, 5261–5267.
- Bublitz, M., Musgaard, M., Poulsen, H., Thøgersen, L., Olesen, C., Schiøtt, B., Morth, J.P., Møller, J.V., and Nissen, P. (2013). Ion pathways in the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* *288*, 10759–10765.
- Buck, B., Zmoon, J., Kirby, T.L., DeSilva, T.M., Karim, C., Thomas, D., and Veglia, G. (2003). Overexpression, purification, and characterization of recombinant Ca-ATPase regulators for high-resolution solution and solid-state NMR studies. *Protein Expr. Purif.* *30*, 253–261.

- Buffy, J.J., Buck-Koehntop, B.A., Porcelli, F., Traaseth, N.J., Thomas, D.D., and Veglia, G. (2006a). Defining the intramembrane binding mechanism of sarcolipin to calcium ATPase using solution NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* *358*, 420–429.
- Buffy, J.J., Traaseth, N.J., Mascioni, A., Gor'kov, P.L., Chekmenev, E.Y., Brey, W.W., and Veglia, G. (2006b). Two-Dimensional Solid-State NMR Reveals Two Topologies of Sarcolipin in Oriented Lipid Bilayers. *Biochemistry (Mosc.)* *45*, 10939–10946.
- Catalucci, D., Latronico, M.V.G., Ceci, M., Rusconi, F., Young, H.S., Gallo, P., Santonastasi, M., Bellacosa, A., Brown, J.H., and Condorelli, G. (2009). Akt increases sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ cycling by direct phosphorylation of phospholamban at Thr17. *J. Biol. Chem.* *284*, 28180–28187.
- Champeil, P., Menguy, T., Soulié, S., Juul, B., de Gracia, A.G., Rusconi, F., Falson, P., Denoroy, L., Henao, F., le Maire, M., et al. (1998). Characterization of a protease-resistant domain of the cytosolic portion of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. Nucleotide- and metal-binding sites. *J. Biol. Chem.* *273*, 6619–6631.
- Charollais, J., and Van Der Goot, F.G. (2009). Palmitoylation of membrane proteins (Review). *Mol. Membr. Biol.* *26*, 55–66.
- Chen, Z., Akin, B.L., Stokes, D.L., and Jones, L.R. (2006). Cross-linking of C-terminal residues of phospholamban to the Ca²⁺ pump of cardiac sarcoplasmic reticulum to probe spatial and functional interactions within the transmembrane domain. *J. Biol. Chem.* *281*, 14163–14172.
- Cieplak, P., Cornell, W.D., Bayly, C., and Kollman, P.A. (1995). Application of the multimolecule and multiconformational RESP methodology to biopolymers: Charge derivation for DNA, RNA, and proteins. *J. Comput. Chem.* *16*, 1357–1377.
- Clarke, D.M., Maruyama, K., Loo, T.W., Leberer, E., Inesi, G., and MacLennan, D.H. (1989). Functional consequences of glutamate, aspartate, glutamine, and asparagine mutations in the stalk sector of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *264*, 11246–11251.
- Clausen, J.D., and Andersen, J.P. (2003). Roles of Leu249, Lys252, and Leu253 in membrane segment M3 of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in control of Ca²⁺ migration and long-range intramolecular communication. *Biochemistry (Mosc.)* *42*, 2585–2594.
- Clausen, J.D., and Andersen, J.P. (2004). Functional consequences of alterations to Thr247, Pro248, Glu340, Asp813, Arg819, and Arg822 at the interfaces between domain P, M3, and L6-7 of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. Roles in Ca²⁺ interaction and phosphoenzyme processing. *J. Biol. Chem.* *279*, 54426–54437.
- Clausen, J.D., McIntosh, D.B., Woolley, D.G., and Andersen, J.P. (2001). Importance of Thr-353 of the conserved phosphorylation loop of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in MgATP binding and catalytic activity. *J. Biol. Chem.* *276*, 35741–35750.
- Clausen, J.D., Vilsen, B., McIntosh, D.B., Einholm, A.P., and Andersen, J.P. (2004). Glutamate-183 in the conserved TGES motif of domain A of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase assists in catalysis of E2/E2P partial reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 2776–2781.
- Colyer, J. (1993). Control of the calcium pump of cardiac sarcoplasmic reticulum. A specific role for the pentameric structure of phospholamban? *Cardiovasc. Res.* *27*, 1766–1771.
- Connolly, M.L. (1983a). Analytical Molecular Surface Calculation. *J Appl Cryst* *16*, 548–558.

- Connolly, M.L. (1983b). Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids. *Science* *221*, 709–713.
- Cornea, R.L., Jones, L.R., Autry, J.M., and Thomas, D.D. (1997). Mutation and phosphorylation change the oligomeric structure of phospholamban in lipid bilayers. *Biochemistry (Mosc.)* *36*, 2960–2967.
- Cornea, R.L., Autry, J.M., Chen, Z., and Jones, L.R. (2000). Reexamination of the role of the leucine/isoleucine zipper residues of phospholamban in inhibition of the Ca²⁺ pump of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *275*, 41487–41494.
- Cornelius, F., and Møller, J.V. (1991). Electrogenic pump current of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase reconstituted at high lipid/protein ratio. *FEBS Lett.* *284*, 46–50.
- Costa, V., and Carloni, P. (2003). Calcium binding to the transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase: insights from molecular modeling. *Proteins* *50*, 104–113.
- Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.-H., Doria, A., et al. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* *360*, 1509–1517.
- Daiho, T., Yamasaki, K., Wang, G., Danko, S., Iizuka, H., and Suzuki, H. (2003). Deletions of any single residues in Glu40-Ser48 loop connecting a domain and the first transmembrane helix of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase result in almost complete inhibition of conformational transition and hydrolysis of phosphoenzyme intermediate. *J. Biol. Chem.* *278*, 39197–39204.
- Daiho, T., Yamasaki, K., Danko, S., and Suzuki, H. (2007). Critical role of Glu40-Ser48 loop linking actuator domain and first transmembrane helix of Ca²⁺-ATPase in Ca²⁺ deocclusion and release from ADP-insensitive phosphoenzyme. *J. Biol. Chem.* *282*, 34429–34447.
- Danko, S., Daiho, T., Yamasaki, K., Liu, X., and Suzuki, H. (2009). Formation of the stable structural analog of ADP-sensitive phosphoenzyme of Ca²⁺-ATPase with occluded Ca²⁺ by beryllium fluoride: structural changes during phosphorylation and isomerization. *J. Biol. Chem.* *284*, 22722–22735.
- Darden, T., York, D., and Pedersen, L. (1993). Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* *98*, 10089–10092.
- De Simone, A., Mote, K.R., and Veglia, G. (2014). Structural dynamics and conformational equilibria of SERCA regulatory proteins in membranes by solid-state NMR restrained simulations. *Biophys. J.* *106*, 2566–2576.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., and Michel, H. (1985). Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature* *318*, 618–624.
- Delint-Ramirez, I., Willoughby, D., Hammond, G.R.V., Hammond, G.V.R., Ayling, L.J., and Cooper, D.M.F. (2011). Palmitoylation targets AKAP79 protein to lipid rafts and promotes its regulation of calcium-sensitive adenylyl cyclase type 8. *J. Biol. Chem.* *286*, 32962–32975.
- Dickson, C.J., Madej, B.D., Skjevik, Å.A., Betz, R.M., Teigen, K., Gould, I.R., and Walker, R.C. (2014). Lipid14: The Amber Lipid Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* *10*, 865–879.

- Dolinsky, T.J., Nielsen, J.E., McCammon, J.A., and Baker, N.A. (2004). PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* *32*, W665-667.
- Domene, C., Bond, P.J., and Sansom, M.S. (2003). Membrane protein simulations: ion channels and bacterial outer membrane proteins. *Adv. Protein Chem.* *66*, 159–193.
- Douglas, J.L., Trieber, C.A., Afara, M., and Young, H.S. (2005). Rapid, high-yield expression and purification of Ca²⁺-ATPase regulatory proteins for high-resolution structural studies. *Protein Expr. Purif.* *40*, 118–125.
- Drachmann, N.D., Olesen, C., Møller, J.V., Guo, Z., Nissen, P., and Bublitz, M. (2014). Comparing crystal structures of Ca(2+) -ATPase in the presence of different lipids. *FEBS J.* *281*, 4249–4262.
- Dror, R.O., Jensen, M.Ø., Borhani, D.W., and Shaw, D.E. (2010). Exploring atomic resolution physiology on a femtosecond to millisecond timescale using molecular dynamics simulations. *J. Gen. Physiol.* *135*, 555–562.
- Duncan, J.A., and Gilman, A.G. (1998). A cytoplasmic acyl-protein thioesterase that removes palmitate from G protein alpha subunits and p21(RAS). *J. Biol. Chem.* *273*, 15830–15837.
- Dupradeau, F.-Y., Pigache, A., Zaffran, T., Savineau, C., Lelong, R., Grivel, N., Lelong, D., Rosanski, W., and Cieplak, P. (2010). The R.E.D. tools: advances in RESP and ESP charge derivation and force field library building. *Phys. Chem. Chem. Phys.* *PCCP* *12*, 7821–7839.
- Durand Philippe, Trinquier Georges, and Sanejouand Yves-Henri (2004). A new approach for determining low-frequency normal modes in macromolecules. *Biopolymers* *34*, 759–771.
- Durrant, J.D., and McCammon, J.A. (2011). Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biol.* *9*, 71.
- Espinoza-Fonseca, L.M., Autry, J.M., and Thomas, D.D. (2014). Microsecond molecular dynamics simulations of Mg²⁺- and K⁺-bound E1 intermediate states of the calcium pump. *PloS One* *9*, e95979.
- Espinoza-Fonseca, L.M., Autry, J.M., and Thomas, D.D. (2015). Sarcolipin and phospholamban inhibit the calcium pump by populating a similar metal ion-free intermediate state. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *463*, 37–41.
- Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M.L., Darden, T., Lee, H., and Pedersen, L.G. (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* *103*, 8577–8593.
- Ewald, P.P. (1921). Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale. *Ann. Phys.* *369*, 253–287.
- Falson, P., Menguy, T., Corre, F., Bouneau, L., de Gracia, A.G., Soulié, S., Centeno, F., Moller, J.V., Champeil, P., and le Maire, M. (1997). The cytoplasmic loop between putative transmembrane segments 6 and 7 in sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase binds Ca²⁺ and is functionally important. *J. Biol. Chem.* *272*, 17258–17262.
- Flach, C.R., Gericke, A., Keough, K.M., and Mendelsohn, R. (1999). Palmitoylation of lung surfactant protein SP-C alters surface thermodynamics, but not protein secondary structure or

orientation in 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine langmuir films. *Biochim. Biophys. Acta* *1416*, 11–20.

Fonseca, J.E., Kaya, S., and Rakowski, R.F. (2007). Temporal and steric analysis of ionic permeation and binding in SERCA via molecular dynamic simulations. *Nanotechnology* *18*, 424022.

Frisch, M., Trucks, G., Schlegel, H., Scuseria, G., Robb, M., Cheeseman, J., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G., et al. (2009). Gaussian 09, Revision A.02. Gaussian 09 Revis. B01 Gaussian Inc Wallingford CT.

Garnett, C., Sumbilla, C., Belda, F.F., Chen, L., and Inesi, G. (1996). Energy transduction and kinetic regulation by the peptide segment connecting phosphorylation and cation binding domains in transport ATPases. *Biochemistry (Mosc.)* *35*, 11019–11025.

Go, N., Noguti, T., and Nishikawa, T. (1983). Dynamics of a small globular protein in terms of low-frequency vibrational modes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *80*, 3696–3700.

Gonen, T., Cheng, Y., Sliz, P., Hiroaki, Y., Fujiyoshi, Y., Harrison, S.C., and Walz, T. (2005). Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals. *Nature* *438*, 633–638.

Gonzalez-Horta, A., Andreu, D., Morrow, M.R., and Perez-Gil, J. (2008). Effects of palmitoylation on dynamics and phospholipid-bilayer-perturbing properties of the N-terminal segment of pulmonary surfactant protein SP-C as shown by 2H-NMR. *Biophys. J.* *95*, 2308–2317.

Gorski, P.A., Glaves, J.P., Vangheluwe, P., and Young, H.S. (2013). Sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) inhibition by sarcolipin is encoded in its luminal tail. *J. Biol. Chem.* *288*, 8456–8467.

Gouin, S.G., Vanquelef, E., Fernandez, J.M.G., Mellet, C.O., Dupradeau, F.-Y., and Kovensky, J. (2007). Multi-mannosides based on a carbohydrate scaffold: synthesis, force field development, molecular dynamics studies, and binding affinities for lectin Con A. *J. Org. Chem.* *72*, 9032–9045.

Gould, G.W., McWhirter, J.M., East, J.M., and Lee, A.G. (1987). Effects of diet on the function of sarcoplasmic reticulum. *Biochem. J.* *245*, 751–755.

Gumbart, J., Wang, Y., Aksimentiev, A., Tajkhorshid, E., and Schulten, K. (2005). Molecular dynamics simulations of proteins in lipid bilayers. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *15*, 423–431.

Haman, F. (2006). Shivering in the cold: from mechanisms of fuel selection to survival. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *100*, 1702–1708.

Hayward, S. (2001). Normal Mode Analysis of Biological Molecules. In *Computational Biochemistry and Biophysics*, O.M. Becker, A.D. MacKerell Jr, B. Roux, and M. Watanabe, eds. (New York: Marcel Dekker), pp. 153–168.

Heath, A.P., Kaviraki, L.E., and Clementi, C. (2007). From coarse-grain to all-atom: Toward multiscale analysis of protein landscapes. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* *68*, 646–661.

Hehre, W.J., Stewart, R.F., and Pople, J.A. (1969). Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. I. Use of Gaussian Expansions of Slater-Type Atomic Orbitals. *J. Chem. Phys.* *51*, 2657–2664.

- Hehre, W.J., Ditchfield, R., Stewart, R.F., and Pople, J.A. (1970). Self-Consistent Molecular Orbital Methods. IV. Use of Gaussian Expansions of Slater-Type Orbitals. Extension to Second-Row Molecules. *J. Chem. Phys.* *52*, 2769–2773.
- Hehre, W.J., Ditchfield, R., and Pople, J.A. (1972). Self—Consistent Molecular Orbital Methods. XII. Further Extensions of Gaussian—Type Basis Sets for Use in Molecular Orbital Studies of Organic Molecules. *J. Chem. Phys.* *56*, 2257–2261.
- Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H.J.C., and Fraaije, J.G.E.M. (1997). LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* *18*, 1463–1472.
- Hestenes, M.R., and Stiefel, E. (1952). Methods of conjugate gradients for solving linear systems (National Bureau of Standards).
- Hinsen, K. (1998). Analysis of domain motions by approximate normal mode calculations. *Proteins* *33*, 417–429.
- Hinsen, K., Thomas, A., and Field, M.J. (1999). Analysis of domain motions in large proteins. *Proteins* *34*, 369–382.
- Hinsen, K., Petrescu, A.-J., Dellerue, S., Bellissent-Funel, M.-C., and Kneller, G.R. (2000). Harmonicity in slow protein dynamics. *Chem. Phys.* *261*, 25–37.
- Hockney, R.W., and Eastwood, J.W. (1988). *Computer simulation using particles* (Bristol [England] Adam Hilger).
- Hoffmann, A., and Grudinin, S. (2017). NOLB: Nonlinear Rigid Block Normal-Mode Analysis Method. *J. Chem. Theory Comput.* *13*, 2123–2134.
- Hoover, null (1985). Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev. Gen. Phys.* *31*, 1695–1697.
- Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., and Simmerling, C. (2006). Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins* *65*, 712–725.
- Huang, Y., Li, H., and Bu, Y. (2009). Molecular dynamics simulation exploration of cooperative migration mechanism of calcium ions in sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Comput. Chem.* *30*, 2136–2145.
- Hughes, E., and Middleton, D.A. (2003). Solid-state NMR reveals structural changes in phospholamban accompanying the functional regulation of Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* *278*, 20835–20842.
- Hughes, E., Clayton, J.C., Kitmitto, A., Esmann, M., and Middleton, D.A. (2007). Solid-state NMR and functional measurements indicate that the conserved tyrosine residues of sarcolipin are involved directly in the inhibition of SERCA1. *J. Biol. Chem.* *282*, 26603–26613.
- Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* *14*, 33–38, 27–28.

- Inesi, G., Ma, H., Lewis, D., and Xu, C. (2004). Ca²⁺ occlusion and gating function of Glu309 in the ADP-fluoroaluminate analog of the Ca²⁺-ATPase phosphoenzyme intermediate. *J. Biol. Chem.* *279*, 31629–31637.
- Jämbeck, J.P.M., and Lyubartsev, A.P. (2012a). An Extension and Further Validation of an All-Atomistic Force Field for Biological Membranes. *J. Chem. Theory Comput.* *8*, 2938–2948.
- Jämbeck, J.P.M., and Lyubartsev, A.P. (2012b). Derivation and Systematic Validation of a Refined All-Atom Force Field for Phosphatidylcholine Lipids. *J. Phys. Chem. B* *116*, 3164–3179.
- Jensen, A.-M.L., Sørensen, T.L.-M., Olesen, C., Møller, J.V., and Nissen, P. (2006). Modulatory and catalytic modes of ATP binding by the calcium pump. *EMBO J.* *25*, 2305–2314.
- Jo, S., Kim, T., Iyer, V.G., and Im, W. (2008). CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.* *29*, 1859–1865.
- Jones, L.R., Simmerman, H.K., Wilson, W.W., Gurd, F.R., and Wegener, A.D. (1985). Purification and characterization of phospholamban from canine cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *260*, 7721–7730.
- Jorgensen, P.L., Hakansson, K.O., and Karlish, S.J.D. (2003). Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu. Rev. Physiol.* *65*, 817–849.
- Jorgensen, W.L., Chandrasekhar, J., Madura, J.D., Impey, R.W., and Klein, M.L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* *79*, 926–935.
- Joseph, M., and Nagaraj, R. (1995). Interaction of peptides corresponding to fatty acylation sites in proteins with model membranes. *J. Biol. Chem.* *270*, 16749–16755.
- Juul, B., Turc, H., Durand, M.L., Gomez de Gracia, A., Denoroy, L., Møller, J.V., Champeil, P., and le Maire, M. (1995). Do transmembrane segments in proteolyzed sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase retain their functional Ca²⁺ binding properties after removal of cytoplasmic fragments by proteinase K? *J. Biol. Chem.* *270*, 20123–20134.
- Kandt, C., Ash, W.L., and Peter Tieleman, D. (2007). Setting up and running molecular dynamics simulations of membrane proteins. *Methods* *41*, 475–488.
- Karplus, M., and McCammon, J.A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat. Struct. Biol.* *9*, 646–652.
- Kazak, L., Chouchani, E.T., Jedrychowski, M.P., Erickson, B.K., Shinoda, K., Cohen, P., Vetrivelan, R., Lu, G.Z., Laznik-Bogoslavski, D., Hasenfuss, S.C., et al. (2015). A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and thermogenesis in beige fat. *Cell* *163*, 643–655.
- Ketchum, R.R., Hu, W., and Cross, T.A. (1993). High-resolution conformation of gramicidin A in a lipid bilayer by solid-state NMR. *Science* *261*, 1457–1460.
- Killian, J.A., and von Heijne, G. (2000). How proteins adapt to a membrane-water interface. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 429–434.
- Kim Wook, Fiori Jennifer L., Shin Yu-Kyong, Okun Eitan, Kim Jung Seok, Rapp Peter R., and Egan Josephine M. (2014). Pancreatic polypeptide inhibits somatostatin secretion. *FEBS Lett.* *588*, 3233–3239.

- Kimura, Y., Kurzydowski, K., Tada, M., and MacLennan, D.H. (1997). Phospholamban inhibitory function is activated by depolymerization. *J. Biol. Chem.* *272*, 15061–15064.
- Kirchberber, M.A., Tada, M., and Katz, A.M. (1975). Phospholamban: a regulatory protein of the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Recent Adv. Stud. Cardiac Struct. Metab.* *5*, 103–115.
- Klauda, J.B., Venable, R.M., Freites, J.A., O'Connor, J.W., Tobias, D.J., Mondragon-Ramirez, C., Vorobyov, I., MacKerell, A.D., and Pastor, R.W. (2010). Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types. *J. Phys. Chem. B* *114*, 7830–7843.
- Kucerka, N., Tristram-Nagle, S., and Nagle, J.F. (2005). Structure of fully hydrated fluid phase lipid bilayers with monounsaturated chains. *J. Membr. Biol.* *208*, 193–202.
- Kucerka, N., Gallová, J., Uhríková, D., Balgavý, P., Bulacu, M., Marrink, S.-J., and Katsaras, J. (2009). Areas of monounsaturated diacylphosphatidylcholines. *Biophys. J.* *97*, 1926–1932.
- Kučerka, N., Nieh, M.-P., and Katsaras, J. (2011). Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. *Biochim. Biophys. Acta* *1808*, 2761–2771.
- Kulahin, N., Grunnet, L.G., Lundh, M., Christensen, D.P., Jorgensen, R., Heding, A., Billestrup, N., Berezin, V., Bock, E., and Mandrup-Poulsen, T. (2011). Direct demonstration of NCAM cis-dimerization and inhibitory effect of palmitoylation using the BRET2 technique. *FEBS Lett.* *585*, 58–64.
- Lakkaraju, A.K., Abrami, L., Lemmin, T., Blaskovic, S., Kunz, B., Kihara, A., Dal Peraro, M., and van der Goot, F.G. (2012). Palmitoylated calnexin is a key component of the ribosome-translocon complex. *EMBO J.* *31*, 1823–1835.
- Lanfranchi, G., Muraro, T., Caldara, F., Pacchioni, B., Pallavicini, A., Pandolfo, D., Toppo, S., Trevisan, S., Scarso, S., and Valle, G. (1996). Identification of 4370 expressed sequence tags from a 3'-end-specific cDNA library of human skeletal muscle by DNA sequencing and filter hybridization. *Genome Res.* *6*, 35–42.
- Laursen, M., Bublitz, M., Moncoq, K., Olesen, C., Møller, J.V., Young, H.S., Nissen, P., and Morth, J.P. (2009). Cyclopiazonic acid is complexed to a divalent metal ion when bound to the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* *284*, 13513–13518.
- Lee, A.G. (2005). How lipids and proteins interact in a membrane: a molecular approach. *Mol. Biosyst.* *1*, 203–212.
- Lee, A.G. (2011). Lipid-protein interactions. *Biochem. Soc. Trans.* *39*, 761–766.
- Lenoir, G., Picard, M., Gauron, C., Montigny, C., Le Maréchal, P., Falson, P., Le Maire, M., Møller, J.V., and Champeil, P. (2004). Functional properties of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase after proteolytic cleavage at Leu119-Lys120, close to the A-domain. *J. Biol. Chem.* *279*, 9156–9166.
- Levental, I., Lingwood, D., Grzybek, M., Coskun, U., and Simons, K. (2010). Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 22050–22054.
- Levitt, M., Sander, C., and Stern, P.S. (1985). Protein normal-mode dynamics: trypsin inhibitor, crambin, ribonuclease and lysozyme. *J. Mol. Biol.* *181*, 423–447.

- Levy, D., Seigneuret, M., Bluzat, A., and Rigaud, J.L. (1990). Evidence for proton countertransport by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase during calcium transport in reconstituted proteoliposomes with low ionic permeability. *J. Biol. Chem.* *265*, 19524–19534.
- Li, G., and Cui, Q. (2002). A coarse-grained normal mode approach for macromolecules: an efficient implementation and application to Ca²⁺-ATPase. *Biophys. J.* *83*, 2457–2474.
- Li, M., Cornea, R.L., Autry, J.M., Jones, L.R., and Thomas, D.D. (1998). Phosphorylation-induced structural change in phospholamban and its mutants, detected by intrinsic fluorescence. *Biochemistry (Mosc.)* *37*, 7869–7877.
- Liao, C., Zhao, X., Liu, J., Schneebeli, S.T., Shelley, J.C., and Li, J. (2017). Capturing the multiscale dynamics of membrane protein complexes with all-atom, mixed-resolution, and coarse-grained models. *Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP* *19*, 9181–9188.
- Lomize, M.A., Pogozheva, I.D., Joo, H., Mosberg, H.I., and Lomize, A.L. (2012). OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Res.* *40*, D370-376.
- London, F. (1930). Zur Theorie und Systematik der Molekularkräfte. *Z. Für Phys.* *63*, 245–279.
- Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.T., Cartailler, J.P., and Lanyi, J.K. (1999). Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution. *J. Mol. Biol.* *291*, 899–911.
- MacLennan, D.H., and Kranias, E.G. (2003). Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 566–577.
- MacLennan, D.H., Asahi, M., and Tupling, A.R. (2003). The regulation of SERCA-type pumps by phospholamban and sarcolipin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *986*, 472–480.
- Magny, E.G., Pueyo, J.I., Pearl, F.M.G., Cespedes, M.A., Niven, J.E., Bishop, S.A., and Couso, J.P. (2013). Conserved regulation of cardiac calcium uptake by peptides encoded in small open reading frames. *Science* *341*, 1116–1120.
- Mall, S., Broadbridge, R., Harrison, S.L., Gore, M.G., Lee, A.G., and East, J.M. (2006). The presence of sarcolipin results in increased heat production by Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* *281*, 36597–36602.
- Marchand, A., Winther, A.-M.L., Holm, P.J., Olesen, C., Montigny, C., Arnou, B., Champeil, P., Clausen, J.D., Vilsen, B., Andersen, J.P., et al. (2008). Crystal structure of D351A and P312A mutant forms of the mammalian sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase reveals key events in phosphorylation and Ca²⁺ release. *J. Biol. Chem.* *283*, 14867–14882.
- Marques, O., and Sanejouand, Y.H. (1995). Hinge-bending motion in citrate synthase arising from normal mode calculations. *Proteins* *23*, 557–560.
- Marrink, S.J., de Vries, A.H., and Mark, A.E. (2004). Coarse Grained Model for Semiquantitative Lipid Simulations. *J. Phys. Chem. B* *108*, 750–760.
- Marrink, S.J., Risselada, H.J., Yefimov, S., Tieleman, D.P., and de Vries, A.H. (2007). The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations. *J. Phys. Chem. B* *111*, 7812–7824.

- Mascioni, A., Karim, C., Barany, G., Thomas, D.D., and Veglia, G. (2002). Structure and Orientation of Sarcolipin in Lipid Environments. *Biochemistry (Mosc.)* *41*, 475–482.
- McGibbon, R.T., Beauchamp, K.A., Harrigan, M.P., Klein, C., Swails, J.M., Hernández, C.X., Schwantes, C.R., Wang, L.-P., Lane, T.J., and Pande, V.S. (2015). MDTraj: A Modern Open Library for the Analysis of Molecular Dynamics Trajectories. *Biophys. J.* *109*, 1528–1532.
- McIntosh, D.B., Clausen, J.D., Woolley, D.G., MacLennan, D.H., Vilsen, B., and Andersen, J.P. (2004). Roles of conserved P domain residues and Mg²⁺ in ATP binding in the ground and Ca²⁺-activated states of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* *279*, 32515–32523.
- Meis, L.D. (2000). Energy interconversion by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase: ATP hydrolysis, Ca²⁺ transport, ATP synthesis and heat production. *An. Acad. Bras. Cienc.* *72*, 365–379.
- de Meis, L., and Inesi, G. (1988). Effects of organic solvents, methylamines, and urea on the affinity for Pi of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *263*, 157–161.
- Menguy, T., Corre, F., Bouneau, L., Deschamps, S., Møller, J.V., Champeil, P., le Maire, M., and Falson, P. (1998). The cytoplasmic loop located between transmembrane segments 6 and 7 controls activation by Ca²⁺ of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* *273*, 20134–20143.
- Meyer, C.W., Willershäuser, M., Jastroch, M., Rourke, B.C., Fromme, T., Oelkrug, R., Heldmaier, G., and Klingenspor, M. (2010). Adaptive thermogenesis and thermal conductance in wild-type and UCP1-KO mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *299*, R1396-1406.
- Møller, J.V., Juul, B., and le Maire, M. (1996). Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* *1286*, 1–51.
- Møller, J.V., Lenoir, G., Marchand, C., Montigny, C., le Maire, M., Toyoshima, C., Juul, B.S., and Champeil, P. (2002). Calcium transport by sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. Role of the A domain and its C-terminal link with the transmembrane region. *J. Biol. Chem.* *277*, 38647–38659.
- Møller, J.V., Olesen, C., Winther, A.-M.L., and Nissen, P. (2010). The sarcoplasmic Ca²⁺-ATPase: design of a perfect chemi-osmotic pump. *Q. Rev. Biophys.* *43*, 501–566.
- Monticelli, L., Kandasamy, S.K., Periole, X., Larson, R.G., Tieleman, D.P., and Marrink, S.-J. (2008). The MARTINI Coarse-Grained Force Field: Extension to Proteins. *J. Chem. Theory Comput.* *4*, 819–834.
- Montigny, C., Decottignies, P., Le Maréchal, P., Capy, P., Bublitz, M., Olesen, C., Møller, J.V., Nissen, P., and le Maire, M. (2014). S-palmitoylation and s-oleoylation of rabbit and pig sarcolipin. *J. Biol. Chem.* *289*, 33850–33861.
- Morozova, D., and Weiss, M. (2010). On the role of acylation of transmembrane proteins. *Biophys. J.* *98*, 800–804.
- Morth, J.P., Pedersen, B.P., Toustrup-Jensen, M.S., Sørensen, T.L.-M., Petersen, J., Andersen, J.P., Vilsen, B., and Nissen, P. (2007). Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* *450*, 1043–1049.
- Mouawad, L., and Perahia, D. (1993). Diagonalization in a mixed basis: A method to compute low-frequency normal modes for large macromolecules. *Biopolymers* *33*, 599–611.

- Moutin, M.J., Rapin, C., Miras, R., Vinçon, M., Dupont, Y., and McIntosh, D.B. (1998). Autonomous folding of the recombinant large cytoplasmic loop of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase probed by affinity labeling and trypsin digestion. *Eur. J. Biochem.* *251*, 682–690.
- Musgaard, M., Thøgersen, L., and Schiøtt, B. (2011). Protonation states of important acidic residues in the central Ca²⁺ ion binding sites of the Ca²⁺-ATPase: a molecular modeling study. *Biochemistry (Mosc.)* *50*, 11109–11120.
- Musgaard, M., Thøgersen, L., Schiøtt, B., and Tajkhorshid, E. (2012). Tracing cytoplasmic Ca(2+) ion and water access points in the Ca(2+)-ATPase. *Biophys. J.* *102*, 268–277.
- Nelson, B.R., Makarewich, C.A., Anderson, D.M., Winders, B.R., Troupes, C.D., Wu, F., Reese, A.L., McAnally, J.R., Chen, X., Kavalali, E.T., et al. (2016). A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle. *Science* *351*, 271–275.
- Neri, M., Anselmi, C., Cascella, M., Maritan, A., and Carloni, P. (2005). Coarse-grained model of proteins incorporating atomistic detail of the active site. *Phys. Rev. Lett.* *95*, 218102.
- Norimatsu, Y., Hasegawa, K., Shimizu, N., and Toyoshima, C. (2017). Protein-phospholipid interplay revealed with crystals of a calcium pump. *Nature* *545*, 193–198.
- Nosé, S. (1984). A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Mol. Phys.* *52*, 255–268.
- Obara, K., Miyashita, N., Xu, C., Toyoshima, I., Sugita, Y., Inesi, G., and Toyoshima, C. (2005). Structural role of countertransport revealed in Ca(2+) pump crystal structure in the absence of Ca(2+). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 14489–14496.
- Oda, A., Fukuyoshi, S., Nakagaki, R., and Takahashi, O. (2013). Determination of AMBER Force Field Parameters for Thioester by Quantum Chemical Calculations. *Chem. Lett.* *42*, 1206–1208.
- Odermatt, A., Taschner, P.E., Khanna, V.K., Busch, H.F., Karpati, G., Jablecki, C.K., Breuning, M.H., and MacLennan, D.H. (1996). Mutations in the gene-encoding SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase, are associated with Brody disease. *Nat. Genet.* *14*, 191–194.
- Odermatt, A., Taschner, P.E., Scherer, S.W., Beatty, B., Khanna, V.K., Cornblath, D.R., Chaudhry, V., Yee, W.C., Schrank, B., Karpati, G., et al. (1997). Characterization of the gene encoding human sarcolipin (SLN), a proteolipid associated with SERCA1: absence of structural mutations in five patients with Brody disease. *Genomics* *45*, 541–553.
- Odermatt, A., Becker, S., Khanna, V.K., Kurzydowski, K., Leisner, E., Pette, D., and MacLennan, D.H. (1998a). Sarcolipin regulates the activity of SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* *273*, 12360–12369.
- Odermatt, A., Becker, S., Khanna, V.K., Kurzydowski, K., Leisner, E., Pette, D., and MacLennan, D.H. (1998b). Sarcolipin regulates the activity of SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* *273*, 12360–12369.
- Odermatt, A., Barton, K., Khanna, V.K., Mathieu, J., Escolar, D., Kuntzer, T., Karpati, G., and MacLennan, D.H. (2000). The mutation of Pro789 to Leu reduces the activity of the fast-twitch skeletal muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA1) and is associated with Brody disease. *Hum. Genet.* *106*, 482–491.

- Ohnoki, S., and Martonosi, A. (1980). Purification and characterization of the proteolipid of rabbit sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* *626*, 170–178.
- Olausson, B.E.S., Grossfield, A., Pitman, M.C., Brown, M.F., Feller, S.E., and Vogel, A. (2012). Molecular dynamics simulations reveal specific interactions of post-translational palmitoyl modifications with rhodopsin in membranes. *J. Am. Chem. Soc.* *134*, 4324–4331.
- Olesen, C., Picard, M., Winther, A.-M.L., Gyruup, C., Morth, J.P., Oxvig, C., Møller, J.V., and Nissen, P. (2007). The structural basis of calcium transport by the calcium pump. *Nature* *450*, 1036–1042.
- Olsson, M.H.M., Søndergaard, C.R., Rostkowski, M., and Jensen, J.H. (2011). PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *J. Chem. Theory Comput.* *7*, 525–537.
- Orlowski, S., and Champeil, P. (1991a). Kinetics of calcium dissociation from its high-affinity transport sites on sarcoplasmic reticulum ATPase. *Biochemistry (Mosc.)* *30*, 352–361.
- Orlowski, S., and Champeil, P. (1991b). The two calcium ions initially bound to nonphosphorylated sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase can no longer be kinetically distinguished when they dissociate from phosphorylated ATPase toward the lumen. *Biochemistry (Mosc.)* *30*, 11331–11342.
- Oxenoid, K., and Chou, J.J. (2005). The structure of phospholamban pentamer reveals a channel-like architecture in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 10870–10875.
- Palmgren, M.G., and Nissen, P. (2011). P-type ATPases. *Annu. Rev. Biophys.* *40*, 243–266.
- Pant, M., Bal, N.C., and Periasamy, M. (2015). Cold adaptation overrides developmental regulation of sarcolipin expression in mice skeletal muscle: SOS for muscle-based thermogenesis? *J. Exp. Biol.* *218*, 2321–2325.
- Parrinello, M., and Rahman, A. (1981). Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* *52*, 7182–7190.
- Pauli, W. (1925). Über den Zusammenhang des Abschlusses der Elektronengruppen im Atom mit der Komplexstruktur der Spektren. *Z. Für Phys.* *31*, 765–783.
- Perahia, D., and Mouawad, L. (1995). Computation of low-frequency normal modes in macromolecules: Improvements to the method of diagonalization in a mixed basis and application to hemoglobin. *Comput. Chem.* *19*, 241–246.
- Periasamy, M., and Kalyanasundaram, A. (2007). SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve* *35*, 430–442.
- Periole, X., Cavalli, M., Marrink, S.-J., and Ceruso, M.A. (2009). Combining an Elastic Network With a Coarse-Grained Molecular Force Field: Structure, Dynamics, and Intermolecular Recognition. *J. Chem. Theory Comput.* *5*, 2531–2543.
- Perrot, N. (2015). Production dans *Escherichia coli* de vésicules enrichies en cavéoline-1(32-178) canine ou son fragment (76-178) (Paris Saclay).

- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* *25*, 1605–1612.
- Plasencia, I., Baumgart, F., Andreu, D., Marsh, D., and Pérez-Gil, J. (2008). Effect of acylation on the interaction of the N-Terminal segment of pulmonary surfactant protein SP-C with phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1778*, 1274–1282.
- Popescu, R., Mispelter, J., Gallay, J., and Mouawad, L. (2005). Molecular dynamics assignment of NMR correlation times to specific motions in a “basket-handle porphyrin” heme. *J. Phys. Chem. B* *109*, 2995–3007.
- Post, R.L., Hegyvary, C., and Kume, S. (1972). Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* *247*, 6530–6540.
- Poulsen, H., Khandelia, H., Morth, J.P., Bublitz, M., Mouritsen, O.G., Egebjerg, J., and Nissen, P. (2010). Neurological disease mutations compromise a C-terminal ion pathway in the Na(+)/K(+)-ATPase. *Nature* *467*, 99–102.
- Powl, A.M., East, J.M., and Lee, A.G. (2003). Lipid-protein interactions studied by introduction of a tryptophan residue: the mechanosensitive channel MscL. *Biochemistry (Mosc.)* *42*, 14306–14317.
- Rahman, A., and Stillinger, F.H. (1971). Molecular Dynamics Study of Liquid Water. *J. Chem. Phys.* *55*, 3336–3359.
- Ramadurai, S., Holt, A., Schäfer, L.V., Krasnikov, V.V., Rijkers, D.T.S., Marrink, S.J., Killian, J.A., and Poolman, B. (2010). Influence of hydrophobic mismatch and amino acid composition on the lateral diffusion of transmembrane peptides. *Biophys. J.* *99*, 1447–1454.
- Rao, S.T., and Rossmann, M.G. (1973). Comparison of super-secondary structures in proteins. *J. Mol. Biol.* *76*, 241–256.
- Reuter, N., Hinsen, K., and Lacapère, J.-J. (2003a). The nature of the low-frequency normal modes of the E1Ca form of the SERCA1 Ca²⁺-ATPase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *986*, 344–346.
- Reuter, N., Hinsen, K., and Lacapère, J.-J. (2003b). Transconformations of the SERCA1 Ca-ATPase: A Normal Mode Study. *Biophys. J.* *85*, 2186–2197.
- Rice, W.J., and MacLennan, D.H. (1996). Scanning mutagenesis reveals a similar pattern of mutation sensitivity in transmembrane sequences M4, M5, and M6, but not in M8, of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum (SERCA1a). *J. Biol. Chem.* *271*, 31412–31419.
- Ridder, I.S., and Dijkstra, B.W. (1999). Identification of the Mg²⁺-binding site in the P-type ATPase and phosphatase members of the HAD (haloacid dehalogenase) superfamily by structural similarity to the response regulator protein CheY. *Biochem. J.* *339 (Pt 2)*, 223–226.
- Roldan, N., Pérez-Gil, J., Morrow, M.R., and García-Álvarez, B. (2017). Divide & Conquer: Surfactant Protein SP-C and Cholesterol Modulate Phase Segregation in Lung Surfactant. *Biophys. J.* *113*, 847–859.

- Rowland, L.A., Bal, N.C., Kozak, L.P., and Periasamy, M. (2015). Uncoupling Protein 1 and Sarcolipin Are Required to Maintain Optimal Thermogenesis, and Loss of Both Systems Compromises Survival of Mice under Cold Stress. *J. Biol. Chem.* *290*, 12282–12289.
- Rusch, M., Zimmermann, T.J., Bürger, M., Dekker, F.J., Görmer, K., Triola, G., Brockmeyer, A., Janning, P., Böttcher, T., Sieber, S.A., et al. (2011). Identification of acyl protein thioesterases 1 and 2 as the cellular targets of the Ras-signaling modulators palmostatin B and M. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *50*, 9838–9842.
- Ryckaert, J.-P., Ciccotti, G., and Berendsen, H.J.C. (1977). Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* *23*, 327–341.
- Sahoo, S.K., Shaikh, S.A., Sopariwala, D.H., Bal, N.C., and Periasamy, M. (2013). Sarcolipin protein interaction with sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) is distinct from phospholamban protein, and only sarcolipin can promote uncoupling of the SERCA pump. *J. Biol. Chem.* *288*, 6881–6889.
- Sahoo, S.K., Shaikh, S.A., Sopariwala, D.H., Bal, N.C., Bruhn, D.S., Kopec, W., Khandelia, H., and Periasamy, M. (2015). The N Terminus of Sarcolipin Plays an Important Role in Uncoupling Sarco-endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) ATP Hydrolysis from Ca²⁺ Transport. *J. Biol. Chem.* *290*, 14057–14067.
- Sansom, M.S.P., Bond, P., Beckstein, O., Biggin, P.C., Faraldo-Gómez, J., Law, R.J., Patargias, G., and Tieleman, D.P. (2002). Water in ion channels and pores--simulation studies. *Novartis Found. Symp.* *245*, 66–78; discussion 79-83, 165–168.
- Sansom, M.S.P., Bond, P.J., Deol, S.S., Grottesi, A., Haider, S., and Sands, Z.A. (2005). Molecular simulations and lipid-protein interactions: potassium channels and other membrane proteins. *Biochem. Soc. Trans.* *33*, 916–920.
- Scarborough, G.A. (2002). Molecular mechanism of the P-type ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* *34*, 235–250.
- Schmidt, T.H., and Kandt, C. (2012). LAMBADA and InflateGRO2: efficient membrane alignment and insertion of membrane proteins for molecular dynamics simulations. *J. Chem. Inf. Model.* *52*, 2657–2669.
- Schulz, G.E. (1991). Domain motions in proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *1*, 883–888.
- Scofano, H.M., Vieyra, A., and de Meis, L. (1979). Substrate regulation of the sarcoplasmic reticulum ATPase. Transient kinetic studies. *J. Biol. Chem.* *254*, 10227–10231.
- Shaw, D.E., Maragakis, P., Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Dror, R.O., Eastwood, M.P., Bank, J.A., Jumper, J.M., Salmon, J.K., Shan, Y., et al. (2010). Atomic-level characterization of the structural dynamics of proteins. *Science* *330*, 341–346.
- She, P., Reid, T.M., Bronson, S.K., Vary, T.C., Hajnal, A., Lynch, C.J., and Hutson, S.M. (2007). Disruption of BCAT^m in mice leads to increased energy expenditure associated with the activation of a futile protein turnover cycle. *Cell Metab.* *6*, 181–194.

- Shi, L., Cembran, A., Gao, J., and Veglia, G. (2009). Tilt and Azimuthal Angles of a Transmembrane Peptide: A Comparison between Molecular Dynamics Calculations and Solid-State NMR Data of Sarcolipin in Lipid Membranes. *Biophys. J.* *96*, 3648–3662.
- Shi, Q., Izvekov, S., and Voth, G.A. (2006). Mixed Atomistic and Coarse-Grained Molecular Dynamics: Simulation of a Membrane-Bound Ion Channel. *J. Phys. Chem. B* *110*, 15045–15048.
- Shinoda, T., Ogawa, H., Cornelius, F., and Toyoshima, C. (2009). Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature* *459*, 446–450.
- Siegel, G., Obernosterer, G., Fiore, R., Oehmen, M., Bicker, S., Christensen, M., Khudayberdiev, S., Leuschner, P.F., Busch, C.J.L., Kane, C., et al. (2009). A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the depalmitoylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* *11*, 705–716.
- Smeijers, A.F., Pieterse, K., Markvoort, A.J., and Hilbers, P. a. J. (2006). Coarse-grained transmembrane proteins: hydrophobic matching, aggregation, and their effect on fusion. *J. Phys. Chem. B* *110*, 13614–13623.
- Smith, W.S., Broadbridge, R., East, J.M., and Lee, A.G. (2002). Sarcolipin uncouples hydrolysis of ATP from accumulation of Ca²⁺ by the Ca²⁺-ATPase of skeletal-muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochem. J.* *361*, 277–286.
- Søndergaard, C.R., Olsson, M.H.M., Rostkowski, M., and Jensen, J.H. (2011). Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values. *J. Chem. Theory Comput.* *7*, 2284–2295.
- Sonntag, Y., Musgaard, M., Olesen, C., Schiøtt, B., Møller, J.V., Nissen, P., and Thøgersen, L. (2011). Mutual adaptation of a membrane protein and its lipid bilayer during conformational changes. *Nat. Commun.* *2*, 304.
- Sorensen, T.L., and Andersen, J.P. (2000). Importance of stalk segment S5 for intramolecular communication in the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* *275*, 28954–28961.
- Sørensen, T.L.-M., Møller, J.V., and Nissen, P. (2004). Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science* *304*, 1672–1675.
- Soulié, S., Neumann, J.-M., Berthomieu, C., Møller, J.V., le Maire, M., and Forge, V. (1999). NMR Conformational Study of the Sixth Transmembrane Segment of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase †. *Biochemistry (Mosc.)* *38*, 5813–5821.
- Stahl, N., and Jencks, W.P. (1984). Adenosine 5'-triphosphate at the active site accelerates binding of calcium to calcium adenosinetriphosphatase. *Biochemistry (Mosc.)* *23*, 5389–5392.
- Starling, A.P., East, J.M., and Lee, A.G. (1993). Effects of phosphatidylcholine fatty acyl chain length on calcium binding and other functions of the (Ca(2+)-Mg2+)-ATPase. *Biochemistry (Mosc.)* *32*, 1593–1600.
- Stock, A.M., Martínez-Hackert, E., Rasmussen, B.F., West, A.H., Stock, J.B., Ringe, D., and Petsko, G.A. (1993). Structure of the Mg(2+)-bound form of CheY and mechanism of phosphoryl transfer in bacterial chemotaxis. *Biochemistry (Mosc.)* *32*, 13375–13380.

- Stokes, D.L., and Green, N.M. (2000). Modeling a dehalogenase fold into the 8-Å density map for Ca²⁺-ATPase defines a new domain structure. *Biophys. J.* *78*, 1765–1776.
- Stokes, D.L., Pomfret, A.J., Rice, W.J., Glaves, J.P., and Young, H.S. (2006). Interactions between Ca²⁺-ATPase and the pentameric form of phospholamban in two-dimensional co-crystals. *Biophys. J.* *90*, 4213–4223.
- Swope, W.C., Andersen, H.C., Berens, P.H., and Wilson, K.R. (1982). A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules: Application to small water clusters. *J. Chem. Phys.* *76*, 637–649.
- Tama Florence, Gadea Florent Xavier, Marques Osni, and Sanejouand Yves-Henri (2000). Building-block approach for determining low-frequency normal modes of macromolecules. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* *41*, 1–7.
- Tian, L., McClafferty, H., Knaus, H.-G., Ruth, P., and Shipston, M.J. (2012). Distinct acyl protein transferases and thioesterases control surface expression of calcium-activated potassium channels. *J. Biol. Chem.* *287*, 14718–14725.
- Tirion, null (1996). Large Amplitude Elastic Motions in Proteins from a Single-Parameter, Atomic Analysis. *Phys. Rev. Lett.* *77*, 1905–1908.
- Tomatis, V.M., Trenchi, A., Gomez, G.A., and Daniotti, J.L. (2010). Acyl-protein thioesterase 2 catalyzes the deacylation of peripheral membrane-associated GAP-43. *PloS One* *5*, e15045.
- Toyoshima, C., and Mizutani, T. (2004). Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature* *430*, 529–535.
- Toyoshima, C., and Nomura, H. (2002). Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* *418*, 605–611.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., and Ogawa, H. (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* *405*, 647–655.
- Toyoshima, C., Asahi, M., Sugita, Y., Khanna, R., Tsuda, T., and MacLennan, D.H. (2003). Modeling of the inhibitory interaction of phospholamban with the Ca²⁺ ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 467–472.
- Toyoshima, C., Nomura, H., and Tsuda, T. (2004). Luminal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues. *Nature* *432*, 361–368.
- Toyoshima, C., Norimatsu, Y., Iwasawa, S., Tsuda, T., and Ogawa, H. (2007). How processing of aspartylphosphate is coupled to luminal gating of the ion pathway in the calcium pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 19831–19836.
- Toyoshima, C., Iwasawa, S., Ogawa, H., Hirata, A., Tsueda, J., and Inesi, G. (2013). Crystal structures of the calcium pump and sarcolipin in the Mg²⁺-bound E1 state. *Nature* *495*, 260–264.
- Tupling, A.R., Asahi, M., and MacLennan, D.H. (2002). Sarcolipin overexpression in rat slow twitch muscle inhibits sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and impairs contractile function. *J. Biol. Chem.* *277*, 44740–44746.

- Ukropec, J., Anunciado, R.P., Ravussin, Y., Hulver, M.W., and Kozak, L.P. (2006). UCP1-independent thermogenesis in white adipose tissue of cold-acclimated Ucp1^{-/-} mice. *J. Biol. Chem.* *281*, 31894–31908.
- Vanquelf, E., Simon, S., Marquant, G., Garcia, E., Klimerak, G., Delepine, J.C., Cieplak, P., and Dupradeau, F.-Y. (2011). R.E.D. Server: a web service for deriving RESP and ESP charges and building force field libraries for new molecules and molecular fragments. *Nucleic Acids Res.* *39*, W511–W517.
- Venable, R.M., Ingólfsson, H.I., Lerner, M.G., Perrin, B.S., Camley, B.A., Marrink, S.J., Brown, F.L.H., and Pastor, R.W. (2017). Lipid and Peptide Diffusion in Bilayers: The Saffman-Delbrück Model and Periodic Boundary Conditions. *J. Phys. Chem. B* *121*, 3443–3457.
- Venturoli, M., Smit, B., and Sperotto, M.M. (2005). Simulation studies of protein-induced bilayer deformations, and lipid-induced protein tilting, on a mesoscopic model for lipid bilayers with embedded proteins. *Biophys. J.* *88*, 1778–1798.
- Verlet, L. (1967). Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Phys. Rev.* *159*, 98–103.
- Vilsen, B., and Andersen, J.P. (1992). CrATP-induced Ca²⁺ occlusion in mutants of the Ca(2⁺)-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *267*, 25739–25743.
- Vilsen, B., Andersen, J.P., Clarke, D.M., and MacLennan, D.H. (1989). Functional consequences of proline mutations in the cytoplasmic and transmembrane sectors of the Ca²⁺(+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *264*, 21024–21030.
- Vilsen, B., Andersen, J.P., and MacLennan, D.H. (1991). Functional consequences of alterations to hydrophobic amino acids located at the M4S4 boundary of the Ca(2⁺)-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *266*, 18839–18845.
- Wakabayashi, S., Ogurusu, T., and Shigekawa, M. (1986). Factors influencing calcium release from the ADP-sensitive phosphoenzyme intermediate of the sarcoplasmic reticulum ATPase. *J. Biol. Chem.* *261*, 9762–9769.
- Wang, G., Yamasaki, K., Daiho, T., and Suzuki, H. (2005). Critical hydrophobic interactions between phosphorylation and actuator domains of Ca²⁺-ATPase for hydrolysis of phosphorylated intermediate. *J. Biol. Chem.* *280*, 26508–26516.
- Wawrzynow, A., Theibert, J.L., Murphy, C., Jona, I., Martonosi, A., and Collins, J.H. (1992). Sarcolipin, the “proteolipid” of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, is a unique, amphipathic, 31-residue peptide. *Arch. Biochem. Biophys.* *298*, 620–623.
- Wegener, A.D., Simmerman, H.K., Lindemann, J.P., and Jones, L.R. (1989). Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation. *J. Biol. Chem.* *264*, 11468–11474.
- Winther, A.-M.L., Bublitz, M., Karlsten, J.L., Møller, J.V., Hansen, J.B., Nissen, P., and Buch-Pedersen, M.J. (2013). The sarcolipin-bound calcium pump stabilizes calcium sites exposed to the cytoplasm. *Nature* *495*, 265–269.
- Yamasaki, K., Daiho, T., Danko, S., and Suzuki, H. (2004). Multiple and distinct effects of mutations of Tyr122, Glu123, Arg324, and Arg334 involved in interactions between the top part

of second and fourth transmembrane helices in sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase: changes in cytoplasmic domain organization during isometric transition of phosphoenzyme intermediate and subsequent Ca²⁺ release. *J. Biol. Chem.* *279*, 2202–2210.

Yamasaki, K., Wang, G., Daiho, T., Danko, S., and Suzuki, H. (2008). Roles of Tyr122-hydrophobic cluster and K⁺ binding in Ca²⁺ -releasing process of ADP-insensitive phosphoenzyme of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ -ATPase. *J. Biol. Chem.* *283*, 29144–29155.

Yatime, L., Laursen, M., Morth, J.P., Esmann, M., Nissen, P., and Fedosova, N.U. (2011). Structural insights into the high affinity binding of cardiotonic steroids to the Na⁺,K⁺-ATPase. *J. Struct. Biol.* *174*, 296–306.

Yu, X., Carroll, S., Rigaud, J.L., and Inesi, G. (1993). H⁺ countertransport and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump in reconstituted proteoliposomes. *Biophys. J.* *64*, 1232–1242.

Zeidman, R., Jackson, C.S., and Magee, A.I. (2009). Protein acyl thioesterases (Review). *Mol. Membr. Biol.* *26*, 32–41.

Zhang, Z., Lewis, D., Sumbilla, C., Inesi, G., and Toyoshima, C. (2001). The role of the M6-M7 loop (L67) in stabilization of the phosphorylation and Ca(2+) binding domains of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase (SERCA). *J. Biol. Chem.* *276*, 15232–15239.

(2014). *Membrane Proteins Production for Structural Analysis* (New York: Springer-Verlag).

Titre : La Sarcopline, un régulateur de l'ATPase-Ca²⁺ SERCA1a : études *in silico*

Mots clés : SERCA1a, Sarcopline, simulation de dynamique moléculaire, analyse des modes normaux

Résumé : La Sarcopline (SLN) est une hélice transmembranaire de 31 résidus dont la fonction est de réguler l'ATPase-Ca²⁺ SERCA1a. Ce régulateur peut subir une modification post-traductionnelle chez certaines espèces. Par exemple, chez le lapin, il est palmitoylé ou oleoylé sur le résidu Cys9. Pour comprendre au niveau moléculaire l'effet de cette modification post-traductionnelle sur la SLN, nous avons réalisé des simulations de dynamique moléculaire de la SLN de lapin insérée dans une bicouche de 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (POPC), non acylée et palmitoylée. L'analyse de ces simulations démontre que la palmitoylation n'affecte pas la structure secondaire, l'orientation (tilt et azimut), ainsi que l'enfouissement de la SLN dans la membrane. De plus, l'analyse de simulations tout atome de la SLN humaine insérée dans une bicouche de POPC montre que la SLN humaine a la même structure secondaire et orientation que la SLN de lapin mais est plus enfouie dans la membrane que celle de lapin, du fait de sa séquence en acides aminés N-terminale plus hydrophobe.

L'ATPase-Ca²⁺ SERCA1a, une ATPase de type P, est localisée dans la membrane du reticulum sarcoplasmique des cellules du muscle squelettique. Elle est impliquée dans les processus de contraction/relaxation musculaire en transportant rapidement le Ca²⁺ cytosolique dans le lumen du reticulum sarcoplasmique grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. D'importants changements conformationnels de SERCA1a ont lieu durant son cycle catalytique comme le montrent les nombreuses structures cristallines de SERCA1a. En particulier, à

l'état E1, la cavité contenant les sites de fixation du Ca²⁺ est ouverte vers le cytoplasme, tandis qu'à l'état E2, cette cavité est ouverte vers le lumen. La transition de l'état E1 à E2 nécessite la phosphorylation du résidu Asp351. Des structures 3D du complexe SERCA1a-SLN ont été déterminées par diffraction aux rayons X avec SERCA1a dans un état E1-Mg²⁺. Pour comprendre le mécanisme détaillé de la régulation de SERCA1a par la SLN, des simulations de dynamique moléculaire et des analyses des modes normaux (NMA) ont été réalisées en utilisant la structure 3D du complexe SERCA1a-SLN inséré dans une bicouche de POPC. Les résultats principaux de ces analyses sont les suivants : **1)** la SLN régule les transitions E1.Mg²⁺ → E1.2Ca²⁺ et E1.Mg²⁺ → E2 ; **2)** l'interaction de la SLN influe sur la structure et la dynamique de SERCA1a et modifie la position de l'hélice transmembranaire TM1 de sorte à ce que la cavité contenant les sites de fixation du Ca²⁺ soit plus ouverte et que les sites soient plus accessibles ; **3)** l'interaction de la SLN avec TM6 affecte deux régions de SERCA1a indispensables à sa fonction : en modifiant la structure et la dynamique de TM6, la SLN perturbe la position et la fluctuation des résidus des sites de fixation du Ca²⁺, leur conférant une conformation inapte à fixer le Ca²⁺. De même, l'interaction avec TM6 induit la courbure de TM5, ce qui affecte de façon indirecte le site de phosphorylation (éloigné de plus de 35 Å de la SLN) et conduit à l'inhibition de la phosphorylation du résidu Asp351.

Nos résultats de cette étude *in silico* fournissent de nouveaux éléments concernant le mécanisme par lequel la SLN régule SERCA1a et qui pourrait être complétés par des travaux expérimentaux.



Title : Sarcolipin, a regulator of Ca^{2+} -ATPase SERCA1a : *in silico* studies

Keywords : SERCA1a, Sarcolipin, Molecular Dynamic simulation, Normal Modes Analysis

Abstract : Sarcolipin (SLN), a transmembrane helix of 31 residues, binds to and regulates the Ca^{2+} -ATPase SERCA1a. This regulator is post-translationally modified in some species. For example, in rabbit, it is palmitoylated or oleoylated on its Cys9 residue. To understand at a molecular level, the effect of this post-translational modification on SLN, all-atom molecular dynamics simulations of unacylated and palmitoylated rabbit SLN embedded in a POPC bilayer were performed. Analysis of the simulations demonstrates that palmitoylation does not affect the secondary structure, the orientation (tilt and azimuth) as well as the burying of SLN within the membrane. In addition, the analyses of all-atom simulations of human SLN embedded in a POPC bilayer show that human SLN has the same secondary structure and orientation as rabbit SLN but is more buried within the membrane than rabbit SLN as a result of its more hydrophobic N-terminal amino acids sequence.

The Ca^{2+} pump SERCA1a, a P-type ATPase, is localized in the sarcoplasmic reticulum membrane of striated muscle cells. It is involved in the contraction/relaxation process by fast pumping the cytoplasmic Ca^{2+} from the cytosol to the lumen of the sarcoplasmic reticulum using the energy of ATP hydrolysis. Large conformational changes of SERCA1a occur during its catalytic cycle as evidenced by the various crystal structures of SERCA1a. In particular, in the E1 state, the cavity that contains the Ca^{2+} binding sites is open toward the cytoplasm while in the E2 state, this cavity is open toward the lumen. The transition

from the E1 to the E2 state involves the phosphorylation of Asp351 residue. 3D structures of SERCA1a-SLN complex have been determined by X-Ray diffraction, with SERCA1a in a E1- Mg^{2+} state. To understand the detailed mechanisms of SERCA1a regulation by SLN, molecular dynamics (MD) simulations and normal mode analysis (NMA) were performed using the 3D structures of SERCA1a-SLN complex embedded in a POPC bilayer. Main results from these analyses are the followings: 1) SLN regulates the $\text{E1-Mg}^{2+} \rightarrow \text{E1-2Ca}^{2+}$ and $\text{E1-Mg}^{2+} \rightarrow \text{E2}$ state transitions; 2) interaction of SLN with SERCA1a impact the structure and dynamic of SERCA1a and modifies the position of the transmembrane helix TM1 such that the cavity that contains the Ca^{2+} binding sites is more widely opened and the Ca^{2+} binding sites more accessible; 3) SLN interaction with affects two regions essential to its function. By changing the structure and dynamic of TM6, SLN alters the position and fluctuations of residues involved in the Ca^{2+} binding sites, such that those sites are unable to bind Ca^{2+} . This interaction with TM6 also induces TM5 bending and thus, indirectly modifies the phosphorylation site conformation, leading to the inhibition of Asp351 phosphorylation.

Our results from these *in silico* studies provide new insights into the mechanism by which SLN regulates SERCA1a activity and could be completed by experimental work.

